

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
NUCLEO DE SAÚDE-NUSAU
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL-PGBIOEXP

ALYNE CUNHA ALVES DIAS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA A AMÔNIA SOBRE LARVAS DE
DIFERENTES ESTÁDIOS DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Porto Velho-RO

2017

ALYNE CUNHA ALVES DIAS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA A AMÔNIA SOBRE LARVAS
DE DIFERENTES ESTÁDIOS DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Dr. Alexandre de Almeida e Silva

Porto Velho-RO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

D541e Dias, Alyne Cunha Alves.

Efeito da exposição aguda e crônica a amônia sobre larvas de diferentes estádios de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) / Alyne Cunha Alves Dias. -- Porto Velho, RO, 2017.

67 f. : il.

Orientador(a): Prof. PhD Alexandre de Almeida e Silva

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1. Nitrogênio amoniacal. 2. Criadouro poluído. 3. Toxicologia. 4. Toxicologia aquática . I. Silva, Alexandre de Almeida e. II. Título.

CDU 595.771

ALYNE CUNHA ALVES DIAS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA A AMÔNIA SOBRE LARVAS
DE DIFERENTES ESTÁDIOS DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Comissão Examinadora:



Dr. Alexandre de Almeida e Silva
(Presidente da banca)

Dr. Jansen Fernandes Medeiros
(Membro memória)

Dr. Moreno Magalhães de Souza Rodrigues (Membro externo)

Porto Velho, 28 de abril de 2017.

Resultado: APROVADA

Aos meus pais, Maria e Benedito, por serem
minha inspiração e minha força.

Ao meu esposo Anderson, por ser tão
dedicado, paciente e amoroso.

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida meu primeiro agradecimento é para Deus que me permitiu chegar até aqui, mesmo conhecendo todas minhas fraquezas. Por ter me dado sabedoria e persistência perante as dificuldades.

À minha família, que esteve ao meu lado, obrigada por todo seu apoio, obrigada mãe, você foi minha inspiração, obrigada pai pelo incentivo.

Ao meu esposo Anderson, com você tudo se tornou mais leve. Obrigada por tudo, pela paciência quando eu não já tinha tanta paciência, pelo apoio nos dias corridos e por estar ao meu lado em todos os momentos independente das minhas escolhas. Você foi essencial para que eu conseguisse enfrentar cada dia. Você é um grande companheiro.

Ao professor Alexandre, pois tenho muita gratidão, obrigada por ter me dado a oportunidade de conhecer a pesquisa e me guiar nesse mundo. Uma oportunidade dada há quase 6 anos atrás mas que sem dúvida foi para mim a melhor escolha feita até hoje e o conhecimento que adquiri foi imensurável, tanto profissional como pessoal. Obrigada também pela paciência, sei que sou muito teimosa, mas mesmo assim o senhor soube indicar meus erros com muita sabedoria, sempre me levando a crescer na pesquisa.

Ao Dr. Moreno, você foi também importante para meu crescimento profissional. Você plantou uma sementinha em mim que me levou a ver bioestatística com outros olhos, hoje tenho menos preconceito e MEDO. Sei que preciso aprender muiiiita coisa ainda e disso não tenho dúvidas, mas essa barreira você começou a quebrar em mim, obrigada por tudo e por sua ajuda e ensinamentos.

Ao Labein, a todos que já passaram como a Vanessa, Naiara, Elizângela, Danilo, Daiane, Rafa e aos que estão como a Ana, Amanda, Sol Sol (você se tornou grande parceiro durante a qualificação e o período pré-defesa, porque pudemos dividir um pouco do nosso cansaço e nos aliviar, gostei muito de te conhecer um pouco mais, te acho o máximo!), obrigada colegas, todos vocês, por tornarem os meus dias divertidos, por tanto me ajudarem e tornar tudo isso

hoje possível, estou finalizando essa etapa. OBRIGADA! A colaboração de todos foi muito importante.

Ao Antônio, mesmo não sendo da turma de mestrado é como se fosse, você me ensinou muito e me ajudou muito para que eu entendesse tantas coisas que pareciam impossíveis, ao meu ver... As suas experiências de vida e seu jeito de se doar ao ensinar foram importantíssimas para mim.

À Glauci, você foi e é uma grande parceira (dentro do lab e fora dele). Aprendi muito com você, apesar de AMBAS sermos cabeça dura, também tínhamos muito em comum e sem dúvida isso transformou meu modo de agir e pensar. Suas experiências me ensinaram muito, você é uma pessoa muito boa e sou grata por se tão generosa a doar muito (porque foram muitos mesmos!) do seu tempo para ouvir minhas reclamações que foram suas reclamações, e por ser sensível aos meus momentos difíceis. Claro que tivemos momentos divertidos, não foi só reclamações, e esse momentos ficarão guardados, você é uma pessoa abençoada que sabe confortar e divertir qualquer pessoa!

Também sou grata a você Aline Andriolo, outra pessoa que doou muito de seu tempo para me ouvir, me aconselhar e me dar bronca. Você também é muito especial. Vou lembrar com muito carinho dos nossos momentos de distrações, através das caminhadas e exercícios, sushi etc, que no final sempre era usado por mim para buscar uma palavra sua que me colocasse no chão. Você apesar de ser mais nova é muito sensata e não tenho dúvida que foi essencial nesse momento da minha vida. Aliás, vocês duas foram essenciais por isso escrevi o agradecimento de vocês num parágrafo só, tudo junto e misturado, porque foi assim que ficamos durante o mestrado da Glauci e até agora no meu mestrado, nos tornamos mais próximas ainda e assim espero ficar por muitos e muitos anos. Meninas, fico feliz por nosso laço de amizade se fortalecer tanto durante esse período louco e ao mesmo tempo emocionante da minha vida. A vocês todo agradecimento seria pouco, parece exagero mais não é, vocês mostraram tanta sensibilidade e empatia por mim, que tornaram momentos complicados em alívio, e isso me deixa feliz, saber que existe pessoas como vocês no mundo.

À todos laboratórios que contribuíram de diferentes formas para esse trabalho chegasse até aqui, sem dúvida aprendi muito com as pessoas que eu tive contanto, com Leandro, Walkimar e tantas outras pessoas que doaram um pouco do seu tempo para me ensinar. Obrigada ao Cebio e ao laboratório de química. A todos fica a minha gratidão.

Obrigada à Universidade Federal de Rondônia, à FIOCRUZ/RO pelo apoio logístico para captura, ao PDTIS, à FAPERO e a CAPES pelo apoio para realização desse trabalho.

Enfim fecharei mais um ciclo na minha vida e sinto que devo agradecer a cada um que passou por ela e deu parte do seu tempo para me ensinar/ajudar, acredito esse sentimento de gratidão é importante e me faz crescer como pessoa, e me faz lembrar que sem ninguém eu não conseguiria nada durante essa etapa que fantástica pela qual eu passei.

“Desde criança sempre me agradava contemplar as formas estranhas da natureza, não como observador que investiga, mas abandonando-me apenas ao seu encanto peculiar, à sua profunda e complexa linguagem. As longas raízes das árvores, os veios coloridos das pedras, as manchas de óleo sobrenadando na água, as fendas dos cristais, todas as coisas desse gênero tiveram desde muito para mim um singular encanto.”

Hermann Hesse

RESUMO

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao ser humano por mosquitos do gênero *Anopheles*. Na América do Sul, o *Anopheles darlingi* é o principal vetor dessa doença. Esse inseto é holometábolo e seu ciclo biológico compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. Os estágios imaturos do *An. darlingi* tem preferência por lagos ou igarapés e esse habitat apresenta componentes físico-químicos que fornecem condições ao desenvolvimento larval. Os componentes químicos incluem diversas substâncias nitrogenadas, que podem ser encontradas na forma de nitrogênio amoniacal. A amônia se difunde facilmente na água, e em elevadas concentrações é altamente tóxica para grande parte da biota aquática. Apesar disso, algumas espécies de mosquitos têm se adaptado a criadouros poluídos. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da exposição crônica e

aguda de amônia sobre diferentes parâmetros biológicos de *An. darlingi*. Para avaliar as concentrações letais e o efeito crônico e agudo nos estádios L1 e L3 foram realizados bioensaios com dez concentrações de amônia (0 - 1000 ppm). Em cada bioensaio foram utilizadas 25 larvas em estágio L1 e L3. Para cada concentração os testes foram realizados em quadruplicata sendo os mesmos repetidos quatro vezes com larvas L1 e cinco com L3. Na exposição crônica a amônia era adicionada diariamente as bacias onde as larvas eram criadas. Diariamente os parâmetros biológicos de interesse foram observados. Posteriormente os dados foram analisados utilizando modelos de regressão lineares generalizados de efeito misto e análise de Probit. A análise da concentração letal foi realizada por Probit no programa Minitab 14 (MINITAB Inc.). Para análise dos efeitos agudo e crônico foram realizadas no software estatístico livre R. As concentrações letais para larvas L1 foram menores que as concentrações letais para larvas L3. De forma geral, o aumento da concentração de amônia causou aumento da mortalidade larval, sendo ainda maior para as larvas expostas cronicamente a amônia e no estágio L1. O tempo de desenvolvimento larval em L1 e L3 foi maior no tratamento crônico e diminuiu com o aumento das concentrações de amônia. Obteve-se menor número de pupas e adultos nos experimentos com larvas L1, e a medida que a concentração de amônia aumenta a número de pupas e adultos diminui. Adultos provenientes de larvas expostas à amônia no estágio L1 tiveram maior longevidade, mas não houve associação entre a concentração de amônia e a longevidade dos adultos. Assim, conclui-se que *Anopheles darlingi* tolera concentrações de amônia próximas a mosquitos que habitam ambientes poluídos, sendo as concentrações letais maiores para o estágio larval tardio (L3). Apesar disso, vários parâmetros biológicos foram afetados negativamente com o aumento da concentração de amônia, sobretudo com a exposição crônica.

Palavras-chave: Nitrogênio amoniacal, Criadouro poluído, Toxicologia, Toxicologia aquática

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and transmitted to humans by mosquitoes of the genus *Anopheles*. In South America, *Anopheles darlingi* is the main vector of this disease. This insect is holometabolous and its biological cycle comprises the phases of egg, four stages larvae, pupa and adult. The immature stages of *An. darlingi* have preference for lakes or streams, and this habitat has physico-chemical components that provide conditions for larval development. The chemical components include various nitrogenous substances, which can be found in the form of ammoniacal nitrogen. Ammonia diffuses easily into water, and at high concentrations is highly toxic to much of the aquatic biota. Despite this, some species of mosquitoes have adapted to polluted breeding grounds. Thus, the objective of the present study is to evaluate the effect of chronic and acute ammonia on different biological parameters of *An. darlingi*. To evaluate the lethal concentrations and the chronic and acute effect in the L1 and L3 stages, bioassays with ten concentrations of ammonia (0 - 1000 ppm) were performed. In each bioassay 25 larvae were used in the L1 and L3 stages. For each concentration, the tests were performed in quadruplicate and were repeated four times with L1 larvae and five with L3 larvae. In the chronic exposition ammonia was added daily to the basins where the larvae were created. Daily biological parameters of interest were observed. Afterwards the data were analyzed using generalized linear regression models of mixed effect and Probit analysis. The lethal concentration analysis was performed by Probit in the Minitab 14 program (MINITAB Inc.). For analysis of the acute and chronic effects were performed in the free statistical software R. The lethal concentrations for L1 larvae were lower than the lethal concentrations for L3 larvae. In general, increased ammonia concentration caused an increase in larval mortality, and it was even greater for larvae exposed to ammonia and at the L1 stage. Larval development time in L1 and L3 was higher in chronic treatment and decreased with increasing concentrations of ammonia. Lower numbers of pupae and adults were obtained in experiments with L1 larvae, and as the concentration of ammonia increases the number of pupae and adults decreases. Adults from larvae exposed to ammonia at the L1 stage had greater longevity, but there was no association between ammonia concentration and adult longevity. Thus, it is concluded that *An. darlingi* tolerates concentrations of ammonia close to mosquitoes inhabiting polluted environments, with lethal concentrations being higher for the late larval stage (L3). Despite this, several biological parameters were negatively affected with the increase of ammonia concentration, especially with chronic exposure.

Key words: Ammonia nitrogen, Pollutant breeding ground, Toxicology, Aquatic toxicology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Migração de esporozoítos de <i>Plasmodium sp.</i> através do epitélio.	14
FIGURA 02- Ciclo de vida do parasita da malária humana <i>Plasmodium vivax</i> .	15
FIGURA 03- Distribuição das principais espécies de vetores da malária nas Américas	17
FIGURA 04- Ciclo de vida do <i>Anopheles darlingi</i>	19
FIGURA 05- Alimentação sanguínea artificial de mosquitos selvagens.....	28
FIGURA 06- Características diagnósticas da espécie <i>Anopheles darlingi</i> .	29
FIGURA 07- Etapas para obtenção dos ovos de <i>Anopheles darlingi</i>	30
FIGURA 08- Etapas para obtenção de larvas de <i>An. darlingi</i> .	31
FIGURA 09- Organograma com as etapas para a titulação.....	32
FIGURA 10- Titulação de solução HCl com solução NaOH e titulação de solução NH ₄ OH através da solução HCl.....	33
FIGURA 11- Reações de neutralização entre uma base e um ácido.....	34
FIGURA 12- Copos plásticos contendo as larvas de <i>Anopheles darlingi</i> nas diferentes concentrações de amônia testadas	36
FIGURA 13- Desenho experimental para avaliação do efeito crônico e agudo da amônia na mortalidade de larvas no estágio L1 e L3 de <i>Anopheles darlingi</i>	37
FIGURA 14- Mortalidade predita durante o desenvolvimento larval nos estádios L1 e L3 de <i>Anopheles darlingi</i> submetido a tratamentos crônico e agudo com diferentes concentrações de amônia.....	40
FIGURA 15- Tempo de desenvolvimento das larvas de estádios L1 e L3 de <i>Anopheles darlingi</i> submetidos aos tratamentos crônico e agudo com diferentes concentrações de amônia.	41
FIGURA 16- Pupas obtidas de larvas dos estádios L1 e L3 de <i>Anopheles darlingi</i> nos tratamentos crônico e agudo com diferentes concentrações de amônia	42
FIGURA 17- Probabilidade de emergência adultos oriundos de larvas dos expostas a amônia nos estádios L1 e L3 de <i>Anopheles darlingi</i> nos tratamentos crônico e agudo nas diferentes concentrações de amônia.	43
FIGURA 18- Longevidade dos adultos oriundos de larvas de <i>Anopheles darlingi</i> expostas a amônia a partir do estágio L1 nos tratamentos crônico e agudo.....	43
FIGURA 19- Longevidade dos adultos oriundos de larvas expostas a amônia a partir do estágio L3 de <i>Anopheles darlingi</i> nos tratamentos crônico e agudo. ...	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Malária	13
1.2	Vetores da malária	16
1.2.1	Importância médica e distribuição.....	16
1.2.2	.Biologia de mosquitos anofelinos.....	18
1.3	Características gerais e propriedades dos criadouros de <i>An. darlingi</i> .	20
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Coleta e criação de <i>Anopheles darlingi</i>	28
3.1.1	Obtenção dos ovos	29
3.1.2	Criação de larvas	31
3.2	Quantificação de amônia	31
3.3	Obtenção das concentrações letais (CL50 e CL90) para L1 e L3	36
3.4	Exposição crônica e aguda da amônia em larvas nos estádios L1 e L3 de <i>An. darlingi</i>	37
3.5	Análise estatística	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Concentrações letais (CLS 90 e 50) da amônia para <i>An. darlingi</i>	39
4.2	Exposição crônica e aguda da amônia em larvas nos estádios L1 e L3 de <i>Anopheles darlingi</i>	39
4.2.1	Efeito da exposição crônica e aguda da amônia na mortalidade em L1 e L3.....	39
4.2.2	Efeito da exposição crônica e aguda da amônia no tempo de desenvolvimento larval em L1 e L3.....	40
4.2.3	Efeito da exposição crônica e aguda da amônia na pupação em L1 e L3.....	41
4.2.4	Efeito da exposição crônica e aguda da amônia na emergência de adultos em L1 e L3.....	42
4.2.5	Efeito da exposição crônica e aguda da amônia na longevidade dos adultos em L1 e L3.....	43

5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença parasitária infecciosa, que ainda acomete milhões de pessoas em todo o mundo. Essa enfermidade é uma das mais graves para humanidade, sendo considerada potencialmente fatal e está diretamente relacionada com populações humanas mais carentes de infraestrutura (WHO, 2017).

Trata-se de uma doença endêmica em regiões tropicais e subtropicais, distribuindo-se principalmente na África Ocidental e Central, Sudeste Asiático, Ilhas da Oceania e países da América Central e América do Sul (HAY et al., 2004; PENNY et al., 2015).

De acordo com o relatório mundial da malária, em 2015 foi registrado cerca de 212 milhões de casos e 429 mil mortes. No Brasil, ainda são intensos os esforços para erradicação dessa doença, mas apesar disso o país registrou em 2015 cerca de 143 mil notificações (WHO, 2016). Além disso, essa doença é predominante na região Amazônica, sendo o Amazonas o estado com maior número de casos notificados. Rondônia é um dos estados localizados na porção oeste da Amazônia apresentando no mesmo período cerca 7.482 casos de malária, ficando em 6º lugar no Ranking de notificações de casos (BRASIL, 2017).

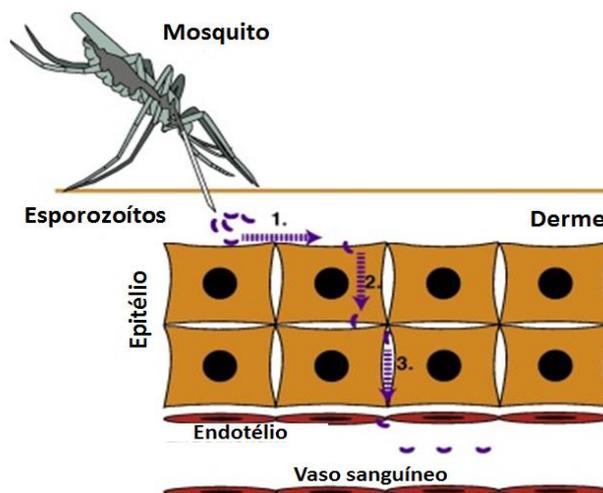
A malária é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que infectam tanto um hospedeiro vertebrado quanto um invertebrado. O conhecimento desse parasito se deu por Charles Louis Alphonse Laveran em 1880 que observou seu crescimento no sangue diferenciando-o de qualquer outra célula presente no hospedeiro e considerando esse elemento como o responsável pelos sintomas no qual as pessoas contaminadas apresentavam (LAVÉRAN et al., 1982). Ronald Ross em 1897 confirmou a transmissão dessa doença por mosquitos e Giovanni Battista Grassi em 1898 apontou o gênero *Anopheles* como responsável pela transmissão da malária humana (PATEL ; SINGHAL; SOMAN, 2016).

São conhecidas cinco espécies que parasitam o homem, o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*

(NEVES et al., 2016) e recentemente o *Plasmodium knowlesi* também foi considerado um parasito da malária humana com distribuição na Ásia (CRAMER, 2015). Dentre as espécies causadoras da malária humana, o *P. falciparum* e *P. vivax* apresentam grande importância. A prevalência do *P. falciparum* se dá na África subsaariana, sendo que em 2014 representou 88% dos casos de malária (WHO, 2016). Já infecção por *P. vivax* ocorre em sua maioria na Ásia e nas Américas, ocorrendo pouquíssimos casos na África. Nas Américas, a infecção por *P. vivax* corresponde a mais de 77% dos casos (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Como mencionado anteriormente, o ser humano contrai o parasito ao entrar em contato com fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Durante a realização do repasto sanguíneo no homem, as fêmeas contaminadas com o plasmódio inoculam vasodilatadores e anticoagulantes a fim de permitir a alimentação sanguínea e ao mesmo tempo liberam formas esporozoítas do protozoário na pele e assim inicia-se o ciclo no hospedeiro humano (FIG. 1)(BEIER, 1998)

FIGURA 01-Migração de esporozoítos de *Plasmodium sp.* através do epitélio após serem inoculados durante repasto sanguíneo do mosquito.



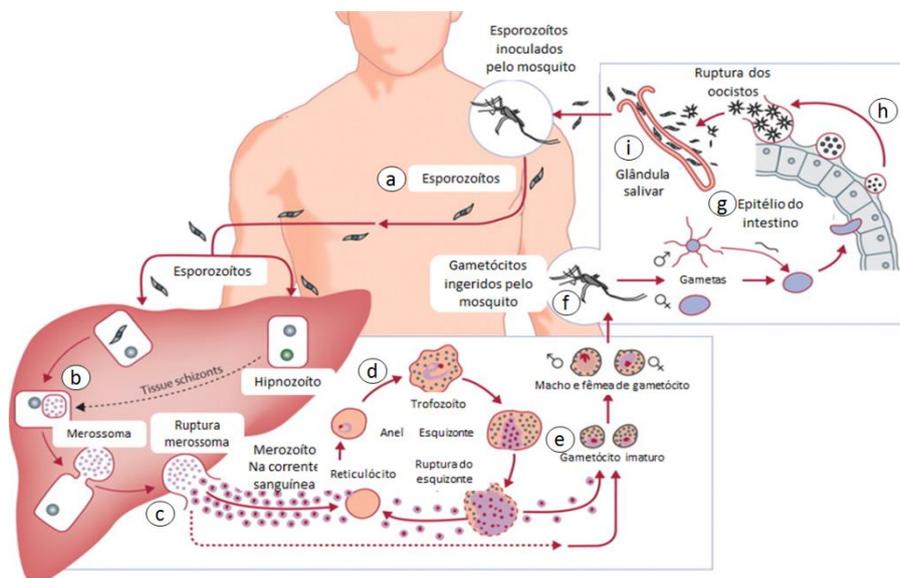
FONTE: Adaptado de YANG & BODDEY, 2017.

No ser humano (FIG. 2-a), os esporozoítos inoculados pelo mosquito apresentam grande motilidade, com isso conseguem atravessar a derme e alcançar a corrente sanguínea ao atingirem os hepatócitos (FIG. 2-b) e

realizam a passagem para o interior das células através da ligação de diferentes moléculas iniciando a esquizogonia pré-eritrocítica (AMINO et al., 2006; YANG; BODDEY, 2017).

Nos hepatócitos ocorre a diferenciação e formação de merozoítos. Os merozoítos resultantes desta multiplicação serão liberados na corrente sanguínea (FIG. 2-c) através de vesículas denominadas merossomas (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006). Na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos e se diferenciam em forma de anel e trofozoítos (FIG. 2-d) através da divisão celular (esquizogonia eritrocítica). Após algumas gerações ocorre diferenciação de alguns trofozoítos em gametócitos (FIG. 2-e) (COWMAN et al., 2016).

Figura 02-Ciclo de vida do parasita da malária humana *Plasmodium vivax*. A-Inoculação de esporozoítos no ser humano; B- Diferenciação de esporozoítos e formação de merozoítos; C- Liberação de merozoítos na corrente sanguínea por merossomas; D- Invasão dos eritrócitos por merozoítos; E- Ingestão de gametócitos por mosquitos; F- Formação de zigoto; G- Formação de oocinetos; H- Formação de oocistos; I- Liberação de esporozoítos na glândula salivar do mosquito.



Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009

Ao entrar em contato com uma pessoa contaminada com o parasita para realizar alimentação sanguínea, o mosquito ingere os gametócitos (FIG.2-e). No intestino do mosquito os gametócitos desenvolvem-se em microgametas e macrogametas e fundem-se formando o zigoto (FIG.2-f). No intestino o zigoto transforma-se em oocinetos (FIG.2-g) apresentando a capacidade de

movimentarem-se, atravessam a membrana peritrófica seguem até o intestino médio, atravessam o epitélio, alojam-se abaixo da membrana basal e se desenvolvem em oocistos (FIG.2-h) (VLACHOU et al., 2006).

Por fim, os oocistos sofrem esporogonia, sendo liberados milhares de esporozoítos na hemocele do mosquito. Esses esporozoítos alcançam as glândulas salivares (FIG. 2-i), podendo ser transmitido para hospedeiro vertebrado durante a inoculação e salivação do mosquito e posteriormente recomeçando o ciclo (SINDEN; BILLINGSLEY, 2001). Dentre as espécies de *Plasmodium*, o *P. vivax* apresenta como característica distinta a manutenção de parasitos dormentes nas células hepáticas, conhecidos como hipnozoítos, assim é possível ocorrer ciclos de reinfecção sem que haja a inoculação de novos esporozoítos (MUELLER et al., 2009)

1.2 Vetores da malária

1.2.1 Importância médica e distribuição

Os vetores da malária são insetos pertencentes a Ordem Diptera e família Culicidae na qual agrupa espécies conhecidas popularmente como pernilongos, carapanãs, muriçocas. Esses organismos apresentam importância médica uma vez que são vetores de agentes etiológicos causadores de doenças como a dengue, chikungunya, febre amarela, filariose, encefalites virais, zika, malária etc (FORATTINI, 2002; FAUCI, 2016; TOLLE, 2009).

Taxonomicamente a família Culicidae é dividida em duas subfamílias, a Culicinae e Anophelinae na qual está inserido gênero *Anopheles*. A este gênero pertencem os mosquitos transmissores da malária humana. O gênero *Anopheles* apresenta distribuição mundial, os adultos possuem palpos maxilares longos, escutelo possui aspecto arredondado e probóscide do mesmo tamanho da antena (FORATTINI, 2002).

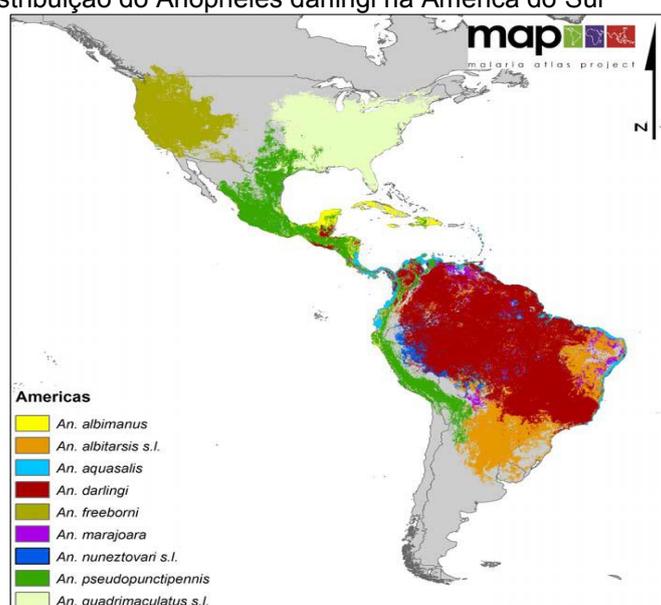
O gênero *Anopheles* é subdividido em sete subgêneros: *Baimaia*, *Anopheles*, *Stethomyia*, *Nissorhynchus*, *Kerteszia*, *Lophopodomyia* e *Cellia*, sendo que este último não é encontrado na região Neotropical. Desses gêneros citados apenas quatro são transmissores da malária: *Kerteszia*, *Anopheles*,

Nyssorhynchus e *Cellia*, sendo esse último com importância médica apenas no Velho mundo onde é restrito (HARBACH, 2013). Os subgêneros *Kerteszia* e *Nyssorhynchus* são encontrados na região Neotropical, e no Brasil são os subgêneros incriminados na transmissão da malária humana (CONSOLI, OLIVEIRA, 1994).

De acordo com o Banco de dados do Catálogo sistemático de Culicidae (*Systematic Catalog of Culicidae*) são conhecidas 486 espécies de mosquitos que pertencem ao gênero *Anopheles*. Apesar da existência de uma ampla gama de anofelinos, apenas 41 espécies exercem papel primário na transmissão da malária.

As principais espécies vetoras nas Américas (FIG. 3) são o *Anopheles freeborni*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles nuneztovari* (SINKA et al., 2012). No entanto, no Brasil, as espécies consideradas como vetores primários são *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis sensu lato*, *Anopheles oswaldoi*, *An. nuneztovari*, *Anopheles triannulatus*, *Anopheles braziliensis*. No subgênero *Kerteszia*, infecções naturais foram relatadas para *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

FIGURA 03-Distribuição das principais espécies de vetores da malária nas Américas. Figura destaca a ampla distribuição do *Anopheles darlingi* na América do Sul



Fonte: SINKA, 2012

E dentre as espécies acima mencionadas, *Anopheles darlingi* é a espécie dominante e o principal vetor da malária na região Norte do (SINKA et al., 2012; GIL et al., 2015a). Além disso, compõem mais de 90% da fauna na Amazônia brasileira (BARBOSA et al., 2016). Alguns aspectos contribuem para que *An. darlingi* seja o vetor dominante na Amazônia Brasileira, dentre eles estão o hábito antropofílico, endofilia e a alta taxa de infecção comparados a outros anofelinos (TADEI et al., 1998).

A preferência por realizar a alimentação sanguínea em humanos, i.e., antropofilia, é uma característica importante do *An. darlingi*. Alguns estudos apontavam que devido a isso, por muito tempo, essa espécie teve maior preferência por realizar alimentação no interior das casas (endofagia), permanecendo no seu interior para repouso (endofilia) (DEANE, 1948). No entanto, o uso de inseticidas intradomiciliares provocou uma mudança de comportamento dessas espécies quanto ao local de repouso e até mesmo o local para alimentação, sendo em alguns locais mais exofágico e exofílico (CHARLWOOD, 1996).

Outro importante fator que contribui para que o *An. darlingi* seja o principal vetor da malária é a sua susceptibilidade a infecção por *Plasmodium* como demonstrado por vários autores (KLEIN et al, 1991a; KLEIN et al, 1992b; DA SILVA-VASCONCELOS et al., 2002). Além disso, o elevado número de casos de malária em estados na Amazônia possivelmente está relacionado com a alta densidade populacional de *An. darlingi* (BARBOSA et al., 2016). Assim, devido a sua susceptibilidade e abundância, o *An. darlingi* consegue manter a transmissão da malária durante todo o ano mesmo em baixa densidade de mosquitos, auxiliando na manutenção do ciclo da doença (DA ROCHA et al., 2008; PÓVOA et al., 2006).

1.2.2 Biologia e morfologia de *Anopheles darlingi*

Os mosquitos são insetos holometábolos e seu ciclo biológico compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (FIG 4). As fases imaturas são aquáticas e a fase adulta é terrestre. Sendo que as fêmeas colocam em média 100 ovos isoladamente e diretamente

na água e o tempo médio de eclosão é de três dias (FIG. 4-A). O tamanho do ovo, bem como as estruturas que o compõem varia de acordo com a espécie. Os ovos de anofelinos possuem flutuadores e estes são compostos por várias câmaras de ar, além de possuir na superfície do exocócion características diferentes entre as espécies que podem ser utilizadas como caracter morfológico (HINTON, 1967).

FIGURA 04- Ciclo de vida do *Anopheles darlingi*. A-Ovo evidenciando os flutuadores; B-Estágio larval; C- Pupa ; D-Fêmea adulta, E- Macho adulto.

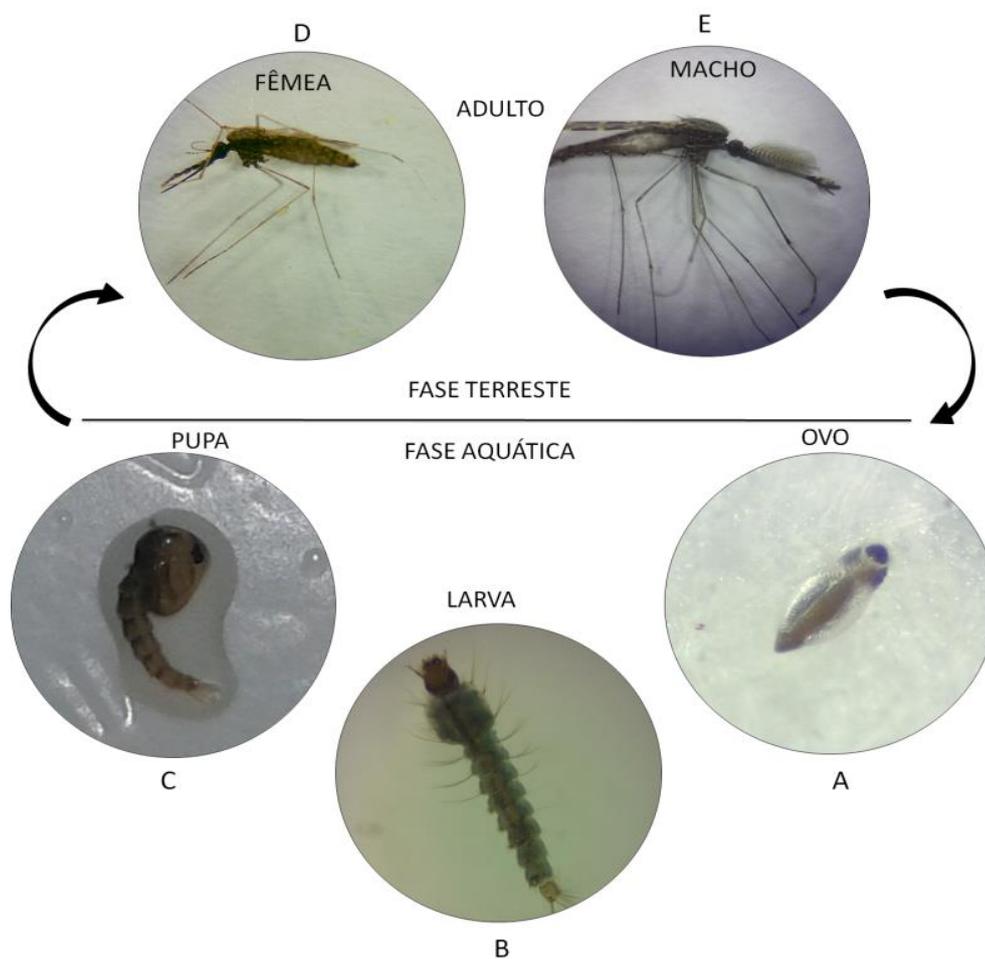


FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

A fase larval (FIG. 4- B) é aquática, os imaturos respiram ar atmosférico, são ápodes e com formato vermiforme. O tempo de desenvolvimento até fase de pupa pode durar em torno de dez dias, variando de acordo com a espécie e as condições do ambiente. Morfologicamente, a larva possui cabeça, tórax e

abdome. Na cabeça está inseridos um par de antenas, olhos e aparelho bucal mastigador-raspador e alimentação consistindo de microrganismos. No tórax, há cerdas que são importantes na taxonomia e no final do abdome, as larvas de anofelinos não possuem sifão, sendo assim, para respirar elas se dispõem paralelamente na superfície da água. Após o quarto estágio larval, transformam-se em pupas. As pupas (FIG. 4- C) possuem aspecto curvo (similar a uma vírgula), nessa fase não se alimentam, respiram por trombetas, e durante dois dias ocorrem as mudanças necessárias para que ocorra a metamorfose e emergência do adulto (CONSOLI; OLIVEIRA 1994).

O adulto (FIG. 4- D) apresenta o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome. Possui a cabeça globosa, com um par de olhos compostos e duas antenas longas onde estão inseridas as cerdas sensoriais. O macho apresenta maior número de cerdas dando aspecto plumoso às antenas, enquanto que na fêmea o número de cerdas das antenas é reduzido, conferindo um aspecto piloso. As peças bucais dos mosquitos são do tipo picador-sugador, sendo composto por cinco peças, duas maxilas, duas mandíbulas, hipofaringe e o labro que são alojados no lábio, constituindo a probóscide. No tórax dos adultos estão inseridas as asas e pernas, que são longas e composta de coxa, trocanter, fêmur, tíbia e cinco artículos tarsais. O abdome possui oito segmentos e dois modificados em ânus e genitália externa, nele estão alojados os órgãos internos. Somente a fêmea é hematófaga, sendo que o sangue utilizado é indispensável para a maturação dos ovos e para maior longevidade das fêmeas e ambos machos e fêmeas alimentam-se de solução açucarada. Os adultos de *An. darlingi* apresentam atividade noturna, iniciando no crepuscular com picos ao longo de toda a noite (CLEMENTS, 1992).

1.3 Características gerais e propriedades físico-químicas dos criadouros de *An. darlingi*

As larvas e pupas de anofelinos se desenvolvem em ambiente aquático e esse habitat apresenta características bióticas e abióticas propícias para a oviposição e para o desenvolvimento larval (REJMÁNKOVÁ; IRELAND; LEGE, 2000; MERETA et al., 2013). Tradicionalmente, o criadouro do *An. darlingi* é

descrito como grandes coleções de água permanentes como lagos ou igarapés com proximidade de moradias. Em períodos chuvosos, com baixa evaporação, as larvas também podem ser encontradas em coleções temporárias, com condições suficientes para o seu desenvolvimento e frequentemente as larvas são encontradas nas margens de rios ou igarapés (DEANE, 1947; MANGUIN et al., 1996).

Na estação seca, os criadouros geralmente são menores devido a evaporação. Além disso, ao longo do ano, as larvas de *An. darlingi* também podem ocupar lagos artificiais feitos pelo homem (VILLARREAL-TREVIÑO et al., 2015),

Os criadouros podem apresentar pequenas variações de acordo com a região, mas de forma geral são locais com profundidade de aproximadamente dois metros, com baixos teores de cloreto de sódio, ensolarados ou parcialmente sombreados com matéria orgânica (folhas, flores, galhos e detritos) e vegetação subaquática e flutuante (MANGUIN et al., 1996; NAGM et al., 2007).

Além destas características, outros componentes físico-químicos presentes na água são importantes para o desenvolvimento de larvas de anofelinos nos criadouros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994) entre os quais podemos destacar temperatura, salinidade, nitratos, nitritos, amônia, condutividade, pH, oxigênio, turbidez, fosfatos e matéria orgânica (PIYARATNE et al., 2005).

A temperatura influencia a sobrevivência larval de anofelinos, podendo ter impacto também no tempo de desenvolvimento e taxa de pupação e em parâmetros de adultos, como por exemplo a longevidade (BAYOH; LINDSAY, 2004). No Suriname, a temperatura média do criadouro de *An. darlingi* foi registrada entre 25,2°C e 26,2°C (HUDSON, 1984). Já Roraima os criadouros ideais apresentam temperatura que variam entre 28,9°C no período chuvoso e 29,7 °C no período seco (NAGM et al., 2007). Em criadouros de água preta no Amazonas, foi observado temperaturas entre 25°C e 27°C, já criadouros de água lamacenta na mesma região apresentaram temperaturas entre 21 ° C e 24 °C (TADEI et al., 1998).

Além da temperatura, outro parâmetro não menos relevantes é o pH. A concentração dos íons de hidrogênio é importante para os insetos aquáticos tendo em visto que estes permanecem um período de sua vida em contato com a água podendo a exposição a baixas concentrações de pH afetar negativamente o transporte epitelial (HARRISON, 2001). Observações de variados criadouros de imaturos de *An. darlingi* em diferentes países sul americanos como no Suriname e Belize indicaram, respectivamente, pH entre 6 e 7 e entre 6,49 e 6,93 (MANGUIN et al., 1996; ROZENDAAL, 1987). Já em Roraima, na estação chuvosa a média do pH foi 5,9 e na estação seca o pH registrado foi de 5,8, com baixo número de *An. darlingi* nesses criadouros (NAGM et al., 2007). Em rios de água escura no Amazonas o pH dos criadouros ficava entre 4,5 e 5 enquanto que rios de águas claras (lamacentas) no estado de Rondônia ficaram entre 7 e 8, sendo os criadouros com pH baixo, os habitats onde foi obtido menor número de larvas (TADEI et al., 1998).

A turbidez também pode se tornar um impedimento à sobrevivência larval (LIU et al., 2012), assim como o oxigênio e sulfato que tem impacto não só sobre as larvas mas também sobre outros microrganismos que podem ser utilizados como alimento pelas larvas (GIMNIG et al., 2001).

Estudos no Brasil sobre os aspectos relacionados à ecologia larval de anofelinos e principalmente aos criadouros em sua maioria abordam principalmente as características citadas acima e não se tem dados sobre a composição química dos criadouros de *An. darlingi*. Por outro lado, em outros países, alguns trabalhos com criadouros de anofelinos destacam além das características explanadas anteriormente outros parâmetros químicos dentre eles os compostos nitrogenados (LIU et al., 2012; NDENGA et al., 2012; PIYARATNE et al., 2005).

Dentre os vários elementos químicos presentes no meio aquático há o nitrogênio, elemento indispensável aos seres vivos. Na água pode ser encontrado na sua forma inerte ou na forma de nitrogênio orgânico, amônia, nitrito ou nitrato. A sua importância se deve por participar nos processos biológicos, contribuindo principalmente para síntese de nucleotídeos e aminoácidos (RABALAIS, 2002; LEHNINGER, 2006).

O nitrogênio está presente naturalmente na atmosfera, mas não está disponível facilmente para as plantas e os animais. Sua fixação biológica é realizada por microrganismos livres ou simbiontes de plantas e o primeiro produto gerado dessa fixação é a amônia (HARDY; BURNS, 1968; BURRIS; ROBERTS, 1993).

A amônia (NH₃) ou nitrogênio amoniacal é um gás, com cheiro intenso e é extremamente solúvel em água (COTTON, 1980). Pode ser obtida através da liberação natural pelas excretas dos organismos no meio aquático, na decomposição da matéria orgânica, ou fontes provenientes das práticas agrícolas, pecuária e também da liberação de efluentes resultante de esgoto no meio urbano (DENTENER; CRUTZEN, 1994; HALSTEAD et al., 2014).

A amônia quando na presença de bactérias como *Nitrossomas* e *Nitrobacter* pode ser oxidada a nitrito e em seguida à nitrato. O nitrito em vertebrados aquáticos tem efeito sobre a hemoglobina oxidando o ferro e incapacitando o transporte de oxigênio, em crustáceos (lagostim). Essa substância pode também oxidar o cobre da hemocianina impossibilitando assim o transporte gasoso. Além disso, pode levar à redução dos níveis de Cl e K dentre outros efeitos (CAMARGO; ALONSO, 2006; JENSEN, 2003)

Entre os três compostos citados, o nitrato é considerado o menos tóxico. A ação do nitrato é similar à do nitrito impossibilitando o transporte de oxigênio pelos pigmentos, mas, devido à baixa permeabilidade das células de organismos aquáticos a esse composto, seu efeito é menor (CAMARGO; ALONSO; SALAMANCA, 2005)

Compostos nitrogenados, além de outros, provenientes dos efluentes urbanos podem ter forte efeito nos ecossistemas aquáticos, com impacto negativo para riqueza de invertebrados (MARTINS et al., 2017) e quando em excesso, podem ser um fator limitante para a vida tanto de animais quanto de plantas (RABALAIS, 2002). A poluição por nitrogênio pode aumentar a concentração de íons de hidrogênio levando a acidificação do meio aquático, além de aumentar a eutrofização e reduzir a sobrevivência dos animais devido a sua toxicidade (CAMARGO; ALONSO, 2006).

Quando o nitrogênio está na forma de amônia, seu excesso pode também agir negativamente sobre a biota aquática, podendo causar estresse

oxidativo para macrófitas, além de ter efeitos tóxicos para vertebrados e invertebrados (LEMARIÉ et al., 2004; NIMPTSCH; PFLUGMACHER, 2007; WANG; LEUNG, 2015). Nos vertebrados como peixes, a amônia pode levar ao aumento no consumo de oxigênio, redução do crescimento e até a morte desses organismos em função da alta toxicidade. Tal toxicidade ocorre também nos invertebrados como moluscos e insetos (ALONSO; CAMARGO, 2003; LEMARIÉ ET AL, 2004; WANG; LEUNG, 2015).

Mesmo com relatos sobre os efeitos negativos da amônia na biota aquática, ainda há poucos estudos que abordam a relação de poluentes como a amônia nos criadouros de larvas de mosquitos, e principalmente em criadouros urbanos. Há diversos relatos na literatura sobre a ocupação dos espaços urbanos por mosquitos. E como exemplo de mosquitos urbanos tem-se o *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

No que se refere ao habitat dessas duas espécies é documentado que as formas imaturas de *Cx. quinquefasciatus* ocupam habitats variados, desde recipientes com água limpa e material orgânico, até mesmo locais totalmente poluídos. Por outro lado, os criadouros do *Ae. aegypti* apesar de também serem artificiais possuem pouca matéria orgânica e água limpa (BURKE et al., 2010; GIL et al., 2015b).

Trabalhos pioneiros com criadouros de anofelinos como de Beattie (1932) sugeriu que a presença de amônia poderia ser um fator para redução da população de mosquitos, prejudicando a oviposição das fêmeas e o crescimento larval. Posteriormente Senior-White (1938) também mostrou que a amônia poderia agir como inibidor de desenvolvimento de larvas do gênero *Anopheles*, no qual a concentração de 1 ppm já seria suficiente para tornar-se um criadouro inviável aos vetores da malária.

Apesar dos habitats de imaturos da maioria dos anofelinos serem “ambientes naturais”, em alguns países tem-se dado cada vez mais atenção aos criadouros antropizados. E na tentativa de se estabelecer um maior conhecimento sobre a ecologia larval, os estudos de caracterização de criadouros de anofelinos de importância vetorial em continentes como Ásia e África também estão cada vez mais contemplando informações sobre a amônia

juntamente aos outros compostos normalmente investigados (NDENGA et al., 2012, FOSSOG et al., 2013).

Estudos de caracterização dos criadouros de anofelinos em vilas ou áreas mais urbanizadas apontaram altas concentrações de amônia, assim como elevados níveis de nitrato, fosfato cálcio, sulfato de magnésio, sólidos dissolvidos, metais pesados e a baixa demanda de oxigênio (OYEWOLE et al., 2009; NKONDJIO et al., 2011; GUNATHILAKA et al., 2013).

Indo mais além do âmbito de caracterização de criadouro, TENE FOSSOG e Colaboradores (2013) revelaram a existência de larvas de *An. gambiae* em habitat onde há presença de amônia. Além disso, demonstraram a tolerância das larvas a essa substância. Na África o *An. gambiae* é uma espécie que assim como o *An. darlingi* explora os habitats em que se tem alterações humanas se aproveitando desses ambientes (NDENGA et al., 2012). Essa espécie é considerada um complexo de espécies, formada por duas populações distintas que ocupam nichos diferentes, havendo uma população mais adaptada a condições urbanizadas com grandes cargas de poluentes (TENE FOSSOG et al., 2013).

No Brasil, embora os criadouros de *An. darlingi* também sejam descritos como de águas límpidas (DEANE, 1948), essa espécie também tem sido amostrada em habitats localizados a pequena distância de moradias humanas (NAGM et al., 2007), o que poderia indicar uma mudança nesse padrão. Amazônia brasileira permanece sobre fortes mudanças ambientais que, em sua maioria, se devem a ocupação de espaços urbanos e periurbanos de modo desordenado, à falta de infraestrutura, desmatamentos e queimadas para retirada de madeira. Além disso, tem-se as atividades rurais como agricultura e piscicultura, que também geram grandes mudanças do meio (HAHN et al., 2014; DOS REIS et al., 2015).

Todas essas mudanças contribuem para aumento da população de mosquitos, em especial da população de *An. darlingi* e conseqüentemente, para o aumento na incidência da malária em diferentes localidades de borda de floresta desmatada na Amazônia (BARROS; HONÓRIO, 2015; TADEI et al., 2016).

No município de Porto Velho (RO), pesquisas em áreas peri-urbanas comprovaram a ocorrência de adultos de *An. darlingi* em locais antropizados com a transmissão da malária. Além de ser observado também a presença de larvas desse vetor em criadouros urbanos, com altas concentrações de amônia na mesma área (GIL et al., 2007; SILVA 2009).

Estudos genéticos com o *An. darlingi* indicam haver variação entre as diferentes populações, principalmente entre populações muito distantes. Esse fato é determinante para que o *An. darlingi* apresente um comportamento tão variado frente às diferentes condições em que a espécie é sujeita, conferindo a esse mosquito uma maior plasticidade diante das mudanças antrópicas (SCARPASSA; CONN, 2007). A variabilidade genética do *An. darlingi* referente ao comportamento hematofágico em diferentes localidades no Amazonas é apontado como uma resposta a exposição aos inseticidas nas moradias. Assim, a variabilidade genética proporcionaria a esse mosquito maior capacidade de habitar diferente ambiente (SILVA; TADEI; SANTOS, 2010; TADEI et al., 2016)

Contudo, apesar de uma ampla gama de informações acerca dos diferentes aspectos relacionados ao *An. darlingi*, ainda assim não se tem estudos relacionados a tolerância de *An. darlingi* a poluentes como a amônia. Mas diante da plasticidade dessa espécie frente a condições de antropização, sugere-se que essa espécie poderia ter a sua tolerância a ambientes poluídos aumento o que implicaria em uma maior distribuição desse vetor para o ambiente periurbano.

Tendo em vista a associação de larvas de mosquito em criadouro com condições consideradas inapropriadas, se faz necessário compreender a relação do *An. darlingi* ao ambiente antropizados e aos poluentes presente nos criadouros. E dada a importância desse mosquito, os estudos dos diferentes aspectos biológicos e ecológicos são importantes para entender a dinâmica de transmissão da malária, e assim desenvolver mecanismos de controles eficientes que permitam reduzir o número de casos de malária (TADEI et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da amônia sobre larvas de *An. darlingi* em condições de laboratório.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as Concentrações Letais (CLs) da amônia sobre as larvas de *An. darlingi* nos estádios L1 e L3 oriundas de adultos coletados em campo.
- Avaliar o efeito crônico e agudo da exposição à amônia nos estádios L1 e L3 de *An. darlingi* sobre os seguintes parâmetros biológicos: mortalidade larval, tempo de desenvolvimento larval, média de pupação, probabilidade média de produção de adultos, longevidade dos adultos

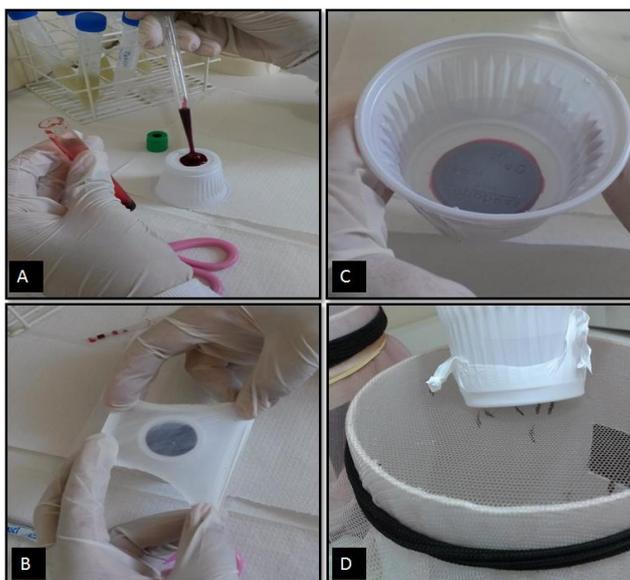
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e criação de *Anopheles darlingi*

Os mosquitos utilizados nos experimentos de laboratório foram coletados em duas propriedades particulares. A primeira, localizada a 27 km de Porto Velho (08°38'00.3"S, 63°55'51.9"W), a segunda no balneário Coqueiral próximo da Universidade Federal de Rondônia (8°51'32.5"S, 63°55'49.6"W). Os mosquitos foram coletados através de atração humana protegida, utilizando capturador de sucção. Logo após a coleta os mosquitos receberam alimentação sanguínea.

O sangue utilizado na alimentação foi coletado em laboratório. Após a coleta, o mesmo era mantido em tubos a vácuo heparinizados, e transportado para campo para sua utilização no repasto sanguíneo das fêmeas. O sangue foi ofertado aos insetos no fundo de copos plásticos de 50 ml, na parte externa e era coberto com membrana de teflon, dentro do copo era adicionada água quente e por fim o sangue era oferecido aos mosquitos por até 10 minutos, tempo suficiente para o ingurgitamento das fêmeas (FIG. 5).

FIGURA 5-Alimentação sanguínea artificial de mosquitos selvagens. A- Preparação do alimentador artificial com adição de sangue no fundo do copo descartável; B- membrana de teflon sendo posicionada no copo, sob o sangue; C- adição de água quente (37°C) dentro do copo.



Fonte: Modificado de Glaucilene Silva Costa, 2016

Após finalizar o repasto, as fêmeas foram mantidas nos copos telados com algodão embebido em sacarose a 10% dentro de uma caixa de isopor e transportadas para o insetário do Laboratório de Bioecologia de Insetos (LaBEIn). Todo procedimento de captura dos mosquitos e coleta de sangue foi realizado com aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa pelo protocolo de número CEP-53021215.0.0000.5300 (Anexo 1).

3.1.1 Obtenção dos ovos

Três dias após a alimentação sanguínea, tempo de maturação dos ovos, foi realizada a identificação da espécie. Para identificação do *An. darlingi* os principais caracteres morfológicos utilizados estão presentes na asa e nos tarsos posteriores (FIG. 6). Na veia anal da asa observa-se a presença de uma mancha escura próximo de cada extremidade e na veia costa a presença de uma mancha escura no início da inserção seguida por uma clara menor que a mancha escura. Os tarsos posteriores apresentam-se inteiramente branco (três últimos artículos) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

FIGURA 6-Características diagnósticas da espécie *Anopheles darlingi*. A- Asa com destaque nas manchas da veia costa (c) e veia anal (a); B- Perna posterior, com destaque nos artículos brancos.

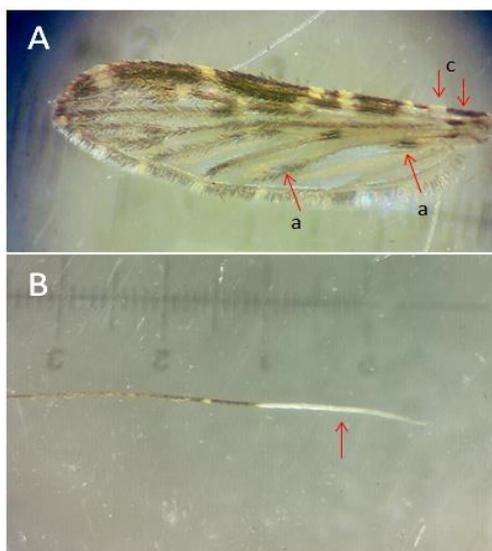


FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

Após a identificação de cada indivíduo uma asa foi retirada para estimular a oviposição. Após esse procedimento, os mosquitos foram

transferidos para dentro de um copo descartável contendo papel filtro úmido no fundo e tela fechando o recipiente. E cada copo continha apenas um mosquito e todos os recipientes telados eram mantidos dentro de uma caixa de isopor com camada de papel toalha úmida (FIG. 7) seguindo o protocolo padrão de criação de *An. darlingi* do laboratório.

FIGURA 7-Etapas para obtenção dos ovos de *Anopheles darlingi*. A- Identificação de espécie com lupa estereomicroscópica; B- acomodação dos mosquitos em copos descartáveis telados em caixas de isopor para oviposição.

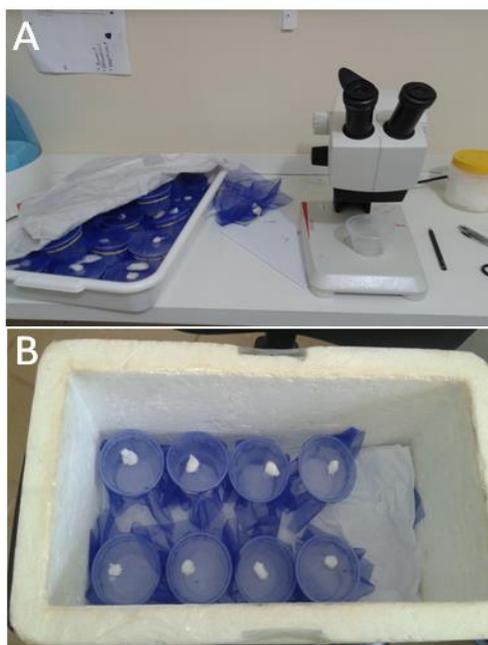


FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

Após dois dias era retirado o papel filtro do fundo do copo descartável onde os ovos estavam retidos, e dentro do mesmo foi colocado uma borda de papel filtro (FIG. 8) para manter a umidade dos ovos e evitar o ressecamento. Em seguida os ovos foram retirados desse papel com jato de água e depositados no recipiente envolvido com outro papel.

FIGURA 8-Etapas para obtenção de larvas de *An. darlingi* após obtenção dos ovos. A- Ovos obtidos após oviposição; B- Transferência de ovos para recipiente de eclosão.

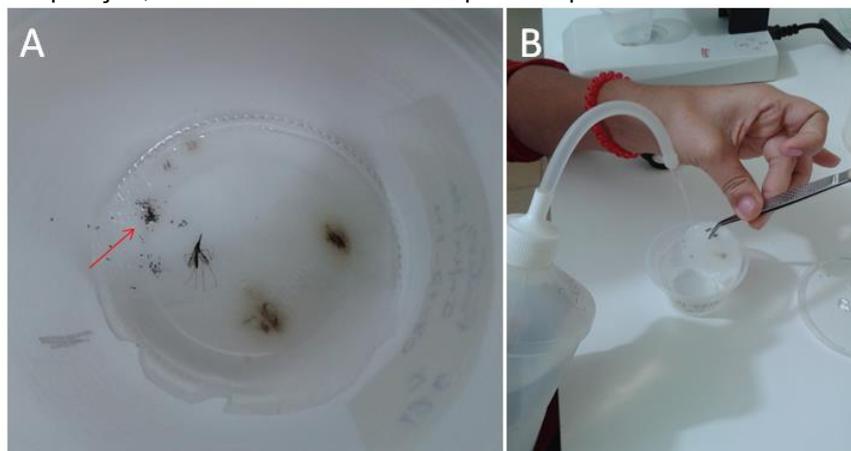


FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

3.1.2 Criação de larvas

As larvas L1 foram mantidas em recipientes de 100 ml, caso não fossem utilizadas para teste, seriam mantidas no copo até chegar ao estágio L3 quando eram transferidas para bacias de 30 x 22 x 8 cm com 300 ml de água filtrada, temperaturas entre 26 e 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Os copinhos e as bacias em que as larvas eram mantidas foram limpas diariamente e a alimentação feita com ração para peixe macerada da marca *TetraMin Tropical Flakes*

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMÔNIA

Para a realização dos experimentos de Concentração letal e efeito crônico e agudo da amônia foi utilizado o Hidróxido de amônio P.A (NH_4OH), marca Dinâmica. Uma solução a 0,1 M foi titulada para confirmação das concentrações de amônia na solução de Hidróxido de Amônio. A titulação é uma análise volumétrica, onde uma determinada substância com concentração desconhecida é titulada por outra substância (solução padrão) conhecida. Dessa forma, a concentração da substância de interesse é obtida através da reação de neutralização das soluções.

Neste método a amônia, espécie química com pH básico foi titulada por uma solução padrão de ácido clorídrico que tem pH ácido (BACCAN, 1979).

Além das soluções de Hidróxido de amônio (NH_4OH) e Ácido clorídrico (HCl) a 0,1M, foi preparado uma solução de Hidróxido de sódio (NaOH) para padronizar a solução titulante (ácido clorídrico), e assim era possível garantir com exatidão da concentração do HCl .

O volume de solução utilizado variou de acordo com a necessidade do experimento, mas geralmente eram preparadas 200 mL de solução, e para cada experimento eram feitas novas soluções e a titulação dos mesmos era realizada. A solução de Hidróxido de amônio era armazenado em refrigerador após a titulação para uso posterior. Todas as soluções foram preparadas no UNIR/FIOCRUZ- RO).

Após o preparo das soluções de NH_4OH , HCl , NaOH , era realizada imediatamente a titulação da substância de interesse (FIG. 9). Para realizar o procedimento utilizou-se uma bureta que apresenta uma torneira para a dosagem de substâncias utilizadas.

FIGURA 09-Organograma com as etapas para a titulação de Ácido Clorídrico e Hidróxido de amônio.

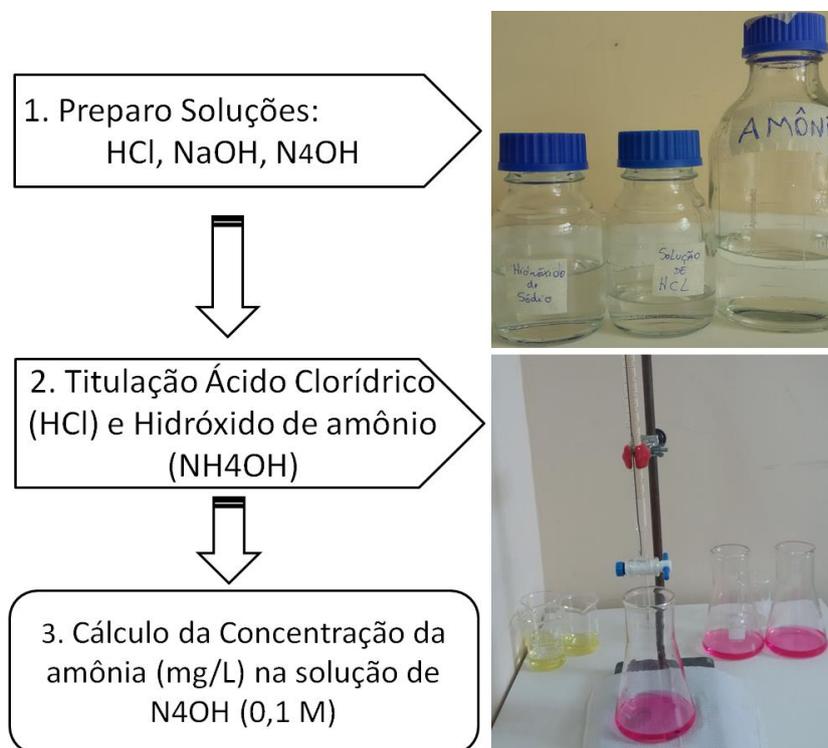


FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

A titulação foi realizada em duas etapas, na primeira etapa, para a titulação do titulando HCl (ácido) (FIG. 10- A) utilizou-se 25 ml da solução de titulante NaOH (base), este foi adicionado na bureta, previamente limpa. Abaixo da bureta colocou-se um Erlenmeyer contendo 12,5ml de solução de ácido clorídrico e nesta solução adicionou-se duas gotas de indicador ácido-base, vermelho de metila que foi o indicador visual para o ponto de neutralização entre a solução de NaOH e HCl. A solução de HCl inicialmente era incolor e após a adição do vermelho de metila apresentava coloração rosada, indicando pH ácido.

Após isso, iniciava-se a titulação, abrindo-se a torneira da bureta para o gotejamento contínuo do NaOH dentro do Erlenmeyer contendo HCl, e esta vidraria deveria ser mantida em agitação para a mistura das duas soluções. O gotejamento da solução de NaOH era encerrado quando se observava a mudança de cor da solução de HCl, que se tornava amarelada. A titulação do HCL foi realizado sempre em triplicata e o volume de NaOH utilizado para a mudança de cor da solução titulada era registrado (FIG. 10- B).

FIGURA 10-Titulação de solução HCl com solução NaOH e titulação de solução NH₄OH através da solução HCl; A-Destaque para a cor da solução não titulada e titulada de HCl; B- Representação das soluções HCl tituladas em triplicatas. C- Destaque para a cor da solução

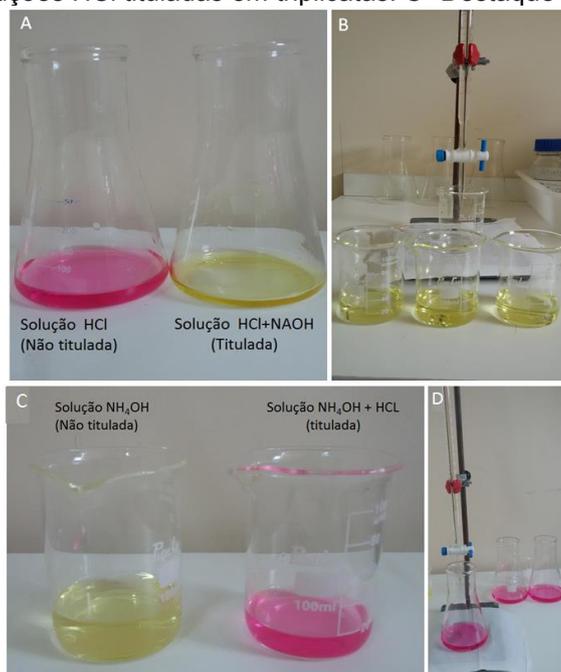


FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

Na segunda etapa foi realizada a titulação da solução de NH_4OH (para uso nos experimentos) através do HCl que foi o titulante utilizado na bureta e seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Neste caso, a solução de NH_4OH inicialmente era incolor e após a adição do vermelho de metila apresentava coloração amarelada, indicando pH básico (FIG. 10- C). E após a titulação a solução de NH_4OH apresentava cor rosada (FIG. 10- D). Na titulação do NH_4OH , o procedimento também foi realizado em triplicata e o volume de HCl utilizado para a mudança de cor da solução titulada foi registrado.

A mudança de cor na titulação do Ácido Clorídrico e posteriormente na titulação do Hidróxido de amônio indica uma reação de neutralização (FIG. 11), ou seja, há mistura de ácido HCl com a base NaOH representado na equação 1 ou da reação entre a base NH_4OH e o ácido HCl , demonstrado na equação 2.

FIGURA 11-Reações de neutralização entre uma base e um ácido. A- Reação entre Hidróxido de Sódio (Base) e Ácido Clorídrico (Ácido) (Equação 1); B- Reação entre Ácido Clorídrico (Ácido) Hidróxido de Amônio (Base)

Reação neutralização do Ácido Clorídrico :



Reação neutralização Hidróxido de Amônio:



Após, finalizado a titulação, com os dados de volumes utilizados tanto para a primeira etapa quanto para a segunda etapa foi calculada a concentração da amônia em miligramas por litro. Para chegar ao resultado da concentração de amônia na solução de Hidróxido de Amônio foi necessário realizar cálculos que levaram em consideração os volumes utilizados de soluções nas duas etapas. Assim, utilizou-se as seguintes fórmulas que permitem conhecer o número de Mol e a Molaridade de cada substância.

- 1- Na reação entre NaOH e HCl:
 - Mol de NaOH e de HCl
 - Molaridade de NaOH
 - Molaridade de HCl
- 2- Na reação entre HCl e NH₄OH
 - Mol de HCl e de NH₄OH
 - Molaridade de NH₄OH

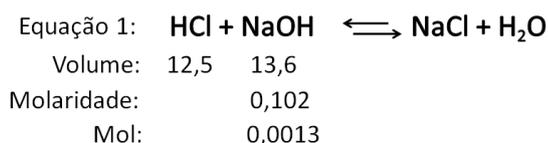
$$\text{Mol:} \quad M = \frac{n}{v}$$

$$\text{Molaridade:} \quad M = \frac{m}{MM \cdot v}$$

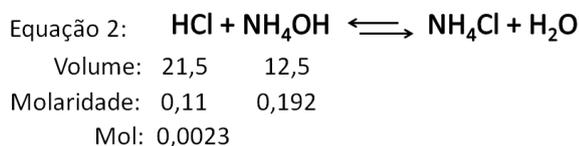
Onde:
 M- molaridade
 n- número de mol
 v- volume
 MM- massa molecular

E dessa forma todas as informações acima permitiram calcular a massa de amônia e obter a concentração real da amônia em solução. Portanto, quando se utilizou uma solução de 200 ml de NH₄OH, esta apresentou uma concentração de 6,75 mg/ml de amônia, e esse valor obtido foi essencial para realizar o preparo da solução estoque que foi utilizado nas diluições dos testes com as larvas.

Reação neutralização do Ácido Clorídrico :



Reação neutralização Hidróxido de Amônio:



↳ Massa amônia em 200 ml

$$M = \frac{m}{MM \cdot V \text{ (L)}} \rightarrow 0,192 = \frac{m}{35,05 \times 0,2} \rightarrow 1,35 \text{ (g)} / 200 = 0,00675 \text{ g/ml}$$

ou

6,75 mg/ml

3.3 Obtenção das concentrações letais (CL₅₀ E CL₉₀) para L1 e L3

Para avaliar as concentrações letais e a toxicidade da amônia e foram realizados bioensaios com larvas no estágio L1 e no estágio L3 (FIG.12). Os testes com larvas L1 e L3 foram realizados com 10 concentrações diferentes da substância (25, 50, 125, 250, 375, 450, 500, 625, 750 e 1000 ppm) e controle (apenas água).

Os testes para o estágio L1 foram realizados com quatro réplicas e quatro repetições. Da mesma forma, os testes com estágio L3 foram realizados com quatro réplicas e cinco repetições. Para cada concentração tanto no teste com L1 quanto L3 foram utilizadas 25 larvas, criadas em condições de laboratório (28°C, 70% UR e 24hs de fotoperíodo) e após 24 horas a mortalidade larval foi registrada (WHO, 2005, modificado).

Para cada repetição foi preparada uma solução estoque (com concentração de 1000 ppm) em água filtrada. Esta solução estoque foi obtida com a diluição da solução de hidróxido de amônio P.A. (previamente titulado). Os testes foram realizados em recipientes plásticos contendo 25 ml de solução. As larvas não foram alimentadas durante o teste. Foram consideradas larvas mortas, aquelas que não foram capazes de alcançar a superfície da água quando perturbadas e ficavam totalmente imóveis.

As concentrações selecionadas para os cálculos dos CLs (CL 50 e CL 90) foram determinadas levando em consideração pelos menos uma concentração que obteve 100% de mortalidade; duas concentrações que tiveram entre 50 a 99% de mortalidade; e duas entre 5 a 50 % de mortalidade (WHO, 2006).

FIGURA 12- Copos plásticos contendo as larvas de *Anopheles darlingi* nas diferentes concentrações de amônia testadas



FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

3.4 Exposição crônica e aguda da amônia em larvas nos estádios L1 e L3 de *An. darlingi*

A fim de avaliar os efeitos da amônia ao longo do tempo nos estádios de L1 e L3 foram realizados testes para obter informações sobre o efeito crônico e agudo dessa substância (FIGURA 13).

FIGURA 13-Desenho experimental para avaliação do efeito crônico e agudo da amônia na mortalidade de larvas no estágio L1 e L3 de *Anopheles darlingi*.



FOTO: ALYNE DIAS, 2016.

As larvas sobreviventes do teste para avaliar as concentrações letais (CL) foram utilizadas nesse teste. Essas larvas foram separadas em dois grupos (duas réplicas de cada concentração para cada grupo) e utilizadas para avaliar o efeito crônico e outro para avaliar o efeito agudo nas diferentes concentrações tanto em larvas no estágio L1 e L3 (FIGURA 13).

No tratamento agudo, as larvas (L1 ou L3) já haviam sido expostas à diferentes concentrações de amônia por 24h no teste do CL. No dia seguinte foram separados dois copos (considerados como réplicas) com as larvas sobreviventes de cada concentração e foram utilizadas para avaliação do efeito agudo, i.e., apenas 24 horas de exposição a amônia, ou efeito crônico, i.e., adição diária de amônia nas mesmas concentrações avaliadas durante os testes para o cálculo dos CLs.

Em ambos os casos, as larvas foram acompanhadas durante todo o desenvolvimento. No entanto, apenas água foi adicionada diariamente no

recipiente, em um volume final de 25 ml e não houve adição de mais solução de NH₄OH no tratamento agudo, enquanto no tratamento crônico, a solução de amônia era renovada diariamente até o final do experimento.

Os tratamentos crônico e agudo foram realizados simultaneamente, no entanto os testes com L1 e L3 não foram realizados no mesmo período. Em ambas as situações experimentais as larvas foram alimentadas da mesma forma, diariamente a água era retirada do recipiente juntamente com resíduos (resto de alimento no fundo do recipiente) e a mesma quantidade de água limpa era repostada no copo. Foi registrado diariamente o número de larvas mortas em cada um dos tratamentos. A alimentação das larvas foi à base de ração de peixe TetraMin Tropical Flakes triturada, duas vezes ao dia.

As pupas foram transferidas para gaiolas teladas e os adultos obtidos das larvas expostas a amônia foram alimentados diariamente com sacarose a 10%. Foi registrada a longevidade de cada adulto de todas as situações experimentais quando possível.

3.5 Análise estatística

Os dados resultantes dos testes de mortalidade foram submetidos a análise de Probit (dosagem x mortalidade) para obtenção do CL₅₀ e do CL₉₀, (programa Minitab 14 (MINITAB Inc.)

Para avaliar o efeito dos tratamentos crônico e agudo e o efeito das concentrações na biologia de larvas nos estádios L1 e L3 de *An. darlingi* sobre os parâmetros biológicos de mortalidade larval, proporção de pupação, probabilidade de se obter adultos foi utilizado como variável resposta em modelos lineares generalizados. Devido ao baixo número de adultos para avaliar a longevidade destes os dados foram agrupados em três categorias: sem amônia, agudo e crônico. O tratamento foi considerado uma variável explicativa (x) e os parâmetros biológicos foram considerados como variável resposta (y) e como efeito aleatório foi utilizado mês em que o experimento foi realizado. Todas as análises foram realizadas no software estatístico livre R 3.2.5 (R Development Core Team 2015).

4 RESULTADOS

4.1 Concentrações letais (CLs 90 e 50) da amônia para *An. darlingi*

As concentrações letais para larvas L1 foram menores que as concentrações letais de larvas L3. A concentração letal para matar 50% (CL50) das larvas L1 foi de 111 ppm e a concentração para matar 90% foi de 367 ppm. Larvas L3 tiveram CL 50 de 350 ppm e CL90 de 598 ppm. Nota-se que, tanto o CL50 foi três vezes maior em L3 e CL90 das larvas L3 foi quase o dobro em relação às larvas L1 (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações Letais (CL50 e CL90) da amônia para larvas L1 e L3 de *Anopheles darlingi* oriundas de adultos coletados na região rural de Porto Velho, RO.

	CL ₅₀	I.C. (inf.-sup.)	CL ₉₀	I.C. (inf.-sup.)
L1	111	103-119	367	331-413
L3	350	338-361	598	579-622

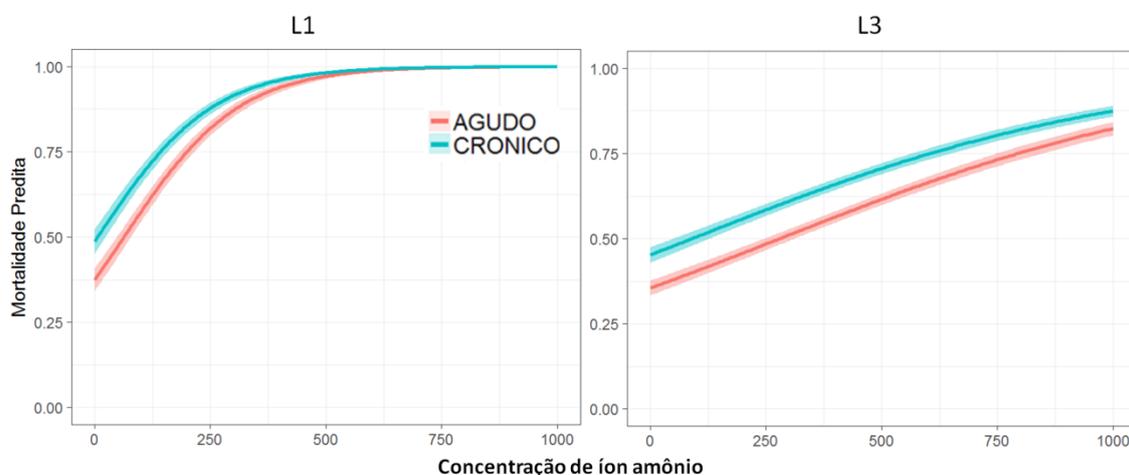
L1= Primeiro estágio larval; L3= terceiro estágio larval; CL= Concentração Letal, IC= Intervalo de Confiança.

4.2 Exposição crônica e aguda da amônia em larvas nos estádios L1 e L3 de *An. darlingi*

4.2.1 Efeito da exposição crônica e aguda da amônia na mortalidade em L1 e L3

Foi observada uma associação entre proporção de larvas mortas e a concentração da amônia. Independente do estágio larval, observou-se que a medida que concentração aumenta a mortalidade larval aumentou significativamente ($p < 0,05$) (FIG. 14). Em larvas L1 foi observado maior mortalidade no tratamento crônico, nesse caso a mortalidade média (todas as concentrações) observada foi de 82,2% já para o tratamento agudo foi de 72,54%, sendo essa diferença significativa ($p < 0,05$). Já para larvas L3, no tratamento agudo a proporção de larvas mortas foi 54,9% e 62,3% para tratamento crônico em L3 ($p < 0,05$).

FIGURA 14-Mortalidade predita durante o desenvolvimento larval nos estádios L1 e L3 de *Anopheles darlingi* submetido a tratamentos crônico e agudo com diferentes concentrações de amônia.



Legenda: As sombras indicam o intervalo de confiança.

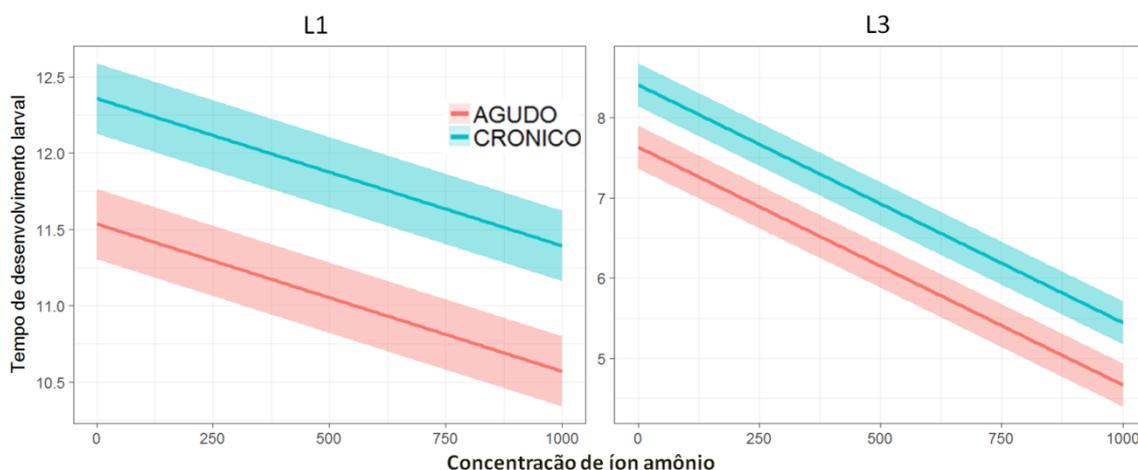
4.2.2 Efeito da exposição crônica e aguda da amônia no tempo de desenvolvimento larval em L1 e L3

Foi observado que existe associação negativa entre o tempo médio de desenvolvimento larval e a concentração de amônia (FIG 15). Nesse caso sendo que à medida que a concentração aumentou o tempo médio de desenvolvimento larval diminuiu significativamente ($p < 0.05$).

Em L1 foi observado que os tempos médios de desenvolvimento larval no tratamento agudo e crônico foram respectivamente 11,4 dias e 12,3 dias com diferença significativa.

Resultado similar foi observado para larvas L3. Nesse caso, os valores observados fora de 6,8 dias no tratamento agudo e de 7,7 dias no tratamento crônico.

FIGURA 15-Tempo de desenvolvimento das larvas de estádios L1 e L3 de *Anopheles darlingi* submetidos aos tratamentos crônico e agudo com diferentes concentrações de amônia.



Legenda: As sombras indicam o intervalo de confiança

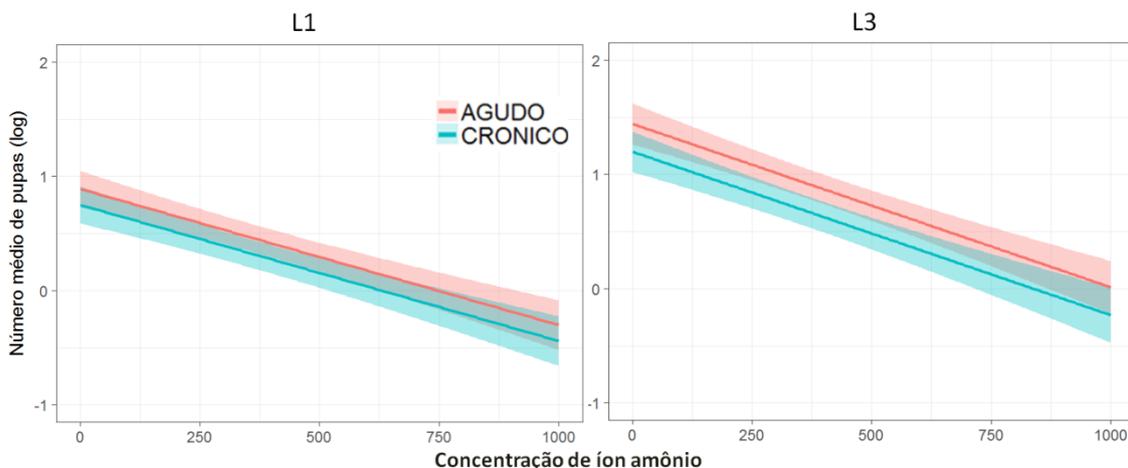
4.2.3 Efeito da exposição crônica e aguda da amônia na pupação em L1 e L3

Observou-se que o número médio de pupas (log) foi associado negativamente com a concentração da amônia, sendo que o número de pupas reduziu significativamente com o aumento da amônia ($p < 0,05$) em ambos os estádios a medida que aumentaram as concentrações de amônia nos tratamentos crônico e agudo (FIG. 16).

Em larvas L1 foi observado que não houve diferença significativa no número médio de pupas (escala logarítmica) entre os tratamentos crônico e agudo. Nos experimentos com larvas no estágio L1 foi obtido o número médio de pupas de 0,11 para tratamento agudo e 0,04 para crônico.

Da mesma maneira, para as larvas L3 também não houve diferença significativa no número médio de pupas entre os tratamentos crônico e agudo. Nesse estágio L3 no entanto, foi obtido maior número médio de pupas, sendo 0,21 para o tratamento agudo e 0,15 para o tratamento crônico.

FIGURA 16-Pupas obtidas de larvas dos estádios L1 e L3 de *Anopheles darlingi* nos tratamentos crônico e agudo com diferentes concentrações de amônia



Legenda: A sombra indica o intervalo de confiança

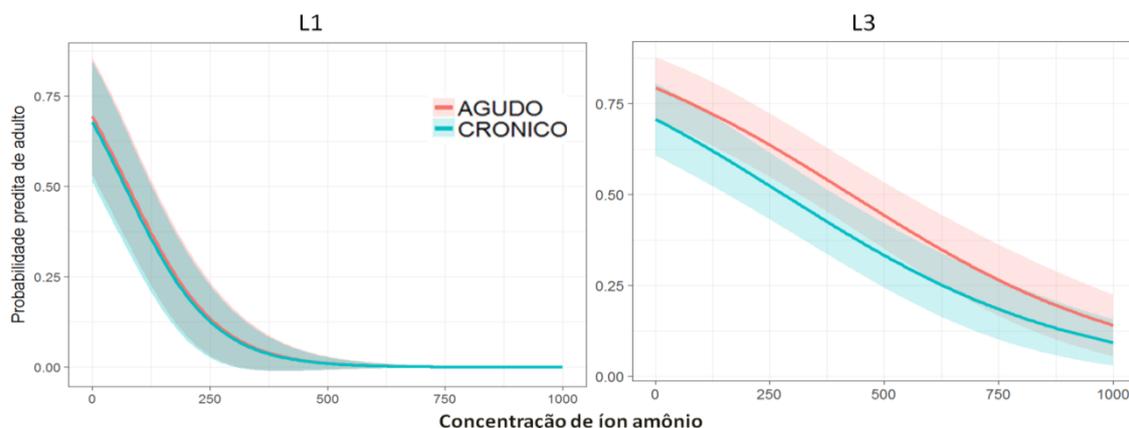
4.2.4 Efeito da exposição crônica e aguda da amônia na probabilidade de emergência de adultos em L1 e L3

Devido ao baixo número de adultos obtidos, optou-se por avaliar a probabilidade de se obter adultos nas concentrações testadas. Observou-se que a probabilidade de se obter adultos reduziu ($p < 0,05$) a medida que aumentou as concentrações nos tratamentos crônico e agudo (FIG. 17).

A probabilidade média predita de emergência de adultos a partir dos testes realizados com larvas no estágio L1 foi de 0,67 no tratamento crônico e de 0,69 no agudo, sendo essa diferença não significativa.

Resultado similar foi observado nos testes com larvas no estágio L3. Nesse caso, a probabilidade média predita de ocorrer a emergência de adultos foi de 0,70 no tratamento crônico e de 0,79 no agudo, e para estes tratamentos também não foi observado diferença significativa.

FIGURA 17-Probabilidade de emersão adultos oriundos de larvas dos expostas a amônia nos estádios L1 e L3 de *Anopheles darlingi* nos tratamentos crônico e agudo nas diferentes concentrações de amônia.



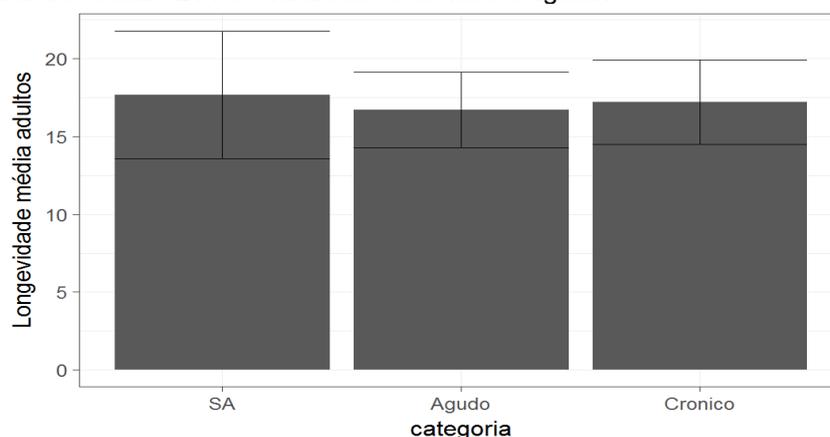
Legenda: A sombra indica o intervalo de confiança

4.2.5 Efeito da exposição da amônia a partir do estágio L1 e L3 para longevidade dos adultos

Não foi observada diferença na longevidade dos adultos entre as categorias SA, Crônico e agudo no estágio L1 e da mesma maneira também não foi observado diferenças entre essas categorias para o estágio L3 ($p > 0,05$) (FIG. 18).

Os adultos provenientes de larvas expostas a amônia a partir do estágio L1 apresentaram a longevidade média no grupo sem amônia (SA) de 17,6 dias, já os adultos provenientes de uma dose de amônia (categoria agudo) tiveram a longevidade de 16,6 dias e no grupo com doses diárias de amônia (crônico) tiveram a longevidade de 17,2 dias.

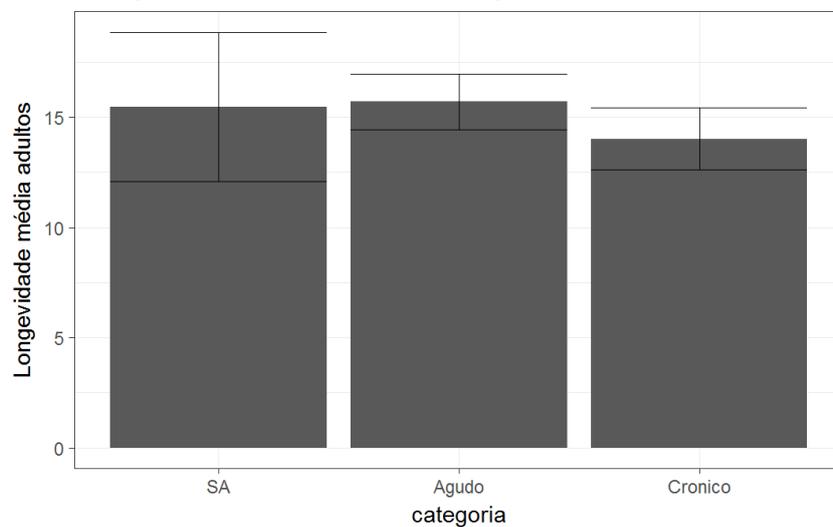
FIGURA 18-Longevidade dos adultos oriundos de larvas de *Anopheles darlingi* expostas a amônia a partir do estágio L1 nos tratamentos crônico e agudo.



Legenda: Sem Amônia, Agudo= tratamento agudo com amônia, Crônico = tratamento crônico com amônia.

Resultado similar foi observado para os adultos resultantes de larvas exposta a amônia a partir do estágio L3, sendo a longevidade média observada de 15,5 dias para o grupo sem amônia, 15,2 para o grupo Agudo e 14,0 dias para o grupo crônico (FIG. 19).

FIGURA 19-Longevidade dos adultos oriundos de larvas expostas a amônia a partir do estágio L3 de *Anopheles darlingi* nos tratamentos crônico e agudo.



Legenda: SA = Sem Amônia, Agudo= tratamento agudo com amônia, Crônico = tratamento crônico com amônia.

5 DISCUSSÃO

As concentrações letais da amônia para as larvas L1 e L3 de *An. darlingi* foram altas comparadas a outros invertebrados e vertebrados (BOARDMAN et al., 2004). Sabe-se que as concentrações letais da amônia podem variar nos organismos e no presente estudo, o CL₅₀ e CL₉₀ obtidos para *An. darlingi* no estágio L1 foi de 111ppm 367 ppm e para L3 foi de 350 ppm e 598 ppm, havendo diferenças significativas entre os estádios larvais (Tabela 1)

Organismos como peixes são extremamente susceptíveis a amônia e em geral apresentam concentração letal abaixo de 1 ppm (WEIRICH; TOMASSO, 1993). O peixe esturjão, *Acipenser brevirostrum*, por exemplo, apresenta CL₅₀ de apenas 0,58 ppm (FONTENOT; ISELY; TOMASSO, 1998), mas não foram observadas diferenças na susceptibilidade do estágio juvenil (CL₅₀-0,89 ppm-24H) quando comparado aos adultos (RICHARDSON, 1997).

Artrópodes aquáticos, como os crustáceos, tendem a ser mais tolerantes do que as espécies citadas anteriormente. Para juvenis do camarão *Penaeus penicillatus* observou-se CL₅₀ de 2,95 ppm (LIN; CHEN, 2001). O anfípode *Eulimnogammarus toletanus*, um pequeno crustáceo, quando submetido a amônia durante 24 horas apresentou o CL₅₀ de 1,23 ppm, havendo redução da concentração letal após períodos de 144 horas, com CL₅₀ de 0,61 ppm (ALONSO; CAMARGO, 2004).

Os estudos mostram que dentre os grupos avaliados são os insetos apresentam maior tolerância. Com o propósito de comparar os efeitos da amônia de efluente de esgoto sob larvas do díptero *Chironomus riparius* foram submetidas a ensaio por 96 horas e após esse períodos foi registrada o CL₅₀ de 6,60 ppm, muito acima das concentrações letais observadas para peixes (MONDA; GALAT; FINGER, 1995). Da mesma forma em larvas de efemérides (Ephemeroptera) coletadas em rios na Rússia com baixos níveis de poluições, quando expostas a amônia por 96 horas apresentaram o CL₅₀ de 14,63 ppm (BEKETOV, 2004).

Wang e Leung (2015) Wang; Leung (2015) destaca diferenças na tolerância de insetos nas Zonas térmicas tropicais e temperadas no planeta. Nas Zonas Tropicais os insetos apresentam a maior susceptibilidade à amônia

em comparação a outros organismos, porém nas Zonas Temperadas são os insetos que apresentam a maior tolerância a amônia.

Entre os insetos, os mosquitos são os mais tolerantes, são os organismos que apresentam as CLs mais elevadas. Observou-se por exemplo em populações de larvas *An. gambiae* de área rural e urbana CLs entre 453-685 ppm próximo ao obtido no nosso estudo. Destacando-se no estudo a tolerância para população de larvas da área urbana (TENE-FOSSOG, et al., 2013).

Para *Ae. aegypti* também foi observado CLs altos quando as larvas dessa espécie foram submetidas a condições de experimental com amônia e por ser um mosquito colonizado após ter sido avaliado diferentes gerações observou-se aumento da tolerância das larvas. No ensaio de toxicidade com a geração inicial (F1) foi obtido CL₅₀ de 191 ppm e à medida que novas gerações eram submetidas a amônia, as concentrações letais aumentavam, sendo obtido na geração F3 um CL₅₀ de 642 ppm, o que sugere que indivíduos mais tolerantes poderiam ter sido selecionados ao longo das gerações (MITCHELL;WOOD, 1984).

No presente estudo, as concentrações letais da amônia para *An. darlingi* foram elevadas e até mesmo próximas as do *An. gambiae* que possui um comportamento diferente do observado para anofelinos amazônicos. Inclusive foram resultados muito acima do observado por Senior-White (1938), que relatou uma situação diferente a observada atualmente para *An. gambiae*, destacando a sensibilidade dos anofelinos à amônia, visto que 1 ppm seria suficiente para inibir o desenvolvimento de larvas de mosquitos desse gênero.

Além das concentrações letais, foi avaliado o efeito da exposição aguda e crônica de diferentes concentrações de amônia, em diferentes estádios do *An. darlingi* e observou-se que a exposição crônica resultou em efeitos negativos maiores na maioria dos parâmetros avaliados.

Nos tratamentos crônico e agudo com amônia, em ambos estádios larvais de *An. darlingi*, a mortalidade foi elevada (> 50%) . Em condições de laboratório sem a adição de substâncias potencialmente tóxicas, os anofelinos apresentam mortalidade natural, de 0,4% das larvas L1 de *An. nuneztovari* e cerca de 19,6 % em larvas L4 (SCARPASSA;TADEI, 1990), já para larvas de

An. darlingi também criado sob as mesmas condições da espécie anteriores, houve mortalidade nula para larvas L1 e mortalidade 6,98 % no estágio L3 (SANTOS; CONTEL; KERR, 1981).

Os efeitos que a amônia causa nos invertebrados não estão bem esclarecidos em relação aos vertebrados. A literatura aponta que essa substância em altas concentrações tende a reduzir a sobrevivência de animais aquáticos. Verificou-se, por exemplo, que o crustáceo *Eulimnogammarus toletanus*, após exposto a amônia, sofreu uma redução da sobrevivência e quando avaliada a taxa de ingestão de alimentos foi observado que está também foi reduzida devido a toxicidade da amônia. Esse fato poderia estar relacionado ao tempo de exposição desse organismo a essa substância sendo a redução da sobrevivência e ingestão mais expressiva em intervalos maiores de exposição (ALONSO; CAMARGO, 2004), semelhante ao que foi observado no presente estudo quando as larvas foram expostas por período prolongado a amônia (tratamento crônico).

Além de interferir na alimentação dos organismos, para camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* foi sugerido que a amônia poderia alterar a resposta imune do indivíduo levando a redução da atividade fagocitária o que estaria associada a redução da resposta imune e a baixa resistência as bactérias nesses organismos, aumentando assim a mortalidade dos indivíduos (LIU; CHEN, 2004).

Para larvas do mosquito *An. gambiae* também foi relatado aumento na mortalidade a medida que ficaram sob a exposição prolongada, da mesma maneira como ocorreu no tratamento crônico do presente estudo. Na população urbana (Forma M) a mortalidade foi cerca de 2% em aproximadamente 25 horas com aumento para 18% em 37 horas e para a população rural (Forma S) a mortalidade foi menor, 1% e 14% (TENE FOSSOG et al., 2013).

Visando lidar com efeitos tóxicos da amônia os animais apresentam diferentes mecanismos de transporte para dentro ou fora das células e estes podem ocorrer de maneira similar (WEIHRAUCH; DONINI; O'DONNELL, 2012). Em crustáceos aquáticos p. ex., a bomba de sódio e potássio foi observada nas células branquiais desse invertebrado (SKOU, 1959) e posteriormente foi

constatado que essa bomba também poderia agir como transportador de amônia para fora das células (MASUI et al., 2002).

Proteínas transmembranas também são reconhecidas por essa função. A família de proteínas Rh (Rhesus) tem tido importância por ser atribuída a ela a função do transporte de amônia nas células dos seres vivos (WEIHRAUCH; DONINI; O' DONNELL, 2012). Nos seres humanos, a proteína Rh foi identificada como responsável pelo carreamento da amônia nas células (MARINI et al., 2000).

Proteínas Rh também foram observada em tecidos de insetos (WEIHRAUCH; MORRIS; TOWLE, 2004). O aumento da população de *Ae. aegypti* levou a estudos sobre diferentes mecanismos para lidar com amônia dos criadouros urbanos. Em *Aedes albopictus* foi observado a expressão da proteína Rh, com estrutura similar ao de seres humanos, em tecidos de fêmeas do mosquito em diferentes regiões do corpo (cabeça, túbulos de Malpighi, tórax, intestino). No entanto, nesse trabalho não foi possível comprovar se a proteína seria responsável pelo transporte de amônia nesse inseto (WU et al., 2010).

Em *Ae. aegypti* essa glicoproteína foi observada nas papilas anais das larvas, local onde ocorre a excreção. Donini (2005) em seu estudo da avaliação do fluxo de íons nas papilas anais (uma estrutura presente no final do abdome) de larvas *Ae. aegypti* comprovou que essa estrutura realizava a troca de íons como cálcio, sódio, cloro, potássio, hidrogênio e íon amônio (NH₄).

Mais tarde a fim de compreender o mecanismo de transporte da amônia nas papilas anais de *Ae. aegypti* foram investigadas se as proteínas transmembranas homólogas aos transportadores Amt/Mep de plantas e microrganismos e proteínas transportadoras homólogas às glicoproteínas Rh (Rhesus) de vertebrados poderiam estar presentes nessa estrutura larval e foram detectados ambos os transportadores denominados como AeRh50-1, AeRh50-2 (Rhesus) e AeAmt1 (Amt/Mep) confirmando a expressão desses transportadores de amônia na papila anal (CHASIOTIS et al., 2016).

Posteriormente foi corroborado, através do estudo de Durant et al. (2017) também com larvas de *Ae. aegypti*, o papel das proteínas AeRh50-1 e AeRh50-2 na excreção de amônia pelas papilas anais larvais, confirmando a

ação desses transportadores para a reduzir ou atenuar os efeitos da amônia. Através dessas vias localizadas em órgãos com função excretora, é possível que a amônia seja retirada do organismo, podendo contribuir para a redução da toxicidade da mesma.

No presente estudo, houve diferença no tempo médio de desenvolvimento entre os tratamentos considerando-se cada estágio larval isoladamente (FIG. 15). De forma geral, considerando o estágio L1, a literatura mostra que para *An. nuneztovari* e *An. darlingi* quando em condições normais de criação em laboratório levam em média 12 dias para desenvolverem de L1 a pupa e de 8 dias do estágio L3 até a fase de pupa (SCARPASSA;TADEI, 1990; SANTOS; CONTEL; KERR, 1981) resultado próximo ao encontrado no presente trabalho quando as larvas estiveram sob regime exposição aguda e crônica da amônia. No entanto, o tratamento crônico de larvas de *An. darlingi* com amônia independente do estágio larval levou ao aumento do tempo de desenvolvimento quando comparado com o tratamento agudo.

Considerando que além da toxicidade, a presença de amônia ou outras substâncias tóxicas podem afetar a alimentação, reduzindo as taxas de ingestão de alimentos (ALONSO; CAMARGO, 2004). Tal alteração por si só pode afetar o desenvolvimento larval e conseqüentemente a taxa de pupação e emergência de adultos (BAYOH; LINDSAY, 2004). Armstrong e colaboradores (1978) observaram que larvas de camarão da espécie *Macrobrachium rosenbergii* quando submetidas a doses subletais de amônia apresentaram redução na sua taxa de crescimento e estudos com *Ae. aegypti* (TELANG; FRAME; BROWN, 2007) mostraram que a alimentação foi um fator importante que influenciou a regulação endócrina, de modo que a deficiência energética pode levar a redução na produção de ecdisona e este por sua vez pode influenciar a muda larval e pupal.

A ecdisona é responsável por regular a expressão de genes que coincidem com o período de pupação em que ocorre reorganização de tecido e intensa atividade celular (MARGAM; GELMAN; PALLI, 2006) (PARTHASARATHY; PALLI, 2007). Caso, de fato, a amônia presente no meio seja responsável pela redução na ingestão de alimento pelos organismos, isso

poderia ter consequências para produção hormonal (ALONSO; CAMARGO, 2004).

Além de alterações indiretas, a amônia consegue atravessar as células e assim levar a alterações no interior celular como a elevação do pH celular e ainda alcançar mitocôndrias e nestas interferir na produção de energia (ATP), mas, apesar disso, não se sabe se os mecanismos de toxicidade da amônia agem da mesma maneira para os diferentes organismos aquáticos seja vertebrado ou invertebrado (MARTINELLE; HÄGGSTRÖM, 1993).

Curiosamente, o tempo de desenvolvimento larval observado no presente trabalho diminuiu significativamente com o aumento da concentração de amônia no meio, muito embora poucas larvas tenham sobrevivido as concentrações mais altas, sobretudo no estágio L1.

Essa observação pode estar relacionada a mecanismos de assimilação dessa substância. Esse mecanismo é um recurso utilizado pelos insetos para a reduzir os efeitos tóxicos da amônia. Os seres vivos de maneira geral realizam a assimilação da amônia na formação de aminoácidos, sendo a glutamina e glutamato os produtos finais principais desse processo, garantindo dessa forma a detoxificação da amônia, podendo posteriormente ser doadores de nitrogênio nas vias metabólicas (LEHNINGER, 2006). Em condições normais, durante o desenvolvimento do inseto, ocorre uma grande variação na produção de aminoácidos e proteínas que são essenciais para que ocorram as transformações necessárias para formas imaturas (larvas e pupas), tanto no crescimento quanto na muda (CHEN, 1966). Através do estudo de Pennington; Goldstrohm; Wells (2003), constatou-se que a glutamina e a alanina estavam presentes em níveis elevados na hemolinfa larval de *Ae. aegypti* podendo ser requisitado para o metabolismo enquanto que na fase adulta do mosquito, os aminoácidos predominantes foram a prolina, alanina, glutamato e glutamina.

Alguns insetos quando em condições de altas concentração de amônia na alimento consegue converter essa substância em aminoácidos e utiliza-los no metabolismo. Os imaturos do bicho-da-seda, um lepidóptero, é um exemplo de organismo que faz a reciclagem da amônia do metabolismo. Testes em laboratório comprovaram que as larvas incorporaram o nitrogênio proveniente da amônia em excesso presente no alimento e então transformavam no amino

ácido glutamina, conversão realizada também no corpo gorduroso, e posteriormente foi utilizada na síntese de fibroína, uma proteína importante para produção do casulo anulando assim o efeito tóxico da amônia (HIRAYAMA; KONNO; SHINBO, 1997). Em outra espécie de bicho-da-seda, *Samia cynthia ricini*, também foi observado que a amônia pode ser transformada em alanina pelas formas imaturas para produção da fibroína, proteína importante para formação do fio da seda, evidenciando a capacidade que os insetos apresentam em lidar com o excesso de amônia, evitando os dos efeitos tóxicos e os mesmo tempo reaproveitando esse componente como fonte de nitrogênio para os processos biológicos (OSANAI et al., 2000).

Situação semelhante foi observado para os mosquitos. Em estudo com adultos de *Ae. aegypti* observou-se que quando alimentados com excesso de amônia este mosquito convertia essa substância em glutamina e posteriormente em outro aminoácido, a prolina. E utilizava esse aminoácido para produção de energia durante o voo (SCARAFFIA; WELLS, 2003).

Mosquitos na fase adulta apresentam além da alimentação açucarada a alimentação sanguínea, que é rica em proteínas que durante o processo metabólico se transformam em compostos nitrogenados, dentre eles a amônia, que pode ser tóxica para o organismo. Foi observado que para lidar com essa situação as fêmeas *Ae. aegypti* realizam a conversão de amônia em diferentes aminoácidos. O corpo gorduroso ou intestino dos mosquitos são responsáveis pela assimilação do nitrogênio amoniacal, e a Glutamina Sintetase (GS) a enzima responsável pelo processo de ligação do glutamato à molécula de amônia (NH₃) dando origem à glutamina, transformando assim a amônia em um produtos menos tóxico para o mosquito (SCARAFFIA et al., 2010).

Outro estudo com diferentes genes de *An. gambiae* expressos após a alimentação sanguínea mostrou que alguns genes transcritos tiveram um aumento de sua expressão e dentre os genes encontrados, a GS também estava presente, sugerindo uma ligação dessa enzima à alimentação sanguínea nos adultos (RIBEIRO, 2003).

A enzima Glutamina sintetase (GS) tem papel fundamental no metabolismo do nitrogênio realizando a detoxificação da amônia, e os estudos baseados em diferentes genes indicam que esta enzima pode ser conservada

em diferentes grupos (CAGGESE et al., 1994). Além de importância fundamental para detoxificação da amônia em adultos de *Ae. aegypti*, a GS podem estar envolvidas na síntese da matriz peritrófica e a inibição dessa enzima, inibiu também a formação da matriz (SMARTT et al., 1998).

Nos mosquitos, a glutamina pode atuar como precursor para síntese de prolina por meio do Glutamato Sintase (GltS) (SCARAFFIA et al., 2010). Esses produtos gerados (glutamina e prolina) são requisitados na produção de energia durante o voo (SCARAFFIA; WELLS, 2003) e até mesma a própria amônia podem ser reutilizados no metabolismo ou então excretados na forma de uréia, ácido úrico (que é a principal excreta dos insetos terrestres) e amônia, que é uma excreta produzida principalmente por animais aquáticos (SCARAFFIA et al., 2005; BURSELL, 1967).

No presente estudo, foi observado que o estágio L1 foi mais sensível a amônia. As diferenças na mortalidade larval, pupação e obtenção de adultos de *An. darlingi* entre os estádios mais jovens (L1) e mais tardios (L3) podem estar ligadas a capacidade para detoxificação de compostos tóxicos ao longo do desenvolvimento larval, sendo os estádios iniciais mais susceptíveis. Em bioensaio com lepidópteros *Spodoptera frugiperda* e *Cydia pomonella* quando submetidas a diferentes inseticidas observou-se que as doses letais foram mais altas nos estádios finais, revelando que o último estágio larval foi mais tolerante ao inseticida em comparação ao estágio inicial. Quando avaliou-se a produção enzimática, foi possível notar também maior produção de enzimas desintoxicantes no último estágio larval (YU, 1983; BOUVIER et al., 2002).

A tolerância de *An. darlingi* a amônia sugere que essa espécie pode ocupar ambientes aquáticos em áreas urbanas poluídas, no entanto vale salientar que a adaptação dessa espécie nesses ambientes, possivelmente, estará sujeita também a outros estressores ambientais (bióticos e abióticos) e não só aos compostos nitrogenados (TENE-FOSSOG et al., 2013). Logo, se faz necessário outros estudos para indicar a capacidade de sobrevivência desse mosquito nesse meio aquático com a presença de amônia em associação a outros componentes químicos estressores.

Pouco se sabe sobre a tolerância e o mecanismo de desintoxicação em anofelinos e os levantamentos de informações sobre a composição química

dos criadouros na Amazônia em sua maioria não dão ciência sobre os compostos nitrogenados e sua associação à outros componentes no meio aquático. Mas se de fato esse mosquito consegue se desenvolver em criadouro com altas concentrações de amônia, essas informações seriam importantes para a compreensão da ecologia larval o que conduzir medidas efetivas para redução da população de mosquitos e proporcionar melhores condições de vida para pessoas que moram em áreas que apresentam condições propícias para o desenvolvimento do vetor e ao mesmo tempo se tornam um desafio para erradicação efetiva da malária (FERGUSON et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

1. As concentrações letais da amônia para *An. darlingi* foram próximas a outras espécies de mosquito que vivem em ambientes antropizados e os estádios mais tardios são mais tolerantes a essa substância.
2. O aumento das concentrações de amônia durante a criação das larvas de *An. darlingi* afetou de forma negativa a maioria dos parâmetros biológicos estudados.
3. Em geral, a exposição crônica das larvas de *An. darlingi* a amônia causou maior alteração nos parâmetros biológicos estudados, mas não afetou a emergência e longevidade de adultos.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, A.; CAMARGO, J. A. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 5, p. 1006–1012, 2003.
- ALONSO, A.; CAMARGO, J. A. Toxic effects of unionized ammonia on survival and feeding activity of the freshwater amphipod *Eulimnogammarus toletanus* (Gammaridae, Crustacea). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 72, n. 5, p. 1052–1058, 2004.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–4, 2006.
- BARBOSA, L. M. C. et al. Behavioral patterns, parity rate and natural infection analysis in anopheline species involved in the transmission of malaria in the northeastern Brazilian Amazon region. **Acta Tropica**, v. 164, p. 216–225, 2016.
- BARROS, F. S. M.; HONÓRIO, N. A. Deforestation and malaria on the amazon frontier: Larval clustering of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) determines focal distribution of malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 939–953, 2015.
- BAYOH, M. N.; LINDSAY, S. W. Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 2, p. 174–179, 2004.
- BEATTIE, M. V. F. The Physico-chemical Factors of Water in Relation to Mosquito Breeding in Trinidad. **Bulletin of Entomological Research**, v. 23, n. 4, p. 477, 1932.
- BEIER, J. C. Malaria Parasite Development. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 519–43, 1998.
- BEKETOV, M. A. Different sensitivity of mayflies (Insecta, Ephemeroptera) to ammonia, nitrite and nitrate: Linkage between experimental and observational data. **Hydrobiologia**, v. 528, n. 1–3, p. 209–216, 2004.
- BOARDMAN, G. D. et al. Toxicity of ammonia to three marine fish and three marine invertebrates. **Environmental Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 134–142, 2004.
- BOUVIER, J. C. et al. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 51, n. 2, p. 55–66, 2002.
- BURKE, R. L. et al. Septic tanks as larval habitats for the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Playa-Playita, Puerto Rico. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, n. 2, p. 117–123, 2010.
- BURSELL. The excretion of Nitrogen in Insects. **Journal of Chemical**

Information and Modeling, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 1967.

BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P.; BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, **Annual Review of Nutrition**, V. 13, 1993.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Resumo epidemiológico, SIVEP-MALÁRIA (Disponível em: <<http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&hiddensections=header%2Cpath%2CdockTop%2CdockLeft%2Cfooter&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&Server=srvbipdf03&Project=DMMalaria&>> Acesso em: 20/04/2017).

CAMARGO, J. A.; ALONSO, Á. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. **Environment International**, v. 32, n. 6, p. 831–849, 2006.

CAMARGO, J. A.; ALONSO, A.; SALAMANCA, A. Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. **Chemosphere**, v. 58, n. 9, p. 1255–1267, 2005.

CHARLWOOD, J. D. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 391–8, 1996.

CHASIOTIS, H. et al. An animal homolog of plant Mep/Amt transporters promotes ammonia excretion by the anal papillae of the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. **The Journal of experimental biology**, v. 219, n. Pt 9, p. 1346–55, 2016.

CHEN. Amino acid and protein metabolism in diabetes mellitus. **The Italian journal of gastroenterology**, v. 25, n. 3, p. 151–155, 1966.

CHRISTOPHERS, S. S. R. *Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, and bionomics. **The syndics of the Cambridge University Press**. India, 1960

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. Vol. I. Development, nutrition and reproduction. 1992.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. Vol. 2. Sensory reception and behaviour. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1999.

CONSOLI, R.A.G.B. & LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pag. 190–196, 1994.

COTTON, F.A. **Advanced inorganic chemistry. A comprehensive Text.**, 1980.

COWMAN, A. F. et al. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.

CRAMER, J. P. Plasmodium knowlesi malaria: Overview Focussing on Travel-Associated Infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 17, n. 3, 2015.

- CAGGESE, C. et al., Genetic, molecular and developmental analysis of the glutamine synthetase isozymes of *Drosophila melanogaster*, **Genetica**, V. 94, 1994
- DA ROCHA, J. A. M. et al. Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon Region, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 872–877, 2008.
- DA SILVA-VASCONCELOS, A. et al. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 151–161, 2002.
- DEANE, L.M. CAUSEY, L. M.; DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil *. **Memórias do Instituto Evandro Chagas: Parasitologia**, v. 1, n. 4, p. 827–965, 1948.
- DEANE, L. M. Observações sobre a Malária na Amazônia brasileira. **Revista do Serviço Especial de saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 3–60, 1947.
- DENTENER, F. J.; CRUTZEN, P. J. A three-dimensional model of the global ammonia cycle. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 331–369, 1994.
- DONINI, A. Analysis of Na⁺, Cl⁻, K⁺, H⁺ and NH₄⁺ concentration gradients adjacent to the surface of anal papillae of the mosquito *Aedes aegypti*: application of self-referencing ion-selective microelectrodes. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 4, p. 603–610, 2005.
- DOS REIS, I. C. et al. Epidemic and endemic malaria transmission related to fish farming ponds in the Amazon Frontier. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.
- DURANT, A. C. et al. *Aedes aegypti* Rhesus glycoproteins contribute to ammonia excretion by larval anal papillae. **Journal of Experimental Biology**, p. 588–596, 2017.
- FAUCI. New engla nd journal. **Perspective**, v. 363, n. 1, p. 1–3, 2016.
- FERGUSON, H. M. et al. Ecology: A prerequisite for malaria elimination and eradication. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2010.
- FONTENOT. A Comparison of Triploid Induction Validation Techniques. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 60, n. 3, p. 221–226, 1998.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp. Vol. II, p., 2002.
- GIL, L. H. S. et al. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. June, p. 271–276, 2007.
- GIL, L. H. S. et al. Seasonal Distribution of Malaria Vectors (Diptera: Culicidae) in Rural Localities of Porto Velho, Rondonia, Brazilian Amazon. **Revista do**

Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 57, n. 3, p. 263–267, 2015a.

GIL, L. H. S. et al. Rudimentary cesspits as breeding sites for *Aedes aegypti* in urban areas of Northern Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 3, p. 73–80, 2015b.

GIMNIG, J. E. et al. Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in Western Kenya. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 2, p. 282–288, 2001.

GUNATHILAKA, N. et al. *Anopheles culicifacies* breeding in polluted water bodies in Trincomalee District of Sri Lanka. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 285, 2013.

HAHN, M. B. et al. Influence of deforestation, logging, and fire on malaria in the Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

HALSTEAD, J. A. et al. Urban stream syndrome in a small, lightly developed watershed: A statistical analysis of water chemistry parameters, land use patterns, and natural sources. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 6, p. 3391–3414, 2014.

HARBACH, R. E. The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. **Cours**, n. August 2013, p. 3–56, 2013.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C. Biological nitrogen fixation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 37, p. 331–358, 1968.

HARRISON, J. F. Insect acid-base physiology, **Annual Review of Entomology**, V. 46, 2001.

HAY, S. I. et al. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 327–336, 2004.

HINTON, H. E. Observations on the biology and taxonomy of the eggs Department of Zoology, **University of Bristol**, 1967.

HIRAYAMA, C.; KONNO, K.; SHINBO, H. The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 10, p. 959–964, 1997.

HUDSON, J. E. *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in the Suriname rain forest. **Bulletin of Entomological Research**, v. 74, n. 1, p. 129, 1984.

JENSEN, F. B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 135, n. 1, p. 9–24, 2003.

KERR, S. C. Biologia de anofelinos amazônicos: 1-Ciclo Biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus - Boa Vista, **Acta Amazônica**, 1981.

KLEIN, Terry A.; LIMA, J. B.; TADA, Mauro S. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. **The**

American journal of tropical medicine and hygiene, v. 44, n. 6, p. 598-603, 1991a.

KLEIN, T.A. et al. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 45, n. 4, p. 463-470, 1992b.

LEMARIÉ ET AL. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 229, n. 1-4, p. 479-491, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LIN, Y. C.; CHEN, J. C. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* boone juveniles at different salinity levels. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 259, n. 1, p. 109-119, 2001.

LIU, C. H.; CHEN, J. C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, n. 3, p. 321-334, 2004.

LIU, X.-B. et al. Random repeated cross sectional study on breeding site characterization of *Anopheles sinensis* larvae in distinct villages of Yongcheng City, People's Republic of China. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 58, 2012.

LOUIS ALPHONSE LAVERAN, C. et al. A Newly Discovered Parasite in the Blood of Patients Suffering from Malaria. Parasitic Etiology of Attacks of Malaria. **Russell Source: Reviews of Infectious Diseases**, v. 4, n. 4 (July-August), p. 908-911, 1982.

MANGUIN, S. et al. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. **Journal of medical entomology**, v. 33, n. 2, p. 205-211, 1996.

MARGAM, V. M.; GELMAN, D. B.; PALLI, S. R. Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). v. 52, p. 558-568, 2006.

MARINI, A. et al. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. v. 26, n. november, p. 341-344, 2000.

MARTINELLE, K.; HÄGGSTRÖM, L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. **Journal of Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 339-350, 1993.

MARTINS, R. T. et al. Effects of urbanization on stream benthic invertebrate communities in Central Amazon. **Ecological Indicators**, v. 73, p. 480-491, 2017.

MASUI, D. C. et al. Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺q, K⁺q) - ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism

for regulation of ammonia excretion. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 471–482, 2002.

MERETA, S. T. et al. Physico-chemical and biological characterization of anopheline mosquito larval habitats (Diptera: Culicidae): implications for malaria control. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 320, 2013.

MITCHELL, M. J; WOOD, R. J. Genetic variation in tolerance of ammonium chloride in *Aedes aegypti*. **Mosquitos News**, V. 44, N. 4, 1984.

MONDA, D. P.; GALAT, D. L.; FINGER, S. E. Evaluating ammonia toxicity in sewage effluent to stream macroinvertebrates: I. A multi-level approach. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 378–384, 1995.

MORENO, M. et al. Infection of laboratory-colonized *Anopheles darlingi* mosquitoes by *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 612–616, 2014.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

NAGM, L. et al. Affinity and diversity indices for anopheline immature forms. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 49, n. 5, p. 309–316, 2007.

NDENGA, B. A. et al. Physical, Chemical and Biological Characteristics in Habitats of High and Low Presence of Anopheline Larvae in Western Kenya Highlands. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13^a Ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 2016.

NIMPTSCH, J. ; PFLUGMACHER, S. Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*, **Chemosphere**, V. 66, 2007.

NKONDJIO, C. A., et al., *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution, **Malaria Journal**, V. 10, 2011.

OSANAI, M. et al. Biosynthesis of L-alanine, a major amino acid of fibroin in *Samia cynthia ricini*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 225–232, 2000.

OYEWOLE, I. O. et al. Physico-chemical characteristics of *Anopheles* breeding sites: Impact on fecundity and progeny development. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 3, n. 12, p. 447–452, 2009.

PARTHASARATHY, R.; PALLI, S. R. Stage- and cell-specific expression of ecdysone receptors and ecdysone-induced transcription factors during midgut remodeling in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 216–229, 2007. PATEL, B; SINGHAL, T; SOMAN, R. Pioneers in Infectious Diseases Pioneers in Parasitology. **Journal of The**

Association of Physicians of India, V. 64, , 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (**PAHO**). Malária (Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&task=display&id=33&Itemid=232> Acesso em: 20/04/2017)

PATEL, B.; SINGHAL, T.; SOMAN, R. Pioneers in Parasitology, **Journal of The Association of Physicians of India**, V. 64, 2016

PENNINGTON, J. E.; GOLDSTROHM, D. A.; WELLS, M. A. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 2, p. 115–121, 2003.

PENNY, M. A et al. Distribution of malaria exposure in endemic countries in Africa considering country levels of effective treatment. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 384, 2015.

PINTO, A. G. N. . et al. The human action effects on the hydrogeochemistry of Negro river at the Manaus shoreline [Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM]. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 627–638, 2009.

PIYARATNE, M. K. et al. Physico-chemical characteristics of *Anopheles culicifacies* and *Anopheles varuna* breeding water in a dry zone stream in Sri Lanka. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 42, n. 2, p. 61–67, 2005.

PÓVOA, M. M. et al. The importance of *Anopheles albitarsis* e and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 163–168, 2006.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849–56, 2006.

RABALAIS, N. N. Nitrogen in aquatic ecosystems. **Ambio**, v. 31, n. 2, p. 102–112, 2002.

R Development Core Team. R: a Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Development Core Team; 2014. Available from: <http://www.r-project.org>

REJMÁNKOVÁ, E.; HARBIN-IRELAND, A; LEGE, M. Bacterial abundance in larval habitats of four species of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Belize, Central America. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, v. 25, n. 2, p. 229–39, 2000.

RIBEIRO, J. M. C. A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 9, p. 865–882, 2003.

RICHARDSON, J. Acute ammonia toxicity for eight New Zealand indigenous freshwater species. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 31, n. May 2015, p. 185–190, 1997.

- ROBERTS, B. Biological nitrogen fixation. **Annual Review Plant Physiology**, v. 29, p. 263–276, 1993.
- ROZENDAAL, J. A. Observations on the biology and behaviour of anophelines in the Suriname rainforest with special reference to *Anopheles darlingi* Root. **Cah. O. R. S. T. O. M. , sŽr. Ent. mŽd. & Parasitol.**, v. 25(1), n. 1, p. 33–43, 1987.
- ROOT, F. M. studies on brazilian mosquitoes. I. The Anophelines of the Nyssorhynchus group. **American Journal of Hygiene**, Vol.6,N.5, 1926.
- SANTOS, J. M. M; CONTEL, E. P. B; KERR, W. E. Biologia de anofelinos amazônicos. 1-Ciclo biológico, postura e estágio larvais de *Anopheles darlingi* Root 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus-Boa Vista. **Acta Amazônica**, V. 11, N. 4
- SCARAFFIA, P. Y.; WELLS, M. A. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. **Journal of Insect Physiology**, V. 49, 2003.
- SCARAFFIA, P. Y. et al. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 491–503, 2005.
- SCARAFFIA, P. Y. et al. Differential ammonia metabolism in *Aedes aegypti* fat body and midgut tissues. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1040–1049, 2010.
- SCARPASSA, V. M; TADEI, W. P. Biologia de Anofelinos amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* Gabaldon, 1940 (Diptera, Culicidae). **Acta Amazônica**, V. 20, 1990.
- SCARPASSA, V. M.; CONN, J. E. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 319–27, 2007.
- SENIOR-WHITE. **Physical Factors in Mosquito Ecology**, 1938.
- SILVA, L. P. Abundância larval de mosquitos (Diptera: Culicidae) e algumas características Físico-Químicas dos criadouros periurbanos e rurais na região de Porto Velho-RO. **Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do titula de Graduação em Ciências Biológicas**. Universidade Federal de Rondônia, 2009.
- SILVA, A. P. B. DA; TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M. DOS. Variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) e relação ao comportamento da atividade de picar, analisada por RAPD. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 585–590, 2010.
- SINDEN, R. E.; BILLINGSLEY, P. F. *Plasmodium* invasion of mosquito cells: Hawk or dove? **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 5, p. 209–211, 2001.
- SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 69, 2012.

SKOU. *O biochimica et biophysica acta*. v. 42, n. 3, p. 0–2, 1959.

SMARTT, C. T. et al. Biochemical analysis of a blood meal-induced *Aedes aegypti* glutamine synthetase gene. **Insect Biochemistry & Molecular Biology**, v. 28, n. 12, p. 935–945, 1998.

SYSTEMATIC CATALOG OF CULICIDAE, Genero *Anopheles* (Disponível: <<http://www.mosquitocatalog.org>> Acesso em: 20/04/2017).

TADEI, W. P. et al. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 2, p. 325–335, 1998.

TADEI, W. P. et al. Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. **Hydrobiologia**, 2016.

TELANG, A.; FRAME, L.; BROWN, M. R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). p. 854–864, 2007.

TENE FOSSOG, B. et al. Physiological correlates of ecological divergence along an urbanization gradient: differential tolerance to ammonia among molecular forms of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **BMC ecology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

TOLLE, M. A. Mosquito-borne Diseases. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 39, n. 4, p. 97–140, 2009.

TOMASSO, W. Journal of Aquatic Animal Health Toxicity of Ammonia and Nitrite to Sunshine Bass in Selected Environments Toxicity of Ammonia and Nitrite to Sunshine Bass in. n. December 2012, p. 37–41, 1993.

VILLARREAL-TREVIÑO, C. et al. Larval habitat characterization of *Anopheles darlingi* from its northernmost geographical distribution in Chiapas, Mexico. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 517, 22 dez. 2015.

VLACHOU, D. et al. The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 16, n. 4, p. 384–391, 2006.

WANG, Z.; LEUNG, K. M. Y. Effects of unionised ammonia on tropical freshwater organisms: Implications on temperate-to-tropic extrapolation and water quality guidelines. **Environmental Pollution**, v. 205, p. 240–249, 2015.

WEIHRAUCH, D.; DONINI, A.; O' DONNELL, M. J. Ammonia transport by terrestrial and aquatic insects. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 4, p. 473–487, 2012.

WEIHRAUCH, D.; MORRIS, S.; TOWLE, D. W. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 26, p. 4491–4504, 2004.

WEIRICH, C. R.; TOMASSO, J. R.; SMITH, T. I.J. Toxicity of Ammonia and Nitrite to Sunshine Bass in Selected Environments, **Journal of Aquatic Animal Health**, V. 5, 1993

WORLD MALARIA REPORT. Global Malaria Programme. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Geneva, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Communicable disease control, prevention and eradication who pesticide evaluation scheme; **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**, WHO, 2005 .

WU, Y. et al. Cloning and functional expression of Rh50-like glycoprotein, a putative ammonia channel, in *Aedes albopictus* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 11, p. 1599–1610, 2010.

YANG, A. S. P.; BODDEY, J. A. Molecular mechanisms of host cell traversal by malaria sporozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 129–136, 2017.

YU, S. J. Age variation in insecticide susceptibility and detoxification capacity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larva. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, n. 2, p. 219–222, 1983.

ANEXO-A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RONDÔNIA - UNIR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES LETAIS DA AMÔNIA E SEU EFEITO NA BIOLOGIA DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE) COLETADOS EM ÁREA RURAL E PERIURBANA DE PORTO VELHO, RO.

Pesquisador: Alyne Cunha Alves Dias

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53021215.0.0000.5300

Instituição Proponente: Universidade Federal de Rondônia - UNIR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.428.600

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de mestrado da aluna Alyne Alves Cunha Dias como orientador o professor Dr. Alexandre de Almeida e Silva do Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental da Fundação Universidade Federal de Rondônia denominado AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES LETAIS DA AMÔNIA E SEU EFEITO NA BIOLOGIA DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE) COLETADOS EM ÁREA RURAL E PERIURBANA DE PORTO VELHO, RO. A realização de tal estudo justifica-se pela necessidade de compreender a tolerância da espécie *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária no Estado de Rondônia à amônia, um componente nitrogenado presente em ambiente com elevada taxa de decomposição e poluição

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da amônia na mortalidade larval e na biologia de mosquitos de *An. darlingi* coletados em área rural e periurbana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco apresentado aos voluntários serão leves e o desconforto será de leve sensação dolorosa no momento da coleta de sangue por punção, algumas vezes podendo apresentar vermelhidão no local da coleta, porém não interferirá nas atividades físicas ou intelectuais dos participantes. Não

Endereço: Avenida Presidente Dutra, 2965 campus José R.

Bairro: Centro **CEP:** 78.000-000

UF: RO **Município:** PORTO VELHO

Telefone: (69)1182-2111

E-mail: cep.unir@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 1.428.600

haverá nenhum beneficiamento imediato aos voluntários mas os mesmos poderão contribuir na observação da urbanização da espécie e, a partir disto, obter maior conhecimento a respeito da biologia e relação do vetor com o meio impactado devido à expansão urbana e seu potencial impacto na epidemiologia da malária. Quanto aos pesquisadores os mesmos se comprometem por escrito a usar equipamento de proteção individual para captura do mosquito.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A folha de rosto está devidamente preenchida. O projeto de pesquisa apresenta uma fundamentação teórica relacionada ao tema a ser pesquisado. A metodologia explicita a coleta e análise dos dados bem como a amostragem mas não caracteriza o tipo de estudo a ser realizado. Os procedimentos éticos resguardam a dignidade dos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE para os participantes redigido de forma clara e todos os requisitos previstos na Resolução 466/CNS/2012. Os procedimentos estão claros e as garantias devidamente explicitadas, bem como a disponibilidade e forma de contato com os pesquisadores. A pesquisadora também assina termo de responsabilidade quanto ao uso de equipamento de proteção individual para captura de mosquitos bem como a realização de exames de gravidez, de acordo com Parecer Jurídico e Norma Técnica do IPEPATRO e Ministério da Saúde 16/CGPNM/DIGES/SVS/MS.

Recomendações:

Descrever o tipo de estudo

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa devidamente instruído e elaborado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_638367.pdf	04/12/2015 22:49:44		Aceito
Folha de Rosto	folharosto_alyne.pdf	04/12/2015 22:45:19	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	orientador.jpg	04/12/2015 22:40:40	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_AlyneDias.doc	03/12/2015 13:56:22	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito

Endereço: Avenida Presidente Dutra, 2965 campus José R.
 Bairro: Centro CEP: 78.000-000
 UF: RO Município: PORTO VELHO
 Telefone: (69)1182-2111 E-mail: cep.unir@yahoo.com.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RONDÔNIA - UNIR



Continuação do Parecer: 1.428.600

Justificativa de Ausência	TCLE_AlyneDias.doc	03/12/2015 13:56:22	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cepunir_alyne.jpg	03/12/2015 13:55:19	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_Alyne.jpg	03/12/2015 13:53:47	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_alexandre.jpg	03/12/2015 13:53:39	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Outros	examegravidez_alyne.pdf	03/12/2015 13:53:20	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado_alynedias_4_Alyne.doc	03/12/2015 12:56:46	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_divulgacao_resultados.jpg	03/12/2015 12:55:14	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto.docx	03/12/2015 12:54:18	Alyne Cunha Alves Dias	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO VELHO, 29 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Edson dos Santos Farias
(Coordenador)

Endereço: Avenida Presidente Dutra, 2965 campus José R.
Bairro: Centro CEP: 78.000-000
UF: RO Município: PORTO VELHO
Telefone: (69)1182-2111 E-mail: cep.unir@yahoo.com.br