



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS DE PORTO NACIONAL  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE,  
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

**OCLÉIA DE SOUSA RODRIGUES SOARES**

**USO DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA ESTUDO DA FAUNA DE  
FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) NO ESTADO DE TOCANTINS,  
BRASIL**

Porto Nacional/TO

2023

**OCLÉIA DE SOUSA RODRIGUES SOARES**

**USO DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA ESTUDO DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA, PSYCHODIDAE) NO ESTADO DE TOCANTINS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Dra. Paloma Helena Fernandes  
Shimabukuro

Porto Nacional  
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- O16u Soares, Ocléia de Sousa Rodrigues.  
Uso de código de barras de DNA para estudo da fauna de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) no estado de Tocantins, Brasil. / Ocléia de Sousa Rodrigues Soares. – Porto Nacional, TO, 2023.  
50 f.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, 2023.  
Orientadora : Paloma Helena Fernandes Shimabukuro  
1. Phlebotominae. 2. DNA Barcode. 3. Taxonomia molecular. 4. Cavema. I.  
Titulo

**CDD 577**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**OCLÉIA DE SOUSA RODRIGUES SOARES**

**USO DE CÓDIGO DE BARRAS DE DNA PARA ESTUDO DA FAUNA DE  
FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) NO ESTADO DE TOCANTINS,  
BRASIL**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, foi avaliada para obtenção do título de mestre em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, e aprovada em sua forma final pela orientadora e banca examinadora.**

Data da aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro-IRR

---

Dra. Glaucilene da Silva Costa

---

Dr. Felipe Dutra Rego

Dedico este trabalho aos grandes amores da  
minha vida: meus filhos, minha mãe e meu  
esposo.

## AGRADECIMENTOS

A Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses, município de Palmas/TO, que cedeu veículo e armadilhas para captura de flebotomíneos;

Ao de Laboratório de Entomologia da Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses por ceder espaço e equipamentos para que eu pudesse processar as amostras para identificação morfológica;

A todos os integrantes do Laboratório de Entomologia da Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses, Anivaldo Romeiro Vasco, Oziel Vieira Oliveira, Leonard Diniz e Anderson Soares Brito pelo acolhimento e ajuda prestada com montagem dos flebotomíneos em lâminas e identificação dos mesmos;

Ao Instituto René Rachou, Fiocruz/Minas, em especial ao Grupo de Estudos em Leishmanioses, pelo apoio para que eu pudesse desenvolver a dissertação;

À Renata de Barros Ramos Oliveira e Caroline Penido Rocha da Plataforma de Sequenciamento de DNA Sanger do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas.

A todos os integrantes do grupo de Estudo em Leishmanioses do Instituto René Rachou pelo acolhimento durante o período que estive lá para processamento das amostras;

Em especial a minha orientadora Paloma Helena, pela disposição em me orientar, pelo carinho, dedicação e ainda pela compreensão nos momentos difíceis pelos quais passei. Só tenho a lhe dizer muito obrigada!

Ao meu colega de trabalho e amigo Arquimedes Pereira Terêncio, que com sol ou chuva me acompanhou para montagem e recolhimento das armadilhas;

Aos colegas de trabalho e motoristas, Edivaldo Bessa Lessa, Eder Castro, Evaldo e Davi Cavalcante que também estiveram comigo durante as coletas;

À Coordenadora do Controle Vetorial, Lara Betânia Melo, pela compreensão nos momentos que estive ausente para execução de demandas da Pós-graduação.

## RESUMO

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Considerados vetores naturais de agentes infecciosos, como vírus, bactérias e protozoários, dentre estes *Leishmania*, que causam as leishmanioses no homem e em outros animais. Cerca de 1.003 espécies ou subespécies são reconhecidas, das quais aproximadamente 537 estão presentes nas Américas, sendo 277 registradas no Brasil. No estado de Tocantins (TO), até o momento foram registradas 70 espécies, e destas, 32 ocorrem no Distrito de Taquaruçu, município de Palmas. Os estudos realizados sobre a fauna de flebotomíneos e registro de novas espécies no estado de Tocantins, utilizou-se apenas identificação através de análises morfológicas. Considerando o uso de dados morfológicos por si só pode subestimar ou superestimar o número de espécies, o presente trabalho tem como objetivo realizar a identificação molecular de espécies de flebotomíneos capturadas no município de Palmas/TO, utilizando-se o fragmento parcial do gene *citocromo c oxidase subunidade I (COI)*. Portanto, realizou-se coletas mensais, durante três noites consecutivas, no período de janeiro a junho, em quatro pontos: Caverna Boa Esperança, Gruta do Evilson, Chácara Serra do Carmo e Chácara do Iago, com armadilhas luminosas modelo HP. Antes do processamento dos insetos (diafanização e montagem), foi realizada a coleta e congelamento a -20°C das pernas de cada exemplar para sequenciamento e posterior identificação molecular. A identificação morfológica dos espécimes revelou 28 espécies distribuídas em 13 gêneros. Três espécies (*Deanemyia samueli*, *Pintomyia gruta*, *Psathyromyia barretti*), ainda não haviam sido registradas no estado de Tocantins, desta forma, a fauna flebotomínica do município e do estado fica composta, até o momento, por 35 e 73 espécies, respectivamente. *Edentomyia* sp. e *Lutzomyia (Lutzomyia)* sp., provavelmente são espécies ainda não descritas, e novos estudos são necessários para verificar sua real identidade taxonômica. O uso do DNA barcode mostrou-se eficiente para identificação das espécies de flebotomíneos do estado de Tocantins, e revelou a existência de diversidade críptica em três espécies, *Nyssomyia whitmani*, *Psychodopygus* sp. série Chagasi e *Psathyromyia aragaoi*, porém a quantidade de amostras sequenciadas é um fator que influencia a eficácia da técnica do DNA Barcode. Dessa forma, o presente estudo encontrou dois obstáculos no que diz respeito à identificação das espécies com o uso de sequências *COI*: o número reduzido de amostras analisadas para algumas espécies, assim como a falta de sequências depositadas no GenBank.

Palavra-chave: Phlebotominae, DNA Barcode, taxonomia molecular, caverna, diversidade alfa.

## ABSTRACT

Sandflies are insects belonging to the order Diptera, family Psychodidae, and subfamily Phlebotominae. Considered natural vectors of infectious agents, such as viruses, bacteria and protozoa, including *Leishmania*, which cause leishmaniasis in humans and other animals. About 1,003 species or subspecies are recognized, of which approximately 537 are present in the Americas, 277 of which are registered in Brazil. In the state of Tocantins (TO), so far, 70 species have been recorded, and of these, 32 occur in the District of Taquaruçu, municipality of Palmas. The studies carried out on the sand fly fauna and recorded of new species in the state of Tocantins, when only identification through morphological analysis was used. Considering the use of morphological data alone can underestimate or overestimate the number of species, the present work aims to carry out the molecular identification of sand fly species captured in the municipality of Palmas/TO, using the partial fragment of the *cytochrome c gene subunit I oxidase (COI)*. Therefore, monthly collections were carried out during three consecutive nights, from January to June, at four sites: Cave Boa Esperança, Grotto's Evilson, and Chácara Serra do Carmo and Chácara do Iago, with HP model light traps. Before processing the insects (clearing and mounting), the legs of each specimen were collected and frozen at -20°C for sequencing and subsequent molecular identification. The morphological identification of the specimens revealed 28 species distributed in 13 genera. Three species (*Deanemyia samueli*, *Pintomyia gruta*, *Psathyromyia barretti*), had not yet been registered in the state of Tocantins, thus, the sand fly fauna of the municipality and the state is composed, so far, of 35 and 73 species, respectively. *Edentomyia* sp. and *Lutzomyia (Lutzomyia)* sp., are probably still undescribed species, and new studies are needed to verify their real taxonomic identity. The use of DNA barcode proved to be efficient for identifying sand fly species in the state of Tocantins, and revealed the existence of cryptic diversity in three species, *Nyssomyia whitmani*, *Psychodopygus* sp. Chagasi series and *Psathyromyia aragaoi*, but the number of sequenced samples is a factor that influences the efficiency of the DNA Barcode technique. Thus, the present study encountered two obstacles with regard to the identification of species using *COI* sequences: the reduced number of samples analyzed for some species, as well as the lack of sequences deposited in GenBank.

Keyword: sandflies, DNA Barcode, molecular taxonomy, cave, alpha diversity.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Regiões amostrais para coleta de flebotomíneos no município de Palmas/TO.....	20
Figura 2 - Pontos de coleta distrito de Taquaruçu e Região Norte – Palmas/TO.....	21
Figura 3 - Gêneros pertencentes a subfamília Phlebotominae amostrados com armadilha HP em Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.....	26
Figura 4 - Amostras número 1 a 19 visualizadas com uso de transiluminador Loccus L-PIX, mostrando o alvo da região <i>COI</i> do gene mtDNA amplificado.....	28
Figura 5 - Árvore inferida pelo método de máxima verossimilhança, baseada no modelo GTR+GAMMA, suporte dos ramos a partir do método aLRT, a análise envolveu 133 sequencias do fragmento do gene <i>COI</i> de flebotomíneos do estado de Tocantins.....	31
Figura 6 - Árvore inferida pelo método de Neighbour-joining, baseada no modelo Maximum Composite Likelihood, valores de suporte de bootstrap (2000) replicas a analise envolveu 133 sequencias do fragmento do gene <i>COI</i> de flebotomíneos do estado de Tocantins e 27 sequencias de outras localidades.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Regiões amostrais com suas respectivas localidades e sítios de captura de flebotomíneos com armadilha modelo HP, no município de Palmas/TO no período de janeiro a maio de 2022.....	20
Tabela 2 - Reagentes utilizados para a reação de amplificação do alvo <i>COI</i> de flebotomíneos capturados no município de Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.....	22
Tabela 3 - Reagentes usados para preparo do master mix para a PCR fragmento do gene <i>COI</i> , de flebotomíneos capturados no município de Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.....	23
Tabela 4 - Flebotomíneos amostrados com armadilha HP no Município de Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.....	27
Tabela 5 - Identificação molecular das sequências <i>COI</i> pelo algoritmo BlastN (GenBank) .....	29
Tabela 6 - Estimativa de divergência evolutiva entre sequencias, as análises foram conduzidas usando o modelo Maximum Composite Likelihood, as posições de códon incluídas foram 1st+2nd+3rd+Noncoding.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
Bi.	<i>Bichromomyia</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Too</i>
BOLD	<i>DNA Barcode of Life Data System</i>
Br.	<i>Brumptomyia</i>
C	Citosina
COI	<i>Citocromo C oxidase subunidade I</i>
De.	<i>Deanemyia</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Ev.	<i>Evandromyia</i>
G	Guanina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRR	Instituto René Rachou
Lu.	<i>Lutzomyia</i>
Mi.	<i>Micropygomyia</i>
ML	Máxima Verossimilhança
mtDNA	DNA mitocondrial
NJ	Neighbour-joining
Ny.	<i>Nyssomyia</i>
Pa.	<i>Psathyromyia</i>
PB	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pi.	<i>Pintomyia</i>
Ps.	<i>Psychodopygus</i>
Sc.	<i>Sciopemyia</i>
SEPLAN	Secretaria de Planejamento
T	Timina
TO	Tocantins
UVCZ	Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Biologia e Ecologia de Phlebotominae</b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Taxonomia da Subfamília Phlebotominae</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Identificação de espécies baseado no Código de Barras de DNA</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>O estado da arte</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Área de estudo</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Captura dos flebotomíneos</b>	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Processamento das amostras</b>	<b>23</b>
3.3.1	Identificação morfológica dos flebotomíneos	23
3.3.2	Identificação molecular	24
<b>3.4</b>	<b>Análise descritiva</b>	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise das Sequências</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Estudo Descritivo da fauna de flebotomíneos</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise filogenética do sequenciamento <i>COI</i></b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Biologia e Ecologia de Phlebotominae

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente no Brasil, dependendo do estado ou da região, como mosquito palha, asa dura, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua e arrepiado (BRASIL, 2014). Esses insetos são vetores naturais de agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias e protozoários, dentre estes *Leishmania*, que causam as leishmanioses no homem e outros animais (SHAW et al., 2003).

Quando comparados aos demais insetos de sua família, possuem um corpo mais delgado, (medindo de 2 a 3 mm de comprimento) pernas mais longas e finas (BRAZIL & BRAZIL, 2003; SHERLOCK, 2003). Apresentam uma coloração que pode variar de castanho claro a escuro com corpo coberto por um grande número de cerdas, dando-lhes um aspecto piloso (KILLICK-KENDRICK, 1999). Possuem asas lanceoladas, estreitas, hialinas e densamente revestidas de cerdas longas. Essas, quando em repouso, permanecem eretas e fletidas para cima (BRAZIL & BRAZIL, 2003; SHERLOCK, 2003).

Os flebotomíneos são conhecidos por fazerem voos curtos e saltado, por isso são conhecidos como maus voadores, o que reforça a hipótese de que estes insetos não se afastam muito dos criadouros e a sua dispersão máxima geralmente não excede um quilômetro (DOHA et al., 1991; MORRISON et al., 1993; READY, 2013). Contudo, estudos realizados para testar a capacidade de voo desses insetos demonstraram ampla capacidade de voo em seu habitat natural (TONELLI et al., 2021).

Ambos os sexos alimentam-se de secreções açucaradas de plantas ou de secreções produzidas por pulgões homópteros, que são fontes de energia imprescindíveis para as atividades de voo, acasalamento, postura e longevidade (MOORE et al., 1987; PETTS et al., 1997), porém as fêmeas precisam de uma dieta sanguínea para completarem o desenvolvimento dos seus ovos e assim prosseguir com a oviposição e manutenção do ciclo biológico (FORATTINI, 1960; RANGEL & LAINSON, 2003). Tal ciclo envolve uma fase de ovo, quatro estádios larvários, seguido de pupa e o estágio final de adulto alado, portanto são classificados como holometábolos (MONTEIRO, 2012). Cada estágio pode ter duração variável de acordo com a espécie, alimentação e condições climáticas. A diversidade vegetal, animal e os fatores microclimáticos que caracterizam as florestas tropicais fornecem recursos alimentícios, abrigos e condições ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento dos flebotomíneos,

influenciando a abundância e diversidade dessas comunidades (SILVA et al., 2007; FERREIRA et al., 2013).

Naturalmente, os flebotomíneos são de ambientes silvestres, com hábito crepuscular e noturno. Durante o dia, permanecem em locais protegidos, abrigam-se nas copas ou nas bases das árvores (occos, troncos e raízes tubulares), no chão entre as folhas secas caídas, dentro de cavernas, em frestas de rochas, dentro de tocas de animais, entre outros locais que oferecem proteção (TEODORO et al., 1993; CASANOVA et al., 2013; DUTRA-REGO et al., 2022). Porém, as mudanças ambientais provocadas por fenômenos naturais ou pela intervenção humana, como a destruição da vegetação nativa, a ocupação humana desordenada e invasão de áreas florestais têm alterado os habitats naturais desses insetos (PESSOA et al., 2007; VALDERRAMA et al., 2011; MORALI et al., 2013). Estudos em áreas antropizadas, retratam o encontro de flebotomíneos, em abrigos de animais como, galinheiro, chiqueiro, estábulo, curral e sob material acumulado nos quintais das habitações. Em ambiente domiciliar, são encontrados nas paredes internas e externas dos domicílios (SANTINI et al., 2017; MACHADO et al., 2017).

Fatores antropogênicos tendem a alterar a composição e o comportamento das populações de flebotomíneos. Enquanto algumas espécies tendem a ter sua população reduzida ou até mesmo desaparecer, outras tornam-se mais abundantes e adaptam-se aos ambientes sinantrópicos, (TRAVI et al., 2002, NIEVES et al., 2014). Estudos mostram que a modificação antropogênica pode favorecer certas espécies a colonizar esse tipo de ambiente, como relatado para *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia gomezi* e *Nyssomyia whitmani* (PETERSON et al., 2003; DE ALMEIDA et al., 2013; NIEVES et al., 2014).

Com a fragmentação florestal e urbanização, aliado às condições do microclima (temperatura e umidade) novos habitats tornam-se disponíveis para a colonização e podem favorecer o crescimento populacional de vetores (KOENKAADT et al., 2004). Como resultado das adaptações aos diferentes ecótopos, as subpopulações começam a evoluir independentemente e, portanto, acumular diferenças genéticas que acabam por levar à especiação. Em caso de especiação, uma subpopulação perde a capacidade de acasalar com sucesso com outras subpopulações, e com o tempo essas adaptações se refletem nas diferenças morfológicas que acabam por diferenciar as populações (JIMENEZ et al., 2000; TRAVI et al., 2002). Nesse sentido, variações morfológicas foram observadas em *Lutzomyia longipalpis*, Mangabeira (1969), foi o primeiro a notar diferenças morfológicas em machos de diferentes

localidades do Brasil. Posteriormente, Ward et al. (1983), confirmaram os achados de Mangabeira; machos coletados no Pará tinham um par de manchas brancas no 4º tergito abdominal enquanto que os machos coletados no Ceará tinham dois pares de manchas brancas no 3º e 4º tergitos. Em seguida, os autores mostraram que as duas formas eram isoladas reprodutivamente, sugerindo que poderiam ser espécies crípticas (WARD et al., 1985).

Estudos moleculares de nove diferentes populações de *Lu. Longipalpis*, sob uma perspectiva macrogeográfica, também evidenciaram diferenças genéticas entre essas populações de diferentes regiões do Brasil, sugerindo a existência de três clusters (CESARIL et al. 2019).

## 1.2 Taxonomia da Subfamília Phlebotominae

A classificação dos flebotomíneos sempre foi um assunto controverso, principalmente no que se refere aos níveis de gênero e subgênero. Nas Américas, as primeiras espécies de flebotomíneos foram descritas por Coquillett (1907), e no Brasil os responsáveis pela primeira descrição de flebotomíneos foram Lutz & Neiva (1912). O primeiro subgênero denominado *Lutzia*, para a espécie *Phlebotomus longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912), foi criado por França (1920), utilizando fundamentalmente a morfologia externa da genitália masculina e em 1924, França substituiu o nome *Lutzia*, pré-ocupado, por *Lutzomyia*.

Muitos sistemas de classificação para flebotomíneos foram propostos desde Newstead (1911), e diferentes gêneros e subgêneros foram criados desde então (FRANÇA, 1919; FRANÇA & PARROT, 1920; NITZULESCU 1931; MANGABEIRA 1941; THEODOR 1948; FAIRCHILD 1955; BARRETO 1962; THEODOR 1965; MARTINS & SILVA 1965; DUCKHOUSE 1973; YOUNG & FAIRCHILD 1974; ABONNENC & LEGER 1976a; LEWIS et al., 1977; ARTEMIEV, 1991).

Nas Américas atualmente existem dois sistemas de classificação:

- a) uma classificação proposta por Lewis et al. (1977) e posteriormente revisada por Young & Duncan (1994), intitulada “Guia para identificação e distribuição geográfica de *Lutzomyia* no México, América do Sul e Central e oeste da Índia”, na qual os flebotomíneos neotropicais são alocados em três gêneros: *Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921; e *Warileya* Hertig, 1948. Esta chave de identificação prioriza a classificação a partir da observação de poucas estruturas, como: a relação entre o tamanho dos segmentos da antena, morfologia dos ascóides,

dos palpos, do lábio, extensão da sutura interocular, cibário em fêmeas, presença ou não de espinhos femurais, genitália masculina, genitália feminina e espermateca.

- b) A classificação proposta por Galati (1995), que reorganizou os grupos e classificou a subfamília Phlebotominae em duas tribos: Hertigiini Abonnenc & Leger, 1976 e Phlebotomini Rondani, 1840. Hertigiini em duas subtribos: Hertigiina Hertigia Fairchild, 1949; para a América e Idiophlebotomina Artemiev, 1991, para o Velho Mundo e Austrália, e Phlebotomini em seis subtribos: Australophlebotomina Artemiev, 1991 e Phlebotomina Rondani, 1840, para o Velho Mundo e as espécies americanas foram incluídas nas subtribos Brumptomyiina Artemiev, 1991, Sergentomyiina Artemiev, 1991, Lutzomyiina Abonnenc & Leger, 1976, e Psychodopygina Galati, 1995 (GALATI, 2003). Galati (2003), agrupa as espécies em 23 gêneros e 20 subgêneros dos 530 táxons (513 atuais e 17 fósseis) descritos para o continente Americano.

Tradicionalmente, em ambas as classificações, as espécies foram identificadas e descritas usando características morfológicas (YOUNG & DUNCAN, 1994; GALATI, 2003), porém a segunda fornece uma hipótese bem fundamentada sobre as relações de parentesco entre as espécies e gêneros dentro de Phlebotominae.

O uso de dados morfológicos por si só pode subestimar ou superestimar o número de espécies, visto que esse método de identificação não consegue reconhecer diferentes componentes de um complexo, e em particular, pode falhar na identificação de espécies crípticas, isto é, subpopulações nos estágios iniciais de especiação que ainda não evoluíram nas diferenças morfológicas (RODRIGUES et al., 2018; PINTO et al., 2015).

Também há ocorrência de fêmeas isomórficas, ou seja, fêmeas que apresentam morfologia muito similar, como é o caso da maioria das fêmeas dos gêneros *Trichophoromyia* Barretto, 1962; *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 e *Trichopygomyia* Barretto, 1962. Além disso, quando apenas uma abordagem morfológica é usada para delinear espécies intimamente relacionadas, estas podem ser consideradas como uma única espécie nominal devido a poucas ou nenhuma diferença morfológica (SOUSA-PAULA et al., 2021).

Outra limitação da identificação exclusivamente morfológica é a complexidade para visualização de algumas estruturas morfológicas que requer uma habilidade e experiência considerável para a identificação taxonômica dos flebotomíneos podendo dificultar a identificação correta dos espécimes.

Verifica-se, assim, que não existe um consenso sobre a classificação dos flebotomíneos das Américas, o que justifica a realização de diferentes métodos de identificação. Atualmente,



métodos como análise cromossômica, morfometria geométrica, criação e colonização em laboratório, isoenzima, análise molecular e filogenética e, mais recentemente, espectrometria de massa, avançaram no sentido de proporcionar uma melhor identificação e classificação dos espécimes de flebotomíneos (AKOUNDI et al., 2016; SOUSA-PAULA et al., 2021).

### 1.3 Identificação de espécies baseado no Código de Barras de DNA

O uso do código de barras de DNA (*DNA Barcode*) tem se tornado uma abordagem econômica e acessível para a avaliação da diversidade biológica (SOUSA-PAULA et al., 2021). A delimitação de espécies por meio desse método, usa um fragmento padronizado de aproximadamente 658 pares de bases (pb), do gene mitocondrial, *citocromo C oxidase subunidade I (COI)*, que é depositado por pesquisadores no banco de dados de sequência, denominado BOLD (*The DNA Barcode of Life Data System*) (RATNASINGHAM et al., 2007; HEBERT et al., 2003).

O uso do *DNA barcode* tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação de espécies de diversos grupos de aves, peixes, anfíbios e artrópodes (HERBERT et al., 2003, 2004a; KERR et al., 2007; WARD et al., 2005, SMITH et al., 2008a). O uso desse método facilitou a identificação e descoberta de novas espécies entre muitos táxons de insetos, incluindo espécies crípticas de flebotomíneos (PINTO et al., 2015; GAJAPATHY et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020). No Brasil, a análise do código de barras de 47 espécies, permitiu que os autores discriminassem corretamente cerca de 90% dos táxons amostrados (42 espécies morfológicamente distintas), quatro espécies apresentaram valores máximo de divergência, indicando diversidade críptica e ainda indicou a necessidade de revisão de táxons dentro do complexo Shannoni (PINTO et al., 2015).

Contudo, há controvérsias no uso do DNA mitocondrial (mtDNA) para identificação de espécies. Esse sistema é dependente da completa cobertura da diversidade de táxons, se sequências de somente parte dos táxons de um determinado grupo estiverem depositadas no banco de dados, a identificação de uma espécie pertencente a esse grupo pode não ser realizada (FRÉZAL et al., 2008).

A taxa de evolução de genes mitocondriais pode ser outro fator prejudicial a eficácia desse método, pois essa taxa pode variar dentro e entre grupos de espécies relacionadas (FREZAL et al. 2008), e isto pode resultar na sobreposição dos níveis de variação intra- e interespecíficos, ou seja, não há uma lacuna entre essas variações. Por exemplo, Rodrigues et al. (2020), em um estudo, por meio do uso de sequências *COI* de flebotomíneos do subgênero

*Evandromyia* (*Aldamyia*), mesmo considerando suas claras diferenças morfológicas, não conseguiram distinguir *Evandromyia carmelinoi* (Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw), *Evandromyia evandroi* (Costa Lima & Antunes) e *Evandromyia lenti* (Mangabeira). Não houve lacuna de código de barras entre esses três táxons do complexo Evandroi. Apesar de Herbert et al. (2003), sugerirem que os valores de distância intraespecífica são menores que os valores de distância interespecífica para o gene mtDNA.

Além do mais, o uso desse único fragmento do mtDNA na identificação das espécies pode não ser informativo o suficiente para descrever a grande diversidade biológica e, consequentemente essa sequência padronizada pode não contribuir com o desafio de identificar táxons e aumentar a taxa de descrição da diversidade biológica (WILL et al., 2004). O fragmento do gene *COI* tem se mostrado bastante efetivo na identificação de diversas espécies animais, mas pode falhar em alguns grupos proximamente relacionados, sendo necessário a análise adicional de regiões nucleares.

#### 1.4 O estado da arte

O Brasil, país de proporções continentais, com clima tropical e densa área silvestre, possui condições favoráveis para abrigar diversas espécies de flebotomíneos. Das 1.003 espécies ou subespécies de flebotomíneos reconhecidas, aproximadamente 530 estão presentes nas Américas, e destas, 277 foram registradas no Brasil (SHIMABUKURO et al., 2017; GALATI, 2003). Esta alta riqueza de espécies no Brasil está associada à diversidade dos biomas, que vai desde florestas tropicais, como Amazônia e a Mata Atlântica, até áreas secas do cerrado e da caatinga.

Segundo Vilela et al. (2015), no estado de Tocantins (TO) foram registradas 70 espécies, e destas, 32 ocorrem no Distrito de Taquaruçu, município de Palmas (MACHADO et al., 2012). Dentre as espécies registradas no Distrito de Taquaruçu as mais abundantes foram: *Micropygomyia villetai* (Mangabeira, 1942), *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), *Evandromyia carmelinoi* (Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, 1986), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). Apesar do estado de Tocantins apresentar alta diversidade (MACHADO et al., 2017), nos estudos realizados até o momento sobre a fauna de flebotomíneos e registro de novas espécies, a identificação das mesmas foi realizada apenas através de análises morfológicas (LUSTOSA et al., 1986; ANDRADE-FILHO et al., 2001, 2004a; VILELA et al., 2011, 2013, 2015; MACHADO et al., 2012, 2017). Sabendo que as

espécies crípticas podem representar uma fração substancial da biodiversidade (STRUCK et al., 2018) e que tanto as espécies crípticas e fêmeas isomórficas só podem ser reconhecidas por métodos mais sensíveis como a análise genética (KORSHUNOVA et al., 2019; STRUCK et al., 2018; SOUSA-PAULA et al., 2021), faz-se necessário estudos moleculares, visto que no estado e conseqüentemente em Palmas podem existir espécies morfologicamente indistinguíveis. Das espécies relatadas no município, encontram-se pelo menos três táxons, *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia whitmani* os quais diferentes linhas de evidências sugerem que esses grupos possuem um número incerto de espécies crípticas (RANGEL et al., 1996; SPIEGEL et al., 2016; SOUZA et al., 2017; SOUSA-PAULA et al., 2021).

Além de ser importante para contribuir com o conhecimento da biodiversidade global, as delimitações precisas de espécies são de importância em muitas áreas, como em biodiversidade (fornecendo números preciosos acerca da riqueza) biologia da conservação (designando espécies ameaçadas), biologia evolutiva (descrevendo padrões de diversificação) (RANNALA et al., 2010) e epidemiologia (quando se trata de vetores de patógenos). No caso dos flebotomíneos, esses insetos apresentam uma alta diversidade críptica e problemas taxonômicos, o que pode ter implicações práticas quando o complexo de espécies refere-se a vetores de patógenos, visto que as medidas de controle e vigilância baseiam-se no conhecimento sobre biologia e a correta identificação das espécies (SOUSA-PAULA et al., 2021).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Descrever a fauna de flebotomíneos no município de Palmas, através da identificação morfológica e molecular e verificar o grau de divergência das sequências obtidas com exemplares de outras regiões do Brasil.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Esse trabalho tem como objetivos específicos:

- I. Descrever a fauna de flebotomíneos coletadas no município, através de identificação morfológica;
- II. Realizar a identificação molecular das espécies de flebotomíneos coletadas no município de Palmas TO;
- III. Comparar as sequencias de DNA de flebotomíneos capturados no município de Palmas/ TO com flebotomíneos provenientes de outros estudos que estejam depositadas no GenBank.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

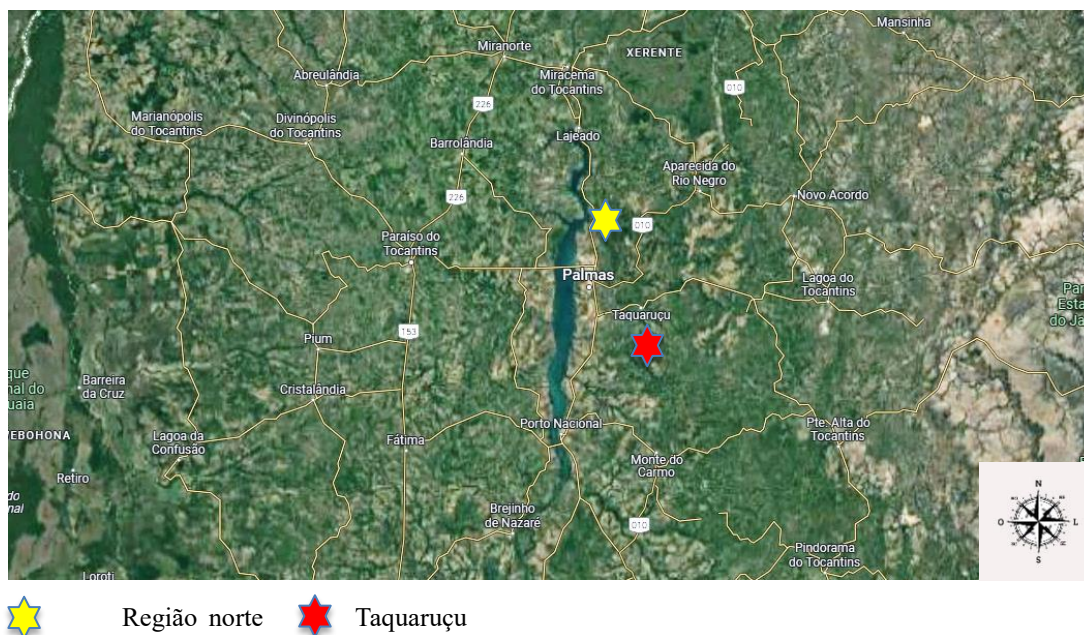
#### 3.1 Área de estudo

O Município de Palmas, capital do estado do Tocantins, possui uma população estimada de 228.332 habitantes, apresenta área de 2.218.943 km<sup>2</sup> (IBGE, 2014). Está situado na região central do estado, nas coordenadas geográficas 10°12'46" de latitude Sul, 48°21'37" de longitude Oeste, altitude média de 260 metros acima do nível do mar. Apresenta clima do tipo úmido subúmido, apresentando moderada deficiência hídrica no inverno (SEPLAN, 2012). A temperatura média de Palmas é de 28 °C e a precipitação média anual varia de 1.600 a 1.700 mm; o ribeirão Taquaruçu Grande, o córrego Brejo Comprido e o ribeirão Água Fria têm destaque na hidrografia da área da cidade; a cobertura natural do solo apresenta vários tipos: Cerrado Sentido Restrito Ralo e Rupestre, Cerrado Sentido Restrito Denso e Típico, Cerradão, Mata Ciliar e de Galeria; os solos são do tipo latossolo vermelho-amarelo (GEOPALMAS, 2015a). Além disso, diferentes formas de relevo estão presentes, tais como: Depressão do Médio Tocantins e Planalto Dissecado do Tocantins (IBGE, 2007).

#### 3.2 Captura dos flebotomíneos

As coletas dos flebotomíneos foram realizadas em propriedades particulares, com autorização prévia dos proprietários, em duas localidades (Figura 1): em um distrito do Município de Palmas, Taquaruçu, sendo um ponto de coleta na caverna Boa Esperança (10°3'86" S; 48°05'35" W) e outro na Gruta do Evilson (10° 2' 31" S; 48° 12' 22" W). Em cada um dos pontos de coleta citados foram instaladas duas armadilhas, uma na zona afótica e outra na zona fótica de cada cavidade. Outras duas armadilhas foram instaladas em chácaras da região Norte de Palmas, Chácara Serra do Carmo (10° 4' 39" S; 48° 20' 8" W) e Chácara do Iago (10° 7' 17" S; 48° 19' 48" W), sendo uma armadilha em cada chácara (Tabela 1). Em cada ponto de captura foram instaladas mensalmente armadilhas luminosas modelo HP (PUGEDO et al., 2005), no período das 18:00 às 6:00 horas, a 1,5 metros acima do nível do solo, por três noites consecutivas (Figura 2). As capturas iniciaram em janeiro de 2022 e finalizaram em maio de 2022, totalizando cinco meses de capturas.

Figura 1 - Regiões amostrais para coleta de flebotomíneos no município de Palmas/TO.



Fonte: o autor, 2022.

Tabela 1 - Regiões amostrais com suas respectivas localidades e sítios de captura de flebotomíneos com armadilha modelo HP, no município de Palmas/TO no período de janeiro a maio de 2022.

Região amostral	Localidade	Sítio amostral	Legenda
Taquaruçu	Caverna Boa Esperança	Zona fótica	PI EXTERNO
		Zona afótica	PI INTERNO
	Gruta do Evilson	Zona fótica	PII EXTERNO
		Zona afótica	PII INTERNO
Região Norte	Chácara Serra do Carmo	Área Silvestre	PIII
	Chácara do Iago	Peridomicílio	PIV

Fonte: o autor, 2023.

Figura 2 - Pontos de coleta, Taquaruçu e Região Norte - Palmas TO.



Fonte: o autor, 2022.

### 3.3 Processamento das amostras

#### 3.3.1 Identificação morfológica dos flebotomíneos

As gaiolas contendo o material resultante das capturas foram transportadas até a Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses (UVCZ) de Palmas, envoltas por sacos plásticos. Os exemplares foram mortos por congelamento e logo após realizou-se a triagem em microscópio estereoscópio binocular. Os flebotomíneos foram acondicionados em tubos de 1,5 mL contendo álcool 70%, com a devida identificação. Antes da realização do processo de clarificação dos espécimes, foi feita a coleta e congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  das pernas de cada exemplar para posterior amplificação do DNA. Para o estudo taxonômico morfológico, os flebotomíneos foram submetidos ao processo de clarificação através do uso de detergente líquido comercial diluído

em água destilada, (1:1), após 12 horas nesta solução, retirou-se os exemplares e foram colocados 15 minutos em solução salina a 0,9%, e em seguida em lactofenol por mais 24 horas. Após retirados do lactofenol, com o uso de microscópio estereoscópio binocular e agulha de insulina estéril, as fêmeas foram dissecadas, separando a cabeça e a porção final do abdome (três últimos segmentos), que foram fixadas em meio de montagem berlese e montadas entre lâmina e lamínula. Os machos foram montados inteiros usando-se o mesmo fixado. A identificação morfológica dos flebotomíneos foi realizada com o uso de microscópio biológico digital (Zeiss Axioscope A1 modelo 11114), no Instituto René Rachou (IRR), seguindo as chaves de identificação e a classificação proposta por Galati (2018).

### 3.3.2 Identificação molecular

#### Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A perna do inseto coletada antes da clarificação e armazenada a -20 °C foi diretamente adicionada ao mix de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) para amplificação do fragmento do gene, *citocromo C oxidase subunidade I (COI)*, do DNA mitocondrial. Para um volume final de 10 µL de mistura de reação, utilizou-se o par de iniciadores LCO1490 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' e HCO2198 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (FOLMER et al., 1994), enzima DNA polimerase Green GoTaq™ mastermix (Promega) e água MilliQ esterilizada (Tabela 2).

Tabela 2 - Reagentes utilizados para a reação de amplificação do alvo *COI* de flebotomíneos capturados no município de Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.

Reagente	Concentração	Volume
Primer LCO1490	2mM	1 µL
Primer HCO2198	2mM	1 µL
Green GoTaq™ mastermix	2X	5 µL
Água MilliQ esterilizada	-	3 µL
Volume final		10 µL

Fonte: o autor, 2023.



A amplificação foi realizada em termociclador Applied Biosystems Proflex PCR System, nas seguintes condições: 95 °C por dois minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 35 ciclos a 95 °C por um minuto para desnaturação 52 °C por um minuto para anelamento, e 72 °C por um minuto e 30 segundos para extensão e de 72 °C por 10 minutos para uma extensão final (PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2020). Como controle positivo usou-se 1 µL DNA de *Lutzomyia longipalpis* e como controle negativo 1 µL de água MilliQ estéril.

A confirmação da PCR foi realizada através de eletroforese, usando-se gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio 5%. Para o preparo do gel usou-se 1 g de agarose para 100 mL de solução tampão TBE 05X. Em cada poço de gel adicionou-se 5 µL das amostras de DNA e 5 µL de marcador peso molecular Kasvi 100 bp e realizou-se uma corrida de 100 watts/hora. Após a eletroforese as bandas foram visualizadas usando transiluminador Loccus L-PIX.

Todas as amostras positivas foram purificadas usando Exosap-It® (Thermo Fisher), no qual foi adicionado 2 µL do reagente e 5 µL do produto da PCR. A mistura foi incubada em banho seco a 37 °C /15 min, seguido de mais 80 °C /15 min. Os fragmentos purificados foram preparados para sequenciamento bidirecional. Para o sentido forward usou-se 1 µL da PCR para 6.75 µL de mastermix, para o sentido reverse foram usados 1 µL da PCR para 6.75 µL de mastermix. Preparo da reação de master MIX para ambos os sentidos, conforme tabela 4.

Os produtos foram sequenciados utilizando-se BigDye Terminator® v3031 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) em sequenciador ABI 3730xL da Plataforma Sequenciamento de DNA por eletroforese capilar do Instituto René Rachou.

Tabela 3 - Reagentes usados para preparo do master mix para sequenciamento do gene COI, de flebotomíneos capturados no município de Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.

Sentido	Primer	Água
Forward	1 µL LCO1490 5mM	5,75 µL
Reverse	1 µL HCO2198 5mM	5,75 µL

Fonte: o autor, 2023.

### 3.4 Análise descritiva

Após identificação dos espécimes através do uso de chave dicotômica, os dados foram tabulados e analisados no software Microsoft Excel (2016).

### 3.5 Análise das Sequências

As sequências “*Forward*” e “*Reverse*” de cada espécime foram conferidas no programa SeqTrace 0.9.0. (<https://bio.tools/seqtrace>) (STUCKY et al. 2018), para avaliação da qualidade. Posteriormente foram editadas manualmente, quando necessário, para gerar as sequências de consenso que foram exportadas no formato FASTA.

Para verificar o posicionamento taxonômico, todas as sequências de consenso foram comparadas com sequências existentes no banco de dados genético GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

O alinhamento das sequências foi feito usando o algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 1994) implementado no software MEGA 11 (TAMURA et al., 2021).

As análises filogenéticas dos arquivos do sequenciamento foram realizadas com o software MEGA 11 (TAMURA et al., 2021) e a partir do alinhamento calculou-se:

- a) a frequência de nucleotídeos para cada sequência;
- b) a frequência de C (sítios conservados), V (sítios variados), Pi (análise de parcimônia), S (singleton);
- c) a estimativa de divergência evolutiva entre sequências (*pairwise genetic distance and overall mean distance*) (TAMURA et al. 2021);
- d) a estimativa do melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos;

Para delimitar as espécies foram conduzidas duas análises:

a) construção de uma árvore de máxima verossimilhança (ML) (FELSENSTEIN, 1981), implementada no programa phyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyML/>), sob o modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G+I, o suporte para os nós foi estimado através de análise de aLRT (approximate Likelihood Ratio Test). As árvores de máxima verossimilhança são construídas para verificação de uma hipótese mais aproximada da real história evolutiva, pois se baseia em métodos evolutivos explícitos.

b) construção de uma árvore de Neighbour-Joining (NJ) (SAITOU et al., 1987), implementada no programa MEGA 11 (TAMURA et al., 2021), as distâncias evolutivas foram

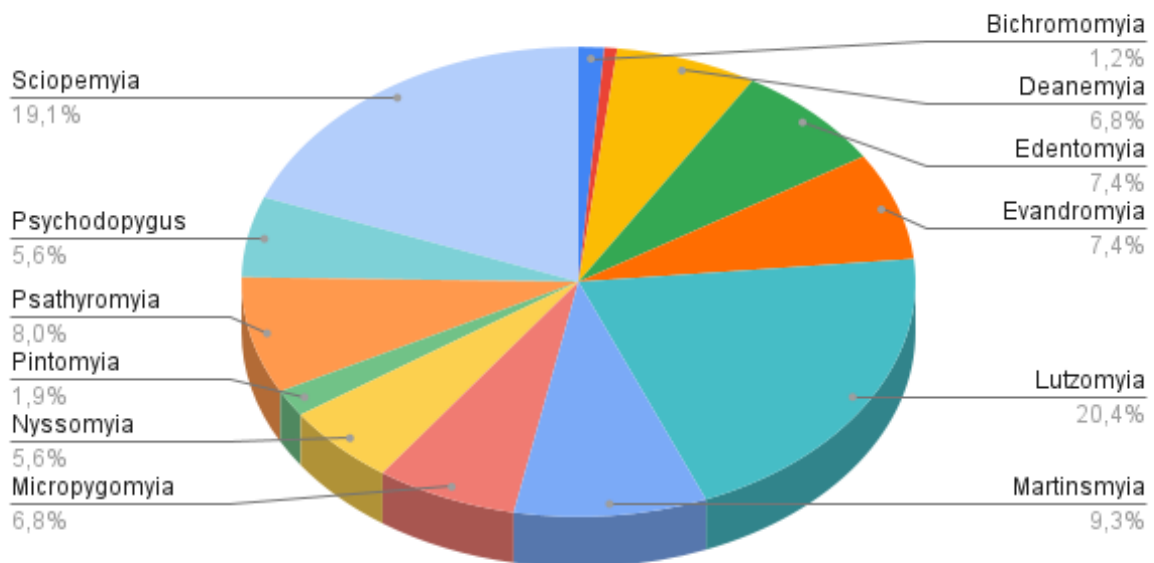
calculadas usando o método Maximum Composite Likelihood (TAMURA et al., 2004), o suporte estatístico dos ramos foi obtido através dos valores de bootstrap com 2.000 replicações ao acaso. Para a construção dessa árvore, criou-se um novo banco de dados com adição de sequências do GenBank com maior grau de similaridade com as sequências de cada espécie deste estudo. A espécie *Sergentomyia hamoni* Abonnenc 1958, código de acesso GenBank (AB787193.1) foi selecionada como grupo externo nas duas árvores. Ambas foram editadas no programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estudo descritivo da fauna de flebotomíneos

A identificação com critérios morfo-anatômicos de uma subamostra de 162 flebotomíneos revelou um total de 28 espécies distribuídas em 13 gêneros. Os gêneros com maior representação foram: *Lutzomyia* com (20,4%), seguido por *Sciopemyia* (19,1%), *Martinsmyia* (9,3%), *Psathyromyia* (8,0%) e *Edentomyia* (7,4%), (Figura 3).

Figura 3 - Gêneros pertencentes a subfamília Phlebotominae amostrados com armadilha HP em Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.



Fonte: o autor, 2023.

A espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) sp.* (França, 1924) (19,75%) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927) (19,13%) foram as mais abundantes entre os espécimes analisadas, seguida por: *Martinsmyia oliveirai* (Martins, Silva & Falcão, 1970) (9,25%); *Edentomyia sp.* (Galati, Andrade Filho, Silva & Falcão, 2003) (7,40%); *Deanemyia samueli* (Deane, 1955) (6,79%) (Tabela 4). Não foi possível atribuir a identidade específica aos exemplares de *Edentomyia sp.*, *Lutzomyia sp.*, *Evandromyia sp.*, e sete (7) exemplares fêmeas do gênero *Psychodopygus* série Chagasi, visto que muitas fêmeas deste gênero são isomórficas (Galati 2003). Do total de espécimes analisados, 59,25% eram fêmeas e 40,75% machos. A

ocorrência de três espécies, *Deanemyia samueli* (Deane, 1955), *Pintomyia gruta* (Ryan, 1986), *Psathyromyia barretti* (Alves & Freitas, 2016) foi observada pela primeira vez no Estado do Tocantins.

Tabela 4 - Flebotomíneos amostrados com armadilha HP no Município de Palmas/TO, no período de janeiro a maio de 2022.

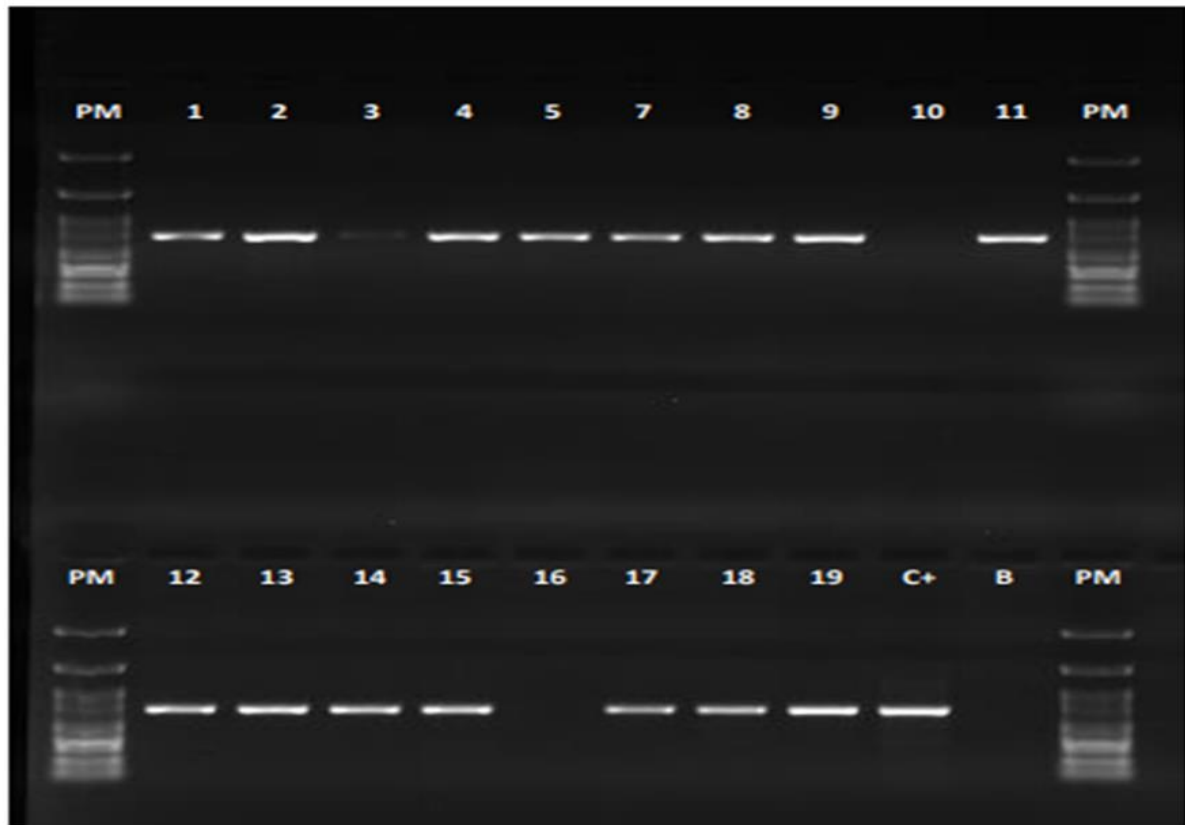
<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>♀</b>	<b>%</b>	<b>♂</b>	<b>%</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
<i>Bichromomyia</i>	<i>Bi. flaviscutellata</i>	1	1,04	1	1,51	2	1,23
<i>Brumptomyia</i>	<i>Br. brumpti</i>	-	-	1	1,51	1	0,61
<i>Deanemyia</i>	<i>De. samueli</i>	8	8,33	3	4,54	11	6,79
<i>Edentomyia</i>	<i>Edentomyia</i> sp.	4	4,16	8	12,12	12	7,40
<i>Evandromyia</i>	<i>Ev. begonae</i>	1	1,04	-	-	1	0,61
	<i>Ev. carmelinoi</i>	2	2,08	2	3,03	4	2,46
	<i>Ev. evandroi</i>	-	-	1	1,51	1	0,61
	<i>Ev. walkeri</i>	1	1,04	-	-	1	0,61
	<i>Ev. lenti</i>	2	2,08	-	0	2	1,23
	<i>Evandromyia</i> sp.	1	1,04	2	3,03	3	1,85
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i> ( <i>Lutzomyia</i> ) sp.	17	17,7	15	15,62	32	19,75
	<i>Lu. longipalpis</i>	1	1,04	-	-	1	0,61
<i>Martinsmyia</i>	<i>Mt. oliveirai</i>	8	8,33	7	10,60	15	9,25
	<i>Mi. acanthopharinx</i>	2	2,08	-	-	2	1,23
	<i>Mi. echinatopharinx</i>	1	1,04	2	3,03	3	1,85
<i>Micropygomyia</i>	<i>Mi. longipennis</i>	2	2,08	1	1,51	3	1,85
	<i>Mi. peresi</i>	2	2,08	1	-	3	1,23
<i>Nyssomyia</i>	<i>Ny. antunesi</i>	-	-	1	1,51	1	0,61
	<i>Ny. whitmani</i>	5	5,20	3	4,54	8	4,93
<i>Pintomyia</i>	<i>Pi. gruta</i>	3	3,12	-	-	3	1,85
<i>Psathyromyia</i>	<i>Pa. aragaoi</i>	3	3,12	2	3,03	5	3,08
	<i>Pa. barretti</i>	-	-	1	1,51	1	0,61
	<i>Pa. brasiliensis</i>	1	1,04	-	-	1	0,61
	<i>Pa. hermalenti</i>	3	3,12	3	4,54	6	3,70
<i>Psycodophygus</i>	<i>Ps. complexus</i>	-	-	1	1,51	1	0,61
	<i>Ps. wellcomei</i>	-	-	1	1,51	1	0,61
	<i>Psycodophygus</i> sp. série Chagasi	7	7,29	-	-	7	4,32
<i>Sciopemyia</i>	<i>Sc. sordellii</i>	20	18,75	11	21,21	31	19,13
<b>Total</b>		<b>96</b>	<b>59,25</b>	<b>66</b>	<b>40,75</b>	<b>162</b>	<b>100</b>

Fonte: o autor, 2023.

#### 4.2 Análise filogenética do sequenciamento *COI*

De um total de 162 espécimes dissecados para montagem de lâmina, 140 foram submetidas a PCR para amplificação direta do alvo *COI*. Após a eletroforese, observou-se um total de 134 amostras amplificadas (Figura 4).

Figura 4 - Amostras número 1 a 19 visualizadas com uso de transiluminador Loccus L-PIX, mostrando o alvo da região *COI* do gene mtDNA amplificado.



PM = Marcador molecular; C += Controle positivo; B= Controle negativo.

Fonte: o autor, 2022.

Todas as amostras amplificadas foram sequenciadas, e após conferência e edição, foi possível obter 133 sequências de consenso (contigs), contendo 658 pb cada.

Para as 133 sequências, a composição média das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) do DNA barcode foram: A = 28,9; T = 38,3; C = 16,9; G = 15,9, respectivamente.

O alinhamento das sequências do gene *COI* para as diferentes espécies analisadas neste estudo apresentou 404 sítios conservados, 254 sítios variáveis, 240 sítios parcimoniosos e 14 *singleton* (mutação única). A distância média observada entre as sequências foi de 0,15.

Segundo o critério AICc (Akaike Information Criterion, corrected) implementado no programa MEGA, o modelo mais indicado para o conjunto de dados foi GTR+G+I, (GTR=General Time Reversible model); G (parâmetro gamma) = heterogeneidade de taxa de substituição entre as posições); I = proporção de sítios invariáveis; Esse modelo considera o máximo de variabilidade existente no conjunto de dados, ou seja, a frequência de todas as bases é diferente, bem como todos os seis pares de substituição nucleotídica (A-C≠A-G≠A-T≠C-G≠C-T≠G-T) (RODRIGUEZ et al., 1990; YANG et al., 1996).

As 133 sequências de consenso representam 23 espécies identificadas morfológicamente até o epíteto específico e 4 apenas até nível de gênero, totalizando 27 espécies com sequenciamento.

De acordo com a identificação molecular gerada pelo algoritmo BlastN no site do NCBI todas as 133 sequências de consenso foram identificadas como pertencentes à subfamília Phlebotominae. Nove (9) (33,33%) exemplares foram identificadas de acordo com a identificação morfológica, dez (10) (37,03%), concordaram apenas até o nível de gênero e oito (8) (29,62%) não foram congruentes com a identificação morfológica (Tabela 5).

Tabela 5 - Identificação molecular das sequências *COI* (658pb) pelo algoritmo BlastN (GenBank)

SEQUEN- CIAS	IDENTIFICAÇÃO MORFOLOGICA	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	SEME- LHANÇA	NÚMERO DE ACESSO
01	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	<i>Bi. flaviscutellata</i>	100,00%	MG234289.1
01	<i>Brumptomyia brumpti</i>	<i>Br. avellari</i>	98,90%	MG234295.1
10	<i>Deanemyia samueli</i>	<i>Mi. micropyga</i>	87,19%	GU909466.1
09	<i>Edentomyia</i> sp.	<i>Mi. venezuelensis</i>	88,04%	GU909484.1
01	<i>Evandromyia begoniae</i>	<i>Evandromyia</i> sp. BOLD: ACK6875	89,18%	KP112550.1
04	<i>Evandromyia carmelinoi</i>	<i>Ev. carmelinoi</i>	99,73%	KP112534.1
02	<i>Evandromyia lenti</i>	<i>Ev. carmelinoi</i>	99,77%	KP112534.1
01	<i>Evandromyia</i> sp.	<i>Evandromyia</i> sp. BOLD: ACK6875	88,87%	KP112550.1
01	<i>Evandromyia walkeri</i>	<i>Ev. walkeri</i>	98,63%	MN181563.1
01	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>Lu. longipalpis</i>	99,39%	KP112586.1
27	<i>Lutzomyia (Lutzomyia)</i> sp.	<i>Lu. dispar</i>	95,82%	KP112578.1
11	<i>Martinsmyia oliveirai</i>	<i>Ny. umbratilis</i>	90,64%	KF467547.1
02	<i>Micropygomyia acanthopharynx</i>	<i>Pi. longiflocosa</i>	90,00%	MT339451.1
03	<i>Micropygomyia echinatopharynx</i>	<i>Lu. longipalpis</i>	89,86%	KP112586.1

Continua na próxima página

SEQUEN- CIAS	IDENTIFICAÇÃO MORFOLOGICA	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	SEME- LHANÇA	NÚMERO DE ACESSO
02	<i>Micropygomyia longipennis</i>	<i>Ny. anduzei</i>	88,55%	KF467591.1
03	<i>Micropygomyia peresi</i>	<i>Mi. trinidadensis</i>	99,35%	MG234371.1
01	<i>Nyssomyia antunesi</i>	<i>Ny. antunesi</i>	99,54%	OP346794.1
08	<i>Nyssomyia whitmani</i>	<i>Ny. whitmani</i>	98,72%	KP112766.1
01	<i>Pintomyia gruta</i>	<i>Ph. perniciosus</i>	88,77%	JN036765.1
05	<i>Psathyromyia aragaoi</i>	<i>Pa. aragaoi</i>	97,69%	KX356042.1
01	<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	<i>Pa. pascalei</i>	89,97%	KP112948.1
05	<i>Psathyromyia hermalenti</i>	<i>Ny. anduzei</i>	89,26%	KF467581.1
01	<i>Psychodopygus complexus</i>	<i>Ps. wellcomei</i>	100%	MH281938.1
01	<i>Psychodopygus</i> sp. série Chagasi	<i>Ps. chagasi</i>	99,85%	MH281893.1
05	<i>Psychodopygus</i> sp. série Chagasi	<i>Ps. wellcomei</i>	100%	MH281938.1
01	<i>Psychodopygus wellcomei</i>	<i>Ps. wellcomei</i>	100%	MH281938.1
25	<i>Sciopemyia sordellii</i>	<i>Sc. sordellii</i>	99,64%	KP113043.1

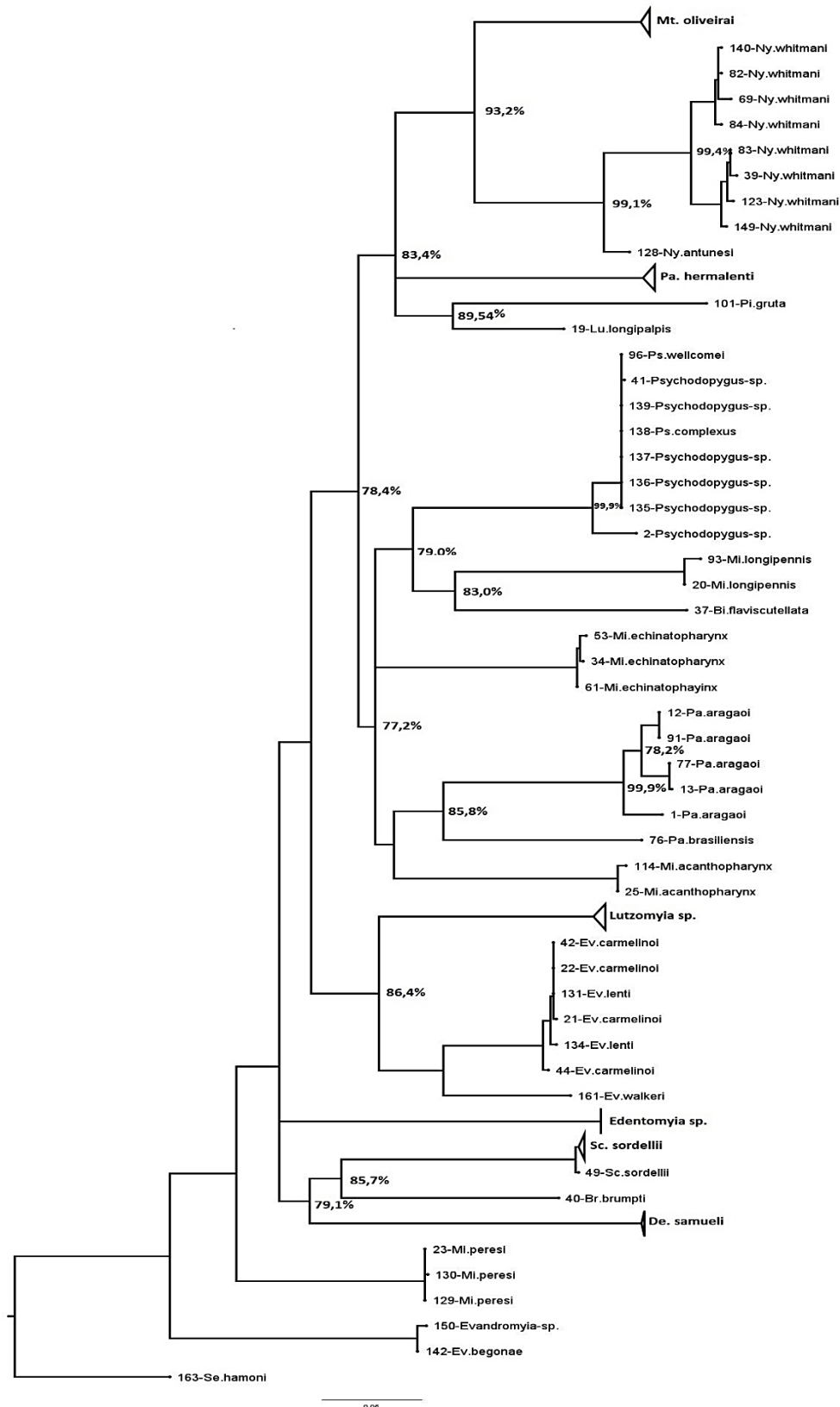
Obs. O número de acesso foi igual para todas as amostras com mais de um exemplar e a semelhança foi obtida através da média.

Fonte: o autor, 2023.

A análise da árvore processada com base no algoritmo de máxima verossimilhança (ML), sob o modelo evolutivo GTR+G+I, mostrou um filograma (Figura 5) onde inicialmente pode ser observado que as espécies *Nyssomyia whitmani*, *Psychodopygus* sp. série Chagasi e *Psathyromyia aragaoi* formaram dois agrupamentos bem definidos em ramos diferentes, com suporte de nó de 99,43%, 99,92%, 99,91%, respectivamente. Enquanto as espécies, *Martinsmyia oliveirai*, *Psathyromyia hermalenti*, *Micropygomyia longipennis*, *Micropygomyia echinatopharynx*, *Micropygomyia acanthopharynx*, *Lutzomyia* sp., *Edentomyia* sp., *Sciopemyia sordellii*, *Deanemyia samueli* e *Micropygomyia peresi*, agruparam-se, cada uma delas, em um único ramo, não havendo diferenças suficiente entre seus haplótipos para sustentar clados diferentes (Figura 5). *Psychodopygus wellcomei*, *Psychodopygus complexus* e cinco espécimes de *Psychodopygus* sp. série chagasi foram agrupadas no mesmo ramo. O mesmo ocorre com as espécies de *Evandromyia lenti* e *Evandromyia carmelinoi*, onde não se observa diferença suficiente entre seus haplótipos para separação dessas espécies (Tabela 6). Observa-se ainda o agrupamento em um único ramo de um espécime de *Evandromyia* sp. com *Evandromyia begonae*. Os resultados acima também podem ser observados na árvore de Neighbour-Joining (Figura 6).



Figura 5 - Árvore inferida pelo método de máxima verossimilhança, baseada no modelo evolutivo GTR+GAMMA, suporte dos ramos a partir do método aLRT, a análise envolveu 133 sequencias do fragmento do gene *COI* de flebotomíneos do estado de Tocantins.



Fonte: o autor, 2023.

Tabela 6 - Estimativa de divergência evolutiva entre sequências, as análises foram conduzidas usando o modelo Maximum Composite Likelihood, as posições de códon incluídas foram 1st+2nd+3rd+Noncoding.

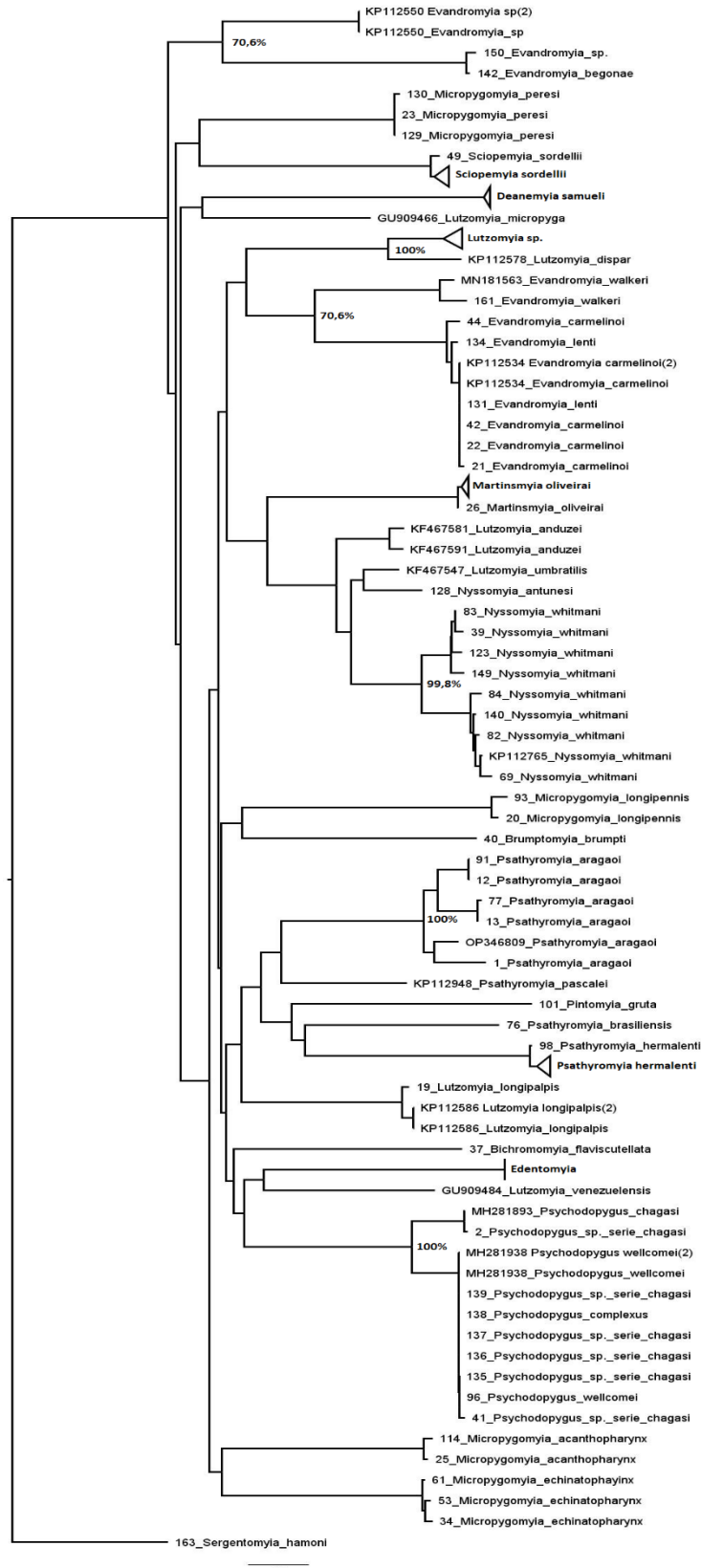
GENERO/ESPECIE	N	DISTANCIA			FREQUENCIA			
		MENOR	MAIOR	MÉDIA	C	V	Si	S
<i>Mi. acanthopharynx</i>	02	0,0045	0,0045	0,00	655	3	0	0
<i>Deanemyia samueli</i>	10	0,0015	0,0030	0,00	656	2	0	2
<i>Mi. echinatopharynx</i>	03	0,0030	0,0046	0,00	654	4	0	4
<i>Edentomyia</i> sp.	09	0,0000	0,0000	0,00	658	0	0	0
<i>Evandromyia</i> sp.	09	0,0014	0,1521	0,08	532	126	91	35
<i>Psathyromyia hermalenti</i>	05	0,0030	0,0061	0,00	651	7	0	7
<i>Mi. longipennis</i>	02	0,0076	0,0076	0,00	653	5	0	0
<i>Lutzomyia</i> sp.	27	0,0015	0,0076	0,00	651	7	6	1
<i>Martinsmyia oliveirai</i>	11	0,0015	0,0045	0,00	654	4	3	1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	08	0,0030	0,0379	0,02	626	32	20	12
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	05	0,0015	0,0397	0,02	627	31	15	16
<i>Micropygomyia peresi</i>	03	0,0015	0,0015	0,00	657	01	00	1
<i>Psychodopygus</i> sp.	08	0,0015	0,0404	0,01	635	23	00	23
<i>Sciopemyia sordellii</i>	25	0,0015	0,0061	0,00	648	10	02	08

C = sítios conservados; V= sítios variados; Si = análise de parcimônia; S = Singleton (mutação única).

obs.: As sequências das espécies do gênero *Evandromyia* e *Psychodopygus* foram agrupadas.

Fonte: o autor, 2023.

Figura 6 - Árvore inferida pelo método de Neighbour-joining, baseada no modelo Maximum Composite Likelihood, valores de suporte de bootstrap (2000) replicas a análise envolveu 133 sequencias do fragmento do gene *COI* de flebotomíneos do estado de Tocantins e 27 sequencias de outras localidades.



Fonte: o autor, 2023.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo, através de análise morfológica identificou 28 espécies de flebotomíneos no município de Palmas, sendo três espécies registradas pela primeira vez no estado (*Deanemyia samueli*, *Pintomyia gruta*, *Psathyromyia barretti*), ressaltando a rica biodiversidade do cerrado brasileiro. Estudos entomológicos anteriores identificaram 32 espécies no Distrito de Taquaruçu (MACHADO et al., 2012) e em 2017, a mesma autora (MACHADO et al., 2017) registrou a presença de 30 espécies em matas de galeria e unidades domiciliares no centro de Palmas e Distrito de Taquaruçu. Outros municípios do estado também apresentaram alta diversidade: Porto Nacional, 26 espécies e Guaraí, 43 espécies, (ANDRADE-FILHO et al., 2001; VILELA et al., 2011). Os estudos iniciais da fauna flebotomínica do estado do Tocantins, até o presente, identificaram 70 espécies (LUSTOSA et al., 1986; ANDRADE-FILHO et al., 2001, 2004a; VILELA et al., 2011, 2013, 2015; MACHADO et al., 2012, 2017), porém com o registro de mais três por esse estudo, a fauna Tocantinense passa a contar com 73 espécies de flebotomíneos. Esses achados indicam uma grande diversidade de espécies de flebotomíneos no Estado, justificado, pelo fato deste apresentar áreas de transição, tanto vegetacional quanto climática, entre o cerrado e a Floresta Amazônica (BIBLIOTECA DIGITAL, 2007).

Sistemas de identificação molecular se aprimoraram com os avanços dos métodos da biologia molecular (AVISE, 2004). Marcadores moleculares têm se mostrado bastante efetivos na diagnose de espécies de diversos grupos. A técnica do “*DNA barcode*” foi proposta por Hebert et al. (2003), e tem se demonstrado uma ferramenta eficiente para identificação de espécies entre vários grupos taxonômicos e útil para identificação de diversas espécies de insetos (SMITH et al., 2008a), incluindo a subfamília Phlebotominae (PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018).

A identificação molecular das espécies gerada pelo algoritmo BlastN no site do NCBI, é realizada pela comparação de uma sequência de interesse com sequências lá depositadas. Essa comparação é realizada por métodos de distância genética, segundo o modelo de evolução molecular Kimura-2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). Primeiramente a sequência de interesse é alinhada com as sequências depositadas no GenBank, em seguida é feita uma busca das 100 sequências mais similares com aquela de interesse, finalmente a espécie é atribuída àquela da sequência mais similar a ela (FRÉZAL et al., 2008). A identificação da espécie de insetos só pode ser aceita se houver similaridade com alguma sequência do GenBank maior do

que 97%. Ou seja, caso a diferença seja maior que 3%, não é possível identificar a amostra a nível de espécie (RUBINOFF, 2006).

Nesse contexto, observa-se que das 27 espécies que foram sequenciadas e comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, 18 (66,66%), não estavam de acordo com a identificação morfológica (Tabela 6). A ocorrência desse fato deve -se à falta de sequências da mesma espécie no banco de dados, a identificações morfológicas errôneas, ou ainda a ocorrência de espécies estreitamente relacionadas com poucas diferenças morfológicas e com diferenças genéticas muito pequenas (RODRIGUES et. al., 2018). As espécies *Martinsmyia oliveirai*, *Pintomyia gruta*, *Micropygomyia acanthopharynx*, *Micropygomyia echinatopharynx*, *Micropygomyia longipennis*, *Psathyromyia hermanlenti* e *Evandromyia begoniae*, sequenciadas neste estudo, tiveram suas sequências disponíveis pela primeira, dessa forma, não possuem sequências no GenBank. Dentre os gêneros que não possuem sequência depositada no banco de dados públicos encontram-se *Deanemyia*, *Edentomyia* (RODRIGUES et. al., 2022), totalizando um número de nove (9) espécies e dois (2) gêneros inéditos no banco de dados (GenBank).

Estudos com o uso do código de barras *COI* demonstram que algumas espécies do gênero *Evandromyia* são agrupadas em um único clado, sem diferenciação de espécie nominal. Pinto et al. 2015, fez uso do código de barras de DNA, através do algoritmo ABDG para discriminar espécies de flebotomíneos de diferentes regiões do Brasil, dentre eles espécimes do gênero *Evandromyia*. Os resultados deste estudo relatam que o algoritmo ABDG não foi capaz de discriminar essas duas espécies, mostrando divergência de sequências muito baixas entre elas (0,1%). Apesar dos autores esperarem que devido à distância (*Evandromyia carmelinoi* de Cáceres, Estado de Mato Grosso e *Evandromyia lenti* de Pancas, Estado do Espírito Santo), favoreceria a redução de fluxo gênico, aumentando assim a divergência entre sequências, esse fato não foi observado. Os autores sugeriram revisão molecular e morfológica dessas espécies, visto que *Evandromyia lenti* não foi registrada em Pancas/ES, e também poderia haver forte hibridização introgressiva entre *Evandromyia carmelinoi* e *Evandromyia lenti* de Cáceres/MT. Rodrigues et al. 2018, avalia a diversidade críptica de espécies de flebotomíneos (sequências *COI*) em escalas espaciais fina e ampla, *Evandromyia carmelinoi* e *Evandromyia lenti* exibiram diferenças genéticas muito pequenas e haplótipos compartilhados e foram fundidos em uma OTU (Unidade Taxonômica Operacional). Rodrigues et al., (2020) em uma análise filogenética de sequências *COI* do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*), associado a quatro métodos diferentes de delimitação de espécies para inferir Unidades Moleculares Taxonômicas Operacionais (MOTUs), obteve resultados semelhantes aos de Pinto et al., 2015 e Rodrigues et

al., 2018, quatro morfoespécies, *Evandromyia carmelinoi*, *Evandromyia evandroi*, *Evandromyia lenti* e *Evandromyia piperiformis* foram fundidas em um único clado/MOTU. Ambos os autores argumentam que a fusão dessas duas espécies, provavelmente deve-se ao seguinte fator: divergência recente, resultado de um evento de especiação recente, portanto essas espécies ainda são capazes de hibridização com introgressão do mtDNA ou não, e apesar das diferenças morfológicas não houve tempo suficiente para diferenças no COI a ponte de separação destas espécies em clados diferentes.

Do mesmo modo, a análise da árvore de máxima verossimilhança (figura 5) mostra três indivíduos de *Evandromyia carmelinoi* e dois de *Evandromyia lenti* no mesmo ramo, indicando que as sequências do gênero *Evandromyia* do estado de Tocantins, também apresentam poucas diferenças genéticas entre si.

De acordo com a árvore de ML, observa-se um padrão de diversificação simpátrica para as espécies *Nyssomyia whitmani*, *Psycodophygyus* sp. série Chagasi e *Psathyromyia aragaoi*. Esta última, formou dois grupos distintos com suporte de nó de 99,9%. Outros estudos também relatam *Psathyromyia aragaoi* como um complexo de espécie. Costa (2022), em um estudo conduzido com sequências *COI* de flebotomíneos amazônicos, relata que sequências de *Pa. aragaoi* coletadas no estado de Rondônia/Brasil quando comparada com sequências provenientes de outras regiões sul americanas, apresenta uma média de divergência suficiente para formar dois ou mais OTUs, a depender do valor de divergência e do método de delimitação usado. As sequências apenas do estado de Rondônia apresentam divergência média maior que 1,89%, formando dois ou mais grupos distintos. Os resultados encontrados por Pinto et al. (2023), também mostraram diversidade críptica para flebotomíneos do estado do Acre, dentre eles *Pa. aragaoi*. Young & Duncan (1994), fez observações sobre as diferenças morfológicas encontradas no parâmetro de populações de *Pa. aragaoi* de diferentes localidades da América do Sul. Esta espécie é amplamente distribuída no continente americano, e no Brasil está presente em 16 unidades federativas e no Distrito Federal (GALATI, 2003), apresentando padrões alopátricos e simpátricos de diversidade críptica, que pode estar relacionado diversidade de biomas no Brasil e continente Sul Americano, além das distâncias geográficas, que podem ter promovido o isolamento geográfico dessas populações e a interrupção do fluxo gênico.

*Nyssomyia whitmani* ocorre no Brasil em associação com diferentes tipos de vegetação, o que evidencia sua presença nos variados biomas, que compreendem a Floresta Amazônica, Cerrado, Savana, Caatinga e Mata Atlântica. Claramente está adaptada às diferentes condições climáticas, áreas preservadas e impactadas, onde apresenta comportamento diferenciado e

distintos habitats, que vão desde o ambiente silvestre até o interior das residências. (YOUNG & DUNCAN, 1994; RANGEL & LAISON, 2009).

Crítérios morfológicos e morfométricos associado a diferenças no comportamento entre populações geograficamente distintas de *Nyssomyia whitmani* têm sustentado a hipótese que esta não seria uma única espécie e sim um complexo de espécies crípticas. Nesta lógica, este flebotomíneo está representado por linhagens geográficas bem caracterizadas: Norte, Nordeste e Sudeste (RANGEL et al. 1996), hipótese corroborada por estudos com marcadores moleculares (RANGEL et al. 1996; ISHIKAWA et al., 1999; MOYA et al., 2020).

Conforme observado na árvore ML, *Nyssomyia whitmani* apresentou-se dividida em dois ramos, nesse contexto, em parte, esses resultados estão coincidentes com os resultados de outros estudos, como Rangel et al. (1996), Margonari et al., (2004), apresentando, portanto, uma evidência adicional a favor da hipótese de *Nyssomyia whitmani* como um complexo de espécies crípticas, porém com padrões simpátricos de diversidade críptica.

Considerando que as fêmeas do gênero *Psychodopygus* série Chagasi são indistinguíveis (GALATI, 2003), não foi possível atribuir identidade específica a seis fêmeas deste gênero, visto que as mesmas foram agrupadas com dois exemplares machos identificados morfologicamente como *Psychodopygus wellcomei* e *Psychodopygus complexus*.

*Lutzomyia (Lutzomyia)* sp. quando comparada com sequências no banco de dados genético foi identificada com 95,82 de semelhança com *Lutzomyia dispar*, uma diferença maior que 3%. Assim como o resultado da comparação das sequências, características morfológicas indicam que *Lutzomyia (Lutzomyia)* sp. não condiz com *Lutzomyia dispar* e provavelmente seja uma nova espécie do gênero *Lutzomyia (Lutzomyia)*.

O gênero *Edentomyia* (subtribo não determinada), é representado por uma única espécie, *Edentomyia piauiensis*, com relatos de ocorrência nos estados do Piauí e Pará (GALATI, 2003). No estado do Tocantins a ocorrência desse gênero é relatada pela primeira vez por Andrade Filho et al. (2008). *Edentomyia piauiensis* é uma espécie exclusiva de ambientes cavernícolas (DUTRA-REGO et al., 2022), no estado do Tocantins o gênero *Edentomyia* foi capturado na caverna Boa Esperança, localizada no Distrito de Taquaruçu. Os ambientes cavernícolas por apresentarem características específicas como temperatura e umidade e ainda a presença de vertebrados, podem fornecer excelentes condições para manutenção da fauna de flebotomíneos (DUTRA-REGO et al., 2022). Esses ambientes têm apresentado uma alta diversidade de flebotomíneos. Andrade-Filho et al (2008), relatou a presença de 16 espécies na caverna Boa Esperança no distrito de Taquaruçu Palmas TO, de Almeida et al (2019), registrou a presença de 25 espécies na gruta do Pitoco em Alcinópolis,

Mato Grosso do Sul. A única espécie desse gênero não possui sequências depositadas em banco de dados genéticos, portanto, não foi possível distingui-la com o uso de DNA Barcode, e novos estudos sobre a espécie encontrada no estado de Tocantins é necessário para verificar sua real identidade taxonômica. Observa-se ainda, que por serem exclusivos de ambientes cavernícolas, as sequências de *Edentomyia* sp. não apresentam diferenças entre si, visto que esses ecossistemas são considerados um dos mais estáveis (GOMES et. al., 2001).



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribuiu para o estudo da diversidade de flebotomíneos e apresenta como resultado o aumento da riqueza de espécies da fauna de flebotomíneos do município e do estado, passando a ser composta por 35 e 73 espécies descritas, respectivamente;

O uso de DNA Barcode revelou a existência de diversidade críptica em duas espécies no estado de Tocantins: *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia aragaoi* e em indivíduos da série Chagasi (*Psychodopygus* sp.) não identificados morfológicamente; e ainda contribuirá com o aumento do número de sequências depositadas no banco de dados público GenBank, sendo nove (9) espécies e dois (2) gêneros inéditos no banco de dados.

As espécies identificadas como crípticas, *Nyssomyia whitmani* e *Psychodopygus wellcomei* da série chagasi, merecem estudos no que dizem respeito ao comportamento, visto que estas são vetoras do agente infeccioso da Leishmaniose tegumentar.

O DNA barcode mostrou-se eficiente para identificação das espécies de flebotomíneos do estado do Tocantins, porém a quantidade de amostras é um fator que influencia a eficácia da técnica do DNA Barcode, um padrão ótimo de análise exigiria uma quantidade de pelo menos cinco indivíduos sequenciados por espécie para que se tenha a possibilidade de compará-los (Hebert et al. 2010). Dessa forma, o presente estudo encontrou dois obstáculos no que diz respeito à identificação das espécies com o uso de sequências *COI*: o número de amostras de algumas espécies, assim como a falta de sequências (BARCODE) no GenBank, que dificulta a identificação através de comparações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABONNENC, E. & N. LEGER. 1976a. Sur une classification rationnelle des Dipteres Phlebotomidae. Cah. Orstom sér. **Ent. Merl. Parasitol.**, Bordy, 14: 69-78.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sand flies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, France, v.10, n. 6, p. 1-40 June 2016.

ANDRADE FILHO, J.D. et al. Description of *Micropygomyia* (*Silvamyia*) *echinatopharynx* sp. nov. (Diptera: Psychodidae) a new species of Phlebotominae sand fly from the State of Tocantins, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro-RJ, v.99, n.6, p. 609-615, Oct. 2004.

ANDRADE FILHO, J.D. et al. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba-MG, v. 34, n.4, p. 323-329, agosto, 2001.

ARTEMIEV, M.M. A classification of the subfamily Phlebotominae. **Parasitology**, vol.33, pag. 69-77, Dec.1991.

AVISE J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**, 2º ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4615-2381-9>.

BARRETO, M.P. Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, Subfamília Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical** de São Paulo, vol.4, pag. 91-100, 1962.

BIBLIOTECA DIGITAL DA CAMARA DOS DEPUTADOS. **Biomias presentes no estado de Tocantins**. Centro de Documentação e Informação Coordenação de Biblioteca <http://bd.camara.gov.br> /agosto 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 5. reimpressão. Brasília, Ministério da Saúde, 2014.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel, E. F.& LAISON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 1º Edição. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 257-274.

CASANOVA, C. Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 7(9), e 2443, September 2013.

CASARIL, AE, et al. Macrogeographic genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* complex populations using Next Generation Sequencing. **PLOS ONE** 14(10), outubro 2019.

COQUILLET, Daniel William. Discovery of blood sucking Psychodidae in America. **Entomological News**, Philadelphia, volume18, pag. 101-102, 1907.

COSTA, G. S. **Diversidade Genética e Taxonomia Integrada de Flebotomíneos (Diptera:**

**Psychodidae) Amazônicos**, Porto Velho, Rondônia 2022, 157 pag. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental/UNIR – FIOCRUZ-RO, para defesa de Doutorado em Ciências Biológicas com ênfase em Parasitologia, 2022.

CREASE, T.J. The complete sequence for the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). **Gene**. vol. 11, núm. 233, pag. 89–99. Jun. 1999.

DE ALMEIDA, P. S. Fauna of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in areas with endemic American cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil -Medical and Veterinary Entomology. **Rev. Bras. Entomol.** vol. 57 num.1, Mar 2013.

DOHA, S. Dispersal of *Phlebotomus-papatasi* (Scopoli) and *Phlebotomus-Langerona* Nitzulescu in El-Hammam, Matrouh governorate, Egypt. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** vol.66, pag. 69–76, 1991.

DUCKHOUSE, D.A. Family Psychodidae. **A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States**. Museu de Zoologia; Universidade de São Paulo, São Paulo, vol. 1, pag 29,1973.

DUTRA-REGO, F. Revisiting the cave-dwelling sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Brazil: Diversity and potential role in the transmission of *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), **Medical and Veterinary Entomology**, Londres, V. 6, p. 1 a 16, Maio de 2022.

FAIRCHILD, G.B. The relationships and classification of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, vol.48, pag. 182-196, May 1955.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, vol. 17 num. 6, 368–376, 1981.

FERREIRA, et al. Ecological and epidemiological aspects of the sand fly (Diptera, Psychodidae) fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **J Med Entomol.** 50(6), 1215-23, nov. 2013.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit I* from diverse metazoan invertebrates-**Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Germany, V. 3, n.5, p. 294-299, Oct. 1994.

FORATTINI, O. P. Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 25, p. 209-215, 1960.

FRANÇA, C. Observations sur le genre *Phlebotomus*. **Botéria (Serie Zoologica)**, v. 17, p. 109-160, 1919.

FRANÇA, C. Observations sur le genre *Phlebotomus*. II. Phlébotomes du Nouveau Monde (*Phlébotomus* du Brésil et du Paraguay). **Bullettin société potugaise des sciences naturelles**, França, 8, 215-36, 1920.

FRANÇA, C. Notes parasitologiques. IV. Phlebotomes. **Journal de Sciencias Matematicas**,

**Físicas e Naturais**, 3, 22-25, 1924.

FRANÇA, C, e PARROT, L. Introduction à l'étude systématique des Diptères du genre *Phlebotomus*. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, 13, 695-708, 1920.

FRÉZAL, L. e LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infect. Genet. Evol.** vol. 8, pag. 727-736, Jun. 2008.

GAJAPATHY, K. et al. DNA barcoding of Sri Lankan Phlebotominae sand flies using *cytochrome c oxidase subunit I* reveals the presence of cryptic species. **Acta Tropica**, v. 161, p. 1-7, 1, May. 2016.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v. p. 23-51, 2003.

GALATI, E. A. B. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classificação, Morfologia e Terminologia de Adultos e identificação de Táxons Americanos**. In: Rangel E.F, Lainson R, editores. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 9 - 212, 2018.

GEOPALMAS. Mapas Temáticos. Macrozoneamento [mapas na internet]. 2015a [acesso em 7 julho 2021]. Disponível em: <http://geopalmasweb.wixsite.com/geopalmas>.

GOMES, F.T., et al. Comunidade de artrópodes de uma caverna calcária em área de mineração: composição e estrutura. **Revista Brasileira de Zoociências**, vol.3, num. 2, pag.77-96, 2001.

HEBERT P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. Biol. Sci.** vol. 7, num. 270, pag.313-321, fev. 2003.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo demográfico 2014. [acesso 17 de novembro de 2020]. Disponível: <https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php>.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. Mapas temáticos [mapas na internet]. 2007 [acesso em 21 julho 2021]. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/tematicos/geomorfologia>.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHLEBOTOMINE SANDFLIES, 6, 2008, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia in Lima, Peru. **PHLEBOTOMINE (DIPTERA: PSYCHODIDAE) SANDFLIES COLLECTED IN A CAVE IN PALMAS, TOCANTINS STATE, BRAZIL**, pag. 06.

ISHIKAW, E.A. et al. Mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the Rain-forest Regions of Amazonia and Northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. vol. 94, pag. 339-345, May. 1999.

JIMENEZ, A.E. et al. Temporal and spatial variation of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica. **J Med Entomol**. Vol. 37, pag. 216-221, 2000.

KERR, K. C. R. et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol.*

Ecol. Notes. vol. 7, pag.535-543, july, 2007.

KILLICK-KENDRICK R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3): 279-89.

KIMURA, M. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** vol. 16, pag. 111-120, 1980.

KOENRAADT, C.J.M. et al. 2004. The effects of rainfall and evapotranspiration on the temporal dynamics of *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* in a Kenyan village. **Acta Tropica**, vol. 90, pag. 141-153, May. 2004.

KORSHUNOVA, T. et al. Multilevel fine-scale diversity challenges the 'cryptic species' concept. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-23, May 2019.

LEWIS, D.J. et al., Proposal for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**, vol. 2, pag. 319–332,1977.

LUSTOSA, E. et. al. Contribuição para o conhecimento da fauna flebotomínica do estado de Goiás – 1984- 1985. Nota prévia I. **Rev. Patol. Trop.**, v.15, n.1, p.7-11, abril 1986.

LUTZ, A., & NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 4, pag. 84-95, 1912.

MACHADO T.O. et al. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in 112 different environments in the district of Taquaruçu, State of Tocantins, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro-RJ v. 107, n.7, p. 955-959, nov. 2012.

MACHADO, T. D. O. et al., The role of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations: potential *Leishmania spp.* vectors in Brazilian savanna. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 112, núm. 10, outubro, 2017.

MANGABEIRA, O. *Psychodopygus* n. subg. (Diptera: Psychodidae): 4ª contribuição ao estudo dos flebotomus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 36, pag. 237-250, 1941.

MANGABEIRA, O. Sobre a sistemática e biologia dos flebotomus do Ceará. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, vol. 21, pag. 3-26, 1969.

MARGONARI, C. S. et al. "Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR." **Journal of medical Entomology**, vol.41, pag.187-192, 2004.

MAROLI, M, et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med. Vet. Entomol**, 27(2):123-147, junho, 2013.

MARTINS, A.V., SILVA, J.E. *Barretomyia* subg. n., novo subgênero de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodidae), com a descrição de uma espécie nova. **Ciência Cultura**, vol.17, 235-236, 1965.

MONTEIRO, C. C.; **O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do**

**Lutzomyia longipalpis para a Leishmania (Leishmania) infantum chagasi e a transmissão do parasito ao vertebrado pela picada.** 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2012.

MOORE, J.S. et al. Honeydew sugars in wild caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography. **Med Vet Entomol**, vol. 1, numero4, pag 427-434, 1987.

MORRISON, A.C, et al., Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J Med. Entomol**, vol. 30, pag. 427–435, 1993.

MOYA, S. L. et al. Phylogenetic relationships of closely-related phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of *Nyssomyia* genus and *Lutzomyia* subgenus- **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 115, pag. 200-220, sep.2020.

NIEVES, E. et al. Effect of environmental disturbance on the population of sandflies and leishmania transmission in an endemic area of Venezuela. **J Trop. Med.** vol. 14, .280629 apr. 2014.

NITZULESCU V. Essai de classification des phlébotomes. **Annu Parasitol Hum Comp.** vol. 9, pag. 271–275, 1931.

PESSOA, F.A.C. Effects of timber harvest on phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102(5): 593-599, 2007.

PETERSON, A.T., and SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology.** 33(9):919–931, 2003.

PETTS, S.L., et al. Nectar from the wax plant *Hoya* sp., as a carbohydrate source for *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Trop. Med. Parasitol**, vol. 91, num.4, pag.443-446, 1997.

PINTO, I. S. et al. DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil, **PLOS ONE** 10, United States, v.10, p. 1-18, october 2015.

PINTO, I.d.S. et al. DNA barcoding of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from the western Brazilian Amazon. **PLOS ONE**, vol. 18, num. 2, pag. 281- 282, feb.2023.

PUGEDO, H. et al. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba-MG, vol.38, no.1, p.70-72, fev. 2005.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2003. 367 p.

RANGEL, E.F. et al. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*)

whitmani (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, vol. 91, pag 43-50, 1996.

RANGEL, E.F., LAISON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 104, num. 7, pag. 937-954, nov. 2009.

RANNALA, B. et al., Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **PNAS**, United States, v. 107, n. 20, p. 9264-9269, may 2010.

RATNASINGHAM, S. and HEBERT, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). **Molecular Ecology Notes**, VOL. 7, pag. 355–364, may.2007.

READY, P.D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Revista Entomologia**, vol. 58, num. 227, pag.50, 2013.

RIVERA, J., CURRIE, D. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). **Mol Ecol Resour.** vol. 9, pag. 224–236, may 2009.

RODRIGUES, B. L., GALATI, E. A. B. Molecular taxonomy of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) with emphasis on DNA barcoding: a review, **Acta Tropica**, 238, 106778, feb. 2023.

RODRIGUES, B.L. et al. DNA Barcoding Reveals Hidden Diversity of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at fine and Broad Spatial Scales in Brazilian Endemic Regions for Leishmaniasis. **J Med Entomol.** vol. 28, pag. 893-901, jun. 2018.

RODRIGUES, B.L., BATON, L.A., SHIMABUKURO, P.H.F. Single-locus DNA barcoding and species delimitation of the sandfly subgenus *Evandromyia* (*Aldamyia*). **Medical and Veterinary Entomology**, vol.34, num. 4, pag. 420-431, dec. 2020.

RODRIGUEZ, F. et al. The general stochastic model of nucleotide substitution. **Journal of Theoretical Biology.** vol. 142, pag. 485–501, feb.1990.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conserv. Biol.**, vol. 4, pag. 1026-1033, aug. 2006.

SAITOU, N. E NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 4, pag. 406-425, july, 1987.

SANTINI, M.S. et al. Co-occurrence and seasonal and environmental distributions of the sandflies *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* in the city of Puerto Iguazú, northeastern Argentina. **Med. Vet. Entomol.** vol. 32, pag. 197- 205, nov. 2017.

SEPLAN-SECRETARIA DE PLANEJAMENTO. Atlas do Tocantins [atlas na internet]. 2012 [Acesso em 7 julho 2021]. Disponível em: <http://seplan.to.gov.br/zoneamento/atlas-do-tocantins>.

SHAW, J. et al. Transmissão de outros agentes: os flebotomíneos brasileiros como

hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: FIOCRUZ**, p. 337-351, 2003.

SHERLOCK, I.A. 2003. Importância Médico-Veterinária. In, RANGEL, E.F. & LAISON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, 1ª Edição. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

SHIMABUKURO, P.H.F. et al. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 660, p. 67-106, 2017.

SILVA, D. F. et al., Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. **Neotropical Entomologia**, 36: 138-144. 2007.

SMITH M. A. et al. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol. Ecol. Notes*, vol. 8, pag. 235-246, mar. 2008.

SOUSA-PAULA, L.C et al. Beyond taxonomy: species complexes in New World phlebotomine sand flies. **Medical and Veterinary Entomology**, São Paulo-SP, p. 1-17, january, 2021.

SOUZA, N.A. et al. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo-SP, v. 112, n.3, p.161-173, mar. 2017.

SPIEGEL, C.N. et al. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 580, p. 1-15, nov. 2016.

STRUCK, T.H. et al. Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. **Trends Ecol Evol**. Cambridge, v. 33 n.3, p.153-163, mar 2018.

TAMURA K., STECHER G., and KUMAR S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**. vol. 38, num. 7, pag.3022-3027, july, 2021.

TAMURA, K., NEI, M., and KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 101, num. 130, pag. 11030-11035, july, 2004.

TAVARES E. S. et al. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Syst. Biol.**, vol. 55, pag. 454-470, jun. 2006.

TEODORO, U. L. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extra florestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, vol. 27, pag.242-249, 1993.

THEODOR, O. Classification of the world species of the subfamily Phlebotominae (Diptera,



- Psychodidae). **Bulletin of Entomological Research**, vol. 39, pag. 85-115, 1948.
- THEODOR, O. On the classification of American Phlebotominae. **Journal of Medical Entomology**, vol. 2, paga.171-197, 1965.
- THOMPSON, J.D, et al CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** vol. 22, pag. 4673–4680, nov. 1994.
- TONELLI, G.B., et al. Sand fly behavior: much more than weak-flying. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol.116, nov. 2021.
- TRAVI, B.L. et al. Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. **J Med Entomol.** 39(3), 451-6, may, 2002.
- VALDERRAMA, A. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** vol. 106, 1024-31. dec.2011.
- VILELA ML, et al. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, State of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz, São Paulo-SP**, v. 108, n.5, p.578-585, august 2013.
- VILELA, M.L, et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniasis in areas impacted by hydroelectric plants, State of Tocantins, Brazil. **PLoS One**, United States, v.6, n.12, p.1-7, december, 2011.
- VILELA, M.L., AZEVEDO A.C.R., GODOY R.E. Description of a New Phlebotomine Species of the Brazilian Cerrado From Sandstone Caves in Tocantins State, Brazil: *Lutzomyia (Lutzomyia) elizabethrangela* sp. nov. (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, Brazil, v.52 n.4, p. 1-8, april 2015.
- WARD, R. D. e HOLMES B. H. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. **Mol. Ecol.** vol. 7, pag. 899–907, nov. 2007.
- WARD, R. D.et al. The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 80, num. 2, pag. 145-148, 1985.
- WARD, R.D. et al. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kalaazar distribution in South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 78, num.3, pag. 269-280, 1983.
- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* Vol. 29, pag. 1847–1857, oct. 2005.
- WILL K. W. e RUBINOFF. D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace

morphology for identification and classification. *Cladistics*, vol. 20, pag. 47–55, feb. 2004.

YANG, Z. Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Likelihood Methods. **Journal of Molecular Evolution**, vol. 42, pag. 294–307, 1996.

YOUNG DG & DUNCAN MA. **Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville, FL: Associated Publishers. 881p, 1994.

YOUNG, D.G., FAIRCHILD, GB. Studies of Phlebotomine sand flies. **Annual Report**, Department of Entomology and Nematology, University of Florida, pag.152, 1974.