

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *ANOPHELES DARLINGI* CRIADO EM LABORATÓRIO SOB DIFERENTES DIETAS*

Eduardo Sterlino Bergo**
Geraldo Magela Buralli **
Jair Lício Ferreira Santos***
Sergio Mello Gurgel **

BERGO, E. S. et al. Avaliação do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratório sob diferentes dietas. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 24: 95-100, 1990

RESUMO: São testadas três dietas para larvas de *A. darlingi*, buscando-se os seguintes parâmetros indicativos de desenvolvimento nesta fase: tempo de evolução total e de cada estágio, sobrevivência ao estágio, diária e total. A metodologia utilizada na determinação desses parâmetros constituiu-se da combinação de dois métodos de análise da estatística vital, adaptados ao estudo de populações mantidas em laboratório. Os tempos de evolução total e de cada estágio foram determinados graficamente a partir das curvas de tendência dos estágios medianos da colônia, em inspeções sucessivas. Os valores de sobrevivência diária, ao estágio e total foram calculados a partir de tábuas de sobrevivência. Os resultados permitiram eleger a dieta composta de uma parte de farinha de peixe para duas partes de farinha de pão e duas partes de germe de trigo como a mais adequada ao desenvolvimento larval, com duração de 12,9 dias entre o primeiro estágio e a emergência do adulto e sobrevivência total de 95%.

DESCRIPTORES: *Anopheles*, crescimento. Larva, crescimento. Alimentação animal.

INTRODUÇÃO

A criação de mosquitos em laboratórios exige o controle de fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar e luminosidade, imprescindíveis para a sobrevivência, longevidade e reprodução dos adultos. Por outro lado, a adequação do alimento oferecido às larvas é condição básica para a sustentação de colônias.

Do ponto de vista apenas da aceitação de alimentos, pode-se considerar que as formas imaturas dos culicídeos são pouco exigentes, ingerindo quase tudo que lhes é oferecido, desde refinadas dietas químicas até infusões preparadas com excremento de cobaias (Gerberg⁹, 1970). Parece, ainda, não haver grande redução de possibilidades quando se consideram apenas as espécies de anofelinos. Entretanto, os dados de literatura revelam-se contraditórios quanto aos resultados obtidos, com ampla variação nas dietas utilizadas para diferentes espécies de *Anopheles*. Assim, enquanto alguns *Nyssorhynchus* exigem infusões que contenham determinados ciliados (Galvão e col.⁸, 1944), *A. darlingi* desenvolve-se bem sem eles, (Corrêa e col.³, 1970). Outros autores, no entanto, consideram necessária

a presença de infusórios na alimentação pelo menos dos dois últimos estágios larvais de *A. darlingi* (Freire e col.⁷, 1947, Santos e col.¹², 1981).

Verificam-se discordâncias também quanto às vantagens na utilização de fermento biológico (Fleischmann) na dieta larval. Freire⁷ observou elevada mortalidade de larvas de 4º estágio de *A. darlingi* quando alimentadas com esse fermento, enquanto Corrêa³ o utilizou justamente para os estágios finais da mesma espécie, como complemento de uma dieta preparada à base de ração de aves, confirmando resultados obtidos por Giglioli¹⁰ (1947).

O grande número de dietas preconizadas é decorrência, em grande parte, da falta de padronização, tanto em composição de nutrientes quanto em formulações que possam ser reproduzidas.

Forattini⁵ (1962) refere que essas tentativas são tão variadas que se pode contá-las pelo número de investigadores que atuam na área.

Desde as observações pioneiras de Crowell⁴ (1940), de que se poderia utilizar alimento comer-

* Trabalho apresentado no Simpósio sobre Malária na II Reunião Nacional de Pesquisadores em Malária, São Paulo, 1988. Realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Proc. CNPq-Polonoroeste 700349/85.

** Diretoria de Combate a Vetores da Superintendência de Controle de Endemias — SUCEN — Rua Paula Souza, 166 — 01027 — São Paulo, SP — Brasil.

** Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil.

cial para cães (dog biscuits) como alimento completo para larvas de mosquitos, o uso de rações industrializadas tem se tornado cada vez mais freqüente, o que contribui, de certa forma, para uma padronização de formulações. Quanto ao valor nutricional dessas dietas, em função das exigências das espécies a que se destinam, os trabalhos não vão além da usual observação de que "tal alimento se mostrou melhor para o desenvolvimento larval".

Quando se busca a criação maciça de anofelinos, com a produção de elevado número de adultos para dar suporte a projetos de pesquisa, é necessária a escolha de alimentos que, além de permitirem um bom desenvolvimento das larvas, não ofereçam dificuldades no preparo, emprego e estocagem; e também sejam feitos a partir de produtos facilmente encontrados no mercado.

Assim, o critério de seleção do alimento ideal seria a capacidade de promover um desenvolvimento larval mais rápido, homogêneo, com taxas de sobrevivência elevadas e de produzir adultos viáveis.

Com bases nesses requisitos, optou-se por testar três diferentes rações, para *A. darlingi*, buscando-se critérios mais objetivos para a eleição de uma delas a ser utilizada no insetário da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo), em Araraquara (Buralli e Bergo², 1988).

O presente trabalho traz os resultados correspondentes aos parâmetros que medem o desenvolvimento larval, pela determinação dos estádios medianos e taxas de sobrevivência.

MATERIAL E MÉTODOS

A população testada consistiu de larvas de *Anopheles darlingi* nascidas a partir de uma única oviposição de fêmeas selvagens, coletadas e alimentadas num mesmo dia, com sangue humano. Trezentas larvas recém-nascidas foram pipetadas por capilaridade e criadas, individualmente, em copos plásticos descartáveis, cada um com 35 ml de água de fonte natural. Dividiu-se esse conjunto em três lotes com cem larvas cada um, denominados L₁, L₂ e L₃ aos quais foram oferecidas três dietas diferentes codificadas como 1, 2 e 3.

Composição das dietas:

Dieta 1: proposta por Corrêa e col.³ (1970), modificada*: partes iguais de farinha de milho, ração para aves domésticas, ração para pássaros

(AVINA) e fermento para biscoito de polvilho.

Dieta 2: proposta por Santos e col.¹² (1981): uma parte de farinha de peixe, duas partes de pão torrado moído e duas partes de germe de trigo.

Dieta 3: proposta por Freire e Faria⁷ (1947), modificada**: uma parte de farinha de peixe, duas partes de pão torrado moído e uma parte de levedura de cerveja.

As rações, pulverizadas em gral, foram oferecidas às larvas de acordo com o preconizado por Molan e col.¹¹ (1963), para *Aedes aegypti*.

A cada período de 12 horas, realizou-se inspeção nos recipientes quando as larvas eram transferidas para copos de água limpa, contadas e realimentadas. Os dados referentes às mortes e ecdises foram lançados em boletim apropriado para acompanhamento do desenvolvimento larval. As exúvias serviram como indicadores da mudança de estádio. Os alados resultantes dessas larvas foram mortos e mantidos à temperatura de -20° C para posterior avaliação bioquímica do estado nutricional.

Todo o experimento foi conduzido, simultaneamente, entre 14 de setembro e 9 de outubro de 1987, no insetário de anofelinos da SUCEN, em Araraquara (Buralli e Bergo², 1988), com temperatura variando entre 25° C e 28° C e luminosidade natural proveniente de uma única janela.

Para avaliar o tempo de desenvolvimento de cada lote de larva (L₁, L₂ e L₃), utilizou-se de uma adaptação da teoria básica aplicada por Forattini e col.⁶ (1977) e por Buralli e col.¹ (1980), para tria-toméneos, onde se lança mão da variável estádio mediano dos insetos no tempo para o cálculo da duração média de cada estádio.

O estádio mediano da colônia, E_i, em cada inspeção *i*, realizada a intervalos de 12 horas, corresponde à mediana da distribuição de freqüências do número de indivíduos existentes nos vários estádios.

Os estádios 1 a 4 representam os 4 estádios larvais, o 5 é a fase de pupa e o 6 corresponde ao adulto recém-emerso.

A curva de tendência dos estádios medianos com o tempo foi feita pela média móvel de três estádios medianos sucessivos. Através dessas curvas de tendência determinou-se graficamente a duração média de cada estádio nos três grupos de larvas.

* Modificada pelo autor a partir de 1970 e utilizada com ótimos resultados até 1977, segundo informação dos técnicos Antenor Seisdedos e Luiz Zaia, da SUCEN.

** Quantidade de fermento ajustada para facilitar a medição.

Embora este método permita calcular as taxas de sobrevivência, pelas áreas delimitadas no gráfico de tendências dos estádios medianos, a partir daqui lança-se mão de metodologia mais adequada para calcular essas taxas. No presente trabalho não ocorreram perdas de observação por tratar-se de grupos de indivíduos confinados, em condições de laboratório, onde se tem controle do tempo de permanência de cada exemplar em cada estádio, bem como do tempo de vida de cada um. Assim, para os cálculos de sobrevivência utilizaram-se tábuas de vida a partir das quais foram calculados: número de "mosquitos/período de 12 horas" vividos em cada estádio, número de óbitos e de sobreviventes, em cada estádio.

Com esses valores foi possível determinar a taxa de sobrevivência ao período de 12 horas em cada estádio (K_j), para os três grupos testados, pela expressão:

$$K_j = 1 - \frac{\text{n}^\circ \text{ de óbitos no estádio } j}{\text{n}^\circ \text{ de mosquitos/período de 12 horas no estádio } j}$$

A taxa de sobrevivência ao estádio j , s_j , foi calculada pela expressão:

$$s_j = 1 - \frac{\text{n}^\circ \text{ de óbitos ocorridos no estádio } j}{\text{n}^\circ \text{ de sobreviventes no início do estádio } j}$$

O produto das taxas de sobrevivência a cada estádio fornece a taxa de sobrevivência total (S) do início do estádio 1 ao final do estádio 5, ou seja:

$$S = s_1 \cdot s_2 \cdot s_3 \cdot s_4 \cdot s_5$$

A avaliação do desenvolvimento dos lotes L_1 , L_2 e L_3 foi feita pela comparação direta dos valores encontrados para duração dos períodos larvais e taxas de sobrevivência, uma vez que os valores encontrados se referiam exclusivamente àqueles grupos testados, sem inferência a outras populações.

RESULTADOS

Os estádios medianos, determinados para cada lote de larvas estão expressos na Tabela 1. Os valores dessa variável, correspondentes às médias móveis de três medições sucessivas, em função do tempo, estão representados no gráfico da Figura. Nesta, estão ilustradas as curvas de tendência dos lotes tratados com as diferentes dietas.

Quanto ao aspecto geral das curvas, pode-se observar que o inseto "mediano" evolui do estádio inicial à fase adulta através de saltos, cuja duração é dada pela inclinação de segmentos sucessivos em forma de "s".

A comparação dessas curvas de crescimento mostra que os lotes L_2 e L_3 apresentaram um desen-

TABELA 1
Estádios medianos de *A. darlingi* calculados para cada inspeção nos lotes de larvas (L)

Tempo (período de 12 horas)	L_1	L_2	L_3
0	1,00	1,00	1,00
1	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,00	1,00
3	1,00	1,00	1,00
4	1,00	1,07	1,04
5	1,00	1,18	1,31
6	1,36	1,99	1,99
7	1,72	1,99	2,00
8	1,96	2,26	2,54
9	1,96	2,56	2,82
10	2,01	2,94	2,99
11	2,05	2,99	3,01
12	2,26	3,08	3,19
13	2,37	3,26	3,61
14	2,77	3,93	3,97
15	2,83	3,95	3,98
16	2,95	3,99	4,00
17	2,97	3,99	4,00
18	2,99	4,00	4,00
19	3,02	4,01	4,03
20	3,13	4,07	4,17
21	3,20	4,15	4,30
22	3,40	4,37	4,68
23	3,44	4,74	4,84
24	3,64	5,01	5,04
25	3,66	5,08	5,27
26	3,80	5,69	5,75
27	3,83	5,83	4,84
28	3,86	5,96	5,94
29	3,87	5,98	5,96
30	3,90	6,00	5,98
31	3,94	-	5,99
32	3,96	-	6,00
33	3,96	-	-
34	3,97	-	-
35	3,97	-	-
36	3,99	-	-
37	3,99	-	-
38	3,99	-	-
39	4,01	-	-
40	4,06	-	-
41	4,14	-	-
42	4,59	-	-
43	4,69	-	-
44	4,89	-	-
45	5,03	-	-
46	5,70	-	-
47	5,72	-	-
48	5,88	-	-
49	5,90	-	-
50	5,99	-	-
51	6,00	-	-

volvimento praticamente idêntico, ao contrário do lote L_1 .

O retardamento relativo do lote L_1 deu-se principalmente no alongamento dos estádios 2 a 4, sendo que este último se destaca.

A projeção dos intervalos correspondentes aos

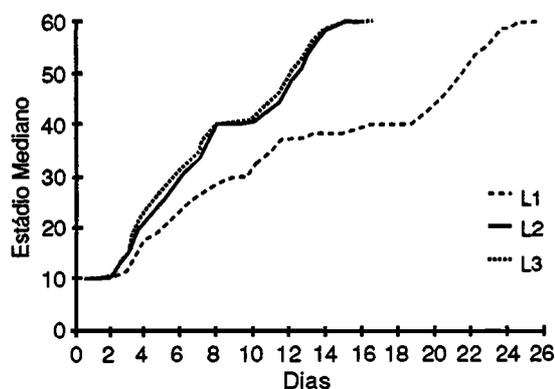


Fig. 1 - Estádios Medianos Calculados por Médias Móveis, Segundo o Tempo, para L1, L2 e L3.

TABELA 2

Duração dos estádios em horas segundo as dietas

Estádio	Duração		
	L ₁	L ₂	L ₃
1	76	65	63
2	80	41	32
3	120	54	58
4	228	108	106
5	48	40	47
Total	552	308	306

estádios no eixo das ordenadas sobre a escala de tempo, pelos pontos das curvas de tendência, fornece, como já foi mencionado, a duração de cada estágio nos três lotes de observação. Esses dados podem ser vistos na Tabela 2, que quantifica a proximidade do tempo total de desenvolvimento entre os lotes L₂ e L₃ e o distanciamento desses valores para o lote L₁ em mais de 50%.

O mesmo comportamento é observado, em linhas gerais, quando são analisados os valores intermediários de duração de cada estágio, nos três lotes.

Cumprir observar, no entanto, dois pontos onde se nota distanciamento importante entre os períodos de duração de estágio nos lotes L₂ e L₃. A duração do 2º estágio do lote L₃ apresentou uma redução de 9 horas em relação ao mesmo estágio do lote L₂.

Entretanto, essa vantagem em tempo de desenvolvimento é compensada pelo atraso que o estágio 5 (fase de pupa) do lote L₃ apresentou em relação ao lote L₂.

As diferenças entre os demais estádios, menores que as citadas, também se compensam, de forma que no tempo total de desenvolvimento os dois lotes praticamente se equiparam, guardando uma diferença significativa do lote L₁.

TABELA 3

Relação entre a duração do desenvolvimento larval de L₁ em horas e a duração média de L₂ e L₃

Estádio	Duração de L ₁	Duração média L ₂ , L ₃	Relação L ₁ /média L ₂ , L ₃
1	76	64	1,19
2	80	36,5	2,19
3	120	56	2,14
4	228	107	2,13
5	48	43,5	1,12
Total	552	307	1,80

TABELA 4

Mosquitos/período vividos, óbitos, número de sobreviventes no início do estágio e sobrevivência ao estágio e ao período de 12 horas, segundo as dietas.

Lote L₁

Estádio	Mosquito/ Período	Óbitos	Nº de sobreviventes no início do estágio	Sobrevivência*	
				ao estágio	por 12 horas
1	666,0	9	100	0,9100	0,9865
2	667,5	2	91	0,9780	0,9970
3	942,5	2	89	0,9775	0,9979
4	1.509,5	8	87	0,9080	0,9947
5	201,5	32	79	0,5949	0,8412
Total	3.987,0	53	47	0,4699	0,9867

Lote L₂

Estádio	Mosquito/ Período	Óbitos	Nº de sobreviventes no início do estágio	Sobrevivência*	
				ao estágio	por 12 horas
1	511,0	2	100	0,9800	0,0061
2	348,0	-	98	1,0	1,0
3	423,0	-	98	1,0	1,0
4	881,5	1	98	0,9898	0,9989
5	343,5	2	97	0,9794	0,9942
Total	2.507,0	5	95	0,9500	0,9980

Lote L₃

Estádio	Mosquito/ Período	Óbitos	Nº de sobreviventes no início do estágio	Sobrevivência*	
				ao estágio	por 12 horas
1	604,0	1	100	0,9900	0,9983
2	313,5	1	99	0,9899	0,9968
3	412,5	2	98	0,9796	0,9951
4	876,0	1	96	0,9896	0,9988
5	358,5	3	95	0,9684	0,9916
Total	2.564,5	8	92	0,9200	0,9969

* O total da sobrevivência por 12 horas corresponde à média por período geral.

Procurou-se quantificar esse comportamento pela relação entre a duração de cada estágio no lote L₁ com a duração média, do mesmo estágio, entre os lotes L₂ e L₃, expressa na Tabela 3.

Observa-se inicialmente que o tempo total de desenvolvimento do lote L₁ foi praticamente o dobro quando comparado com o tempo médio L₂, L₃. A

diferença se deve principalmente à maior duração dos estádios 2, 3 e 4.

A avaliação da sobrevivência das larvas de *A. darlingi*, para as três dietas testadas, feita através das tábuas de vida correspondentes aos lotes L_1 , L_2 e L_3 , permitiu chegar aos demais resultados que constituem objeto do presente trabalho. Tais resultados estão expressos na Tabela 4, onde também se verificam correspondências entre as dietas 2 e 3, com sensível diferença da dieta 1. A taxa de sobrevivência total para aqueles lotes foi superior a 90%, enquanto que para L_1 foi inferior a 50%.

Considerando-se as taxas de sobrevivência ao estágio, verificaram-se taxas menores no lote L_1 em todos os estádios, quando comparados aos lotes 2 e 3. Entretanto, as diferenças observadas nos estádios 1 a 4 são pouco expressivas frente à observada no estágio 5 (pupa), principal responsável pela baixa taxa de sobrevivência total do lote L_1 .

COMENTÁRIOS

Considerando as curvas de desenvolvimento, bem como os períodos de duração dos estádios (Fig. 1 e Tabela 2), nota-se sensível vantagem na utilização das dietas 2 ou 3 em relação à dieta 1.

A semelhança das curvas sugere, entretanto, que não ocorreram mudanças fundamentais no padrão de desenvolvimento larval quando se consideram quaisquer das três dietas.

As diferenças observadas, provavelmente devido à oferta de nutrientes de cada uma, traduzem-se principalmente pelo aumento da permanência do inseto "mediano", em cada estágio, do lote L_1 .

Esse alongamento, como já foi visto, é maior nos estádios 2, 3 e 4, quando se supõe que deva ocorrer maior demanda alimentar para o desenvolvimento larval. O estágio inicial parece depender menos das diferenças nutricionais das dietas que aqueles intermediários.

Por outro lado, as diferenças observadas entre o desenvolvimento dos lotes L_2 e L_3 levam a supor que essas estejam relacionadas à presença de nutrientes que pudessem favorecer diferencialmente os estádios.

O atraso registrado no lote 3, em relação ao lote 2, ocorreu somente na fase de pupa, que não se ali-

menta. Há uma provável carência de elementos nutricionais na dieta 3 afetando a metamorfose larva/adulto naquele lote. Como essa dieta contém uma levedura, ao invés de germe de trigo da dieta 2, é possível que aquele alimento seja mais vantajoso apenas no início do crescimento, uma vez que o 2º estágio foi mais curto.

Essa vantagem poderia estar relacionada ao tamanho das partículas, mais acessíveis às larvas jovens. Isso deixaria de ser importante com a evolução das larvas, quando pesariam mais as disponibilidades nutricionais do alimento.

Esses dados mostram a relação existente entre carência nutricional e a maior permanência dos indivíduos nos estádios de crescimento, com efeitos sobre a fase de transição para adulto. Giglioli¹⁰ (1947) constatou que essa situação determina maior mortalidade na fase de pupa, o que pode ser observado, nesse caso, para o lote L_1 .

Quanto às taxas de sobrevivência ao período de 12 horas, embora as diferenças entre o lote L_1 e os demais pareçam pequenas, deve-se considerar que os efeitos dessas taxas se expressam em função da duração dos estádios. O longo tempo de desenvolvimento do lote L_1 acentua, portanto, esse efeito.

CONCLUSÕES

1. A dieta composta de uma parte de farinha de peixe, duas partes de pão torrado moído e duas partes de germe de trigo propiciam desenvolvimento satisfatório dos estádios imaturos de *A. darlingi* mantidos em laboratório.
2. Eventuais carências nutricionais de dietas larvais traduzem-se pelo alongamento do tempo de desenvolvimento dos estádios imaturos, bem como pelo aumento da mortalidade na fase de transição para adulto.
3. A combinação das técnicas de cálculo do estágio mediano e tábuas de vida constitui-se num instrumento adequado de avaliação do desenvolvimento de mosquitos mantidos em colônia.

AGRADECIMENTOS

Aos técnicos Luiz Zaia, Antenor Seisdedos, João Maurício N. S. Filho e José Carlos Gabarron pelo apoio na parte laboratorial.

BERGO, E. S. et al. [Evaluation of the larval development of *Anopheles darlingi* (Diptera - Culicidae) raised in the laboratory on different diets]. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 24: 95-100, 1990.

ABSTRACT: Three diets for *A. darlingi* larvae were tested in order to arrive at the following parameters indicative of development in this phase: length of time, both for overall as for each stage of evolution and daily and total stage-survival. A methodology which combined two vital statistical methods of analysis, adjusted to the study of populations under laboratory conditions, was used for determining these parameters. The length of time for overall and for each stage of evolution were graphically assessed on the basis of trend curves of colony median stages, in sequential surveys. Values for the total and the daily stage-survival were estimated from survival tables. Results permitted the selection of the most adequate diet for the larval development as that composed of one part of fish flour to two parts of bread flour and two parts of a heat germ, giving an average length of 12.9 days between the first larval stage and the emergent adult. Total survival rate was of 95%.

KEYWORDS: Anopheles, growth. Larva, growth. Animal feeding.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BURALLI, G. M. et al. Alimentação de *Triatoma infestans* em laboratório. Rev. bras. Malar., 32: 42-52, 1980.
2. BURALLI, G. M. & BERGO, E. S. Manutenção de colônia de *Anopheles darlingi* Root, 1926, em laboratório. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 30: 157-64, 1988.
3. CORRÊA, R. R. et al. Informe sobre uma colônia de *Anopheles darlingi* transmissor da Malária. [Trabalho apresentado ao XVIII Congresso Brasileiro de Higiene, São Paulo, 1970].
4. CROWELL, R. L. Apud GAHAN, J. B. & SMITH, C.N. Problems connected with raising mosquitos in the laboratory. Bull. Wild Hlth Org., 31: 445-8, 1964.
5. FORATTINI, O. P. Entomologia médica. São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. v. 1.
6. FORATTINI, O. P. et al. Aspectos ecológicos da tripanosomíase americana. X — Dados populacionais das colônias de *P. megistus* e de *T. sordida* espontaneamente desenvolvidas em ecótopos artificiais. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 11: 362-74, 1977.
7. FREIRE, S. A. & FARIA, G. A. Criação e alguns dados sobre a biologia do *Anopheles (N) darlingi*. Rev. bras. Biol., 7: 57-66, 1947.
8. GALVÃO, A. L. A. et al. Alguns dados sobre a manutenção de colônias de *Nyssorhynchus* em laboratório. Arq. Hig. Saúde públ., 9: 85-102, 1944.
9. GERBERG, E. J. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Amer. Mosq. Control Ass. Bull., (5), 1970.
10. GIGLIOLI, G. Laboratory colony of *Anopheles darlingi*. J. Nat. Malar. Soc., 6: 159-64, 1947.
11. MORLAN, H. B. et al. Methods for mass rearing of *Aedes aegypti* (L). Apud GERBERG, E. J.⁹
12. SANTOS, J. M. et al. Biologia de anofelinos amazônicos. 1 — Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi*, Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus-Boa Vista. Acta amazôn., 11: 789-97, 1981.

Recebido para publicação em 25/4/1989
Reapresentado em 1/2/1990
Aprovado para publicação em 19/2/1990