

BIO-19

139



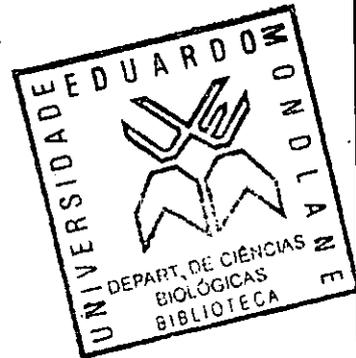
**UNIVERSIDADE
EDUARDO MONDLANE**



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

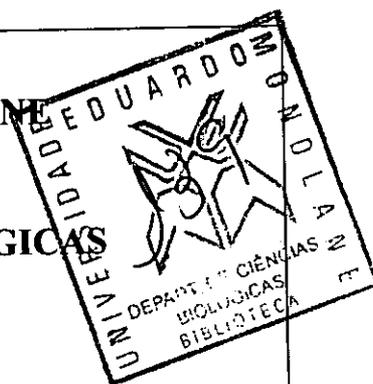
Trabalho de Licenciatura



**ESTUDO DOS FACTORES QUE INFLUENCIAM O
ACASALAMENTO EM MOSQUITOS DO GÊNERO
*ANOPHELES***

Autor
José Machado Almeida

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



TRABALHO DE LICENCIATURA

**Título: Estudo dos factores que influenciam o acasalamento em
mosquitos do género *Anopheles***

Autor: José Machado Almeida

Supervisores: Dr. Derek Charlwood
Dr. Nelson Cuamba

Co-supervisor: dra. Sandra Silva

Maputo, Outubro de 2005

DEDICATÓRIA

À minha falecida mãe

Adélia José

Ao meu querido filho, pai e adoráveis irmãos,

*José Almeida Jr. e Machado Almeida,
Odete e Ereneu*



AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus agradecimentos ao Dr. Derek Charlwood pela supervisão, orientação, apoio e transmissão de conhecimentos no decorrer deste trabalho.

Agradeço também ao Dr. Nelson Cuamba e dra. Sandra Silva, pela supervisão geral do trabalho.

À equipa do projecto MOZDAN em Furvela (Inhambane), em especial aos senhores Lourenço e Nelson.

À equipa do projecto SIMA em Massavasse (Gaza), em especial aos senhores Júlio e Graciete.

Aos meus colegas Vênancio, Olga e Maria Nélia que tanto me ajudaram no trabalho de campo.

Aos Técnicos da secção de Bioquímica do Hospital Central de Maputo, pelo apoio moral.

Aos meus familiares, amigos e todos aqueles que aqui não foram mencionados mas que de alguma forma contribuíram directa ou indirectamente para a realização deste trabalho.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, José Machado Almeida, declaro por minha honra serem verdadeiros todos os dados deste trabalho.

Assinatura

José Machado Almeida

GLOSSÁRIO

Antropofílico - que possui mais afinidade pelo homem.

Complexo – Grupo de mosquitos constituído por espécies biológicas com poucas diferenças morfológicas.

Crepúsculo – claridade frouxa que se nota antes do romper ou depois do pôr do sol.

Endofagia - hábito de se alimentar dentro das habitações.

Endofilia - hábito de repousar dentro das habitações.

Exofagia – hábito de se alimentar fora das habitações.

Exofilia - hábito de repousar fora das habitações.

Híbrido – ser que provém de duas espécies diferentes.

Híbrido viável - ser que provém de duas espécies diferentes e que está em condições para viver.

Local de formação de enxames – lugar em redor de casas (quintal) onde ocorre a formação de enxames.

Marca/marcador – distintivos visíveis ou não pelo homem usados pelos mosquitos do género *Anopheles* como ponto de referência para a formação de um enxame.

Mosquito refractário ao *Plasmodium* – Resistente à infecção por *Plasmodium* i.e. que não permite o desenvolvimento do *Plasmodium* no seu interior.

Ponto de formação de um enxame – sítio específico dentro de um local de formação de enxames, onde um determinado grupo de mosquitos se encontram enxameando a poucos metros do chão.

Selvagem – Fenótipo da maioria da população em condições naturais.

Simpátricos – Que coabitam numa mesma área/região.

Zoofílico – que possui mais afinidade por animais.

RESUMO

A importância do género *Anopheles* reside no facto de conter os vectores da malária, filaríase e algumas arboviroses. A crescente resistência dos anofelinos aos insecticidas requer a procura de formas alternativas de controlo. Métodos em estudo incluem o uso de machos estéreis e mosquitos transgénicos. Contudo, o uso destes métodos implica uma compreensão do comportamento dos anofelinos incluindo o de acasalamento. Neste trabalho foram estudados os factores que influenciam o acasalamento do *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* em Massavasse (Gaza) e Furvela (Inhambane).

Os enxames de mosquitos foram observados na hora do crepúsculo. Os mosquitos enxameando foram colectados usando uma rede entomológica e separados através de caracteres morfológicos em *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* usando a chave de Gillies & Coetze, (1987). Os locais onde ocorriam os enxames foram descritos esquematicamente, mostrando as distâncias entre estes e as casas, as plantas, e outros detalhes considerados relevantes. Mosquitos contidos numa gaiola foram observados durante 72h consecutivas com vista a perceber a variação do seu ritmo de actividade de voo. O tamanho das asas de mosquitos colectados em enxames, saindo ou repousando nas casas foi medido. As médias do comprimento das asas destes três grupos foram comparados através de ANOVA para testar a hipótese de que a formação dos enxames está relacionada com o tamanho dos machos.

An. gambiae s.l. e *An. funestus s.l.* são simpátricos tanto em Furvela como em Massavasse. Os enxames foram observados apenas ao pôr do sol onde foi também observado maior actividade de voo. Os enxames destas espécies ocorrem nos mesmos locais e nas mesmas horas, contudo não foi observado algum marcador associado com a formação dos mesmos. Em Massavasse a formação de enxames de *An. pharoensis* estava condicionada à existência de marcadores brancos. Não foram observadas diferenças significativas nas médias dos comprimentos das asas dos machos de *An. gambiae s.l.* colectados em enxames, saindo ou repousando dentro das habitações ($F = 0,2485$; $DF = 2$; $P = 0,7807$). O mesmo foi observado em relação ao *An. funestus* ($F = 0,3142$; $df=2$; $P = 0,7315$), rejeitando a hipótese de enxameamento em função do tamanho dos machos.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

A) TABELAS

- 1: Locais de formação de enxames, número de mosquitos espécies colectadas em cada ponto em Furvela.
- 2: Locais de formação de enxames, número e espécies colectadas em cada ponto em Massavasse.

B) GRÁFICOS

1. Relação entre a variação da intensidade luminosa e o número de mosquitos saindo.
2. Tempo de saída de machos e fêmeas de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* em relação à hora de pôr do sol.
3. Variação do ritmo de actividade dos mosquitos ao nascer e pôr do sol.
4. Comprimento médio das asas dos machos de *An. gambiae s.l.* de acordo com o tipo de colecta na localidade de Furvela.
5. Comprimento médio das asas dos machos de *An. funestus. s.l.* de acordo com o tipo de colecta na localidade de Furvela.

C) FIGURAS

1. Local de estudo
2. Casa com rede mosquiteira na porta (colecta de mosquitos saindo)
3. Medição do tamanho das asas

LISTA DOS ANEXOS

Técnicas:

1. Observação de enxames

Figuras:

1. Colecta de mosquitos enxameando usando uma rede entomológica modificada por Marchand.
2. Mosquitos recém colectados, na extremidade da rede entomológica.
3. Local de formação de enxames, casa n° 922.

Tabelas elaboradas com base nos dados obtidos no campo

1. Mosquitos colectados saindo da casa n.º 922, no dia 24/02/2005, em Furvela, distrito de Morrumbene, província de Inhambane.
2. Mosquitos colectados saindo da casa n.º 922, no dia 25/02/2005, em Furvela, distrito de Morrumbene, província de Inhambane.
3. Mosquitos colectados saindo da casa n.º 922, no dia 28/02/2005, em Furvela, distrito de Morrumbene, província de Inhambane.
4. Mosquitos colectados saindo da casa n.º 045, no dia 30/03/2005 em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza.
5. Mosquitos colectados saindo da casa n.º 045, no dia 31/03/2005 em Massavasse distrito de Chókwè, província de Gaza.
6. Mosquitos colectados saindo da casa n.º 045, no dia 01/04/2005 em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza.
7. Médias de mosquitos colectados saindo da casa n.º 922, em intervalos de 3 minutos durante 3 tardes em Furvela, distrito de Morrumbene, província de Inhambane.
8. Médias de mosquitos colectados saindo da casa n.º 045, em intervalos de 3 minutos durante 3 tardes em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza.
9. Médias de mosquitos colectados saindo das casas n.º 922 em Furvela e 045 em Massavasse em intervalos de 3 minutos durante 3 tardes
10. Relação entre actividade de voo e pôr do sol de mosquitos numa gaiola em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza, 02/04/2005.
11. Relação entre actividade de voo e pôr do sol, de mosquitos contidos numa gaiola em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza, 03/04/2005.
12. Relação entre actividade e pôr do sol de mosquitos contidos numa gaiola em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza; médias dos dias 02 e 03/04/2005.
13. Relação entre actividade e nascer do sol de mosquitos contidos numa gaiola em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza, 03/04/2005.
14. Mosquitos machos colectados nos enxames em Massavasse, distrito de Chókwè, província de Gaza entre 09/03/2005 a 19/04/2005.
15. Mosquitos machos colectados nos enxames em Furvela, distrito de Morrumbene, província de Inhambane entre 17/02/2005 a 03/03/2005.

Tabelas elaboradas com base nos resultados do ANOVA

1. ANOVA: Single Factor *An. gambiae s.l.*

1. ANOVA: Single Factor *An. funestus s.l.*

ÍNDICE

CONTEÚDO	PAGINA
DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
DECLARAÇÃO DE HONRA.....	iii
GLOSSÁRIO.....	iv
RESUMO.....	v
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	vi
GRÁFICOS.....	vi
FIGURAS.....	vi
LISTA DOS ANEXOS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3. OBJECTIVOS.....	7
3.1 Objectivo Geral.....	7
3.2 Objectivos Específicos	7
4. HIPÓTESES:.....	7
5. MATERIAL E MÉTODOS	8
5.1 Local de Estudo.....	8
5.1.1 Localidade de Furvela	8
5.1.2 Localidade de Massavasse.....	9
5.2 Material usado.....	11
5.3 Descrição da metodologia	12
5.3.1 Observação dos enxames.....	12
5.3.2 Relação entre o tamanho dos machos e comportamento	13
5.3.3 Relação entre actividade de voo e crepúsculo	15
5.4 Análise Estatística	15
5.5 Considerações Éticas.....	15
6. LIMITAÇÕES E ENVIESAMENTOS.....	16

7. RESULTADOS.....	17
7.1 Observação de enxames e descrição dos locais da sua formação.....	17
7.1.1 Descrição dos locais de formação dos enxames em Furvela.....	18
7.1.2 Descrição dos locais de formação dos enxames em Massavasse.....	19
7.1.3 Composição geral dos mosquitos colectados nos enxames.....	21
7.2 Comportamento dos <i>An. gambiae s.l.</i> e <i>An. funestus s.l.</i> nas horas do crepúsculo.....	25
7.2.1 Saída das habitações.....	25
7.2.2 Ciclo de actividade de voo.....	27
7.3 Relação entre o tamanho dos machos e comportamento.....	28
8. DISCUSSÃO.....	30
8.1 Observação de enxames.....	30
8.2 Estudo do comportamento dos <i>An. gambiae s.l.</i> e <i>An. funestus s.l.</i> nas horas do crepúsculo.....	34
8.2.1 Saída das habitações.....	34
8.2.2 Ciclo de actividade voo.....	35
8.3 Relação entre o tamanho dos machos e seu comportamento.....	36
9. CONCLUSÕES.....	37
10. RECOMENDAÇÕES.....	38
11. BIBLIOGRAFIA.....	39
12. ANEXOS.....	44

I. INTRODUÇÃO

Três géneros de mosquitos são inclusos na sub-família Anophelinae, mas apenas um, o *Anopheles*, com mais de 400 espécies, está extensamente distribuído pelo mundo. Espécies de *Anopheles* são de grande importância médica, devido ao seu papel na transmissão da malária, filaríase linfática causada por *Wuchereria bancrofti* (Kettle, 1995), e algumas arboviroses (Gilles & Warrell, 1993).

O género *Anopheles* pertence à ordem Díptera, sub-ordem Nematocera, família Culicidae, sub-família Anophelinae (Boane e Mommers, 1994).

Os vectores primários da malária na África Sub-sahariana são membros do complexo *An. gambiae*. O complexo compreende pelo menos 6 espécies biológicas com poucas diferenças morfológicas, nomeadamente *An. gambiae* Giles *sensu stricto*, *An. arabiensis* Patton, *An. quadriannulatus* Theobald, *An. bwambae*, *An. melas* Theobald e *An. merus* Dönitz.

2 / Segundo Gilles & Warrel (1993) quatro espécies do complexo *An. gambiae* procriam-se na água doce: *An. gambiae s.s.*, o vector mais importante da malária em África (Service, 1988), que predomina em áreas húmidas, é altamente antropofílico; *An. arabiensis* localiza-se mais em savanas e em muitas outras áreas, é mais zoofílico e exofílico mas não obstante, é um importante vector da malária; *An. quadriannulatus* é zoofílico e conseqüentemente não é vector da malária e o *An. bambwe* tem uma distribuição muito restrita numa área pequena do Vale do Rift onde se reproduz nas águas geotérmicas e é um vector minoritário e localizado da malária (White, 1974). Dois membros do complexo *An. gambiae* são encontrados em água salgada: *An. melas* do Oeste de África e *An. merus* do Este. Eles são vectores locais da malária e geralmente são exofágicos e zoofílicos e por isso mesmo são vectores menos eficientes comparados com *An. gambiae s.s.* (White, 1974 e Gillies & Coetze, 1987).

Estudos feitos por Cuamba (2003), indicam que os principais vectores de malária em Moçambique são o *An. arabiensis* que está largamente distribuído enquanto que *An. gambiae s.s.* não é frequente na zona sul, onde a precipitação é menor que 600 mm por ano. De acordo com o mesmo autor *An. merus* foi encontrado ao longo da costa bem como a 350 Km no

interior; *An. quadriannulatus* está restrita a áreas secas a 24°S. Em muitos lugares vários membros do complexo são simpátricos. No laboratório não existem barreiras de acasalamento entre as espécies e formam híbridos viáveis (em condições para viver) mas estéreis (Marchand, 1984). Entretanto no campo a hibridização é um fenómeno muito raro, e não se conhecem as causas que contribuem para tal fenómeno.

O segundo vector importante da malária em Moçambique é o *An. funestus* Giles membro de um grupo de espécies de tamanho diminuto e escuros, cujos adultos apresentam grande uniformidade de caracteres. As espécies deste grupo se distinguem por pequenas variações no padrão morfológico das asas e são conhecidos como “grupo *funestus*” que por sua vez se divide em quatro subgrupos que são o *funestus* (*funestus*, *parensis* e *aruni*), *confusus*, *leesoni* e *rivulorum-brucei* (*rivulorum* e *brucei*) (Gillies & De Meillon, 1968).

A estratégia actual de combate à malária inclui o controlo do vector utilizando redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas, pulverização intra-domiciliária, entre outras actividades. Estes métodos tornam-se menos eficazes por causa do desenvolvimento de resistência aos insecticidas pelos vectores. Assim, novos métodos de controlo estão sendo estudados. Um deles envolve a modificação dos vectores através de métodos genéticos, que tornam os mosquitos refractários ao parasita (James *et al* citado por Cuamba, 2003) e a possível utilização de machos estéreis. Para que estas novas formas de controlo tenham melhores resultados torna-se necessário obter, em primeiro lugar, informação suficiente sobre o comportamento dos machos em geral e no acasalamento em particular. Porém, até então não existe uma compreensão clara da dinâmica das formas de cópula dos *Anopheles*, mas sabe-se que a fêmea se acasala apenas uma vez na vida, e à semelhança presume-se que o macho também.

Por outro lado dos poucos estudos feitos sugerem que a fêmea não selecciona o macho com o qual se acasala. Por exemplo, o tamanho dos machos em *An. gambiae* s.s. não parece influenciar o acasalamento (Charlwood *et al.* 2002). Mas fêmeas que copulam com machos com dois dias de idade têm mais probabilidade de fazer oviposição do que aquelas que

acasalam com machos mais velhos (Chambers & Klowden, 2001). Para que a técnica de modificação genética dos vectores funcione será necessário que machos jovens geneticamente modificados sejam introduzidos no campo para acasalarem com fêmeas selvagens (fenótipo da maioria da população em condições naturais) produzindo assim uma prole maior de mosquitos geneticamente alterados (refractários ao parasita).

Em muitas áreas de África, o *An. gambiae sensu lato* é encontrado juntamente com *An. funestus s.l.* e por isso a redução da transmissão deverá estar direccionada para estes dois grupos.

Em geral os mosquitos de género *Anopheles* acasalam no crepúsculo (pôr do sol) em enxames constituídos pelos machos que ocorrem em locais abertos a poucos metros do chão, acima de uma área de contraste (superfície preta contra um fundo branco e vice-versa)(Charlwood *et al*, 2003a). As fêmeas vão ao encontro dos machos no enxame. Os machos se apercebem da sua aproximação pela frequência de batimento das asas, e voam nessa direcção para acasalarem. Caso isto se concretize, o par voa para outro lugar onde concluirá a inseminação. Até agora não se sabe como as fêmeas conseguem reconhecer os enxames das suas respectivas espécies evitando assim o surgimento de híbridos.

No presente estudo pretende-se determinar os factores que influenciam o acasalamento dos *Anopheles* tais como o comportamento de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* durante o crepúsculo, a existência de barreiras reprodutivas entre membros do complexo *An. gambiae s.s.* e entre estes e o grupo *An. funestus s.l.*, assim como a taxa de sobrevivência dos machos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2) A malária em África continua sendo um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento, com custos estimados em 1.8 biliões de dólares e causa cerca de um milhão de mortes por ano, principalmente em crianças (WHO, 1994).

3) Dentre os vectores da malária na região tropical de África apenas 3 são considerados como sendo de maior importância (Gillies & Coetzee, 1987; Gillies & De Meillon, 1968). Estes são o *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* e *An. funestus*.

A espécie ancestral do complexo *An. gambiae*, o *An. quadriannulatus*, alimenta-se preferencialmente em animais e não é considerado vector (Gillies & Coetzee, 1987). Os outros membros do complexo são todos vectores entre os quais *An. gambiae s.s.* é o mais eficiente por causa do seu carácter demasiado antropofílico (Garret-Jones *et al.*, 1971-1978), citados por Takken & Knols (1999), acompanhado pela preferência de se alimentar dentro das casas (endofagia), repousar dentro das casas (endofilia) e alta susceptibilidade a infecção por parasitas de *Plasmodium falciparum*. Os restantes membros do complexo não têm um hospedeiro específico. *An. arabiensis* varia notavelmente de antropofílico a largamente zoofílico dependendo da localização geográfica (White, 1974). Além disso foi reportado que diferentes cariótipos destas espécies diferem nos seus hábitos de alimentação, isto é endofagia versus esofagia (Colluzi, 1992). *An. funestus* é antropofílico, endofágico e endofílico. Ele é menos susceptível à infecção pelo *Plasmodium spp.* que *An. gambiae*, mas por causa da sua alta densidade em que possivelmente ocorre, esta pode ser um importante vector local (Charlwood *et al.*, 1997), citado por Takken & Knols (1999). A combinação de antropofilia e endofilia coloca ambos *An. gambiae s.s.* e *An. funestus* numa posição especial dentre os vectores da malária. Associada com a relativa alta taxa de sobrevivência, estes factores fazem com que estas duas espécies sejam as principais responsáveis pela transmissão da malária em África.

X
A duração do ciclo de vida desde o ovo ao *Anopheles* adulto varia entre 7 dias a 31°C e 20 dias a 20°C, tendo cada espécie o seu intervalo óptimo de temperatura (Gilles & Warrell, 1993). Os mosquitos emergem da pupa ao anoitecer e voam para um lugar apropriado para repouso enquanto a cutícula endurece durante cerca de 24 horas (Gillies & De Meillon, 1968). Depois deste período as fêmeas alimentam-se numa primeira fase de suco de plantas o que lhes deixa com a divertícula esofágica dilatada. A alimentação dos machos neste período parece não ter sido ainda estudada (Gillies & De Meillon, 1968). Os machos emergem primeiro que as fêmeas, o que presumivelmente permite a maturação e algum grau de dispersão antes da emergência das fêmeas (Charlwood *et al.*, 2003b). O acasalamento ocorre no segundo e terceiro dias após a emergência dos machos (Charlwood *et al.*, 2003b). A fêmea adulta alimenta-se de sangue pela primeira vez na noite seguinte após a sua emergência da pupa (Gilles & Warrell, 1993). A longevidade dos *Anopheles* fêmeas está directamente relacionada com a transmissão da malária e varia com a espécie, factores externos como a temperatura, humidade e presença de inimigos naturais (Gilles & Warrell, 1993). A duração média da vida do *Anopheles* é de 10-14 dias, mas ocasionalmente podem viver mais. Algumas espécies chegam a completar 3 a 4 semanas; os machos vivem menos que as fêmeas. Os órgãos dos sentidos usados pelos mosquitos (machos e fêmeas) virgens para entrar nas casas são os olhos e fazem-no ao amanhecer, normalmente através de orifícios como portas e janelas a procura de um lugar para repouso. Por outro lado, as fêmeas que já copularam entram nas casas à noite pelo telhado e procuram o alimento (sangue) usando para tal o seu olfacto para descobrir onde se encontra a vítima (Charlwood *et al.*, 2003a). ✓

✓ A alimentação dos mosquitos baseia-se no néctar produzido por plantas que é usado para seus processos metabólicos e voo (Foster, 1995). Este provém de flores, nectários extraflorais e outras fontes. O néctar é a única fonte de alimento dos machos enquanto as fêmeas de algumas espécies alimentam-se numa primeira fase de açúcar e mais tarde de sangue..

Durante o desenvolvimento das gónadas as fêmeas de muitas espécies de *Culex* e *Culiseta* continuam se alimentando de pequenas quantidades de açúcar intercalando com a alimentação hemática (Nasci & Edman, 1984). Fêmeas de *An. freeborni* alimentadas com sangue frequentemente sugam néctar durante a última fase do desenvolvimento gonadotrófico (Holliday-Hanson *et al*, 1997). Contudo a maioria das espécies de *Aedes* e *Anopheles* não sugam néctar durante os estágios de gravidez em que se alimentam de sangue derivando todos os seus nutrientes deste (Straif & Beier, 1996; Takken *et al*, 1998).

O dióxido de carbono presente no ar expirado pelos vertebrados serve de indicador para os artrópodes hematófagos da presença de um hospedeiro. Experiências recentes sugerem que os odores humanos estão envolvidos na atracção dos vectores afrotropicais da malária (Haddow, 1942), citado por Takken & Knol (1999). Uma casa habitada atrai mais *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* do que uma desocupada, e existe uma correlação positiva entre o número de ocupantes e de mosquitos colectados no seu interior (Takken & Knols, 1999).

O sucesso reprodutivo dos mosquitos requer respostas direccionadas para a localização e reconhecimento de parceiros da mesma espécie. Para o caso dos anofelinos predominam acasalamentos monândricos que ocorrem nos primeiros 3 a 5 dias de vida (Verhoek & Takken, 1994). Um conhecimento profundo dos mecanismos de formação dos enxames e acasalamento é de extrema importância para o controlo genético em perspectiva. Tais conhecimentos permitirão que os machos que serão produzidos no laboratório estejam em condições de sobreviver e competir com sucesso no campo com os seus coespecíficos selvagens.

3. OBJECTIVOS

3.1 Objectivo Geral

Estudar os factores que influenciam o acasalamento dos principais vectores de malária em Moçambique, o *Anopheles funestus s.l.* e o *Anopheles gambiae s.l.*.

3.2 Objectivos Específicos

- Identificar os factores que contribuem para o isolamento reprodutivo entre as espécies do complexo *An. gambiae* e entre estas e o grupo *An. funestus*;
- Descrever o comportamento dos *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* nas horas do crepúsculo (nacer e pôr do sol);
- Determinar a relação entre o tamanho dos machos e a probabilidade de cópula;
- Estimar a taxa de sobrevivência dos machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.*.

4. HIPÓTESES:

- a) A diferença na resposta aos marcadores é a causa do isolamento reprodutivo das espécies do complexo *An. gambiae* e entre estas e o grupo *An. funestus*.
- b) H_0 : Os enxames são formados pelos machos de tamanho maior;
 H_1 : Machos de todos os tamanhos são encontrados nos enxames.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de Estudo

O estudo foi realizado nas localidades de Furvela, distrito de Morrumbene, província de Inhambane e Massavasse, distrito de Chókwé, província de Gaza, entre os meses de Fevereiro e Março de 2005.

5.1.1 Localidade de Furvela

A localidade de Furvela (24° 43' S e 35° 18' E) localiza-se a cerca de 400 Km a norte da cidade de Maputo e 7 Km a sul da vila de Morrumbene, na província de Inhambane, ao longo da estrada nacional nº 1.(Figura nº 1). A povoação situa-se a 3 Km do vale do rio Furvela que a delimita no extremo norte. O rio Furvela é uma pequena corrente de água com cerca de 4m de largura. No seu vale encharcado cultiva-se cana-de-açúcar, arroz, bananeiras e constitui um potencial local de reprodução de mosquitos do gênero *Anopheles*.

A vegetação predominante em Furvela é do tipo savana arbórea e arbustiva. A maior parte dos habitantes vive de agricultura de subsistência, com base no milho, mandioca, amendoim e feijão. Coqueiros e cajueiros são as árvores mais predominantes e constituem as culturas de rendimento..

An. funestus s.l. é o mosquito mais abundante em Furvela. Sabe-se que existem pelo menos três membros do complexo *An. gambiae*. (*An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* e *An. merus*) o que torna este lugar ideal para estudar barreiras entre espécies. Também podem ser encontrados *An. tenebrosus*, *Mansonia spp.* e uma variedade de culicíneos (Charlwood *et al*, 2003a).

5.1.2 Localidade de Massavasse

A localidade de Massavasse (24° 38' S e 33° 7' E) situa-se a aproximadamente 160 Km à norte da cidade de Maputo a 40 Km à norte de Macia, distrito de Bilene na província de Gaza (Figura nº 1).

A aldeia situa-se acerca de 7 Km da estrada Macia-Chókwè, e é uma zona de regadio, possuindo assim muitas valas de irrigação que constituem os principais locais de reprodução dos mosquitos. O segundo local de procriação são os buracos deixados pelas pegadas do gado dado que a terra é lamacenta quando chove.

A população de Massavasse vive de agricultura de subsistência, sendo o arroz e tomate as culturas mais predominantes. A segunda actividade praticada nesta região é a criação de gado, um factor importante para a abundância de vários géneros de mosquitos dentre os quais *Anopheles*, *Mansonia*, *Culex*, entre outros.

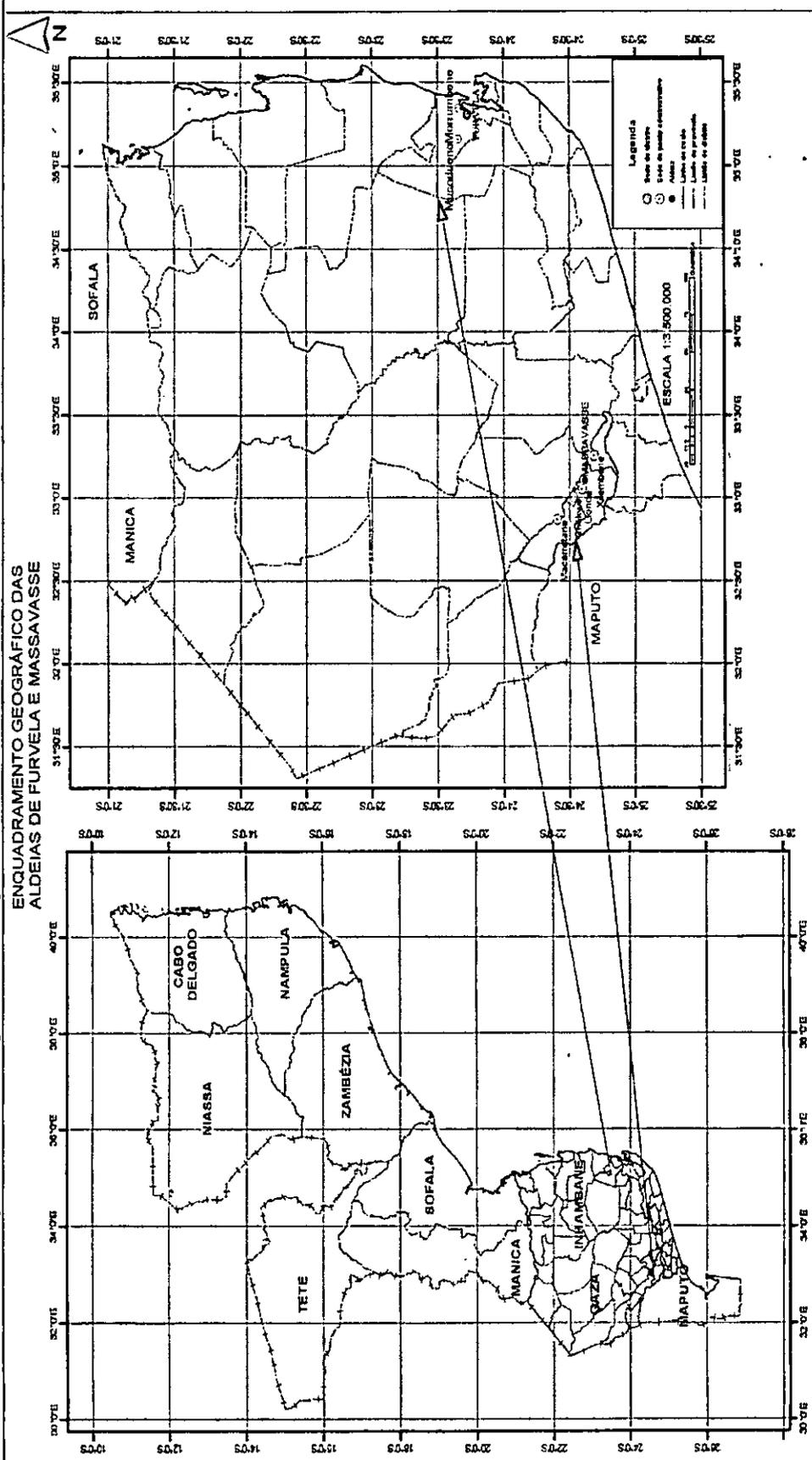


Figura n° 1. Localização geográfica das localidades de Massavasse (Chókwè) e Furvela (Morrumbene).

5.2 Material usado

- Redes mosquiteiras
- Aspiradores
- Copos para conservação dos insectos
- Lanternas
- Relógios
- Medidor da intensidade da luz (Light meter)
- Tubos de vidro
- Tubos
- Caixas
- Escada
- Panos brancos e pretos
- Máquina fotográfica digital
- GPS (Global Positioning System)

- Bloco de notas
- Cadernos de campo
- Lápis e canetas
- Etiquetas
- Pinças entomológicas
- Microscópio de dissecação
- Micrómetro
- Placas de petri
- Gaiolas (20*20*20cm e 40*40*40cm)

5.3 Descrição da metodologia

O trabalho de campo foi realizado durante 9 semanas sendo 5 em Furvela e 4 em Massavasse durante os meses de Fevereiro e Março. A escolha destes meses teve como base as variações sazonais da população de mosquitos que é abundante na estação chuvosa.

5.3.1 Observação dos enxames

Com base nos dados dos registos anteriores de mosquitos colectados a saírem das habitações ao pôr do sol, fornecidos pelos projectos MOZDAN em Furvela e SIMA Massavasse que se dedicam à investigação entomológica da malária, foram seleccionadas as casas com um número elevado de mosquitos. Destas casas foram seleccionadas as que possuíam grande percentagem de *An. gambiae s.l.* em relação a *An. funestus s.l.* Foram realizadas observações ao pôr do sol nas proximidades destas casas durante duas tardes com vista a localização de enxames de mosquitos. As observações foram interrompidas nos locais onde não foram localizados enxames. Foram feitas observações de enxames nas casas onde estes foram localizados, pelo método descrito por Charlwood & Jones (1980) e Charlwood *et al.* (2002) (Anexo nº 1).

Para a identificação dos factores que contribuem para o isolamento reprodutivo das espécies do complexo *An. gambiae* e entre estas e o grupo *An. funestus*, foram realizadas observações ao pôr do sol em redor das casas que continham enxames de mosquitos. Machos de vários enxames foram colectados usando uma rede entomológica modificada por Marchand (1984), fig. nº 1 e 2 (Anexo). No Laboratório procedeu-se a identificação morfológica dos mosquitos de cada enxame usando a chave de Gillies & Coetze (1987), para separar membros do complexo *An. gambiae* e do grupo *An. funestus*.

Os locais onde ocorriam estes enxames foram descritos em termos de vegetação (densidade e altura), distância em relação às casas, altura de formação e foram esboçados

esquemas com vista a mostrar os outros pormenores considerados relevantes para a formação dos enxames.

5.3.2 Relação entre o tamanho dos machos e comportamento

Para verificar a probabilidade do tamanho dos machos afectar o acasalamento, o comprimento das asas de machos colectados em repouso dentro das casas, saindo e enxameando foi medido. A colecta de mosquitos em repouso dentro das casas foi feita no período de manhã. Com uma lanterna, as paredes e tecto das casas eram iluminadas a procura de mosquitos. Quando fossem localizados, eram aspirados ficando deste modo aprisionados no interior do aspirador, sendo em seguida colocados num copo previamente identificado (nº da casa, nome do colector, tipo e data de colecta). O tempo médio de colecta por casa foi de dez minutos.

Para a colecta de mosquitos a saírem das habitações foi necessário conhecer a hora do pôr do sol. Esta era fornecida por um GPS (Global Positioning System). Dez a vinte minutos antes era colocada uma rede mosquiteira nas porta das casas do tipo ilustrado na figura 2. O colector introduzia-se dentro da casa levando consigo copos entomológicos para colocar os mosquitos e um aspirador. Um medidor de intensidade luminosa (RS 180-7133) era colocado na porta com o sensor fora da casa e o leitor dentro. Quando os mosquitos começavam a sair dirigindo-se à porta, ficavam retidos na rede e eram colectados usando um aspirador. Os mosquitos colectados em intervalos de 3 minutos eram colocados em copos diferentes previamente identificados, até que não houvesse nenhum mosquito na rede (fim do período de saídas). Em simultâneo era feito o registo das intensidades luminosas nos mesmos intervalos. Terminado o período de saídas desmontava-se a rede mosquiteira da porta, transportavam-se os mosquitos colectados para o laboratório onde se procedia a identificação morfológica (complexo *An. gambiae* ou *An. funetus*), sexo e contagem dos mosquitos contidos em cada copo.

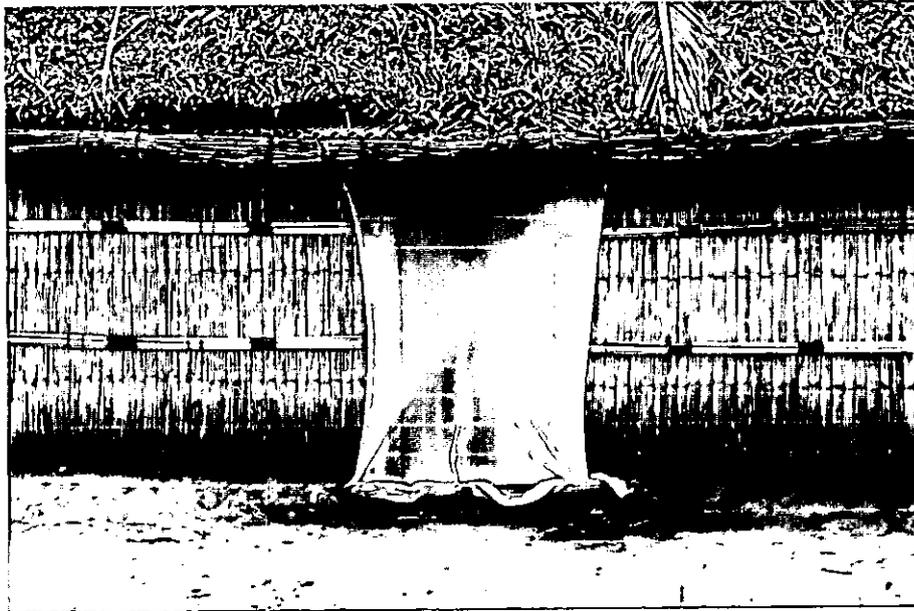


Figura n° 2. Casa com rede mosquiteira na porta (colecta de mosquitos saindo)

O comprimento das asas entre a base e o topo excluindo os pêlos laterais, destes três grupos (repousos, saídas e enxames) foi medido usando um micrómetro colocado na ocular de um microscópio de dissecação (Figura 3). Cada divisão no micrómetro ocular foi calibrado para 0,03mm (1 divisão no micrómetro=0,03mm) em Furvela e 0,04mm em Massavasse.

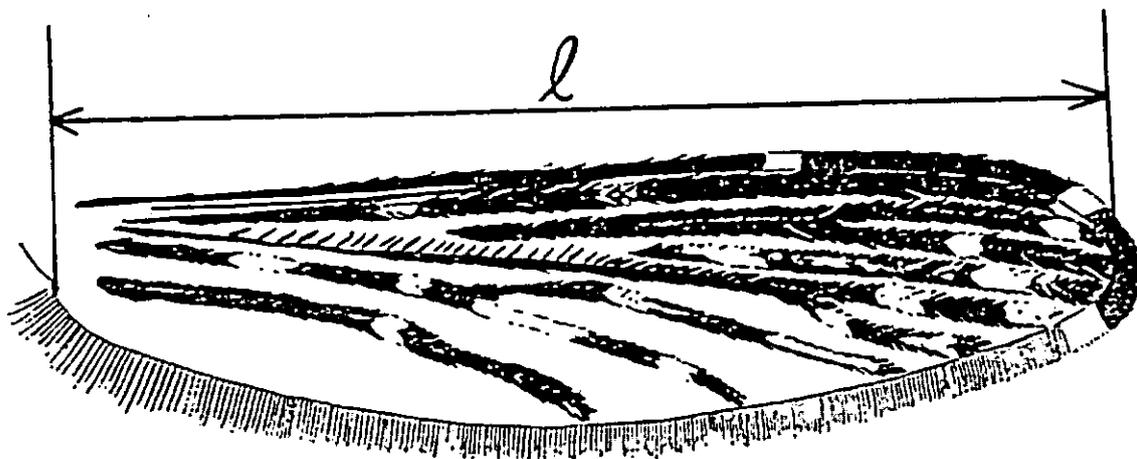


Figura 3. Medição do comprimento da asa.

5.3.3 Relação entre actividade de voo e crepúsculo

Com vista a observar a relação entre a actividade dos mosquitos e crepúsculo (nacer e pôr do sol) foi realizada a seguinte experiência: Um dia antes foram feitas colectas de mosquitos saindo das habitações e colocados numa gaiola. Estas colectas obedeceram certas precauções que consistiram na aspiração cuidadosa e em pequenos números (3-4 mosquitos), com vista a evitar danos na sua estrutura ou que ficassem fragilizados o que provavelmente reduziria o seu tempo de vida. No laboratório os mosquitos foram alimentados com uma solução de sacarose e água, embebidos em pequenas bolas de algodão, colocadas por cima das gaiolas. Nos dias seguintes os mosquitos foram observados durante 72 horas consecutivas anotando-se o número dos que estavam voando dum extremo para o outro. Nos casos em que era difícil contá-los devido ao facto de grande número de mosquitos estar em movimento estimava-se a percentagem.

5.4 Análise Estatística

Os dados foram introduzidos na ficha do Excel e analisados através do teste ANOVA para testar diferenças significativas nas médias dos tamanhos das asas de machos colectados repousando, saindo e enxameando.

5.5 Considerações Éticas

Em ambos distritos onde o estudo foi realizado, os projectos MOZDAN (Furvela) e SIMA (Massavasse) que se dedicam ao estudo da transmissão e controlo da malária fizeram a mobilização prévia da população. Este acto consistiu no fornecimento de informação sobre a importância dos trabalhos a serem realizados e os benefícios que os mesmos trariam à comunidade local.

Durante a colecta dos mosquitos nas casas, as famílias que não possuíam redes mosquiteiras eram aconselhadas a comprá-las para se prevenirem do risco de contraírem a malária.

6. LIMITAÇÕES E ENVIESAMENTOS

A taxa de sobrevivencia dos machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* não foi possível obter devido a ausência de condições laboratoriais que reproduzissem fielmente as condições do campo.

Uma falha no sistema de frio nos laboratórios do INS levou à deterioração dos reagentes para PCR (Polymerase Chain Reaction), nomeadamente o Taq polymerase, os dNTPs, Cloreto de magnésio, marcadores de ADN o que tornou impossível a identificação das espécies dos complexos *An. gambiae* e *An. funestus* ao nível específico. A aquisição destes reagentes num curto espaço de tempo é difícil, quer devido aos custos , quer aos sistemas burocráticos envolvidos.

7. RESULTADOS

7.1 Observação de enxames e descrição dos locais da sua formação

Os enxames foram observados em seis locais (Figura 2 a-f), sendo quatro em Furvela (Figura 2a-d) e dois em Massavasse (Figura 2e-f). Em Furvela grande parte das observações foi efectuada nos locais descritos pelas figuras 2c-d, e em Massavasse pelas figuras 2e e f. Em todos os locais os enxames começavam a se formar 0-10 minutos após o pôr do sol. Os enxames coincidiam com a hora de saída dos mosquitos das casas. Na maioria das vezes foi difícil ver o primeiro macho a enxamear. Os enxames eram normalmente descobertos com 4-8 machos que voavam dum lado para o outro como se estivessem procurando um local para iniciar a formação do enxame. O número aumentava a medida que os outros membros se juntavam ao grupo, tornando-se cada vez maior que podia ser estimado em 10-30 mosquitos em Furvela e mais de 30 em Massavasse. A altura média de ocorrência dos enxames era de 1-3 metros do chão. Nos enxames os mosquitos voavam vertical e horizontalmente com as cabeças orientadas para Este ou Oeste. Tanto em Furvela como em Massavasse não foi observado algum marcador associado à formação dos enxames de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.*. As experiências com marcadores em Furvela foram feitas no local descrito pela figura 2c. Quando um pano preto fosse colocado nos locais habituais de ocorrência dos enxames de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* estes não se formavam ou então se formavam ao lado deste local mas a uma altura muito grande. Quando uma lona prateada ou branca fosse colocada embaixo de um enxame este se dispersava. Em Massavasse foram vistos enxames de *An. pharoensis* no local descrito pela figura 2e por cima de um saco branco próximo do ponto E, por cima de peças de roupa de cor branca estendidas na relva, ponto J e em outros locais onde haviam flores de cor branca. Em várias ocasiões foram vistos enxames *An. pharoensis* por cima de um dos observadores vestido de branco, seguindo-o. Quando três observadores vestidos de cores diferentes, um dos quais de branco, parassem num determinado local, os *An. pharoensis* ficavam por cima da cabeça destes a aproximadamente 0,2 metros e quando os três se deslocavam para direcções diferentes os

mosquitos seguiam o de branco. Os enxames desta espécie eram compostos por centenas de machos que formavam uma coluna vertical de cerca de 1,5 metros. Retirando o objecto branco do local os enxames se dispersavam. Quando sons imitando a frequência de batimento das asas das fêmeas fossem emitidos por um dos observadores a aproximadamente um metro de um dos enxames, os mosquitos voavam para o local onde se encontrava o emissor. Os seis locais de formação de enxames observados ocorriam em locais abertos, com boa iluminação e na vizinhança das casas. Com raras excepções os enxames ocorriam nos mesmos locais em várias tardes.

7.1.1 Descrição dos locais de formação dos enxames em Furvela

Na localidade de Furvela na casa nº 011 (Figura 2a) foram descobertos dois enxames (A e B), a poucos metros do vale do rio. No primeiro dia uma tentativa de colecta dos mesmos falhou, pois ocorriam a aproximadamente quatro metros de altura. No dia seguinte foram colectados alguns machos que enxameavam a aproximadamente um metro do chão. Tanto no ponto A como no B enxameavam machos de *An. funestus s.l.*. Nesta mesma tarde os mosquitos se dispersaram cedo por causa do fumo proveniente de uma lareira localizada a sete metros.

No local descrito pela figura 2b foram localizados dois enxames um dos quais perto de uma casa-de-banho, próximo da machamba de mandioqueiras (A) e outro próximo de uma casa (B) sendo ambos compostos por machos *An. funestus s.l.*

Na casa nº 922 figura 2c, foram observados três pontos de formação de enxames. Nos pontos A e B ocorriam enxames mistos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.*. Segundo as observações realizadas neste local parecia que havia um grupo que enxameava um pouco mais para cima e outro em baixo com uma separação muito pequena. Dada a curta distância de formação dos enxames não foi possível colectar cada grupo separadamente. No ponto C foi colectado um enxame de insectos que inicialmente foram confundidos com mosquitos e que após uma observação no laboratório concluiu-se que não eram.

Dois enxames foram observados no local descrito pela figura 2d (casa n.º 1336). Os enxames mais numerosos localizavam-se no ponto A enquanto que no B raramente eram vistos. Os enxames que ocorriam nestes locais eram compostos por machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.*

7.1.2 Descrição dos locais de formação dos enxames em Massavasse

Na localidade de Massavasse na casa n.º 045 (Figura 2f) localizada perto do canal onde existe água e muitas plantas aquáticas, foram descobertos no primeiro dia das observações três pontos onde se formavam enxames (A, B e C). Os enxames presentes no ponto A eram compostos por machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* No ponto B situado perto de uma casinha a dois metros do canal foram colectados maioritariamente machos de *An. gambiae s.l.* O mesmo sucedeu no ponto C que distava poucos metros de um pombal. No ponto D, a poucos metros do canal foram colectados machos de *An. gambiae s.l.*, *An. pharoensis* e *Culex sp.* Finalmente, no ponto E enxameavam *An. funestus s.l.* e *Culex sp.* As observações de enxames em redor desta casa falharam em cinco tardes consecutivas devido ao vento que soprava com uma velocidade ligeiramente elevada. Algumas vezes foram vistos machos tentando enxamear nos locais habituais, mas acabavam desaparecendo por causa da ventania. Em algumas tardes de vento moderado foram vistos alguns enxames apenas nos pontos D e E.

Dos seis locais (quintais) onde as observações foram realizadas o descrito pela figura 2e, em Massavasse foi o que apresentou maior número de pontos de formação de enxames, com cerca de dez, representados pelas letras A à J (Tabela n.º 2). *An. funestus s.l.* foram colectados nos pontos A, B, C, D e J; *An. gambiae s.l.* enxameavam maioritariamente nos pontos D, F, G e I; Nos pontos C e D para além das espécies atrás referidas foram colectados também machos de *An. pharoensis*. Esta espécie normalmente enxameava no ponto E, H e J, locais onde havia um objecto de cor branca (saco, roupa, flores, etc.), e os seus enxames eram compostos por centenas de mosquitos; os enxames de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* continham algumas dezenas.

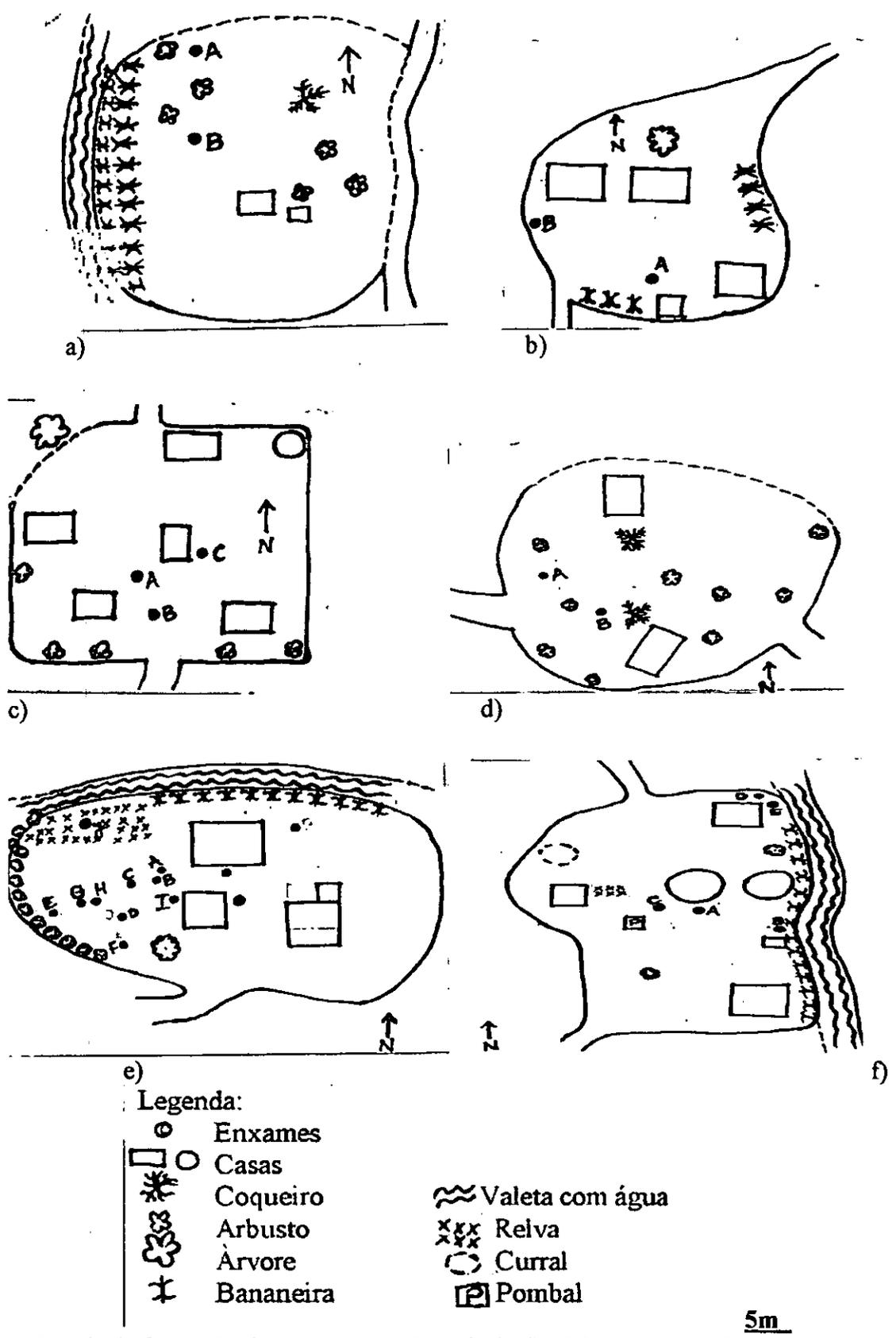


Fig. 2 Locais de formação de enxames em Furvela (a-d) e Massavasse (e-f).

Após dez dias de observação de enxames de *An. pharoensis*, *An. gambiae s.l* e *An. funestus s.l.* neste local, no décimo primeiro dia houve queda de chuvas em Massavasse. As chuvas duraram cerca de três horas, mas não foi possível obter a quantidade de precipitação por falta de equipamento. A partir desta data até ao fim das observações (oito dias seguintes), não foram vistos enxames de *An. pharoensis*. Os enxames de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* continuavam a se formar nos locais habituais.

Foram efectuadas observações ao amanhecer durante 7 dias em Furvela e 10 dias em Massavasse nos locais habituais de formação de enxames, contudo não foram vistos machos enxameando neste período.

7.1.3 Composição geral dos mosquitos colectados nos enxames

Em Furvela as observações ao pôr do sol foram realizadas em 10 tardes culminando com a colecta de 128 mosquitos em 14 enxames, dos quais 74% (n=95) foram machos de *An. gambiae s.l.*; 25% (n=32) foram machos de *An. funestus* e 1% (n=1) foi fêmea de *An. funestus s.l.* (Tabela n.º 1).

Na localidade de Massavasse foram feitas observações em 14 tardes e colectados 1007 mosquitos em 33 enxames sendo 24,1% (n=243) machos de *An. gambiae s.l.*, 20,1 (n=202) machos de *An. funestus*, 53,7% (n=541) machos de *An. pharoensis* e 1,99% (20) machos de *Culex sp.* (Tabela n.º 2).

Tabela n.º 1: Locais de formação de enxames, número de mosquitos e espécies colectadas em cada ponto na localidade de Furvela.

Locais de colecta		N.º de enxames colectados	N.º de mosquitos			
N.º da casa	Pontos de formação de enxames		<i>An. gambiae s.l.</i>		<i>An. funestus</i>	
			♂	♀	♂	♀
922 (Fig. 3)	A	3	14	0	15	1
	B	5	21	0	12	0
1336 (Fig.4)	A	4	52	0	5	0
	B	2	8	0	0	0
Total		14	95	0	32	1

Os enxames eram compostos maioritariamente por machos. Uma fêmea de *An. funestus s.l.* foi colectada juntamente com 8 machos numa das ocasiões em Furvela. Em Massavasse foi colectada 1 fêmea de *An. pharoensis* e 4 fêmeas de *Culex sp.* juntamente com dois machos de *An. gambiae s.l.* e noutra ocasião 31 machos *An. funestus s.l.* 1 fêmea de *Culex sp.*.

Tabela n ° 2: Locais de formação de enxames, número e espécies colectadas em cada ponto na localidade de Massavasse.

Locais de colecta	N.º de casa	Pontos de formação de enxames	N.º de exames colectados	N.º de mosquitos						An. pharoensis		Culex ssp.	
				An. gambiae s.l.		An. funestus s.l.		An. pharoensis		Culex ssp.			
				♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
922 (Fig. 2e)		A	2	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0
		B	3	2	0	48	0	0	0	0	2	0	0
		C	4	7	0	33	0	0	24	0	2	1	0
		D	3	59	0	63	0	0	234	0	0	0	0
		E	4	6	0	1	0	0	213	0	4	0	0
		F	2	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		G	3	18	0	0	0	0	0	1	5	0	0
		H	1	0	0	1	0	0	50	0	3	0	0
		I	3	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		J	2	0	0	28	0	0	20	0	0	0	0
045 (Fig. 2f)		A	2	11	0	11	0	0	0	0	1	0	0
		B	1	12	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		C	1	8	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		D	1	3	0	0	0	0	6	0	10	0	0
		E	1	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0
Total			33	243	0	202	0	541	1	20	0	0	

7.2 Comportamento dos *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* nas horas do crepúsculo

7.2.1 Saída das habitações

Normalmente, os mosquitos começavam a sair na hora do pôr do sol (00:00min) e terminavam 33 minutos depois (00:33min)(Gráfico n.º 1). Durante este intervalo, o número de mosquitos saindo aumentava em função do tempo atingindo o número máximo no 9º a 15º minuto. A partir deste instante os números decresciam gradualmente atingindo zero ao 33º minuto. A intensidade luminosa decrescia logaritmicamente a medida que o sol desaparecia no horizonte e grande parte dos mosquitos saía no intervalo de 48-0 Lux.

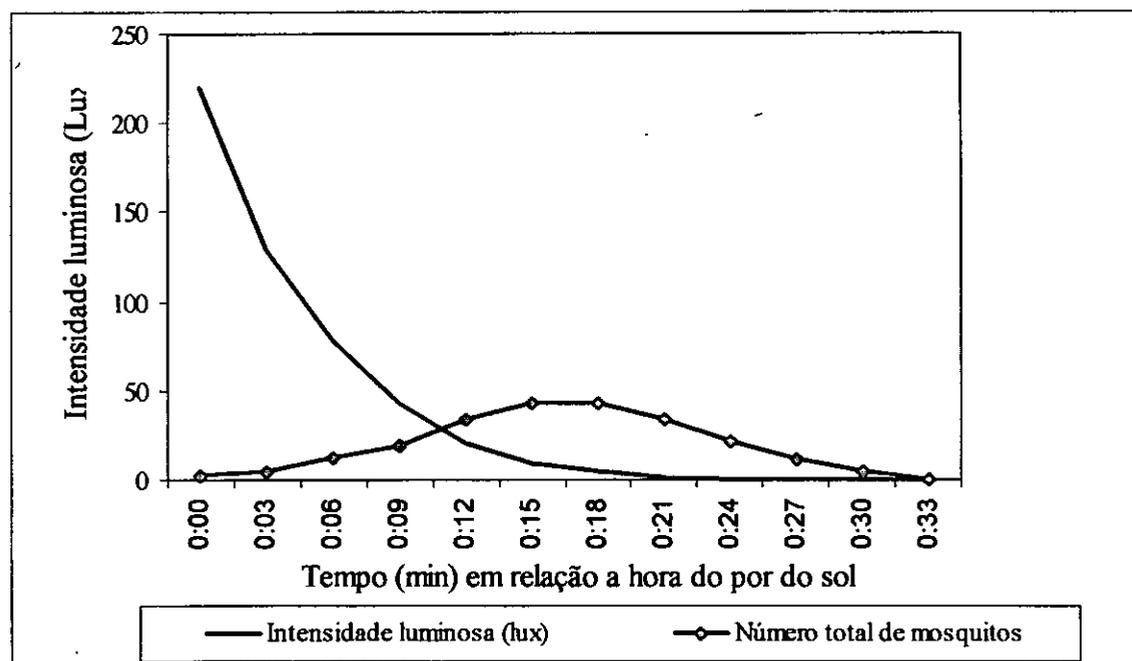


Gráfico n.º 1 Relação entre a variação da intensidade luminosa e o número de mosquitos saindo fora das habitações

Durante as experiências verificou-se que os machos eram os primeiros a sair das casas, o que ocorria 0-10 minutos após o pôr do sol. As fêmeas começavam a sair mais tarde, 7-10 minutos depois do início da saída dos machos, atingindo o seu pico ao 15° ao 24° minutos, o que normalmente correspondia a uma intensidade luminosa de 10 a 0 Lux (Gráfico n.º 2).

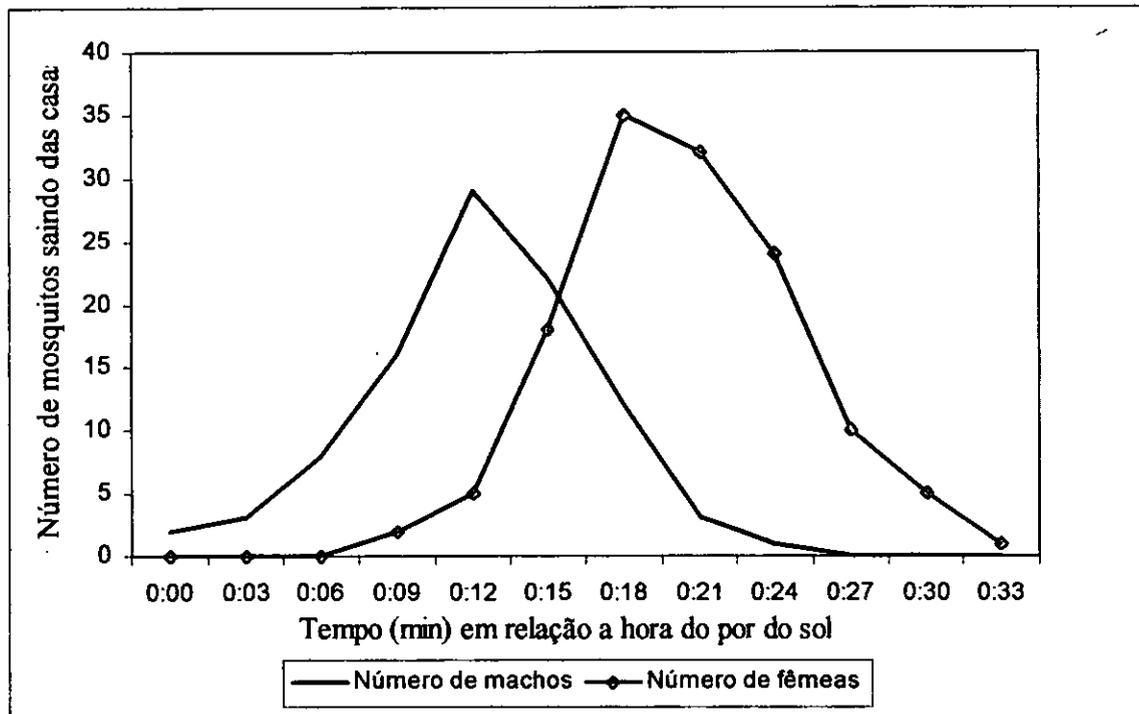


Gráfico n.º 2: Tempo de saída de machos e fêmeas de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* em relação à hora de pôr do sol.

7.2.2 Ciclo de actividade de voo

A actividade de voo ao entardecer (pôr do sol), aumentava a partir da hora do pôr do sol; os mosquitos eram vistos voando da mesma maneira que nos enxames. Durante as manhãs (nascer do sol) a actividade não era muito intensa comparativamente às tardes (Gráfico n.º 3).

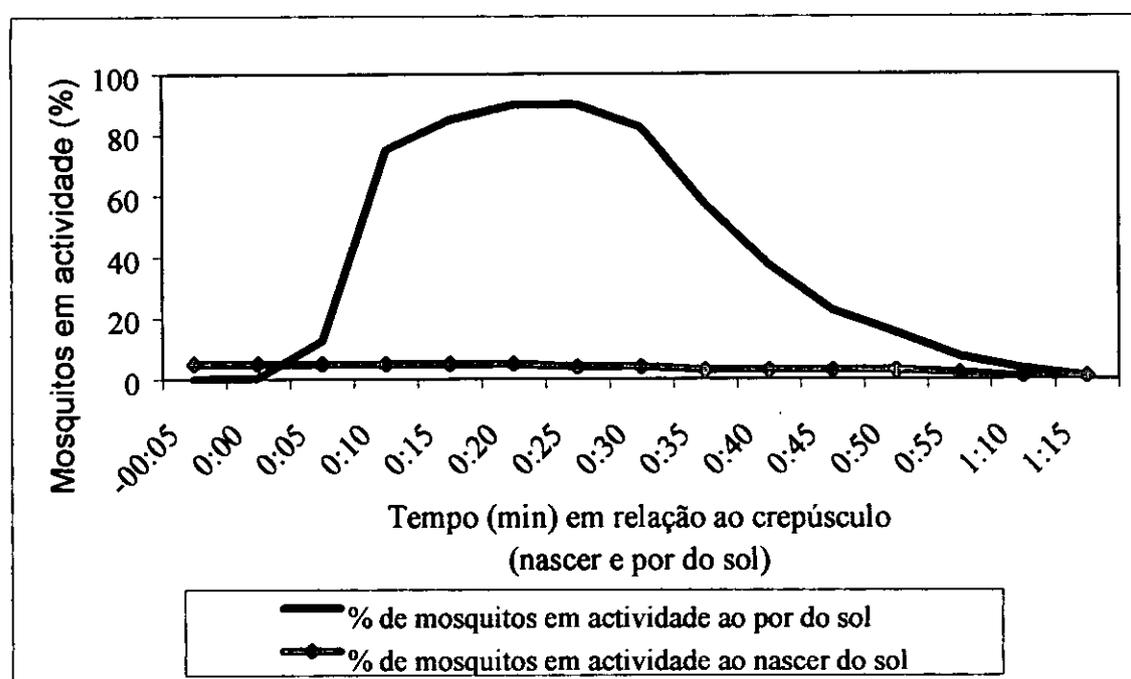


Gráfico 3: Variação do ritmo de actividade dos mosquitos ao nascer e pôr do sol.

7.3 Relação entre o tamanho dos machos e comportamento

A relação entre o tamanho e comportamento é mostrada no gráfico n.º 4. Não se observaram diferenças significativas nas médias dos comprimentos de asas dos machos de *An. gambiae s.l.* dos três grupos: Enxames (n=170), Sidas (n=525), Repousos (n=257) ($F=0,2485$; $df=2$; $P=0,7807$).

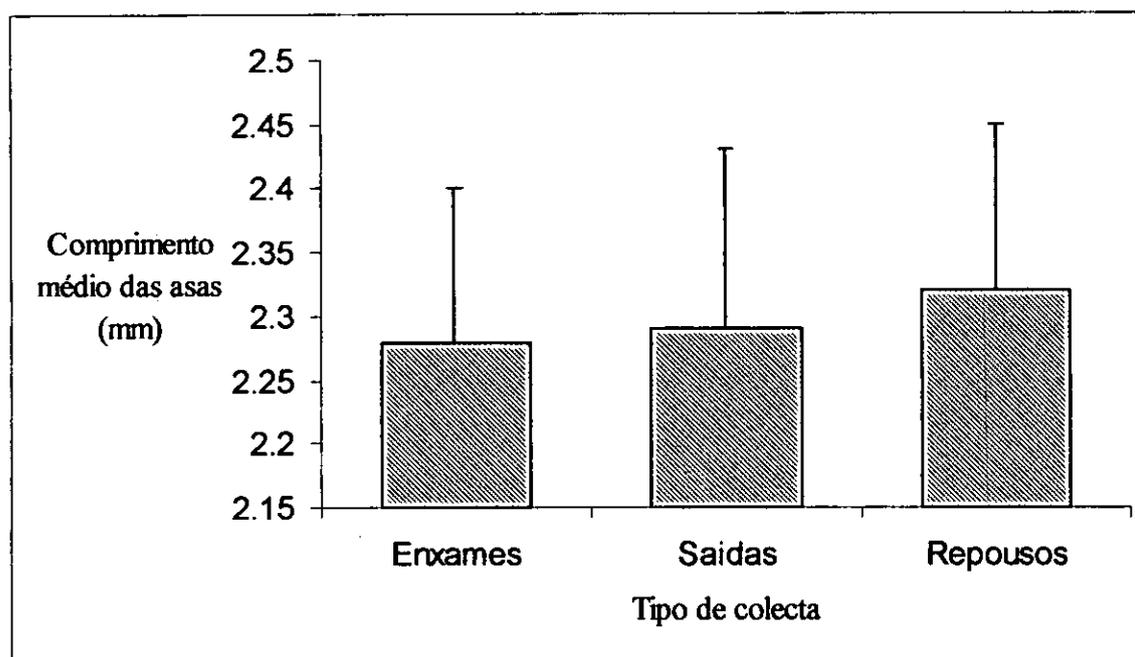


Gráfico n.º 4. Comprimento médio das asas dos machos de *An. gambiae s.l.* de acordo com o tipo de colecta, na localidade de Furvela. Cada barra representa a média + desvio padrão de cada tipo de colecta.

Tal como foi observado em *An. gambiae s.l.* verificou-se que não houve diferenças significativas nas médias dos comprimentos de asas dos machos de *An. funestus s.l.* colectados enxameando, repousando e saindo das casas (Gráfico n.º 5): Enxames (n=108), Saida (n=451) e Repousos (n=168)(F=0,3142 ; df=2 ; P =0,7315).

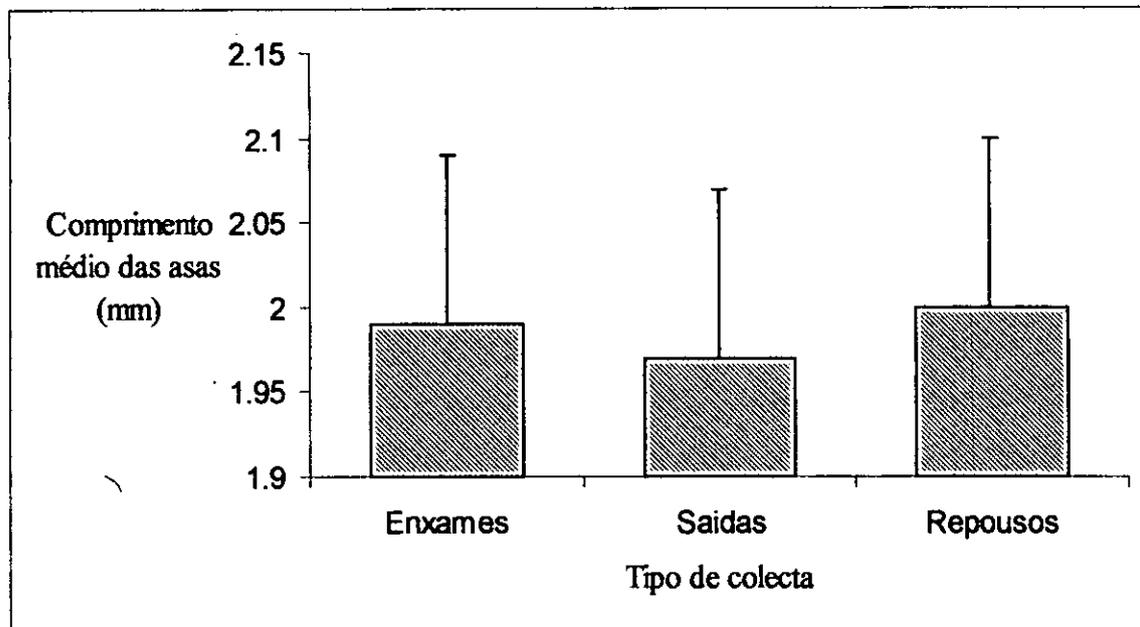


Gráfico n.º 5. Comprimento médio das asas dos machos de *An. funestus s.l.* de acordo com o tipo de colecta na localidade de Furvela. Cada barra representa a média + desvio padrão de cada tipo de colecta.

8. DISCUSSÃO

8.1 Observação de enxames

A agregação é a primeira fase muito importante para o acasalamento da maioria dos mosquitos (Clements, 1999). A inseminação de mosquitos ocorre predominantemente nas horas de formação de enxames (Charlwood & Jones, 1979) citados por Diabate *et al.* (2003). Tanto em Furvela como em Massavasse os enxames começavam a se formar no intervalo de 0-10 minutos após o pôr do sol. Eles eram iniciados por um pequeno número de machos voando de um extremo para o outro, e progressivamente os outros machos se juntavam ao grupo, atingindo dezenas ao fim de 10 minutos. Os enxames permaneciam nos locais habituais até o tempo em que a luz solar desaparecia na sua totalidade, tornando difícil a sua visualização a olho nu. Todos os enxames vistos ocorriam em lugares abertos (sem sombras de árvores), com uma boa iluminação e na vizinhança das casas. Os mosquitos enxameavam com as cabeças voltadas para Este ou para Oeste, o que está de acordo com os resultados encontrados por Russel & Rao (1960), citado por Reisen & Aslamkhan (1975) mas discordantes com o estudo feito por este último autor. Segundo Reisen & Aslamkhan (1975), usualmente as cabeças estavam orientadas para Noroeste mas ocasionalmente para Norte ou Oeste. Aproximadamente 50 a 100 machos se reuniam por cima de um marcador e ficavam visualmente orientados para Este garantindo a adesão do enxame (Takken & Knols, 1999). (Novo parágrafo, isto não tem relação com o anterior). Contudo, neste estudo não foi observado algum marcador visível associado à formação dos enxames de *An. gambiae s.l* e *An. funestus s.l.* tanto em Furvela como em Massavasse, o que torna impossível descrever os marcadores ideais para a formação de enxames. Na Tanzânia, Marchand (1984) igualmente não observou algum marcador visível associado com os enxames de *An. gambiae s.s.* e *An. arabiensis* que ocorriam em áreas planas, abertas, entre palhotas e árvores. Os enxames observados no presente trabalho corriam em sítios com características semelhantes às aquelas descritas por este autor, isto é, locais com alguma visibilidade ao céu.

Durante as experiências com marcadores (panos pretos e brancos), os enxames de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* nunca se formaram por cima destes, e se dispersavam quando estes fossem colocados em baixo dos mesmos, tanto em Furvela como em Massavasse. Este facto está de acordo com os resultados das observações feitas por Charlwood *et al* (2003a) em Furvela, mas contrastam com os de machos de *An. gambiae s.l.* em São Tomé que se formavam por cima de uma toalha preta (1x1,5 m) colocada no chão, e até podiam ser induzidos a seguir o marcador quando este fosse deslocado a pequenas distâncias (Charlwood *et al*, 2002b). Uma provável razão para esta diferença no comportamento é o facto de o membro do complexo observado em São Tomé ter sido o *An. gambiae s.s.* forma molecular M de *An. gambiae* que não é encontrado em Moçambique (Cuamba, 2003) e noutras regiões da África oriental (Charlwood *et al*, 2003a).

Charlwood & Jones (1980), observaram enxames de *An. melas* na Gâmbia que se formavam e permaneciam por cima de um pedaço de papel (45x51Cm) mesmo quando este fosse movimentado lentamente dentro duma área clareada pelo horizonte. Em Massavasse *An. pharoensis* enxameavam por cima de objectos de cor branca.

Os enxames de *An. pharoensis* não foram mais vistos após a chuva que caiu no 11º dia das observações em Massavasse. As fêmeas desta espécie são frequentemente encontradas nos campos de arroz abrigados nos caules das plantas (Gillies & De Mellon, 1968). O seu desaparecimento provavelmente está relacionada com este seu hábito de vida exofílico. Dada a intensidade das chuvas, é provável que os *An. pharoensis* tenham morrido em massa enquanto que os *An. funestus s.l.* e *An. gambiae s.l.* não foram afectados por serem endofílicos.

Nas tardes de ventania não ocorria formação de enxames, ou se dispersavam rapidamente em locais mais abertos ou seja sem alguma protecção contra o vento como uma parede ou um arbusto. No local descrito pela figura 2f, foram vistos alguns enxames apenas nos pontos D e E provavelmente por se localizarem nos cantos da casa o que confere certa

protecção contra o vento. Segundo Bates (1941b) citado por Bates (1949), em gaiolas grandes os enxames podiam ser dispersos ligando uma ventoinha eléctrica.

Durante o estudo não foram vistos pares de casais a saírem dos enxames e em raras ocasiões foram colectadas fêmeas num grupo de machos, facto que coloca em questão a função reprodutiva dos enxames formados ao pôr do sol por muitas espécies de mosquitos (Nielsen & Heager, 1960; Downes, 1969), citados por Diabate *et al* (2003). Muitos autores acreditam que os enxames são compostos primariamente por machos. As fêmeas se aproximam destes e ocorre o acasalamento (Reisen & Aslamkhan, 1976; Reisen *et al*, 1977; Yuval *et al*, 1992). Os machos enxameiam todos os dias na sua idade sexualmente activa, enquanto que as fêmeas geralmente copulam apenas uma vez na sua vida e mudam de comportamento após a inseminação. Assim assumindo que a proporção de machos e fêmeas na altura de eclosão é igual (1 : 1), é justificável a pouca ocorrência de acasalamentos (Jones & Gubbins, 1978; Charlwood & Jones, 1980). Esta ausência de casais nos enxames observados tanto em Furvela como em Massavasse também pode sugerir que o acasalamento esteja a ocorrer em outros locais com melhores condições que os pontos em observação. Segundo Charlwood (comunicação pessoal) os enxames podem ser observados com frequência em alguns locais e serem extremamente raro em outros o que sugere que hajam outras estratégias de acasalamento em mosquitos deste género.

A maior parte dos enxames colectados eram compostos por machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* que são simpátricos tanto em Furvela como em Massavasse. Isto mostra que as condições requeridas pelos dois grupos para enxamear são semelhantes. Enxames mistos têm sido ocasionalmente reportados (Diabate *et al*, 1997). Marchand (1984) observou na Tanzânia o *An. funestus s.l.* enxameando em locais marginalmente diferentes daqueles usados por espécies simpátricas como *An. gambiae s.s.* e *An. arabiensis* e se sobrepunham frequentemente formando enxames mistos. Em Furvela existem locais onde foram vistos apenas enxames de *An. funestus s.l.*, e outros onde os dois grupos (*An. gambiae* e *An. funestus*) enxameam juntos ou a escassos centímetros. O primeiro relato de enxames de *An. funestus s.l.* foi feito por Harper (1944) que os descreveu como

“dançando para cima e para baixo acerca de um pé dentro de um quarto” a 16 Km de Nyanza, lago Vitória e nenhum marcador foi mencionado. Gilles e De Meillon afirmam na sua extensa revisão que nunca viram *An. funestus s.l.* enxameando mesmo em área de elevada densidade. Enxames de *An. funestus s.l.* são frequentes em Furvela como em Massavassé. Eles ocorriam em locais abertos 1 a 3 metros do chão o que difere com os observados por Harper (1944).

As espécies de mosquitos que requerem as mesmas características ambientais para enxamear podem formar enxames mistos em área onde elas são simpátricas, mas isso não significa que elas se inter-cruzam (Diabate *et al.*, 2003). Marchand (1984) estudou uma população de duas espécies simpátricas e concluiu que ocorriam enxames mistos mas com uma frequência muito baixa. As duas espécies formavam enxames nos mesmos locais e nas mesmas horas mas não foram encontrados híbridos no campo. Por outro lado a hibridização entre as duas espécies ocorria prontamente em gaiolas no laboratório (Marchand, 1984). Sendo assim, é lógico pensar que provavelmente existe um mecanismo ainda desconhecido que evita a hibridização no campo.

Os machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* evitam contacto com parceiros inter-específicos no campo talvez pelas seguintes razões: durante o período de crepúsculo altura em que ocorre a formação dos enxames, os machos ficam com as fibrilas das suas antenas erectas. É possível que isto lhes permita distinguir as frequências de batimento de asas de fêmeas intra-específicas mesmo que a diferença seja muito pequena. O mesmo não deve estar a acontecer no laboratório, possivelmente pelo facto destas espécies serem eurigâmicas (que requerem um ambiente natural para acasalar). É provável que a eurigamia faça com que a sensibilidade das fibrilas seja maior no campo do que em gaiolas. Devem ser estes os factores que mais contribuem para a prevenção de acasalamentos inter-específicos entre membros do complexo *An. gambiae* assim como entre estes e o grupo *An. funestus* no campo.

8.2 Estudo do comportamento dos *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* nas horas do crepúsculo

8.2.1 Saída das habitações

Geralmente, os mosquitos começavam a sair das casas na hora exacta do pôr do sol e as saídas prolongavam-se até ao 33º minuto. A intensidade luminosa baixava logaritmicamente. Os mosquitos continuavam saindo mesmo que a intensidade luminosa atingisse zero Lux (na escuridão). Os mosquitos que continuavam a sair mesmo depois da escuridão, provavelmente se dirigiam aos locais de formação de enxames para acasalar, o que significa que os enxames continuam nos seus locais mesmo após o desaparecimento da luz solar, uma vez que os olhos dos anofelinos são muito sensíveis a baixa intensidade luminosa (Land *et al*, 1997). Algumas vezes os mosquitos podiam ser vistos através dum raio de luz emanado de uma máquina fotográfica, a enxamear no escuro. Contudo, já não era possível discriminar entre fêmeas e machos. Métodos para observar o que acontece nos exames nestas condições poderiam elucidar a ocorrência de acasalamento.

Os machos são os primeiros que começam a sair a uma intensidade luminosa de aproximadamente 220 Lux, ao passo que as fêmeas iniciam um pouco mais tarde, isto é, 7-10 minutos depois. O pico de saída das fêmeas é atingido na altura em que maior parte dos machos já abandonou as casas e se encontra a enxamear. Provavelmente, ao longo da evolução deste género, os machos ganharam a habilidade de detectar pequenas variações da intensidade luminosa em relação às fêmeas. Este facto faz com que elas comecem a sair mais tarde quando a intensidade luminosa torna-se extremamente baixa na faixa de 10-0 Lux, atingindo o seu pico num instante em que maior parte dos machos já saiu. Este é um dos factores que garante o sucesso reprodutivo dos anofelinos porque permite a saída dos machos mais cedo para formar os enxames de modo que as fêmeas os encontrem enquanto já começaram com o ritual nos locais habituais. Por outro lado, machos que saem mais cedo podem ter a desvantagem de se fatigar mais cedo diminuindo deste modo as suas chances de acasalar em relação aos que saem na hora em que as fêmeas começam

a chegar nos enxames. Este é um pormenor que deve ser posto em consideração quando forem usados machos transgênicos para o controle da malária.

Segundo Charlwood *et al.* (2003a), é provável que a diferença na resposta aos marcadores horizontais seja suficiente para prevenir a formação de enxames mistos e consequentemente ser responsável pelo isolamento reprodutivo. No presente estudo verifico-se que *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* saem no mesmo intervalo de tempo e enxameam nos mesmos locais, o que coloca em questão a hipótese de a diferença nas horas formação dos enxames e respostas diferentes aos marcadores horizontais contribuírem para o isolamento reprodutivo.

8.2.2 Ciclo de actividade voo

O ritmo fisiológico diário (ciclo circadiano) afecta a actividade sexual de certas espécies de mosquitos (Jones *et al.*, 1972b). Estudos sobre a actividade circadiana de voo em mosquitos foram direccionados para o comportamento de fêmeas virgens alimentadas com açúcar (Jones *et al.*, 1972a,b; Nayar & Sauerman, 1971a; Chiba, 1964, 1971) citados por Jones & Gubbins (1978). Jones *et al.* (1972b) mostrou que o padrão da actividade de voo em *An. gambiae s.l.* pode ser dividido em duas partes. O pico inicial normalmente segue o desaparecimento da luz, coincidindo com o tempo de saída dos mosquitos das casas ao pôr do sol. A actividade secundária que atinge o seu máximo 6–10h depois do pico inicial, ocorre no campo, na altura em que os mosquitos procuram um hospedeiro para a sua refeição hemática (Gillies & De Meillon, 1968). Este padrão bimodal da actividade circadiana dos *Anopheles* permite a realização de grande parte de actividades que envolvem o voo.

Em experiências feitas com *An. superpictus*, foi observado que os enxames eram formados em intervalos de 24h, aparentemente associado com o ritmo de actividade geral de todo o enxame (Bates, 1949). Provavelmente terá sido por esta razão que no presente trabalho, o estado de actividade era atingido nas horas do pôr do sol, o mesmo não

acontecendo ao amanhecer. Contudo parece que o acasalamento não é universalmente condicionado pelo ritmo de actividade. Experiências com *Aedes aegypti*, por exemplo, o acasalamento invariavelmente ocorria se houvesse um distúrbio dos mosquitos na gaiola o que fazia com que eles comesçassem a voar (Bates, 1940). Segundo este mesmo autor, quando os mosquitos estão no seu estado de actividade intensa, a formação de enxames é causada por uma mudança da intensidade luminosa (Luz para escuridão e vice-versa). Este facto admite a possibilidade de formação de enxames ao amanhecer. Contudo, durante 7 manhãs de observação em Furvela e 10 em Massavasse não foram vistos enxames de mosquitos ao amanhecer. O único relato de enxames ao amanhecer é de Charlwood (2002) que observou enxames que se formavam neste período e desapareciam 15 minutos após o nascimento do sol em São Tomé. Segundo o mesmo autor, os acasalamentos neste período foram raros comparativamente ao pôr do sol. Há contudo, que referir que a espécie de *An. gambiae* observada era da forma molecular M, mencionada anteriormente como não ocorrendo na África Oriental (Charlwood *et al*, 2003, Cuamba 2003).

8.3 Relação entre o tamanho dos machos e seu comportamento

As médias de comprimento de asas dos machos colectados nos enxames em repouso e saindo das casas não foi significativamente diferente, o que significa que não existe um tamanho específico que enxameia. Machos de todas as dimensões foram encontrados enxameando, repousando e saindo das casas. O tamanho dos machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* em Furvela parece não afectar o comportamento dos mesmos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Charlwood *et al* (2002b) em São Tomé, segundo o qual o tamanho dos machos de *An. gambiae s.l.* parece ter pouco efeito no seu comportamento.

9. CONCLUSÕES

Os mosquitos pertencentes ao complexo *An. gambiae* e ao grupo *An. funestus* são simpátricos em Furvela como em Massavasse. Eles formam enxames mistos o que significa que as condições requeridas para formar enxames são semelhantes.

Neste trabalho não foi possível identificar o mecanismo exacto que impede o intercruzamento das diferentes espécies do complexo *An. gambiae* e entre estes e o grupo *An. funestus* embora enxameiem nos mesmos locais e nas mesmas horas.

Não foi observado algum marcador visível associado à formação dos enxames de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.*, mas todos os enxames ocorriam em locais com alguma visibilidade ao céu.

Os machos são os primeiros a sair das casas ao entardecer. As fêmeas saem 7-10 minutos mais tarde. Este deve ser um dos factores que garante o sucesso reprodutivo dos anofelinos.

O tamanho dos machos de *An. gambiae s.l.* e *An. funestus s.l.* não afecta o comportamento dos mesmos em relação a formação de enxames.

10. RECOMENDAÇÕES

Para que o controlo genético da malária seja bem sucedido, devem ser feitos estudos mais detalhados sobre o comportamento geral e no acasalamento dos mosquitos do género *Anopheles*.

Os estudos do comportamento dos mosquitos do género *Anopheles* devem ser locais i.e. devera se ter o cuidado de não generalizar os resultados obtidos numa determinada região, pois parece que o comportamento dos *Anopheles* varia com a espécie e região em questão.

Durante estudos que envolvem colecta de mosquitos em repouso, devem ser usados aspiradores eléctricos porque a aspiração pela boca pode provocar doenças do sistema respiratório.

11. BIBLIOGRAFIA

Bates, M. (1949). The Natural History of Mosquitoes, New York.

Boane, C. e P. Mommers (1994). Parasitologia. 50pp. Universidade Eduardo Mondlane. Maputo, Moçambique.

Chambers, G. M., M. J. Klowden (2001). Age of *Anopheles gambiae* Giles male mosquitoes at time of mating influences female oviposition. Medical Vector Ecology, 26:196-201.

Charlwood, J.D., M. D. Jones (1980). Mating in mosquito, *Anopheles gambiae* s.l.; swarming behaviour. Physiological Entomology, 5: 315-320.

Charlwood, J. D., J. Pinto, C. A. Sousa, H. Madsen, C. Ferreira, V.E. do Rosário (2002a). Male size does not affect mating success (of *Anopheles gambiae* in São Tomé). Journal Vector. Ecology, 27:178-183.

Charlwood, J. D., J. Pinto, C. A. Sousa, H. Madsen, C. Ferreira, V.E. do Rosário (2002b). The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: culicidae) from São Tomé Island. Journal Vector. Ecology, 27:178-183.

Charlwood, J. D., R. Thompson, H. Madsen (2003a). Observation on the swarming and mating behaviour of *Anopheles funestus* Giles from southern Mozambique. Malarial Journal, 2:2.

Charlwood, J.D., J. Pinto, C.A. Sousa, V. Petrarca, C. Ferreira, V. E. do Rosário (2003b). "A mate or a meal" – Pre-gravid behavior of female *Anopheles gambiae* from the islands of São Tomé and Príncipe, West Africa. Malarial Journal, 2:9.

Cuamba, N. J. B. (2003). The Bionomics, Population structure and Roles in Transmition of malaria Vectores in Mozambique and Angola. Tese de Doutoramento. The University of Liverpool.

Clements, A. N. (1999). The biology of mosquitoes. Sensor Reception and Behaviour. Cambridge: Cambridge University Press.

Colluzi, M (1992). Malaria vector analysis and control. Parasitology Today, 8: 113-118.

Diabate, A., T. Baldet, C. Brengues, P. Kengne, K. R. Dabire, F. Simard, F. Chandre, J. M. Hougard, J. Hemingway, J. B. Ouedraogo, D. Fontenille (2003). Natural swarming behaviour in the molecular M form of *Anopheles gambiae*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 97: 1-4.

† Foster, W. A (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. Annual Review of Entomology, 40:443-474.

Gilles, H. M., D. A. Warrel (1993). Buce-Chwatt Essencial Malariology, 3ª Edição, 339pp. Great Britain, Edward Arnold.

Gillies M. T. & Coetzee M. (1987). A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Publication of The South African Institute for Medical Research nº 55. Johannesburg: South African Institute for Medical Research.

† Gillies, M. T., B. De Meillon (1968). The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical Region), 2ª Edição, 343pp. South Africa, South African Institute for Medical Research.

Harper, J. O (1944). .Note on the swarming of *Anopheles funestus* Giles in East Africa. Eastern African. Medical Journal. 21:150-151.

Haddow, A.J. (1942). The mosquito fauna and climate of native huts at Kimusu, Kenya. Bulletin of Entomology Research, 33: 91-142.

Holliday-Hanson ML, B. Yuval, R. K. Washimo (1987). Energetics and sugar-feeding of Field- collected anopheline females, Journal of Vector Ecology, 22: 83-89.

Jones, M. D. R., C. M. Gubbins & D. Marsh (1972b). Light-on effects and the question of bimodality in circadian flight activity of mosquito *Anopheles gambiae*. Journal of Experimental Biology, 57: 347-357.

Jones, M. D., S. J. Gubbins (1978). Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in the relation to insemination, feeding and oviposition. Physiological Entomology, 3: 213-220.

Kettle, D. S. (1995); Medical and Veterinary Entomology. 725pp, UK, CAB International.

Land, M. D. F., G. Gibson & J. Horwood (1997). Mosquito eye design: Conical rhabdms are matched to wide aperture lenses. Proceedings of Royal. Society., London., Ser. B, 264:-1183-87.

Marchand, R. P. (1984). Field observation on swarming and mating in *Anopheles gambiae* mosquitoes in Tanzania. Netherland. Journal of Zoology, 34: 367-387.

Nasci, R. S., J. D. Edman (1984). *Culiseta melanura* (Diptera: culicidae): Population structure and nectar feeding in a freshwater swamp and surrounding areas in southeastern Massachusetts, USA, Journal of Medical Entomology, 21:567-572.

Reisen, W. K. & M. Aslamakhan (1976). Observation on swarming and mating behaviour of *Anopheles culicifacies*. Bulletin of the World Health Organisation, 54: 155-158.

Reisen, W. K., Y. Asman & T. F. Siddiqui (1977). Observations on swarming and mating of some Paquistan mosquitoes in nature. Annals of the Entomological Society of America, 70: 988-995.

Service, M.W. (1988). Biosystematics of Haematophagous Insects. 360pp. Oxford. Oxford University Press.

Straif, S. C., J. C. Beier (1996). Effects of sugar availability on the blood-feeding behaviour of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 33: 608-612.

Takken, W., M.J. Klowden, G.M. Chambers (1998). The effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae s.s.* (Diptera: Culicidae): The disadvantage of being small. Journal of Medical Entomology 35: In press.

Takken, W., B. G. J. Knolls (1999). Odor-mediated behaviour of afrotropical malaria mosquitoes. Annual Review of Entomology, 44:131-157.

Verhoek, B. A., W. Takken (1994). Age effects on the insemination rate of *Anopheles gambiae s. l.* in the laboratory. Entomology Experienced and Applied, 72:167-172.

Yuval, B., J. W. Wekesa & R. K. Washino (1992). Swarming and mating in *Anopheles freebornii*: Preliminary observations and methods for field studies. Proceedings of the Californian Mosquito Vector Control Association, 60: 76-81.

White. G. B. (1974). *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. Transation of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien, 68: 278-298.

World Health Organization (1996). World malaria situation in 1994. Part 1. Weekly Epidemiological, Rec. 72: 269-276.

12. ANEXOS

12.1 Técnicas

Observação de enxames

As observações directas dos enxames foram feitas com o observador a aproximadamente 1,5 metros a Este do enxame olhando-o acima. Isto significa que os mosquitos eram visíveis na silhueta contra o horizonte ocidental iluminado podendo assim ser observados perfeitamente.

12.2 Figuras



Figura 1: Colecta de mosquitos enxameando



Figura 2: Mosquitos recém colectados, na rede entomológica modificada por Marchand



Figura 3: Local de formação de enxames, Casa n.º 922', descrito pela figura 2f, em Massavasse

Tabela 3: Mosquitos colectados saindo da casa n.º 922, no dia 28/02/2005, na localidade de Furvela, distrito de Morrumbene, Província de Inhambane.

Tempo(min) em relação ao pôr do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Total de mosquitos colectados	Total de machos	Machos de <i>An. gambiae</i> <i>s.l.</i>	Machos de <i>An. funestus</i> <i>s.l.</i>	Total de fêmeas colectadas	Fêmeas de <i>An. gambiae</i> <i>s.l.</i>	Fêmeas de <i>An. funestus</i> <i>s.l.</i>
00:00	-	-	-	-	-	-	-	-
00:03	-	-	-	-	-	-	-	-
00:06	-	8	4	2	2	0	0	0
00:09	-	27	23	14	9	4	4	0
00:12	-	35	23	13	10	12	4	8
00:15	-	33	14	7	7	19	8	11
00:18	-	49	5	2	3	44	23	21
00:21	-	25	0	0	0	25	19	6
00:24	-	25	0	0	0	25	21	4
00:27	-	9	0	0	0	9	7	2
00:30	-	12	0	0	0	12	9	3
00:33	-	3	0	0	0	3	0	0

Tabela 4: Mosquitos colectados saindo da casa nº 045, no dia 30/03/2005 em Massavasse, distrito de Chókwè, Província de Gaza.

Tempo(min) em relação ao pôr do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Total de mosquitos colectados	Total de machos	Machos de <i>An. gambiae</i> <i>s.l.</i>	Machos de <i>An. funestus</i> <i>s.l.</i>	Total de fêmeas colectadas	Fêmeas de <i>An. gambiae</i> <i>s.l.</i>	Fêmeas de <i>An. funestus</i> <i>s.l.</i>	Outras Espécies
00:00	-	0	0	0	0	0	0	0	0
00:03	-	0	0	0	0	0	0	0	0
00:06	-	2	2	2	0	0	0	0	0
00:09	-	9	8	6	2	1	0	1	0
00:12	-	26	20	12	8	6	4	2	0
00:15	-	49	37	20	17	12	6	6	0
00:18	-	77	20	15	5	57	17	40	0
00:21	-	71	1	1	0	70	23	47	0
00:24	-	51	0	0	0	51	22	29	0
00:27	-	12	0	0	0	12	12	0	0
00:30	-	13	0	0	0	11	1	12	0
00:33	-	0	0	0	0	0	0	0	1♀ <i>Culex sp</i>

Tabela 7: Médias de mosquitos colectados saindo da casa n ° 922, por intervalos de 3 minutos em 3 tardes na localidade de Furvela, distrito de Morrumbene, Província de Inhambane.

Tempo(min) em relação ao pôr do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Total de mosquitos colectados	Total de machos	Machos de <i>An. gambiae</i> s.l.	Machos de <i>An. funestus</i> s.l.	Total de fêmeas colectadas	Fêmeas de <i>An. gambiae</i> s.l.	Fêmeas de <i>An. funestus</i> s.l.
00:00	230	0	0	0	0	0	0	0
00:03	140	3	1	1	0	0	0	0
00:06	84	14	6	4	2	0	0	0
00:09	48	21	17	10	7	1	1	0
00:12	23	29	24	15	10	5	2	3
00:15	10	32	12	7	5	15	7	8
00:18	4	25	6	2	3	28	16	12
00:21	1	21	1	1	0	20	14	6
00:24	0	11	0	0	0	17	13	4
00:27	0	8	0	0	0	7	5	2
00:30	0	1	0	0	0	4	3	1
00:33	0	0	0	0	0	1	0	0

Tabela 9: Médias de mosquitos colectados saindo das casas nº 922 em Furvela e 045 em Massavasse por intervalos de 3 minutos em 3 tardes

Tempo(min) em relação ao pôr do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Total de mosquitos colectados	Total de machos	Machos de <i>An. gambiae s.l.</i>	Machos de <i>An. funestus s.l.</i>	Total de fêmeas colectadas	Fêmeas de <i>An. gambiae s.l.</i>	Fêmeas de <i>An.funestus s.l.</i>
00:00	220	2	2	2	0	0	0	0
00:03	129	4	3	2	0	0	0	0
00:06	78	12	8	6	2	0	0	0
00:09	43	19	16	10	7	2	1	0
00:12	20	34	29	17	13	5	3	3
00:15	9	43	22	13	10	18	-12	6
00:18	4	43	12	5	6	35	17	18
00:21	1	34	3	1	2	32	17	15
00:24	0	22	1	1	0	24	15	10
00:27	0	11	0	0	0	10	8	3
00:30	0	5	0	0	0	5	3	3
00:33	0	0	0	0	0	1	0	0

Tabela n ° 10: Relação entre actividade e pôr do sol de mosquitos numa gaiola. Massavasse, distrito de Chókwè, Província de Gaza, 02/04/2005.

Tempo em relação a hora do pôr do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Actividade (% de mosquitos voando)
-00:05	13	0
00:00	8	0
00:05	3	15
00:10	0	75
00:15	0	80
00:20	0	90
00:25	0	90
00:30	0	80
00:35	0	40
00:40	0	25
00:45	0	20
00:50	0	15
00:55	0	5
00:60	0	5
00:65	0	2

Tabela n ° 11: Relação entre actividade e pôr do sol de mosquitos numa gaiola. Massavasse, distrito de Chókwè, Província de Gaza, 03/04/2005.

Tempo em relação a hora do pôr do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Actividade (% de mosquitos voando)
-00:05	10	0
00:00	4	1
00:05	1	10
00:10	0	75
00:15	0	90
00:20	0	90
00:25	0	90
00:30	0	85
00:35	0	75
00:40	0	50
00:45	0	25
00:50	0	15
00:55	0	10
00:60	0	2
00:65	0	0

Tabela n ° 12: Relação entre actividade e pôr do sol de mosquitos numa gaiola. Massavasse, distrito de Chókwè, Província de Gaza; Médias dos dias 02 e 03/04/2005.

Tempo em relação a hora do pôr do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Actividade (% de mosquitos voando)
-00:05	12	0
00:00	6	1
00:05	2	13
00:10	0	75
00:15	0	85
00:20	0	90
00:25	0	90
00:30	0	83
00:35	0	58
00:40	0	38
00:45	0	23
00:50	0	15
00:55	0	8
00:60	0	4
00:65	0	1

Tabela n ° 13: Relação entre actividade e nascer do sol de mosquitos numa gaiola. Massavasse, distrito de Chókwè, Província de Gaza, 03/04/2005.

Tempo em relação a hora de nascimento do sol	Intensidade luminosa (Lux)	Actividade (% de mosquitos voando)
-00:05	4	5
00:00	7	5
00:05	9	5
00:10	12	5
00:15	19	5
00:20	26	5
00:25	31	4
00:30	35	4
00:35	43	3
00:40	52	3
00:45	60	3
00:50	77	3
00:55	97	2
00:60	114	1
00:65	124	1

Tabela n.º 14: Mosquitos machos colectados nos exames em Massavasse, Distrito de Chókwè, Província de Gaza entre 09/03/2005 a 19/04/2005.

Enxame	Data de Colecta	Número da casa	Locais de formação dos exames	Número de machos colectados			
				<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>An. funestus</i> s.l.	<i>An. pharoensis</i>	<i>Culex sp.</i>
1	09/03/2005	922	-	43	61	0	0
2	10/03/2005	045	A	10	11	0	0
3	10/03/2005	045	B	12	1	0	0
4	10/03/2005	045	C	8	0	0	1
5	14/03/2005	045	D	3	0	6	10
6	15/03/2005	045	A	1	0	0	1
7	16/03/2005	045	E	0	1	0	0
8	16/03/2005	045	D	0	0	14	10
9	17/03/2005	922	A	0	7	0	0
10	17/03/2005	922	B	0	11	0	0
11	17/03/2005	922	C	1	0	10	0
12	17/03/2005	922	D	9	0	234	0
13	17/03/2005	922	E	0	0	110	0
14	18/03/2005	922	F	57	0	0	0
15	18/03/2005	922	C'	0	2	14	0
16	18/03/2005	922	E	1	0	3	0
17	18/03/2005	922	E'	0	0	107	4
18	19/03/2005	922	C	6	0	0	2
19	19/03/2005	922	G	5	0	0	0
20	19/03/2005	922	H	0	1	50	3
21	22/03/2005	922	J	0	5	0	0
22	22/03/2005	922	G	2	0	1	4 ♀
23	22/03/2005	922	I	14	0	0	0
24	22/03/2005	922	C	0	31	0	1 ♀
25	23/03/2005	922	B	2	27	0	2
26	23/03/2005	922	G	11	0	0	1
27	23/03/2005	922	I	25	0	0	0
28	24/03/2005	922	J	0	23	0	0
29	24/03/2005	922	D	7	2	0	0
30	24/03/2005	922	F	2	0	0	0
31	24/03/2005	922	I	19	0	0	0
32	24/03/2005	922	E'	5	1	0	0
33	31/03/2005	3175	-	4	-	-	-
34	30/03/2005	3175	-	14	-	-	-
35	19/04/2005	045	-	30	-	-	-
Total				218	184	548	29♂e 5♀

Tabela nº15: Mosquitos machos colectados nos enxames em Furvela,
Distrito de Morrumbene, Província de Inhambane entre 17/02/2005 a 03/03/2005.

Enxame	Data de Colecta	Número da casa	Local de formação dos enxames	Número de machos colectados	
				<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>An. funestus</i> s.l.
1	17/02/2005	1336	B	31	-
2	18/02/2005	922	B	3	10
3	20/02/2005	922	B	8	2
4	21/02/2005	922	B	8	0
5	21/02/2005	1336	B	2	-
6	22/02/2005	1336	A	6	-
7	25/02/2005	922	B	2	-
8	28/02/2005	1336	A	6	-
9	01/03/2005	922	A	10	4
10	01/03/2005	1336	B	6	0
11	02/03/2005	922	A	1	8♂ e 1♀
12	02/03/2005	1336	A	9	0
13	03/03/2005	992	A	3	3
Total				95	28

Tabelas de ANOVA

ANOVA: Single Factor *An. gambie s.l.*

Tabela nº 1: Resultado de análise de variância comparando as médias dos comprimentos de asas de mosquitos colectados enxameando, repousando e saindo das habitações.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.00831	2	0.004155	0.248559554	0.780764	3.15884563
Within Groups	0.95283	949	0.016716			
Total	0.96114	951				

ANOVA: Single Factor *An. funestus s.l.*

Tabela nº 2: Resultado de análise de variância comparando as médias dos comprimentos de asas de mosquitos colectados enxameando, repousando e saindo das habitações.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.00657	2	0.003285	0.314299	0.731558	3.158846
Within Groups	0.595755	724	0.010452			
Total	0.602325	726				