

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

GLAUCILENE DA SILVA COSTA

**EFEITO DE ALIMENTOS ALTERNATIVOS AO SANGUE NA BIOLOGIA  
REPRODUTIVA DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Porto Velho, RO

2016

GLAUCILENE DA SILVA COSTA

**EFEITO DE ALIMENTOS ALTERNATIVOS AO SANGUE NA BIOLOGIA  
REPRODUTIVA DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Área de concentração: Biologia, biodiversidade, ecologia e controle de vetores de interesse médico, da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva

Porto Velho, RO

2016

**GLAUCILENE DA SILVA COSTA**

**EFEITO DE ALIMENTOS ALTERNATIVOS AO SANGUE NA BIOLOGIA  
REPRODUTIVA DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Comissão Examinadora:

---

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

---

Dra. Maria Aurea Pinheiro Silveira  
(Membro externo)

---

Dr. Jansen Fernandes Medeiros  
(Membro memória)

Porto Velho, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

### **Dedico**

A minha mãe, que independente do lugar que esteja sei que está torcendo muito por mim. Por sempre ter batalhado pelo melhor para suas filhas e ter nos ensinado que o saber é nossa única herança. IN MEMORIAM

Aos amigos que foram de suma importância para a concretização do mestrado, ajudando na parte física e emocional.

A minha família que torce sempre para o meu sucesso.

## Agradecimentos

Não sou tão religiosa, mas acredito que exista um ser maior que nos guia e nos ajuda a seguir em frente, costume chamá-lo de Deus, pois foi assim que me foi apresentado, então primeiramente, Obrigada Deus.

Ao Professor Alexandre de Almeida, pela paciência e compreensão, sei que não fui fácil nesses últimos 25 meses, quando eu não estava querendo pular da janela, estava te dando motivos para querer me defenestrar, mas agradeço imensamente pela oportunidade e confiança, principalmente por ter me deixado fazer parte do “LARbein”.

A T-O-D-O-S que fizeram parte do Laboratório de Bioecologia de Insetos (LaBEIn), principalmente nesses últimos dois anos. Tenho esse laboratório realmente como um lar, e vocês sempre foram como uma família para mim. Assim, como em toda família, existem aqueles que não gostamos tanto e aqueles que são essências, porém todos fazem parte da minha história. Agradeço por toda ajuda que me foi dada.

As coleguinhas Aline Andriolo e Vanessa Marnei, pela ajuda (física e mental), pelos cafés, lanches, churrascos, por me fazerem sair de casa. Agradeço o coleguismo dentro e fora do laboratório.

Alyne Cunha (mais conhecida como Cantinho de cerca), OBRIGADA pela sua amizade, principalmente no último ano. Você se tornou essencial! Te agradeço pela ajuda, pelos conselhos, caronas e até pelas brigas, que ocorrem porque somos bem parecidas (cabeças duras). Se eu pudesse, trabalhava com você pelo resto da minha vida!

Daiane Silva te agradeço pela amizade, você diz que eu tenho motivos para odiar você, pois acho que só tenho motivos para agradecer ter te conhecido. Se tem uma coisa que faria eu passar por todo o mestrado novamente essa, seria a conquista da sua amizade. Agradeço pela lealdade, pelos conselhos, ajuda, por todo o carinho, saiba que no final das contas tenho você como uma irmã mais velha.

Ao Dr. Moreno Rodrigues, pela ajuda nas análises estatísticas do trabalho, mas agradeço principalmente pelas explicações personalizadas para que eu pudesse entender tudo isso. Pelas conversas e pelo incentivo, que foram de suma importância nessa reta final do mestrado.

Aos amigos Rafa, Thais e Lury como sempre a companhia de vocês foi de grande valia. Agradeço especialmente a Jana por estar sempre disponível para escutar as reclamações, as alegrias, as tentativas de acerto e erro, as decepções e por ter me acompanhado na montanha russa de sentimentos que foi o Mestrado. E Tiago, você da mesma forma, agradeço ainda pelas noites que ficou estudando comigo para fazer a prova do mestrado e por todo apoio que você me deu desde o início até hoje.

Antônio Marques, obrigadíssima pela ajuda que me foi oferecida nesses últimos meses. Deve ter se arrependido de ter dado liberdade, porque eu perturbei o quanto pude! Perturbei tanto que acabou virando meu namorado. Obrigada pelas leituras, dicas, paciência e amizade, elas foram de suma importância para mim. Serei eternamente grata.

Agradeço a minha família e aos amigos, que entenderam a minha frequência afetiva, que foi bem baixa nesses últimos 25 meses, mas que sempre estavam dispostos a me darem ombro e ouvidos.

A turma de mestrado do PGBioExp 2014, vocês foram de longe a melhor turma de sala de aula que eu já tive! Tornaram os meses com aulas mais legais. Em especial Carol e principalmente Cris, pessoa como você é raro no mundo de hoje! Agradeço pela sua amizade e espero que perdure para além do mestrado!

A Fiocruz Rondônia pela disponibilidade do carro para apoio nas capturas, que foram de extrema importância para que os trabalhos fossem desenvolvidos, em especial ao Prof. Jansen Medeiros pela compreensão.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) pelo financiamento da bolsa, que foi fundamental, possibilitando assim dedicação exclusiva para desenvolver o projeto.

Enfim, a todos que fizeram parte direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui! Deixo a vocês o meu MUITO OBRIGADA!

***“Nós todos ajudamos uns aos outros a permanecer fortes.***

***Ninguém é forte sozinho”***

***-O quarto de Jack***

***“Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço”***

***-Dave Weinbaum***

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa que atinge aproximadamente 500 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, anualmente são registrados aproximadamente 450 mil casos. Essa doença é transmitida ao homem pela picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae), sendo no Brasil, *Anopheles darlingi* o principal vetor. Os mosquitos apresentam características específicas para completar seu ciclo de vida. Uma dessas características é a necessidade de sangue para completar seu ciclo gonotrófico. A utilização do sangue exige cuidados e apresenta riscos atrelados a normas legais além de muitas vezes ser necessário manter biotérios em instituições de pesquisa para sua obtenção. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de alimentos alternativos ao sangue humano em parâmetros reprodutivos de *An. darlingi*. Os alimentos alternativos foram: (i) Sangue (20%) + soro albumina bovino (*BSA*) diluído em uma solução fisiológica (S-A), (ii) *BSA* diluída em solução fisiológica na concentração de 200mg/mL (SF-AL200), (iii) *BSA* diluída em solução fisiológica na concentração de 400mg/mL (SF-AL400), (iv) Sacarose 10% + *BSA* na concentração de 200mg/mL (S1), (v) Sacarose 10% + *BSA* na concentrações de 400mg/mL (S2), (vi) Sacarose 10% + Solução Fisiológica + *BSA* na concentração de 200mg/mL (S3) e (vii) Sacarose 10% + Solução Fisiológica + *BSA* na concentração de 400mg/mL (S4). Para verificar o efeito dos alimentos acima citados observou-se o número de mosquitos ingurgitados, a sobrevivência até a oviposição, a proporção de mosquitos que ovipuseram e o número médio de ovos e larvas por fêmea. Dez mosquitos de campo foram transferidos para copos plásticos e, em seguida cada copo recebia uma das diferentes formulações de alimentos. Os alimentos permaneciam sobre as gaiolas por 20 minutos e, posteriormente, os mosquitos que não se alimentavam eram separados. O desenho acima descrito foi repetido para duas diferentes formas de administração de alimento: gotícula e membrana, sendo que um total de 21 copos (210 mosquitos) foram utilizados para cada tratamento. Foi observado um baixo número de mosquitos ingurgitados nos alimentos alternativos administrados em membrana quando comparado com o sangue, tendo uma diferença significativa. Já nos alimentos oferecidos em gotículas, a proporção média de mosquitos ingurgitados foi maior quando comparado com sangue administrado em membrana. A proporção média de mosquitos vivos até a oviposição em membrana não foi significativamente diferente em relação ao sangue, assim como a sobrevivência dos mosquitos que se alimentaram de gotículas também não diferiu significativamente dos controles sangue e sacarose 10%. Observou-se, que independente da forma de administração, todos os alimentos alternativos desencadearam a ovogênese, porém a produção de ovos ainda é maior com o sangue com exceção da solução S2. Todos os tratamentos levaram a produção de larvas. No entanto, a média de larvas produzidas nos alimentos alternativos, administrados em membrana e gotículas, foram significativamente mais baixas quando comparadas com o sangue. Conclui-se que os alimentos alternativos administrados em gotículas são promissores, porém mais estudos são necessários para verificar a melhor composição visando a substituição do sangue na criação de *An. darlingi*.

**Palavras-chave:** Alimentos alternativos, Fecundidade, Fertilidade, Malária, Soro Albumina Bovino (*BSA*), Vetor.

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease that affects approximately 500 million people worldwide. In Brazil, about 450,000 cases are registered annually. This disease is transmitted to humans by the bite of female mosquitoes from the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae); in Brazil, *Anopheles darlingi* is the main vector. Mosquitoes have specific characteristics to complete their life cycle. One of these characteristics is the need for blood in order to complete their gonotrophic cycle. The use of blood requires care and presents risks linked to legal norms in addition to the fact that it is often necessary to maintain vivariums in research institutions in order to obtain it. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of alternative foods to human blood on reproductive parameters of *An. darlingi*. The alternative foods were: (i) Blood (20%) + bovine serum albumin (BSA) diluted in a saline solution (S-A), (ii) BSA diluted in a saline solution at a concentration of 200mg/mL (SF-AL200), (iii) BSA diluted in a saline solution at a concentration of 400mg/mL (SF-AL400), (iv) 10% Sucrose + BSA at a concentration of 200mg/mL (S1), (v) 10% Sucrose + BSA at a concentration of 400 mg/mL (S2), (vi) 10% Sucrose + Saline Solution + BSA at a concentration of 200mg/mL (S3) and (vii) 10% Sucrose + Saline Solution + BSA at a concentration of 400mg/mL (S4). To check the effect of the food mentioned above, the number of engorged mosquitoes, survival until oviposition, the proportion of mosquitoes that laid eggs and the mean number of eggs and larvae per female were observed. Ten field mosquitoes were transferred to plastic cups and then each cup received one of the different food formulations. The food remained in the cages for 20 minutes and then the mosquitoes that did not eat were separated. The design described above was repeated for two different forms of food administration: droplet and membrane, with a total of 21 cups (210 mosquitoes) used for each treatment. A low number of engorged mosquitoes was observed for alternative foods administered in a membrane compared to the blood, with a significant difference. However, in food supplied in droplets, the average proportion of engorged mosquitoes was higher when compared to blood administered in a membrane. The average proportion of live mosquitoes until oviposition in the membrane was not significantly different compared to the blood, just as the survival of mosquitoes that ate from droplets did not differ significantly from the blood and 10% sucrose controls. Regardless of the form of administration, all alternative food triggered oogenesis, but egg production is even greater with blood, except the S2 solution. All treatments led to the production of larvae. However, the average of larvae produced in alternative foods, administered in a membrane and in droplets, were significantly lower compared to blood. It was concluded that alternative food administered in droplets are promising, but further studies are required to determine the best composition, aiming to replace blood in raising *An. darlingi*.

**Keywords:** Alternative Foods, Fecundity, Fertility, Malaria, Bovine Serum Albumin (BSA), Vector.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Ciclo da Malária .....	15
<b>Figura 2-</b> Países com transmissão contínua de malária em 2013. ....	16
<b>Figura 3-</b> Distribuição de anofelinos (Culicidae: Anophelinae) nas Américas. ....	18
<b>Figura 4-</b> Estágios de vida de <i>Anopheles darlingi</i> . (A) ovo (B) larva (C) pupa (D) Mosquito adulto (fêmea). ....	20
<b>Figura 5-</b> Características diagnósticas de <i>Anopheles darlingi</i> . (A) Asa com destaque nas manchas escuras das extremidades da veia anal e na mancha escura da veia costal (B) Perna posterior, com destaque nos artículos brancos. ....	21
<b>Figura 6-</b> Ilustração do sistema digestivo de mosquito. Com destaque para o intestino e divertículos. ....	23
<b>Figura 7-</b> Cascata de Sinais que ocorrem em mosquitos após a alimentação sanguínea desencadeando a vitelogênese. ....	26
<b>Figura 8-</b> Local de coleta de <i>Anopheles darlingi</i> realizadas no ano de 2015 e 2016 no município de Porto Velho, Rondônia. ....	30
<b>Figura 9-</b> Mosquito da espécie <i>An. darlingi</i> coletado em campo. Espécime com o abdome visivelmente vazio. ....	31
<b>Figura 10-</b> Copo telado utilizado para triar os mosquitos que não estavam ingurgitados e administrar os alimentos controles e alternativos. ....	32
<b>Figura 11-</b> Alimentação administrada por membrana. A- Sangue sendo colocado no fundo do copo descartável de 50 mL invertido, B- Aplicação da fita Veda-Rosca no fundo do copo, - Acréscimo de água ~37°C dentro do copo e D- Membrana com alimento sendo colocado sobre as gaiolas teladas .....	33
<b>Figura 12-</b> Alimentação administrada por gotículas. Aplicação com micropipeta e aparência das gotículas sobre as gaiolas teladas. ....	34
<b>Figura 13-</b> Diagrama das formas de administração e alimentos alternativos oferecidos para <i>Anopheles darlingi</i> .....	35
<b>Figura 14-</b> Mosquitos da espécie <i>An. darlingi</i> , após o fornecimento dos alimentos. Mosquito: 1- ingurgitado com alimentos alternativo; 2- ingurgitado com sangue e 3- não ingurgitado. ....	36
<b>Figura 15-</b> Proporção (+/- erro padrão) de <i>Anopheles darlingi</i> ingurgitados nos diferentes alimentos administrados em membrana. ....	38
<b>Figura 16-</b> Proporção (+/- erro padrão) de <i>Anopheles darlingi</i> vivos até a oviposição nos diferentes alimentos administrados em membrana. ....	39
<b>Figura 17-</b> Proporção (+/- erro padrão) da resposta de ingurgitamento de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> nos diferentes alimentos administrados em gotículas e nos controles. ....	41
<b>Figura 18-</b> Proporção (+/- erro padrão) de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> vivas até a oviposição alimentados com os diferentes alimentos alternativos ministrados em gotículas e nos controles. ....	42
<b>Figura 19-</b> Proporção (+/- erro padrão) de mosquitos <i>Anopheles darlingi</i> que ovipuseram nos diferentes alimentos administrados em gotículas e no controle. ....	43

<b>Figura 20-</b> Média (+/- erro padrão) de ovos por fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> nos diferentes alimentos administrados em gotículas e no controle. ....	44
<b>Figura 21-</b> Média (+/- erro padrão) da produção de larvas de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> nos diferentes alimentos administrados em gotículas e no controle.....	45
<b>Figura 22-</b> Índice de Qualidade (IQ) dos diferentes métodos e alimentos oferecidos para mosquitos da espécie <i>Anopheles darlingi</i> .(A) Alimentos ofertados com membrana; (B) Alimentos ofertados em gotículas. ....	46

## Lista de Abreviações e Siglas

<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
<i>BSA</i>	Albumina Sérica Bovina
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<i>Cx</i>	<i>Culex</i>
LaBEIn	Laboratório de Bioecologia de Insetos
S-A	Sangue 20% + Soro albumina bovino ( <i>BSA</i> ) diluída em solução fisiológica 400/mg/mL
SF-AL200	Solução fisiológica + 200 mg/mL de <i>BSA</i>
SF-AL400	Solução fisiológica + 400 mg/mL de <i>BSA</i>
S1	Sacarose 10% + Soro albumina bovino ( <i>BSA</i> ) com 200mg/mL
S2	Sacarose 10% + Soro albumina bovino ( <i>BSA</i> ) com 400mg/mL
S3	Sacarose 10% + solução fisiológica + Soro albumina bovino ( <i>BSA</i> ) com 200mg/mL
S4	Sacarose 10% + solução fisiológica + Soro albumina bovino ( <i>BSA</i> ) com 200mg/mL
Fig.	Figuras
Tab.	Tabelas

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Malária – Importância e Epidemiologia</b> .....	14
<b>1.2 Vetores da malária</b> .....	17
1.2.1 <i>Anopheles darlingi</i> - Distribuição, biologia e ecologia .....	18
<b>1.3 Alimentação de mosquitos adultos e sua importância na biologia geral e reprodução</b> .....	22
<b>1.4 Alimentos alternativos para a ovogênese em mosquitos</b> .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	29
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>3.1 Coleta de mosquitos</b> .....	30
<b>3.2 Alimentos alternativos</b> .....	32
3.2.1 Administrados em membrana.....	32
3.2.2 Administrados em gotículas .....	33
<b>3.3 Parâmetros biológicos avaliados</b> .....	35
<b>3.4 Índice de qualidade</b> .....	37
<b>3.5 Análise de dados</b> .....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	38
<b>4.1 Alimentos alternativos oferecidos em membrana</b> .....	38
<b>4.2 Alimentos alternativos oferecidos em gotículas</b> .....	40
<b>4.3 Índice de Qualidade (IQ) nos diferentes alimentos e formas de administração</b> .....	45
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57

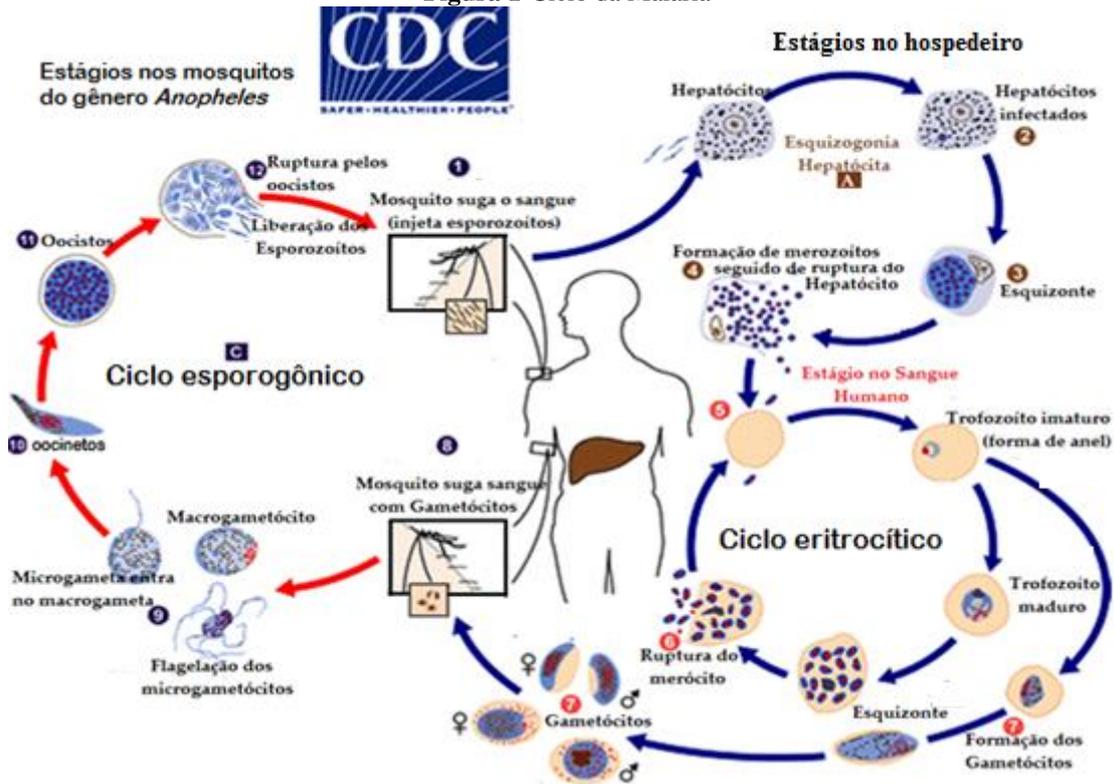
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Malária – Importância e Epidemiologia

A malária é uma doença causada por protozoários pertencentes à ordem Coccidiida, subordem Haemosporidiidea, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Atualmente, são descritas cinco espécies capazes de infectar o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (BRASIL, 2012) e *Plasmodium knowlesi*, cuja infecção natural foi confirmada em seres humanos em 2004 (SINGH et al. 2004; KANTELE e JOKIRANTA, 2010; LEE et al 2011).

A doença pode ser transmitida ao homem por transfusão de sangue (KITCHEN e CHIODINI, 2006), uso compartilhado de seringas e agulhas infectadas ou pelo parto (congenita) (LO et al., 1991; WANDERLEI et al., 1991), porém a forma predominante de infecção é por meio da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada com o *Plasmodium*. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito infectado com o parasito inocula esporozoítas no hospedeiro humano, esses invadem células hepáticas transformando-se em esquizontes maduros, no qual tem-se a ruptura e liberam merozoítas. Esses merozoítas invadem os glóbulos vermelhos transformando-se em esquizontes e liberando novos merozoítos para invadir novos eritrócitos. Alguns desses merozoítas se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos. Esses então são ingeridos pelos mosquitos durante o repasto. No estômago dos mosquitos os gametas se fundem formando o zigoto, que tornam-se móvel e alongado formando o oocineto, que se dirige para a parede intestinal do inseto, perfurando-a, resultando em oocisto. Esses oocistos produzem esporozoítos que invadem a glândula salivar do anofelino, e a inoculação desse esporozoíto em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo da malária (Figura 1).

Figura 1-Ciclo da Malária

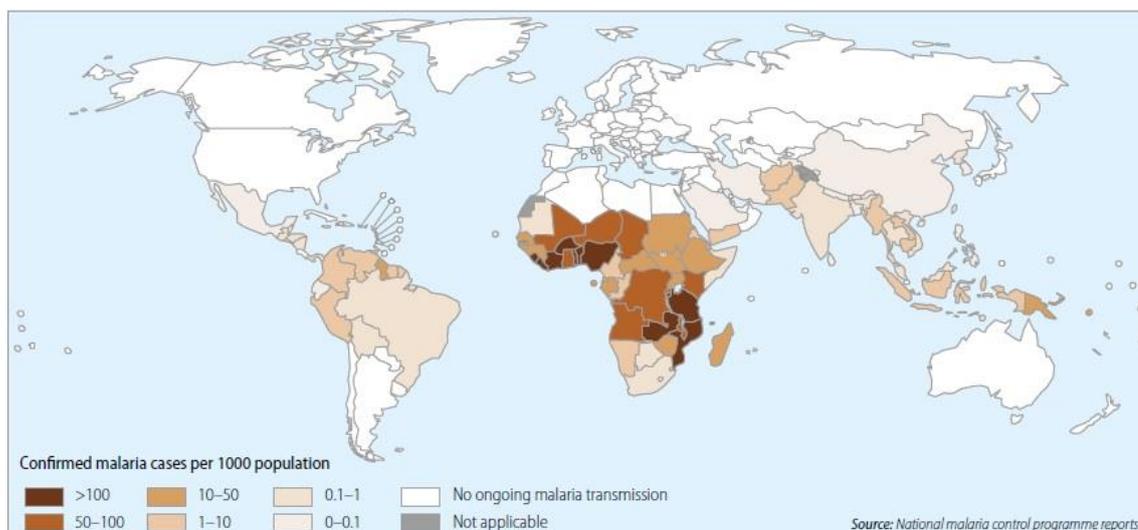


Fonte: Modificado de <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>

Esses patógenos atacam órgãos como fígado, baço e cérebro causando no ser humano sintomas como febre, calafrios, cefaleia, e vômito e, caso não tratada adequadamente, pode levar o indivíduo a óbito.

Devido a sua alta morbidade e mortalidade a malária é considerada uma das doenças parasitárias mais preocupantes no mundo (WHO, 2014). O impacto no desenvolvimento econômico e na saúde das pessoas é maior nas regiões subtropicais e tropicais. No ano 2000, a Organização Mundial de Saúde estimou a ocorrência de 300 a 500 milhões de novos casos clínicos da doença e 2,7 milhões de mortes. Em 2009, o relatório da WHO mostrou uma redução nos casos de malária ao redor do mundo, tendo uma estimativa de 863.000 mortes e 243 milhões de casos dos quais a maioria ocorreu no continente Africano. Além disso, houve redução na escala espacial na qual a doença ocorre, sendo que no século passado cerca de 53% da superfície terrestre era considerada área de risco e atualmente esse valor passou a ser de 27% (HAY et al 2004, WHO 2014). Mesmo assim, apesar da redução expressiva dos casos de malária, a doença ainda constitui um importante problema de saúde pública (Figura 2).

**Figura 2**-Países com transmissão contínua de malária em 2013.



Fonte: WHO, 2014.

Nas Américas, a doença é endêmica em 21 países de maneira que aproximadamente 120 milhões de pessoas vivem em área de risco. O Brasil ocupa a primeira posição no ranking de número de casos (143.415) seguido por Venezuela (90.708), Peru (64.676) e Colômbia (40.768) sendo que juntos esses países são responsáveis por mais de 50% dos casos notificado no continente (WHO, 2015).

No Brasil a grande incidência de malária no país tem se restringido aos estados que compõem a Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). Porém, também são descritos casos da doença na região extra-amazônica, incluindo casos autóctones de malária, com notificações na região Centro-Oeste e na região de Mata Atlântica (LIMONGI et al., 2008; OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2010).

Alguns fatores podem estar intimamente ligados a alta incidência na região amazônica como: grandes coleções hídricas, alto índice pluviométrico, modificações antrópicas como o desmatamento, construção de hidroelétricas, estradas, movimentos migratórios, pessoas suscetíveis; existência do parasito e vetor, fatores econômicos e sociais (tipo de habitação e hábitos de trabalho) e composição da fauna contribuíram e contribuem para a manutenção desta endemia na Amazônia (MS, 2008, CAMARGO 2003, MARTENS e HALL, 2000).

## 1.2 Vetores da malária

Os vetores do parasito da malária humana são insetos pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Anophelinae e gênero *Anopheles* (BUSTAMANTE, 1957; BRUCE-CHWATT, 1980; FORATTINI, 2002). Esse gênero inclui seis subgêneros: *Stethomya*, *Lophopodomys*, *Anopheles*, *Kerteszia*, *Nyssorhyncus* e *Celia*, sendo esse último presente apenas no Velho Mundo.

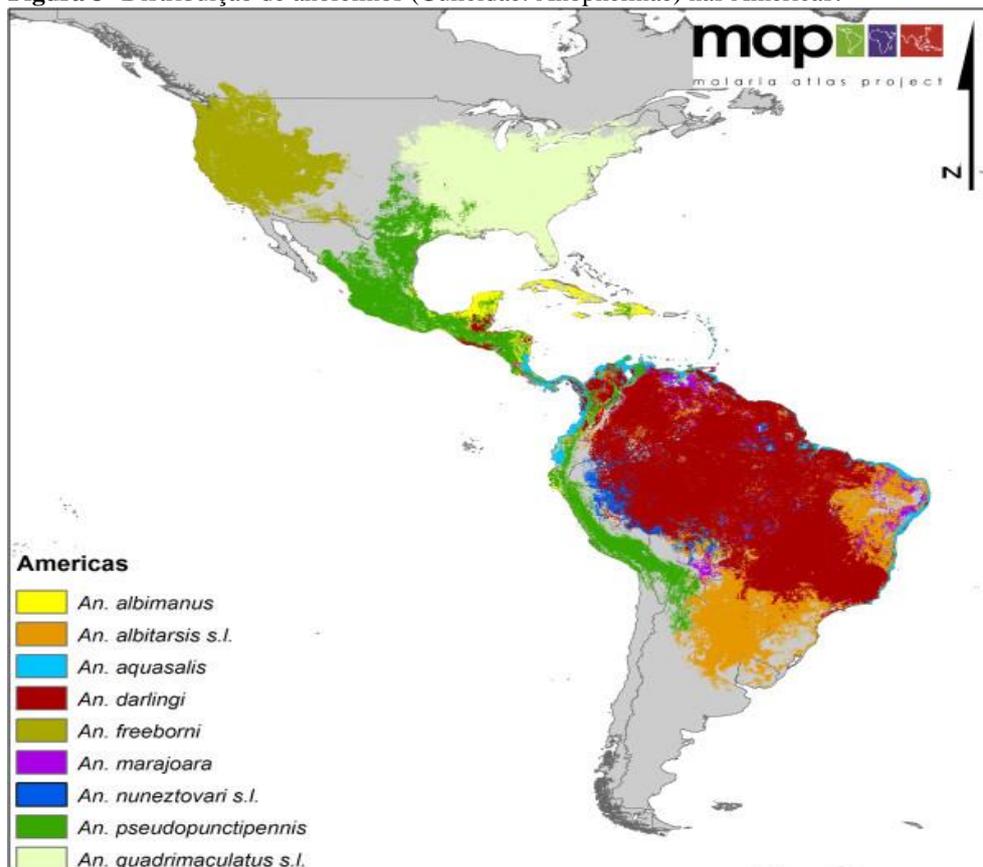
O gênero *Anopheles* possui cerca de 500 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas e, segundo o banco de dados Systematic Catalog of Culicidae, 150 espécies estão localizadas no continente africano, 178 na Ásia e 79 na América do Sul.

De acordo com Sinka et al. (2012), do total de espécies descritas apenas 70 são vetores de protozoários da malária humana, das quais 41 são consideradas vetores primários da doença. Entre as características que conferem essa competência a essas espécies, pode-se citar a habilidade de se alimentar em hospedeiros vertebrados, longevidade, suscetibilidade a infecção pelo parasito da malária e o local da proliferação (DESPOMMIER, 2005). Além disso, o sucesso de uma espécie como vetor primário da doença está intimamente ligado a fitofisionomia da região.

No continente Africano, o complexo de espécies *Anopheles gambiae* que está presente na África Subsaariana (COETZEE, 2004; BASS, 2007) e o *Anopheles funestus* presente na região Oeste do continente são os principais vetores da doença (Nigéria, Camarões e Gana) (MOFFET et al., 2007). Já no continente Asiático podemos citar o complexo *Anopheles culicifacies* como importante vetor nas zonas rurais do Sul da Ásia e o complexo *Anopheles dirus*, *Anopheles minimus* e *Anopheles harrisoni* nos países do sudeste asiático (MANGUIN et al., 2008).

O continente americano apresenta rica fauna anofélica sendo que na América do Norte os principais vetores são *Anopheles freeborni*, encontrado mais no Noroeste do continente e *Anopheles quadrimaculatus* no Sudeste; América Central: *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles aquasalis* (WHO, 2014; SINKA et al 2012). Já na América do Sul podemos citar *Anopheles albimanus*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles nuneztovari* na Colômbia (OLANO et al., 2001; ZAPATA, 2007; MONTOYA-LERMA et al., 2011) (Figura 3).

**Figura 3-** Distribuição de anofelinos (Culicidae: Anophelinae) nas Américas.



Fonte: Sinka, 2012.

No Brasil foram descritas 54 espécies de anofelinos, destas os importantes transmissores da malária humana pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. As principais espécies responsáveis por manter a endemia e/ou desencadear epidemias devido sua alta antropofilia e susceptibilidade à infecção natural no subgênero *Kerteszia* são *Anopheles bellator* e *Anopheles cruzii*, e no subgênero *Nyssorhynchus* são as espécies *Anopheles albitarsis*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles braziliensis*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles oswaldoi* e *Anopheles triannulatus* (RACHOU, 1958; CONSOLI e LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994 e REBELO et al., 2007; POVÓA et al., 2000).

### 1.2.1 *Anopheles darlingi* - Distribuição, biologia e ecologia

*Anopheles darlingi* é um dos principais vetores da malária nas regiões amazônicas da Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela e Brasil (ZIMMERMAN 1992, HIWAT et al. 2010; HIWAT e BRETAS, 2011). Alguns fatores contribuem para a alta capacidade vetorial de *An. darlingi* como: a susceptibilidade a

plasmódios que infectam humanos, capacidade de transmitir a malária dentro e fora de residências e hábito antropofílico (DEANE, 1986; CONSOLI e OLIVEIRA, 1998).

Esse vetor se desenvolve em grandes coleções de água profundas com pouca matéria orgânica, límpidas e parcialmente sombreadas como represas, remansos de rios, lagoas (RACHOU, 1958; DEANE, 1986; CHARLWOOD, 1996). Os mosquitos desta espécie são encontrados durante todo o ano, porém ocorre a diminuição de sua população na estação seca e aumento com o início das chuvas (TADEI et al., 1998; VITOR et al., 2009). *An. darlingi* tem uma plasticidade comportamental muito grande sendo difícil uma extrapolação a partir de uma situação epidemiológica de um local para outro, podendo ser endofágico/exofágico, endofílico/exófilico, oportunista ou altamente antropofílico (ZIMMERMAN et al., 2006; HIWAT e BRETAS, 2011; REINBOLD-WASSON, 2012). Normalmente, apresentam atividade crepuscular, porém sua atividade pode se estender durante toda a noite (TADEI e THATCHER 2000; VOORHAM, 2002; GIL et al., 2003). Apesar de possuir um comportamento endofílico e endofágico, existe a hipótese de uma mudança nesse hábito devido às metodologias de controle, que consistem na borrifação de inseticidas dentro das residências (AKHAVAN et al., 1999; SERVICE, 1991; ROZENDAAL, 1991). Outros estudos também demonstram uma mudança de comportamento em relação ao ambiente, no qual indivíduos dessa espécie tem sido registrado com maior presença no peridomicílio (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 1989; GIL et al., 2003; GAMA et al., 2009, AHUMADA et al, 2013, GIL et al 2015). Apesar disso, se mantém como um eficiente transmissor do parasito (KLEIN et al, 1991a; KLEIN et al, 1991b; TADEI e THATCHER, 2000).

O desenvolvimento de *Anopheles*, assim como os demais culicídeos, consiste em duas fases: aquática - ovo, larva (quatro estádios larvais) e pupa e terrestre - mosquito adulto (Figura 4).

**Figura 4**-Estágios de vida de *Anopheles darlingi* . (A) ovo (B) larva (C) pupa (D) Mosquito adulto (fêmea).

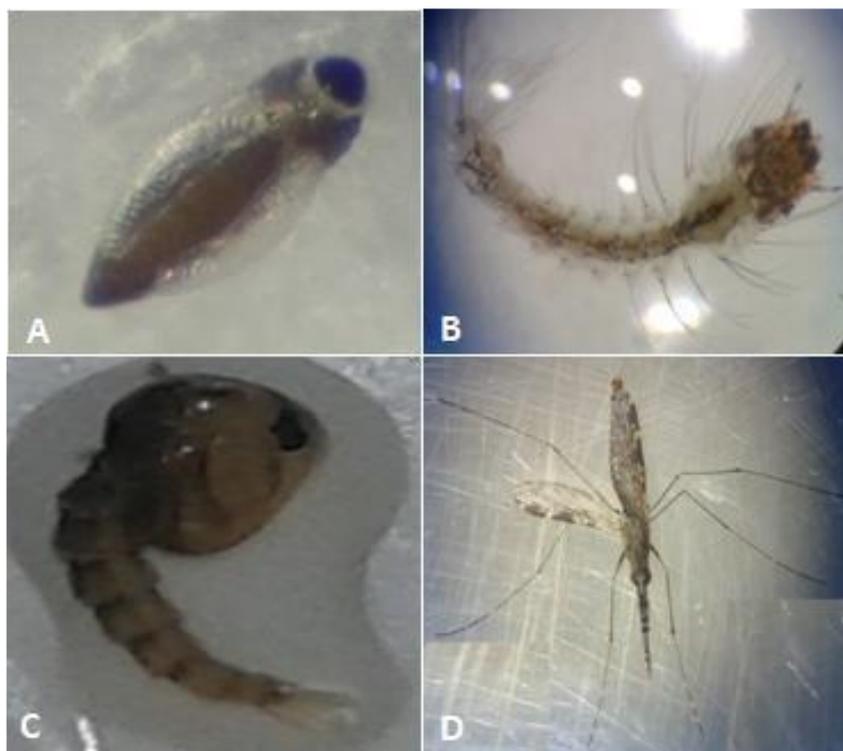


Foto: Alyne Dias, 2014

As fêmeas ovipõem diretamente na água limpa, parada ou com pouca correnteza. Os ovos são elípticos ou ovais, possuindo um aspecto alongado (Figura 4A). São postos isoladamente e em suas laterais encontram-se flutuadores que facilitam sua permanência na superfície da água. As formas e tamanhos dos flutuadores podem variar de acordo com a espécie. O tempo de eclosão varia entre dois ou três dias e tem um número médio de 75 a 150 ovos depositados e esses não resistem a dessecação (FORATTINI, 1973; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 1992, FLEMING, 1992).

As larvas (Figura 4B) passam por quatro instares, possuem grande mobilidade e são de vida livre. Essas têm um aspecto vermiforme com os dois primeiros tagmas bastante globulosos e abdome semicilíndrico com oito segmentos. Elas precisam, em geral, de sete a dez dias para o desenvolvimento, mas isso pode variar de acordo com fatores abióticos e bióticos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Apresentam uma coloração esbranquiçada podendo variar conforme o ambiente e o tipo de alimento que consomem. Por não possuírem sifão respiratório passam a maior parte do tempo na superfície da água e respiram ar atmosférico e por isso são facilmente reconhecidas devido sua posição paralela à superfície da água (FLEMING,1992).

Geralmente se desenvolvem em águas limpas que contenha pouca matéria orgânica, e apesar de serem mais frequentes em rios, quando ocorrem cheias o número de criadouros aumenta devido ao transbordamento de poças, valas e campos encharcados (MANGUIN et al., 1996).

As pupas (Figura 4C) têm um formato curviforme sinuoso lembrando o aspecto de uma virgula, é nesta fase que ocorre as maiores modificações necessárias para a metamorfose. As pupas não se alimentam e assim como as larvas precisam entrar em contato com a superfície da água para respirarem, essas respiram através de trombetas respiratórias. Essa fase pode durar de 1 a 3 dias (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). As pupas de machos são menores que as de fêmeas, sendo os primeiros a emergir para o estágio adulto (FLEMING, 1992).

Após a emergência, o inseto adulto (Figura 4d) abandona a água e vai para um abrigo. Devido a sua angulação perpendicular à base de repouso são conhecidos como “mosquitos pregos”. O corpo dos adultos é dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como antenas, olhos e palpos. No tórax estão os apêndices para locomoção, pernas e asas. O abdome abriga os órgãos internos como aparelho reprodutor, digestivo e excretor (FORATTINI, 2002). Os principais caracteres morfológicos, para a identificação da forma adulta de *An. darlingi* estão presentes na asa, pois a veia anal é predominantemente clara com uma mancha escura próximo de cada extremidade, primeira mancha da veia costal maior que a mancha clara seguinte e tarsos posteriores com os três últimos artículos (III-V) inteiramente brancos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) (Figura 5).

**Figura 5-** Características diagnósticas de *Anopheles darlingi*. (A) Asa com destaque nas manchas escuras das extremidades da veia anal e na mancha escura da veia costal (B) Perna posterior, com destaque nos artículos brancos.



Fonte: [http://www.wrbu.org/SpeciesPages\\_ANO/ANO\\_A-hab/ANdar\\_hab.html](http://www.wrbu.org/SpeciesPages_ANO/ANO_A-hab/ANdar_hab.html)

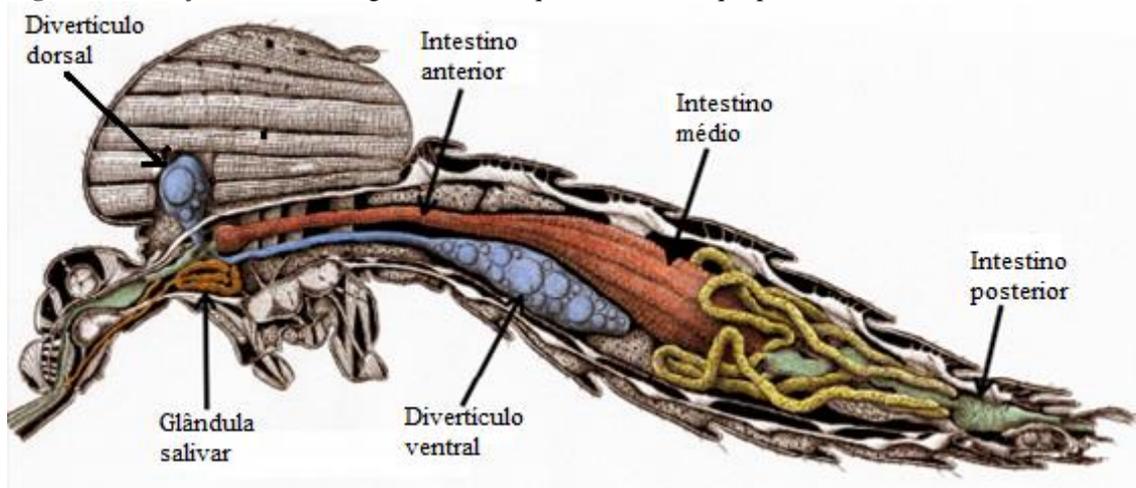
Machos e fêmeas alimentam-se de seiva de plantas e frutos danificados, sendo que somente as fêmeas se alimentam de sangue, pois este é necessário para fornecer proteínas para o desenvolvimento dos ovos (FORATTINI, 2002). Os adultos têm aproximadamente um mês de vida e acasalam durante o vôo. Após a cópula, a fêmea alça vôo a procura de sangue através de estímulos sensoriais, tais como odor e dióxido de carbono (CLEMENTS, 1999). Após a realização do repasto a fêmea procura um lugar para repousar até a digestão do sangue e maturação dos ovos, que dura cerca de 72 horas. As proteínas presentes no sangue auxiliam na maturação dos ovários e desenvolvimento total dos ovos. Após esse período elas procuram um local para a desova, que ocorre geralmente a noite. Em geral, basta um acasalamento para que a fêmea se mantenha fértil por toda sua vida (FORATTINI, 2002; REY, 2001).

### **1.3 Alimentação de mosquitos adultos e sua importância na biologia geral e reprodução**

As fêmeas de mosquitos hematófagos têm três modos de alimentação bem diferentes: ingestão da água, em que apenas um pequeno volume é ingurgitado e transportado para o intestino médio; a alimentação açucarada, em que é ingerido um grande volume de néctar ou seivas de plantas e levado direto para o divertículo ventral (*crop*) para que o estômago fique livre caso haja oportunidade de um repasto sanguíneo; e a alimentação sanguínea, na qual o sangue é conduzido direto para o intestino (FRIEND, 1978) (Figura 6). Os mosquitos utilizam quimiosensilas nos tarsos, labela, labro e o interior da bomba cibarial para identificar substâncias alimentares (CLEMENTS, 1992), sendo que a composição química do alimento irá determinar o seu destino dentro do mosquito (GOODING, 1972).

O intestino dos mosquitos é dividido em intestino anterior, médio e posterior. As partes anterior e posterior são revestidas por uma fina camada de quitina, porém o intestino médio não dispõe deste revestimento e, portanto, alguns insetos sintetizam uma estrutura quitinosa extracelular denominada matriz peritrófica que, entre outras funções, protege as células desta região contra agentes abrasivos (químicos ou mecânicos) (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996; GRAF et al, 1986; TERRA, 1990).

**Figura 6**-Ilustração do sistema digestivo de mosquito. Com destaque para o intestino e divertículos.



Fonte: Orfanó, 2012

No intestino anterior há os divertículos, que surgem ao final do esôfago: dois dorsais e um ventral. Os divertículos dorsais são menores que os ventrais, quando estão cheios (Figura 6). Na final do esôfago existe uma válvula (estomodeal) quando os mosquitos ingerem sangue, essa válvula se abre e o sangue é armazenado no intestino médio; entretanto quando ingerem néctar, a válvula continua fechada encaminhando o alimento para o divertículo ventral (ROMOSER, 1996).

As diferentes regiões do intestino têm funções especializadas. O intestino anterior está envolvido com condução e armazenamento do alimento. O médio digestão e absorção, ao passo que o posterior está responsável por eliminar os produtos vindo do intestino médio e túbulos de Malpighi (ROMOSER, 1996).

Machos e fêmeas de mosquitos dependem da ingestão de carboidratos para manter seu metabolismo energético, influenciando na suas atividades e longevidade (NAYAR e SAUERMAN, 1973). A disponibilidade de fontes alimentares pode aumentar a taxa de sobrevivência dos mosquitos, diminuir o tempo no ciclo gonotrófico e aumentar a capacidade vetorial (GU et al. 2011).

A ingestão de soluções açucaradas pode ser utilizada não apenas para suprir a necessidade energética para o voo (VAN HANDEL, 1984), mas também para iniciar a produção de ovos em fêmeas autógenas (MAGNARELLI, 1978). A digestão do açúcar é feita pelas  $\alpha$ -glicosidases, identificadas em mosquitos por Schaefer e Miura (1972), cujos os experimentos mostraram que as glândulas salivares de *Culex tarsalis* contêm enzimas que clivam a sacarose. James et al. (1989) sugeriram que essas enzimas poderiam ser ingeridas com a alimentação ajudando na digestão dos carboidratos no divertículo.

Moreira-Ferro (1999) detectou atividade  $\alpha$ -glicosidases em glândulas salivares de *Anopheles darlingi*. Entretanto a origem das  $\alpha$ -glicosidases e o local que ocorre a digestão dos carboidratos ingeridos pelos mosquitos ainda permanece em discussão. Em alguns trabalhos a produção de  $\alpha$ -glicosidases estava associada às glândulas salivares e a digestão de sacarose ao divertículo (MOREIRA-FERRO, 1999; MARINOTTI et al, 1996; JAMES et al, 1989).

É comumente aceito que a digestão de açúcares em mosquitos ocorra no divertículo e a de sangue, no intestino médio, já que são armazenados em compartimentos diferentes do trato digestivo. Entretanto, em *An. darlingi*, os sucos vegetais são enviados para o intestino médio. Pajot et al. (1975) observaram que em 46% dos intestinos continham um fluido claro, e em 69% dos casos o conteúdo do estômago foi positivo para a glicose. Quando as fêmeas estavam alimentadas com sumos vegetais e tiveram a oportunidade de ingerir sangue, o mesmo empurrava o sumo da planta para a região posterior do estômago (PAJOT et al. 1975). Caroci (2003), em estudos com fêmeas de *An. darlingi*, sugere que o papel dessas enzimas não seja significativo no que diz respeito à digestão de sacarose no divertículo, dado nível encontrado no interior desse órgão, indicando que o divertículo funciona apenas para o armazenamento e fornecimento gradativo de açúcares para o intestino e onde ocorre a sua digestão, uma vez que foi detectada atividade  $\alpha$ -glicolítica aumentada após três horas de ingestão de açúcar no intestino dos mosquitos (CAROCI et al 2003).

Por outro lado, o sangue está relacionado principalmente ao desenvolvimento dos ovos. Porém, diferentemente dos mosquitos autógenos, capazes de realizar pelo menos um ciclo gonotrófico sem repasto sanguíneo (TELANG e WELLS, 2004), as fêmeas de *Anopheles darlingi* são exclusivamente anautógenas, sendo a alimentação sanguínea essencial na obtenção de nutrientes para o desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovos (BRIEGEL, GUT e LEA, 2003).

Além da alteração morfológica que ocorre no abdômen (dilatação abdominal) a alimentação sanguínea provoca drásticas mudanças no metabolismo das fêmeas (SANDERS et al., 2003; FEITOSA et al., 2006). Em poucas horas, após a ingestão de sangue, os níveis de proteases podem aumentar em até 20 vezes, digerindo proteínas em aminoácidos que são liberados na hemolinfa (PACEY e O'DONNELL, 2014). As tripsinas são as principais proteases no processo digestivo do sangue e sua síntese, geralmente, é induzida pela presença de aminoácidos livre encontrados no sangue (NORIEGA et al, 1999; MARQUARDT, 2005). Acredita-se que a função dessa síntese de tripsinas é

verificar se há proteína suficiente para suportar o ciclo gonotrófico. Quando isso acontece, vias de transdução de sinais ativam a transcrição da tripsina tardia e de genes que codificam outras proteases como as aminopeptidases e carboxipeptidases (MARQUARDT, 2005; WEIDLICH et al, 2012).

Após a ingestão e durante a digestão, ocorre a maturação dos ovócitos e formação dos grânulos de vitelo (ovogênese). Os aminoácidos provenientes do repasto atuam como sinalizadores para numerosos processos metabólicos no intestino médio dos mosquitos estimulando uma sinalização em cascata que leva a liberação do hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OEH) iniciando assim a vitelogênese em várias espécies de culicídeos (UCHIDA et al. 1998, 2001).

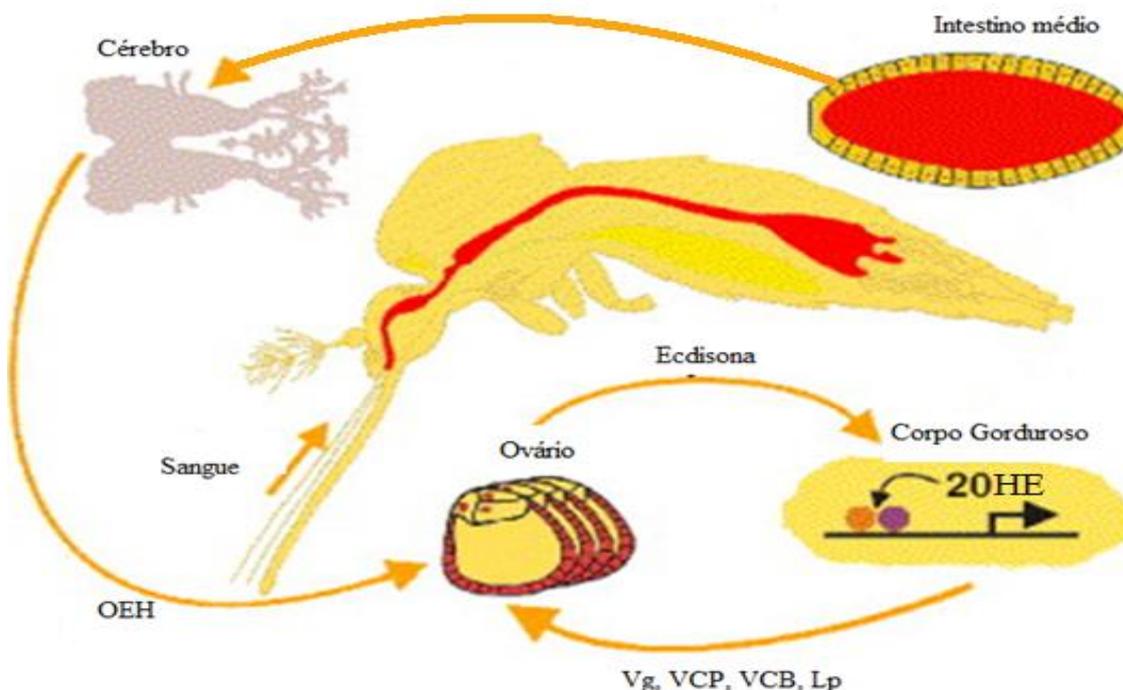
A vitelogênese é um processo de síntese, transporte e acúmulo de proteínas precursoras de vitelo no qual proteínas, lipídeos e açúcares são incorporados nos ovócitos. O processo é dividido em três etapas, a primeira, pré-vitelôgenese que é a fase que ocorre antes da ingestão do sangue em que os tecidos são preparados e amadurecidos. Nessa fase ocorre proliferação de organelas no corpo gorduroso e separação de células ovarianas. Ainda durante esse período, o hormônio juvenil III exerce influência nos três primeiros dias após a emergência do adulto e se o corpo gorduroso e ovários não forem expostos a esse hormônio eles não serão responsivos durante o período vitelogênico (RAIKHEL et al, 2002).

A segunda fase, período vitelogênico inicia-se com a ingestão sanguínea, levando a liberação do hormônio OEH que é secretado pelo cérebro do mosquito (LEA et al, 1967). O OEH estimula os ovários a produzir e secretar ecdisona para a hemolinfa, que ao chegar ao corpo gorduroso é convertida a 20-hidroxiecdisona (20HE). A 20HE estimula a síntese das principais proteínas precursoras do vitelo (vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica entre outras) que serão secretadas para a hemolinfa, endocitadas pelos ovários e armazenadas nos ovócitos (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992).

A última fase, o fim do período vitelogênico, é caracterizada pelo fim da síntese das proteínas precursoras de vitelo, início da produção do córion, que é uma camada glicoproteica que tem função de proteção do ovo. Isso ocorre aproximadamente entre 48 e 72 horas após a ingestão de sangue. Quando o ovo atinge a maturidade, o epitélio folicular desaparece deixando-o diretamente em contato com o oviduto. Na passagem pelo oviduto ocorre a fecundação, pois devido a sua contração, espermatozóides armazenados na espermateca são liberados e penetram pela micrópila. No final desse

processo, a fêmea deposita seus ovos em superfícies úmidas, finalizando o ciclo gonadotrófico (BROWN et al., 1998; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1992) (Figura 7).

**Figura 7-** Cascata de Sinais que ocorrem em mosquitos após a alimentação sanguínea desencadeando a vitelogenese.



Legenda: Com alimentação sanguínea tem-se a dilatação do intestino médio do mosquito e liberação de um sinal dependente do sangue do intestino para o cérebro. Após o recebimento desse sinal pelo cérebro há a liberação do hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OEH) que estimula os ovários para sintetizar e liberar ecdisona. Essa ecdisona segue para o corpo gorduroso e lá é convertida em 20-hidroiecdisona (HE), ativando a expressão do gene das proteínas precursora e lá é sintetizada no corpo gorduroso e depois são transportadas para o ovário para serem incorporadas no oócito em desenvolvimento. Vg: vitelogenina; VCP: vitelogenina carboxipeptidase; VCB: vitelogênicas catépsina; Lp: Lipoforina. Fonte: Attardo, 2005. Modificada

#### 1.4 Alimentos alternativos para a ovogênese em mosquitos

O sangue de vertebrados é uma mistura de leucócitos, eritrócitos e plaquetas que estão suspensas em um meio aquoso chamado plasma. Os eritrócitos são os principais componentes do sangue compreendendo 45% do volume total, e a proteína principal nestas células é a hemoglobina. Os outros 55% são constituídos pelo plasma, que contém componentes inorgânicos, tais como: Cloreto de sódio (NaCl), ácido clorídrico (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) entre outros, que atuam como tampões e também proteínas como

imunoglobulinas, transferrinas e principalmente a soroalbumina (FARLEY, HENDRY e MCLAFFERTY, 2012).

Os primeiros trabalhos sobre frações de sangue na biologia reprodutiva de mosquitos sugeriram que a proteína é o principal nutriente do sangue necessário para a ovogênese (WOKE, 1937; YEOLI E MER, 1938; DIMOND et al., 1956; SINGH e BROWN, 1957). A partir dessa informação, vários trabalhos vêm sendo feitos na tentativa de substituir o sangue de vertebrados para fins de produção de ovos dos mosquitos. Primeiramente, ofereceu-se para as fêmeas de *Aedes aegypti* algodões embebidos com soluções de sacarose misturados com aminoácidos e sais (DIMOND et al 1956) ou proteínas isoladas (LEA et al 1956) mostrando que, com a presença de aminoácidos essenciais, foi possível a produção de ovos. Rutledge et al. (1964) em vez de algodão, utilizou um alimentador artificial para oferecer sangue de galinha, eritrócitos humanos e uma solução salina com albumina sérica bovina (BSA) para *Aedes aegypti*, *Armigeres subalbatus* e *Anopheles stephensi*. Na albumina sérica bovina (BSA) podemos encontrar os aminoácidos que são considerados importantes para a produção de ovos (DIAMOND, 1956; PRATA, 2008; 2005).

KOGAN (1990), em estudo sobre alimentos alternativos ao sangue, descobriu que uma mistura de proteínas do sangue como albumina, hemoglobinas e  $\gamma$ -globulinas suportava a produção de ovos em *Aedes aegypti*. Outro estudo mais recente relata que duas concentrações (100 e 200 mg/mL) de albumina sérica bovina (BSA) estimulam a vitelôgenese e o desenvolvimento dos ovos em *Aedes albopictus* (PITTS, 2014).

Para os culicíneos, percebeu-se a necessidade da adição de fagoestimulantes para que os mosquitos ingurgitassem o alimento artificial, aumentando assim o número de fêmeas ingurgitadas e a quantidade de alimento que os mosquitos ingeriam. Esses fagoestimulantes são os nucleotídeos adenil difosfato (ADP), Adenil monofosfato (AMP) e trifosfato de adenosina (ATP) e sua adição causou aumento da taxa de ingurgitamento, conforme o número de grupos fosfatos ligados aumentava (CLEMENTS, 1992).

Para *Anopheles*, no ingurgitamento utilizando frações de sangue e soluções artificiais, observou-se que *An. stephensi*, *An. freeborni*, *An. gambiae* e *An. dirus* alimentaram-se apenas de uma solução salina composta por cloreto de sódio (NaCl) e bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), sem a necessidade de fagoestimulante. No entanto, *An. dirus* teve uma taxa e ingurgitamento maior quando adicionado BSA à solução (KOGAN, 1990).

Sianturi et al. (1996) testaram *BSA* e concentrados de eritrócitos como fonte de alimento para *An. farauti*, mostrando que a *BSA* tem um rendimento de produção de ovos e eclosão larval bem parecida com o tratamento controle (sangue de cobaia).

Existem poucos estudos sobre a substituição da alimentação sanguínea para *Anopheles*. Kogan (1990) afirma especificamente que *An. gambiae* alimentou-se de forma inconsistente com uma refeição artificial, produzindo ovos viáveis em apenas um de seis ensaios. Outro estudo relatou a oviposição de *An. quadrimaculatus* resultante de refeições artificiais, porém não havia dados sobre números de ovos ou comparações com o controle (LEA et al, 1956).

Em relação aos anofelinos neotropicais nenhum estudo sobre essa abordagem foi realizado até o momento, dessa forma estudos visando uma refeição substituta do sangue que suporte a produção de ovos e boa eclosão larval são uma alternativa atraente para a criação de mosquitos em laboratórios, diminuindo assim os custos e tramites legais envolvendo a manutenção de colônias de insetos vetores.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito da utilização de alimentos alternativos ao sangue humano em parâmetros da biologia de *Anopheles darlingi*.

### 2.2. Objetivos específicos

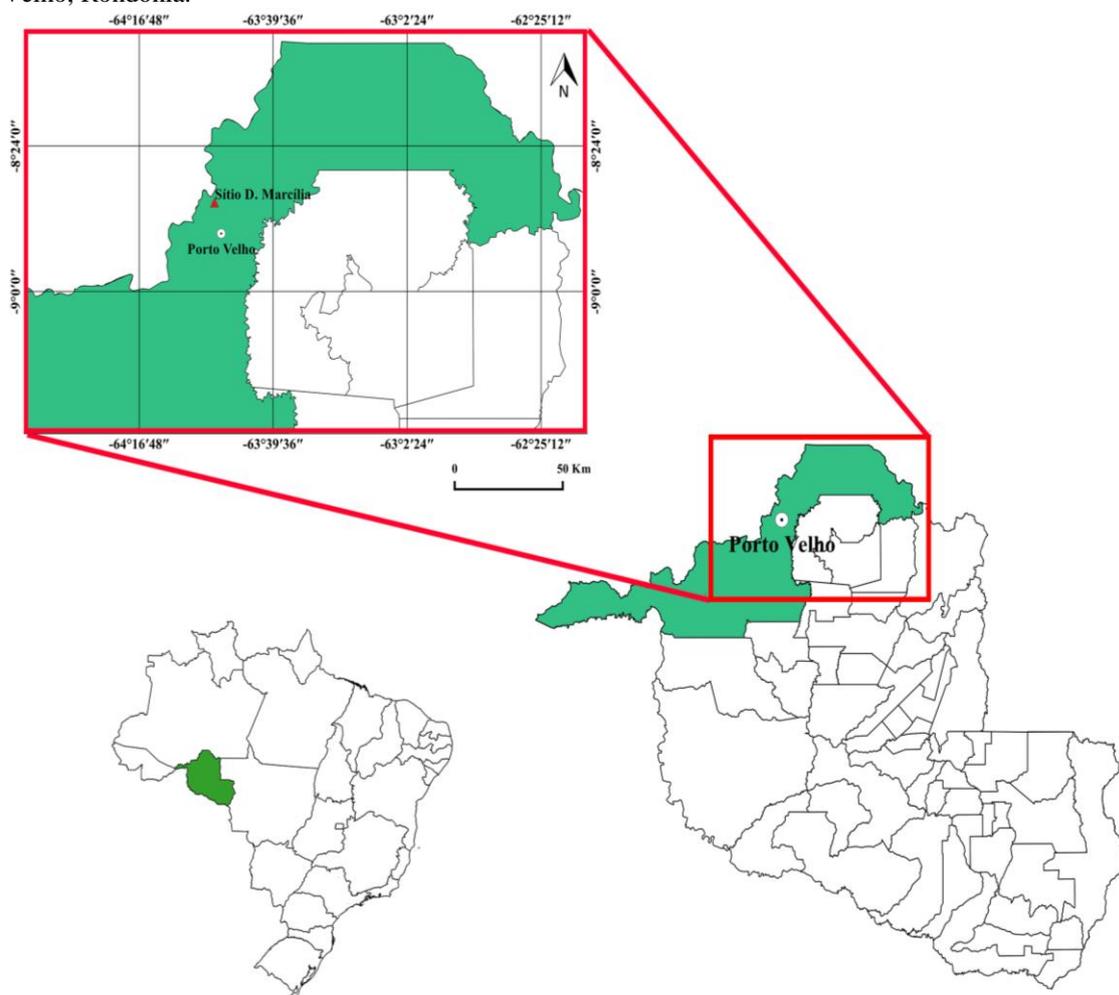
- Avaliar o ingurgitamento, sobrevivência, oviposição, produção de ovos e larvas de *Anopheles darlingi* nas seguintes condições:
  - Três diferentes composições de alimento alternativo, fornecidos através de membrana de teflon;
  - Quatro diferentes composições de alimento alternativo, fornecidos através de gotículas.
- Criar e comparar índice de qualidade para os alimentos alternativos e suas respectivas formas de administração nos parâmetros acima descritos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de mosquitos

Os mosquitos foram coletados em uma localidade rural (Sítio Dona Marcília) localizada a 27 km do centro da cidade de Porto Velho ( $08^{\circ}38'00.3''\text{S}/ 63^{\circ}55'51.9''\text{W}$ ) (Figura 8). Porto velho é a capital do Estado de Rondônia, tem um clima tipicamente quente e tropical úmido durante todo o ano. A temperatura do ar tem pouca variação e o regime pluviométrico é caracterizado por um período chuvoso (novembro a abril) com precipitações de 220 mm e um período seco (maio a setembro) com precipitações inferiores a 55 mm.

**Figura 8**-Local de coleta de *Anopheles darlingi* realizadas no ano de 2015 e 2016 no município de Porto Velho, Rondônia.



Produzido por: Antônio Marques, 2015.

As coletas de fêmeas de *An darlingi* foram realizadas das 18:00 às 20:00hs, por meio de atração humana protegida (CEP: 53016315.9.0000.5300). Essa técnica consiste na exposição das pernas, protegidas com meia preta, para atrair os mosquitos os quais são capturados com o auxílio do aspirador manual antes que a picada e a subseqüente sucção sejam realizadas. Apenas os pesquisadores envolvidos no trabalho participaram da coleta. Posteriormente, os mosquitos capturados eram colocados em gaiolas de PVC medindo 4,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura. Os mosquitos eram então triados e, aqueles que apresentassem o abdome visivelmente vazios (Figura 9), eram transferidos para copos descartáveis de 300 mL transparentes e telados de maneira que em cada copo tivesse um número máximo de 10 mosquitos (Figura 10).

**Figura 9-** Mosquito da espécie *An. darlingi* coletado em campo. Espécime com o abdome visivelmente vazio.



Foto: Glaucilene Silva Costa, 2016.

**Figura 10-** Copo telado utilizado para triar os mosquitos que não estavam ingurgitados e administrar os alimentos controles e alternativos.



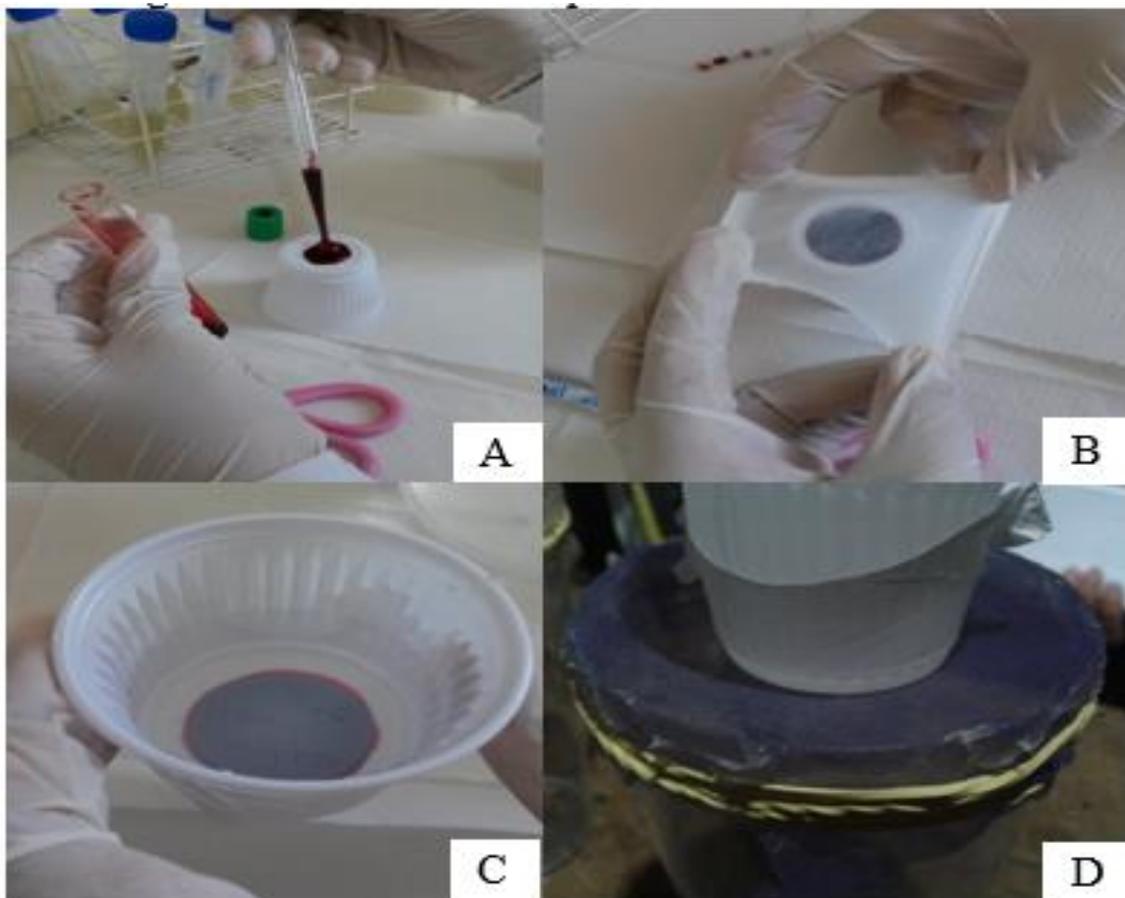
Foto: Glaucilene Silva Costa, 2016.

## 3.2 Alimentos alternativos

### 3.2.1 Administrados em membrana

O método de membrana simula um hospedeiro, e consiste em colocar o alimento no fundo de um copo descartável de 50 mL, que logo após é envolto por uma fita de politetrafluoretileno (Veda-rosca), posteriormente o copo foi virado e colocado em cima das gaiolas e água a 37°C foi adicionada em seu interior (adaptado de RUTLEDGE et al. 1964) (Figura 11). Na administração com membrana foram disponibilizadas quatro composições de alimento, com exceção do sangue (controle), os alimentos alternativos utilizados nesse experimento eram compostos de albumina sérica bovina (*BSA*) com 200 mg/mL (SF-AL200) e 400 mg/mL (SF-AL400) diluída em uma solução fisiológica preparada com cloreto de sódio e bicarbonato de sódio, nas concentrações de 0,15 e 0,1 M, respectivamente e *BSA* diluído em solução fisiológica a 400mg/mL misturado ao sangue total a 20% v.v. (S-A). Os alimentos foram administrados em campo para os mosquitos, logo após a coleta e triagem dos mesmos.

**Figura 11-**Alimentação administrada por membrana. A- Sangue sendo colocado no fundo do copo



descartável de 50 mL invertido, B- Aplicação da fita Veda-Rosca no fundo do copo, - Acréscimo de água ~37°C dentro do copo e D- Membrana com alimento sendo colocado sobre as gaiolas teladas.

Foto: Glaucilene Silva Costa, 2016.

### 3.2.2 Administrados em gotículas

As gotículas eram disponibilizadas em cima das telas das gaiolas que continham os mosquitos (Figura 12). Na administração por gotículas foram disponibilizadas cinco composições de alimentos. Os alimentos utilizados nesse experimento eram compostos de sacarose 10% (controle negativo), sacarose 10% mais, albumina sérica bovina (*BSA*) sendo que 200 mg/mL (S1) e 400 mg/mL (S2) e soluções compostas de *BSA* com 200 mg/mL (S3) e 400 mg/mL (S4) diluídas em solução fisiológica e sacarose 10% (Figura 13). Todos os alimentos foram administrados em campo, logo após a coleta e triagem dos mosquitos.

**Figura 12-** Alimentação administrada por gotículas. Aplicação com micropipeta e aparência das gotículas sobre as gaiolas teladas.

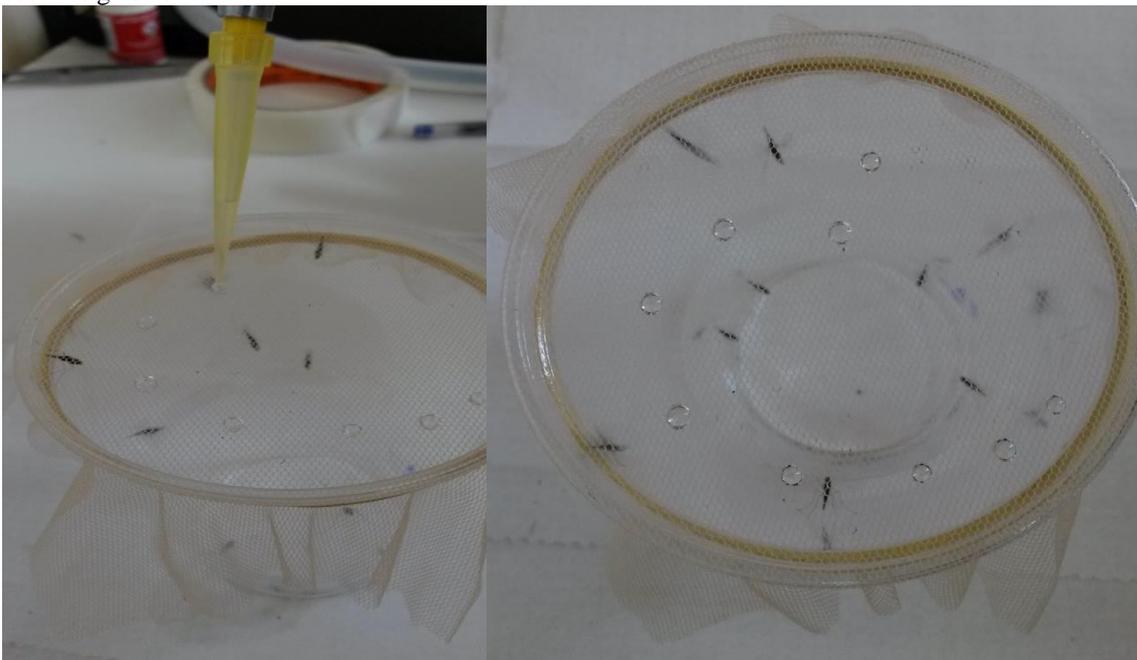
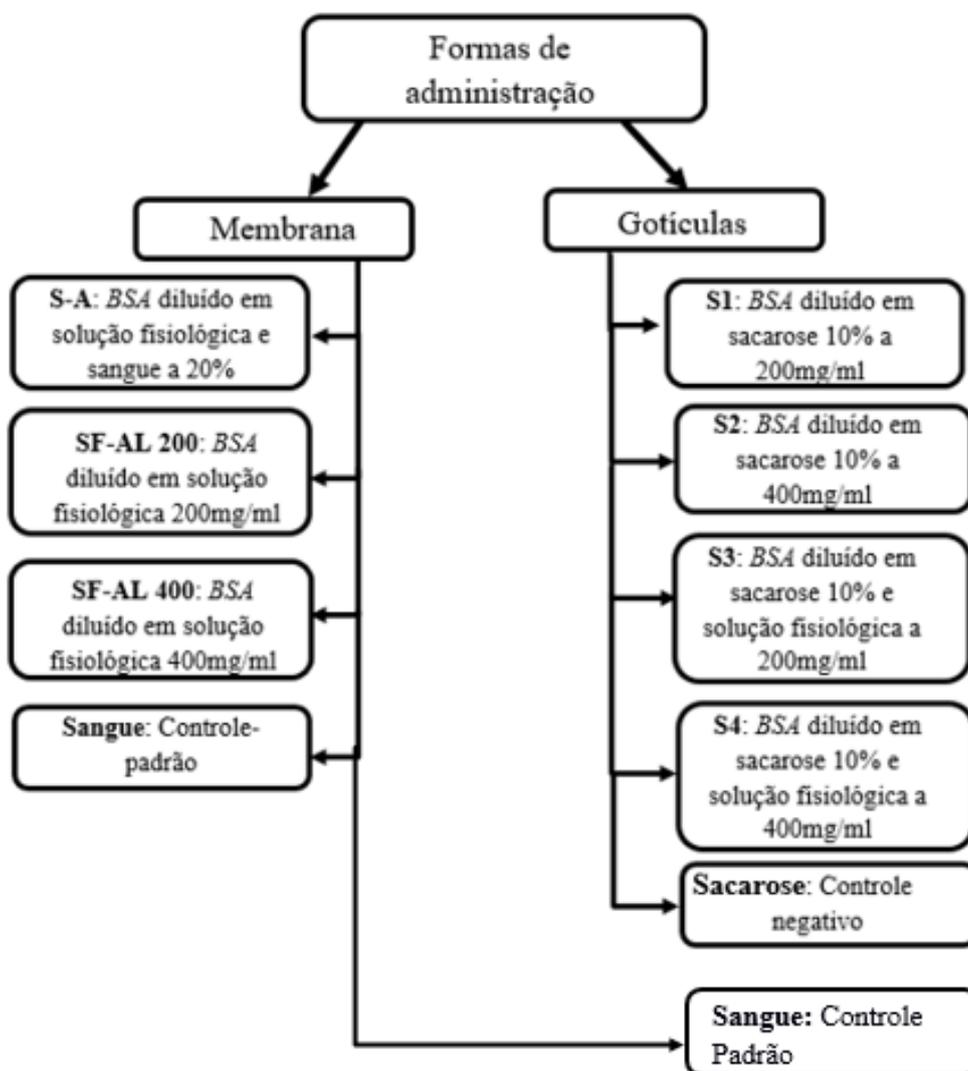


Foto: Glaucilene Silva Costa, 2016.

Os alimentos ficavam disponíveis para os mosquitos por um período de 20 minutos. Posteriormente a alimentação, os mosquitos eram transportados para o laboratório de Bioecologia de Insetos onde os parâmetros biológicos foram analisados.

Foram utilizados um total de 210 copos, sendo 21 para cada tratamento. Cada copo continha 10 mosquitos inicialmente, totalizando 210 mosquitos para cada tratamento. Nesse trabalho houve 7 diferentes alimentos alternativos e dois controles (sangue e sacarose) e duas formas de administração (Figura 13).

**Figura 13-** Diagrama das formas de administração e alimentos alternativos oferecidos para *Anopheles darlingi*.



### 3.3 Parâmetros biológicos avaliados

No presente trabalho foram considerados as seguintes variáveis como parâmetros biológicos: (i) ingurgitamento, (ii) sobrevivência até a oviposição, (iii) número de mosquitos que ovipuseram (iv) número de ovos produzidos, (v) número de larvas produzidos.

O ingurgitamento foi registrado observando o abdome dos mosquitos em campo após o contato com os alimentos oferecidos por 20 minutos. Dessa forma, foram considerados mosquitos ingurgitados aqueles que apresentassem o abdome completo ou

parcialmente cheio (Figura 14). Os mosquitos que não apresentassem nenhum grau de ingurgitamento foram contabilizados e retirados das fases seguintes do trabalho.

**Figura 14-** Mosquitos da espécie *An. darlingi*, após o fornecimento dos alimentos. Mosquito: 1- ingurgitado com alimentos alternativo; 2- ingurgitado com sangue e 3- não ingurgitado.

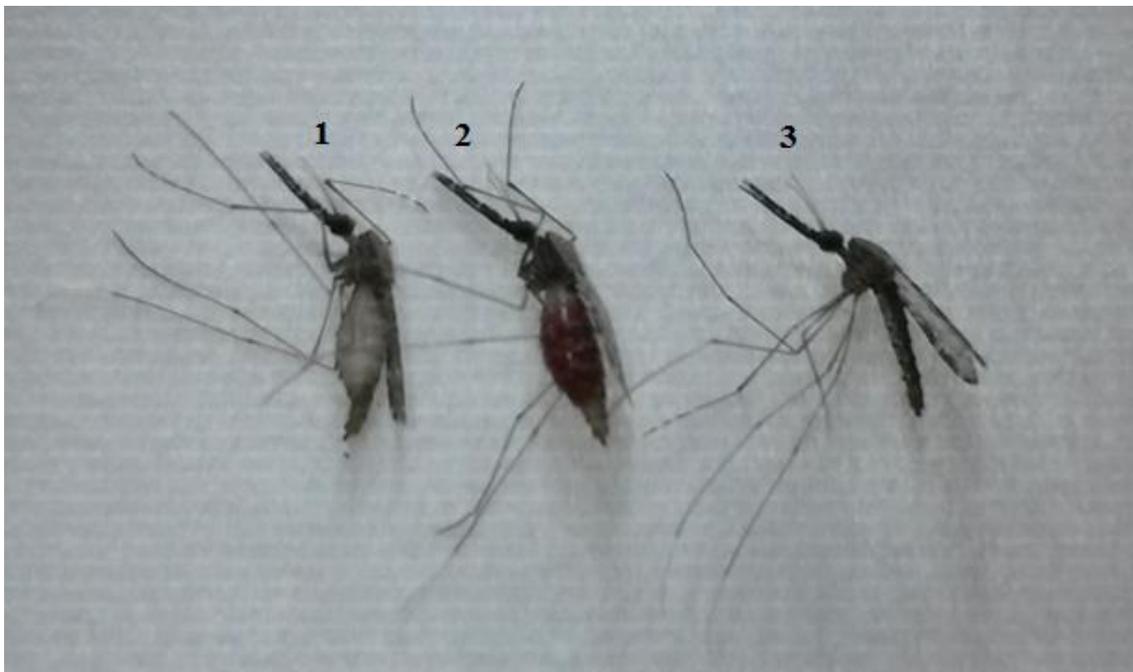


Foto: Glaucilene Costa, 2016

Para sobrevivência nos diferentes tratamentos foi registrado o número de fêmeas que estavam vivas no terceiro dia após o início do experimento, esse tempo é necessário para digestão do sangue. Em seguida, as fêmeas foram anestesiadas com acetato de etila em um tubo mortífero e submetidas a oviposição induzida, que consiste na remoção de uma das asas das fêmeas com auxílio de pinças entomológicas e lupa (estereomicroscópio). As fêmeas foram identificadas em nível de espécie com a ajuda da chave de identificação de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Após a remoção das asas, as fêmeas foram colocadas individualmente em copos plásticos (100 mL) forrados com papel filtro úmido e telados oferecendo condições apropriadas para oviposição, i.e., dentro de uma caixa de isopor em fileiras e intercalados com papel toalha úmido, seguindo o protocolo de criação do Laboratório de Bioecologia de Insetos- LaBEIn.

Após 48 horas da oviposição, contou-se o número de mosquitos que ovipuseram em cada alimento, para a quantificação da proporção de oviposição.

O número médio de ovos foi estimado pelo número de ovos colocados por cada fêmea (fecundidade), que foi contabilizado utilizando uma Lupa estereomicroscópica da marca LEICA EZ4.

Os copos contendo os ovos após a contagem foram revestidos com papel filtro nas bordas. O papel filtro do fundo dos copos foi retirado e picetado com água, para que os ovos desgrudassem, seguindo o protocolo utilizado na criação de *An. darlingi* no LaBein.

Durante 72 horas, esses ovos eram picetados e as larvas que eclodiram eram alimentadas com ração de peixe (Tetramin Tropical Flakes) triturada sendo que no terceiro dia as larvas foram contabilizadas e o número de larvas eclodidas de cada tratamento (fertilidade) foi anotado.

### 3.4 Índice de qualidade

O índice de qualidade para cada tipo de alimento alternativo foi calculado centralizando os parâmetros observados, isto é, cada observação subtraída da média e dividida pelo seu desvio padrão. Posteriormente os valores obtidos foram somados e ao número de larvas foi dado peso 2.

$$IQ = \text{Número}_{(\text{ingurgitamento})} + \text{Número}_{(\text{sobrevivência})} + \text{Número}_{(\text{oviposição})} + \text{Número}_{(\text{ovos})} + (\text{Número}_{(\text{larvas})} * 2)$$

### 3.5 Análise de dados

Para verificar o efeito dos diferentes tratamentos na: (i) Proporção de mosquitos ingurgitados, (ii) Proporção de mosquitos que sobreviveram até a oviposição (iii) Proporção de mosquitos que ovipuseram, (iv) média de ovos produzidos, na (v) média de larvas e (vi) no índice de qualidade foram utilizados modelos lineares generalizados de Efeito Mixto (Lmer). Nesse caso o tratamento foi considerado com variável explicativa (x) e uma das variáveis acima foram consideradas como variável resposta (y). Além disso, foi inserido no modelo dois termos de efeito aleatório: o dia em que o experimento foi realizado e a gaiola onde os mosquitos se encontravam. A distribuição de probabilidade utilizada foi ajustada de acordo com o tipo da variável resposta (y), nesse caso foi utilizada a distribuição binomial quando se tratavam de dados de proporção ou Poisson quando se tratava de dados de contagem. Posteriormente os modelos foram checados

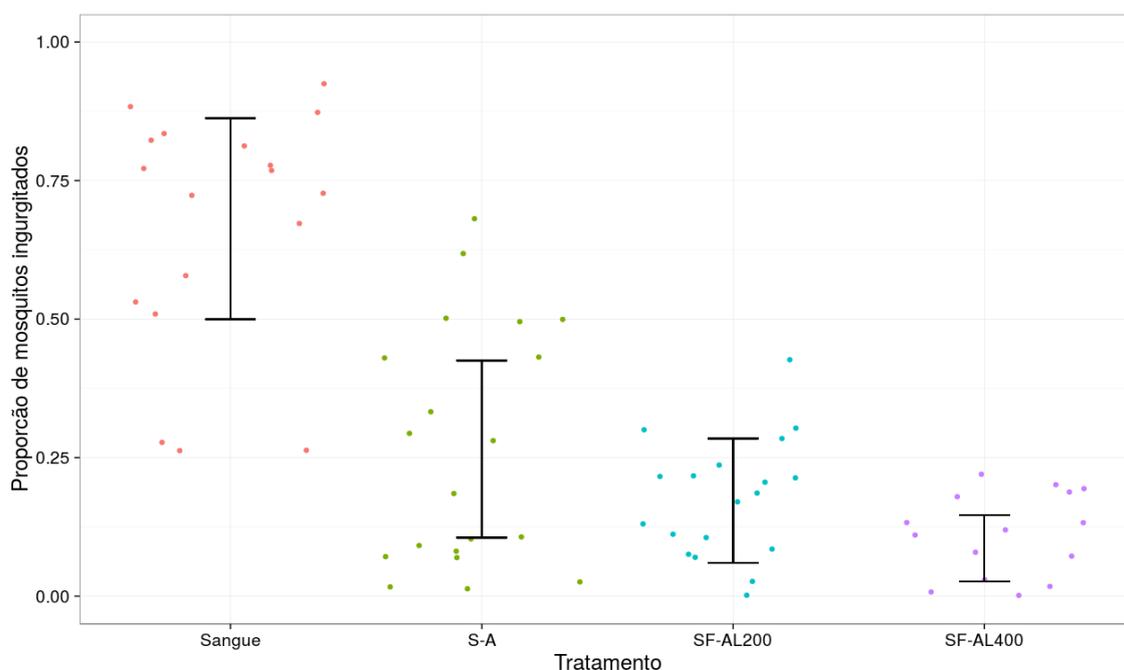
através de análise de resíduos e a dispersão do modelo foi checada utilizando a função `dispersion_glmmer`. Intervalos de confiança de Walds foram construídos para os parâmetros estimados no modelo. Todas as análises foram realizadas no software estatístico livre R 3.2.5 (R Development Core Team 2015) utilizando os pacotes `ggplot2`, `lme4` e `blme4`.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Alimentos alternativos oferecidos em membrana

Nos experimentos realizados para verificar o efeito de diferentes alimentos alternativos oferecidos via alimentação artificial com membrana, foi observado um maior número de mosquitos ingurgitados no grupo controle, 72,2% (49,7% – 86,3%), enquanto que nos demais grupos a porcentagem de mosquitos que ingurgitaram foi significativamente ( $p < 0,05$ ) menor, i.e., 25,1% (10,1% – 42,5%) no tratamento S-A, no tratamento SF-AL 200 15,6% (6,0% – 28,45%) e 7,5% (2,7% – 14,65%) em SF-AL 400 (Figura 15).

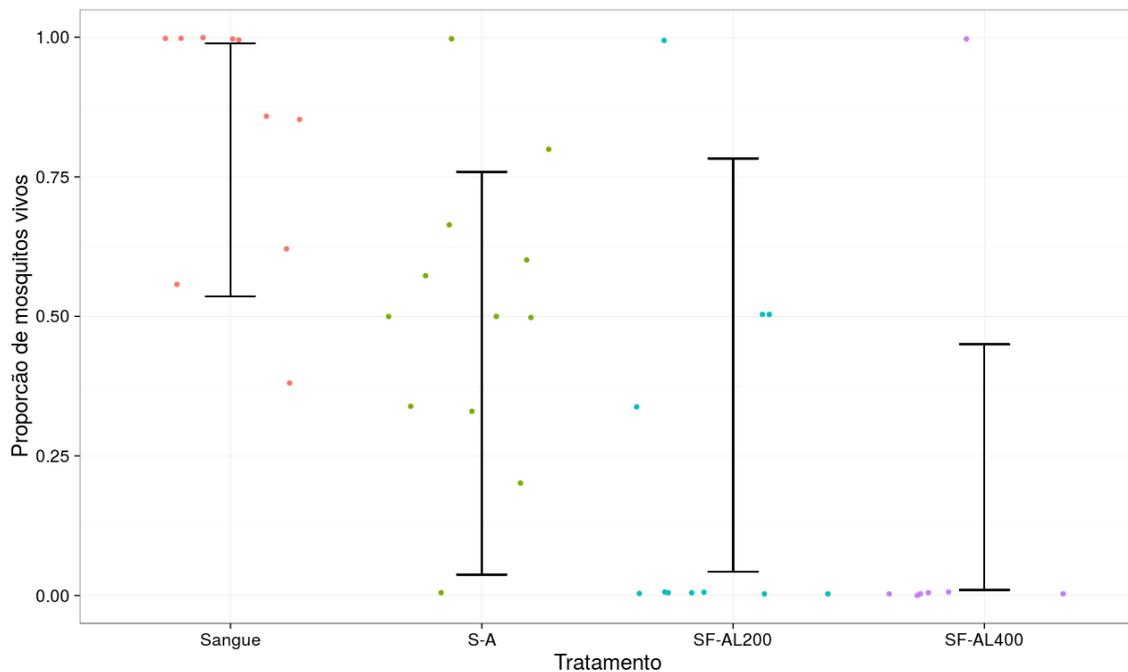
**Figura 15-** Proporção (+/- erro padrão) de *Anopheles darlingi* ingurgitados nos diferentes alimentos administrados em membrana.



Legenda: Sangue: controle; S-A: Sangue 20% + Soro albumina bovino (BSA) diluída em solução fisiológica 400/mg/mL; SF-AL200: Solução fisiológica + 200 mg/mL de BSA; SF-AL400: Solução fisiológica + 400 mg/mL de BSA.

Em relação a sobrevivência das fêmeas até a oviposição observou-se que aquelas alimentados com S-A e SF-AL 200 não apresentaram uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle, tendo uma proporção de ingurgitamento de 36,35% (3,7% – 76%) e 39,2% (4,2% - 78,2%), respectivamente. Já nos mosquitos alimentados com SF-AL 400 apenas 14,1% (1% - 45%) sobreviveram até a oviposição, sendo observada uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle que teve uma porcentagem de sobrevivência de 91,1% (53,6 – 99%) (Figura 16).

**Figura 16-** Proporção (+/- erro padrão) de *Anopheles darlingi* vivos até a oviposição nos diferentes alimentos administrados em membrana.



Legenda: Sangue: controle; S-A: Sangue 20% + Soro albumina bovino (BSA) diluída em solução fisiológica 400/mg/mL; SF-AL200: Solução fisiológica + 200 mg/mL de BSA; SF-AL400: Solução fisiológica + 400 mg/mL de BSA.

Devido ao baixo número de mosquitos ingurgitados e que sobreviveram nos alimentos alternativos administrados em membrana, os demais parâmetros avaliados (oviposição, produção de ovos e larvas) foram submetidos apenas a análise descritiva.

Dos mosquitos que ingurgitaram e sobreviveram até a oviposição no controle e nos diferentes alimentos alternativos foi observado que maior porcentagem de oviposição

de fêmeas que se alimentaram de sangue, seguido por SF-AL 200, SF-AL400 e a menor porcentagem foi encontrada nas fêmeas que se alimentaram de S-A (Tabela 1). O número médio de ovos foi de 131,8 no controle. Nos tratamentos o número médio de ovos foi 105,0 em S-A, 47,1 em SF-AL200 e 76,0 em SF-ALB400 (Tabela 1) e o número médio de larvas produzidos foi de 90,1, 84,4, 33,8 e 34,2 respectivamente (Tabela 1). O número médio de larvas produzidos em sangue foi de 111,20 (Tabela 1).

**Tabela 1:** Parâmetros reprodutivos observados para *Anopheles darlingi* após alimentação administrada por membrana.

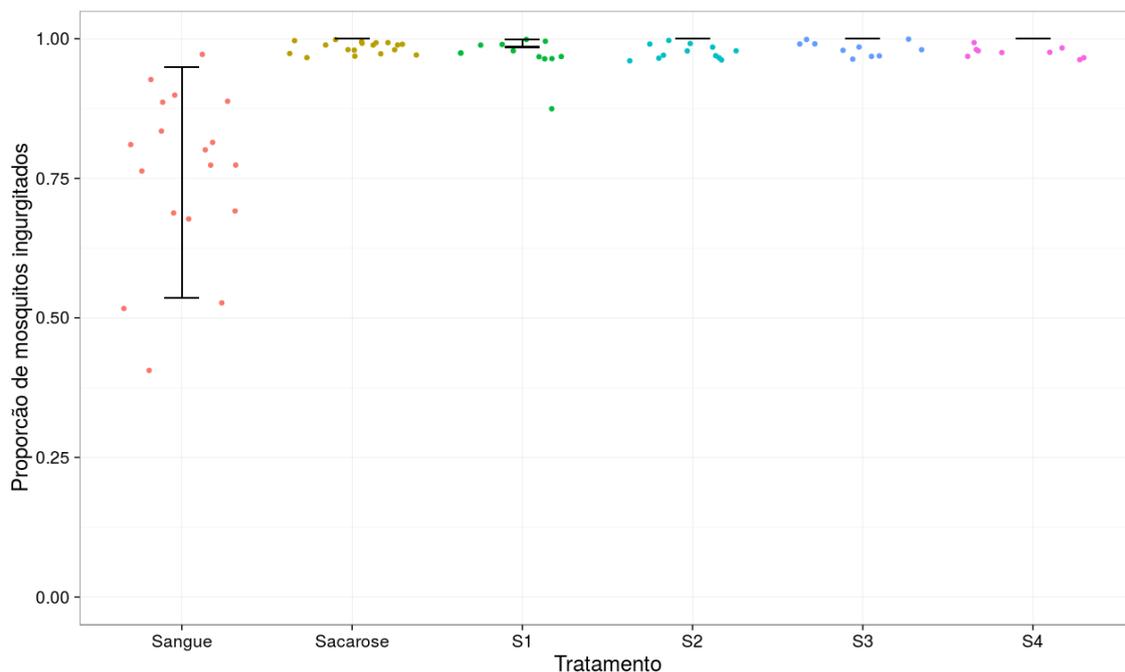
Parâmetro	Tratamento			
	Sangue	S-A	SF-AL200	SF-AL400
Oviposição (%)	78,0	42,0	54,1	50,0
Ovos ( $\bar{X}$ )	131,8	105,0	47,1	76,0
Larvas ( $\bar{X}$ )	111,20	96,30	11,33	26,00

Legenda: Sangue: controle; S-A: Sangue 20% + Soro albumina bovino (BSA) diluída em solução fisiológica 400/mg/mL; SF-AL200: Solução fisiológica + 200 mg/mL de BSA; SF-AL400: Solução fisiológica + 400 mg/mL de BSA.

#### 4.2 Alimentos alternativos oferecidos em gotículas

Nos experimentos realizados para verificar o efeito dos diferentes alimentos alternativos oferecidos por gotículas, foi observado um menor número de mosquitos ingurgitados no sangue, 79,7% (53,6% – 94,9%), esse administrado em membrana, quando comparado com a sacarose que obteve um total 100% de fêmeas ingurgitadas. Nos demais grupos a porcentagem de mosquitos que ingurgitaram foi de 99,5% (98,5 – 99,9) em S1, 100% em S2, 100% em S3 e 100% em S4, sendo essa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparado com o sangue (Figura 17).

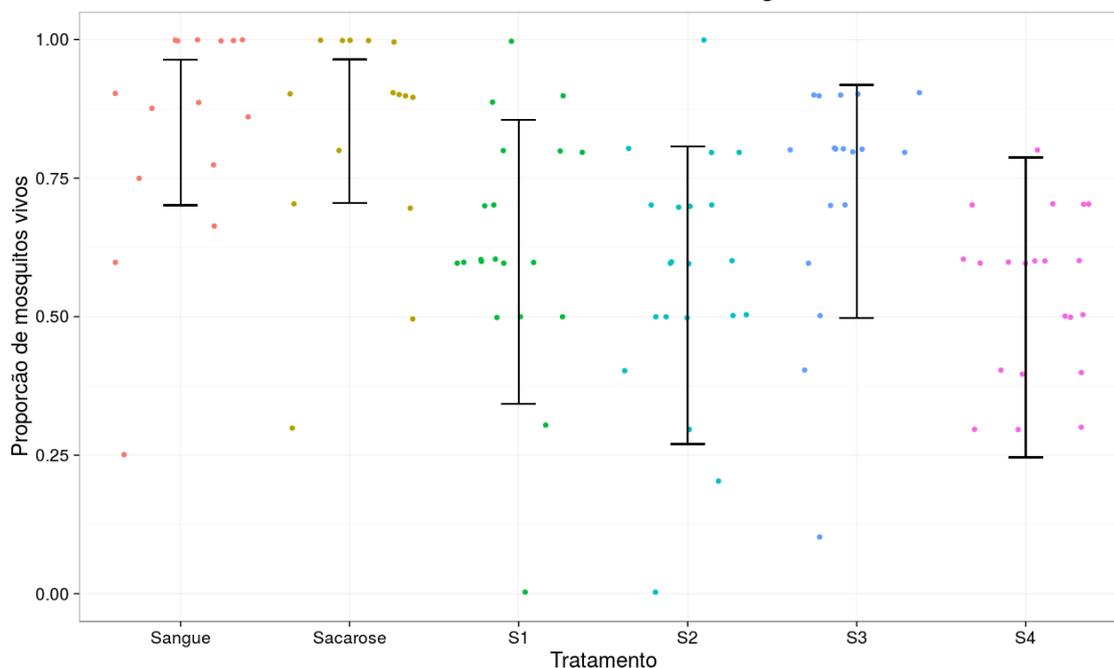
**Figura 17-** Proporção (+/- erro padrão) da resposta de ingurgitamento de fêmeas de *Anopheles darlingi* nos diferentes alimentos administrados em gotículas e nos controles.



Legenda: Sangue: controle; Sacarose 10%: controle negativo; S1: Sacarose 10% + Soro albumina bovino (BSA) com 200mg/mL; S2: Sacarose 10% + BSA 400mg/mL; S3: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 200mg/mL; S4: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 400mg/mL.

Em relação a sobrevivência das fêmeas até a oviposição, foi observado que aquelas alimentadas com sangue e as fêmeas alimentadas com sacarose apresentaram uma proporção de sobrevivência de 87,9% (70,1% – 96,3%) e 88,1% (70,4% - 96,4%), respectivamente. Entretanto não foi encontrado uma diferença significativa ( $p>0,05$ ) em relação aos demais alimentos (Figura 18).

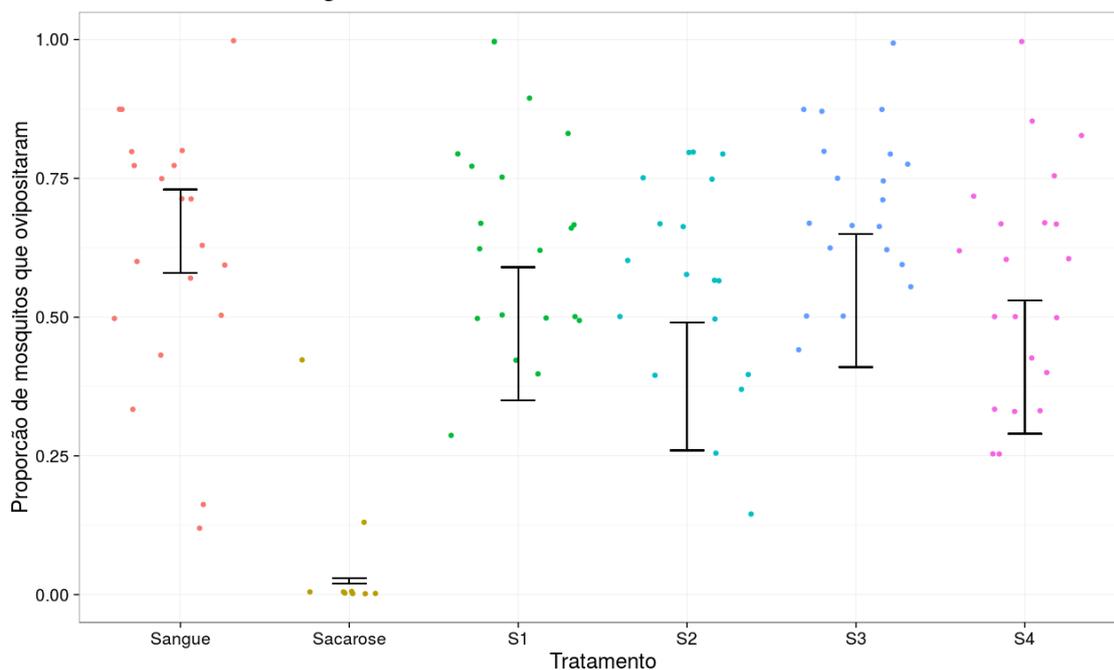
**Figura 18-** Proporção (+/- erro padrão) de fêmeas de *Anopheles darlingi* vivas até a oviposição alimentados com os diferentes alimentos alternativos ministrados em gotículas e nos controles.



Legenda: Sangue: controle; Sacarose 10%: controle negativo; S1: Sacarose 10% + Soro albumina bovino (BSA) com 200mg/mL; S2: Sacarose 10% + BSA 400mg/mL; S3: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 200mg/mL; S4: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 400mg/mL.

Foi observado uma maior proporção de mosquitos que ovipuseram no tratamento controle em relação aos demais alimentos. O tratamento S3 obteve uma proporção de oviposição de 53,58% (41,65% – 65,13%), seguido por S1 com 47,79% (35,86% – 59,98%), sendo essa uma diferença não significativa em relação ao controle. No tratamento S4 foi verificado uma proporção 40,98% (29,47% – 53,53%) de mosquitos que ovipuseram e 37,38% (26,58% – 49,49%) no tratamento S3, sendo essa uma diferença não significativa ( $p > 0,05$ ) em relação aos demais alimentos alternativos (Figura 19). A proporção de oviposição dos mosquitos que se alimentaram apenas de sacarose foi de 1,1% (0,32% - 2,75%), mostrando a baixa quantidade de mosquitos de campo que possam ter feito um repasto sanguíneo antes da captura dos mesmos.

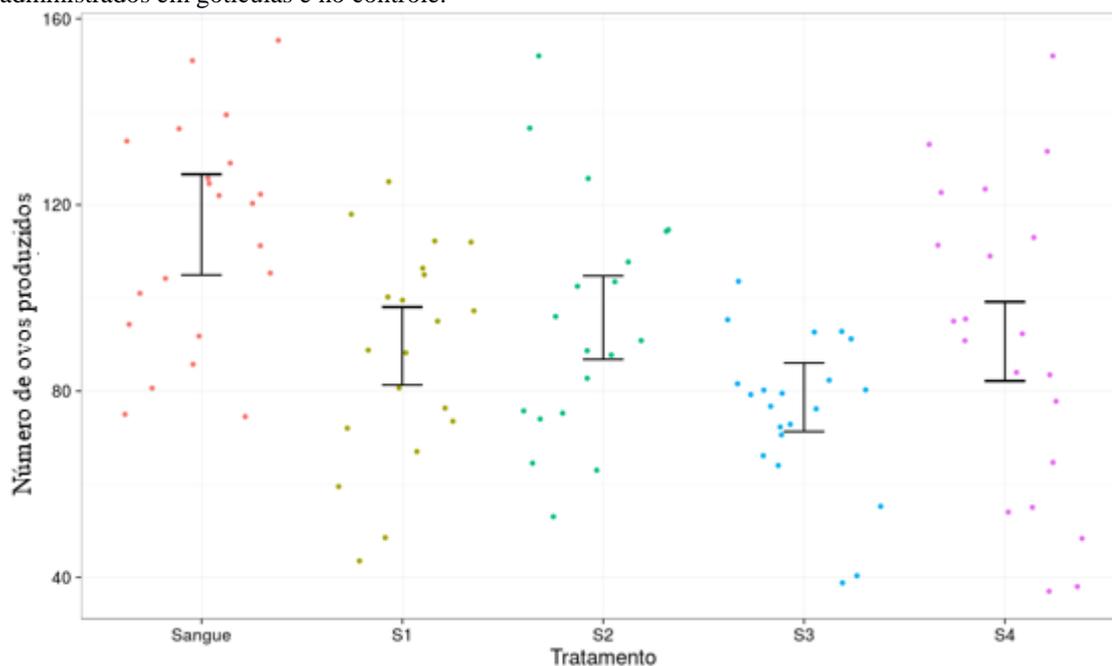
**Figura 19-** Proporção (+/- erro padrão) de mosquitos *Anopheles darlingi* que ovipuseram nos diferentes alimentos administrados em gotículas e no controle.



Legenda: Sangue: controle; Sacarose 10%: controle negativo; S1: Sacarose 10% + Soro albumina bovino (BSA) com 200mg/mL; S2: Sacarose 10% + BSA 400mg/mL; S3: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 200mg/mL; S4: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 400mg/mL.

Em relação ao número médio de ovos postos por fêmeas foi observado uma maior produção média no controle, 113,5 (104,8 - 126,6), porém não houve uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a média de ovos postos no controle e no tratamento S2, que obteve uma média de 95,2(86,8 – 104,8) ovos postos. Já nos demais alimentos alternativos a média de ovos postos foi de 88,4 (81,2 - 98) em S1, 75,8 (71,2 – 86,0) em S3 e 91(82,1 – 99,2) em S4, apresentando uma diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ) (Figura 20).

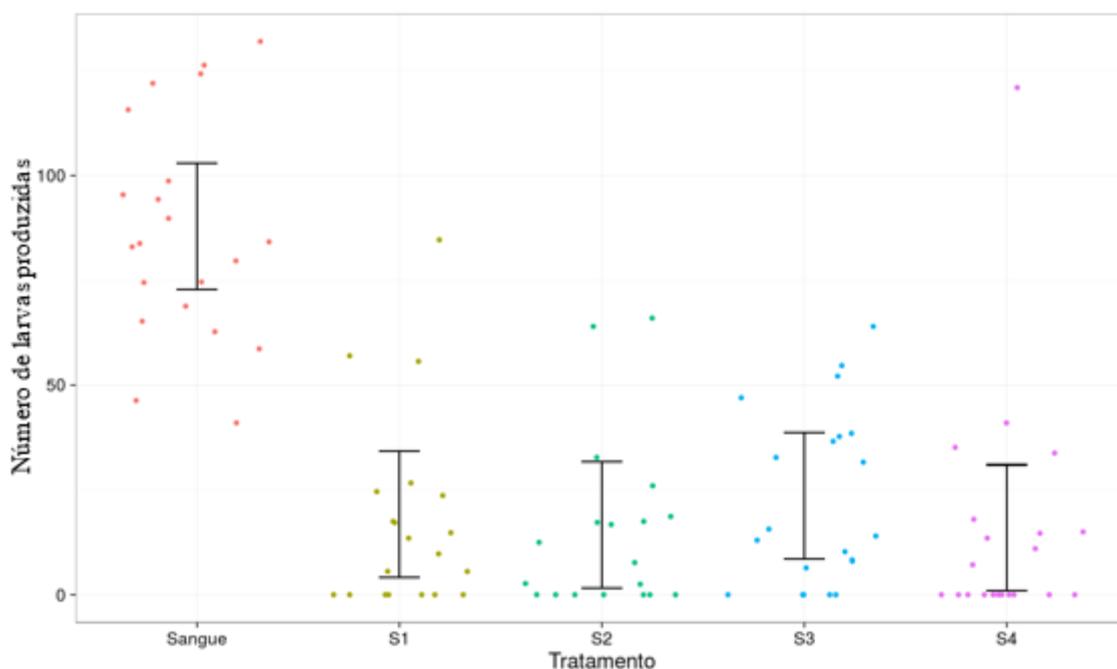
**Figura 20-** Média (+/- erro padrão) de ovos por fêmeas de *Anopheles darlingi* nos diferentes alimentos administrados em gotículas e no controle.



Legenda: Sangue: controle; S1: Sacarose 10% + Soro albumina bovino (BSA) com 200mg/mL; S2: Sacarose 10% + BSA 400mg/mL; S3: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 200mg/mL; S4: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 400mg/mL.

As fêmeas alimentadas com sangue produziram um número médio de larvas maior em relação aos alimentos alternativos, ( $P < 0,05$ ), observou-se uma produção média de 86,72 (72,86-102,95) de larvas nesse alimento. O tratamento alternativo que obteve um número médio de larvas maior foi S3, que produziu 22,4 (8,55 – 38,64) de larvas, tendo uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado com sangue. No demais tratamentos a produção larval foi de 17,9 (4,2 – 34,3) para S1, 15 (1,7 – 31,7) para S2 e 14,8% (0,91 – 8,4) para S4, sendo essa uma diferença significativa em comparação com o controle (Figura 21)

**Figura 21-** Média (+/- erro padrão) da produção de larvas de fêmeas de *Anopheles darlingi* nos diferentes alimentos administrados em gotículas e no controle.



Legenda: Sangue: controle; S1: Sacarose 10% + Soro albumina bovino (BSA) com 200mg/mL; S2: Sacarose 10% + BSA 400mg/mL; S3: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 200mg/mL; S4: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 400mg/mL.

### 4.3 Índice de Qualidade (IQ) nos diferentes alimentos e formas de administração

Diversos parâmetros biológicos de *Anopheles darlingi* obtidos com diferentes dietas alternativas e modos de administração, i.e., membrana (Tabela 2) e gotícula (Tabela 3) foram sumarizados e utilizados para cálculo do IQ.

**Tabela 2-** Parâmetros biológicos de *Anopheles darlingi* após alimentação com diferentes dietas alternativas administradas em membrana. N= 210 mosquitos

Tratamento	Ingurgitamento (%)	Sobrevivência (%)	Ovipuseram (%)	Qtd_Ovos ( $\bar{X}$ )	Qtd_Larvas ( $\bar{X}$ )
S-A	53 (25,2)	23 (43,3)	11 (47,8)	1245 (113,1)	1175 (106,8)
SF-AL200	33 (15,71)	14 (42,4)	7 (50)	330 (47,14)	86 (12,28)
SF-AL400	16 (7,61)	3 (18,7)	1 (33,3)	76 (76)	26 (26)
Sangue	149 (70,9)	137 (91,9)	93 (67,8)	12441 (133,77)	10464 (112,51)

Legenda: Sangue: controle; S-A: Sangue 20% + Soro albumina bovino (BSA) diluída em solução fisiológica 400/mg/mL; SF-AL200: Solução fisiológica + 200 mg/mL de BSA; SF-AL400: Solução fisiológica + 400 mg/mL de BSA

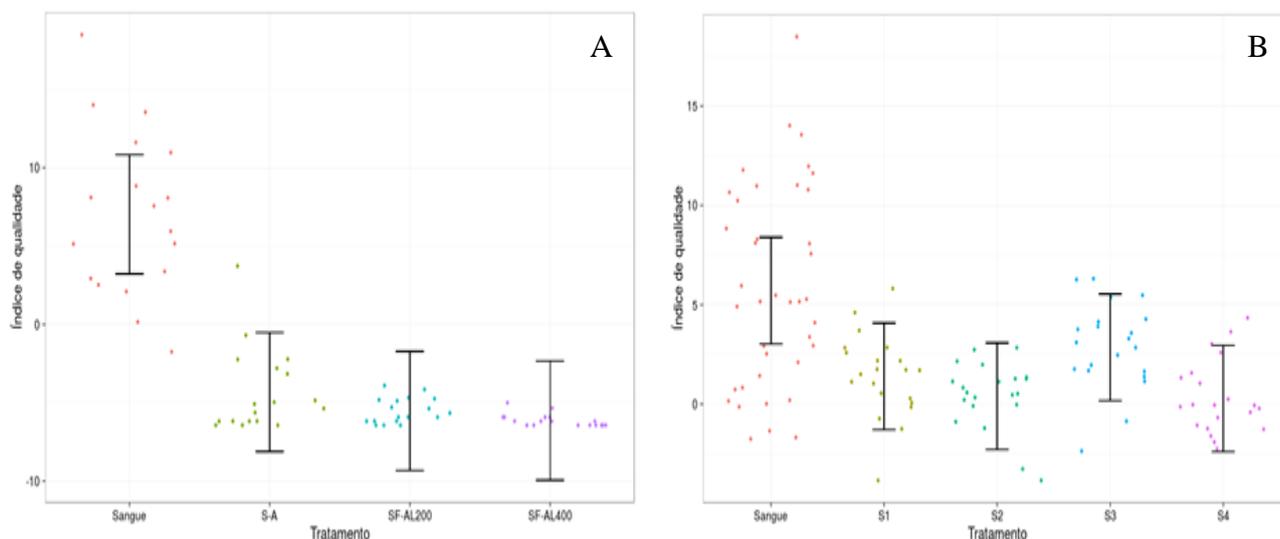
**Tabela 3-Parâmetros biológicos de *Anopheles darlingi* após alimentação com diferentes dietas alternativas em gotículas. N= 210 mosquitos**

Tratamento	Ingurgitamento (%)	Sobrevivência (%)	Ovipuseram (%)	Qtd_Ovos ( $\bar{X}$ )	Qtd_Larvas ( $\bar{X}$ )
S1	209 (99,5)	135 (64,6)	87 (64,4)	7689 (88,3)	1265 (14,4)
S2	210 (100)	120 (57,1)	65 (54,1)	6123 (94,2)	952 (14,6)
S3	210 (100)	161 (76,6)	112 (69,5)	8687 (77,5)	2331 (20,81)
S4	210 (100)	114 (54,28)	66 (57,8)	5947 (90,1)	877 (13,28)
Sacarose	210 (100)	185 (88,1)	4 (2,1)		
Sangue (Membrana)	167 (79,5)	146 (87,5)	97 (66,43)	11009 (113,4)	8435 (86,9)

Legenda: Sangue: controle; Sacarose 10%: controle negativo; S1: Sacarose 10% + Soro albumina bovino (BSA) com 200mg/mL; S2: Sacarose 10% + BSA 400mg/mL; S3: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 200mg/mL; S4: Sacarose 10% + solução fisiológica + BSA 400mg/mL.

Nos alimentos alternativos administrados por via de membrana observou-se um alto índice de qualidade (IQ) no sangue quando comparado com os alimentos alternativos, tendo o controle um IQ de 7 (3,2 – 10,8). Os IQs dos alimentos alternativos foram de -4,3 (-8,1 - -0,5) para S-A, -5,5(-9,3 - -1,7) para SF-AL200 e -6,1 (-9,9 - -2,3) para SF-AL400, sendo essa uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 22A). Já nos alimentos alternativos administrados em gotículas observou-se que não houve diferença significativa entre os alimentos alternativos e o sangue sendo os valores obtidos de 4,8 (2,5 – 7,1) para o sangue, 1,4 (-0,8 – 3,7) para S1, 0,45 (-1,9 – 2,7) para S2, 2,91 (0,18 – 5,5) para S3 e 0,3 (-2,0 - 2,5) para S4, sendo essa uma diferença não significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 22B).

**Figura 22-** Índice de Qualidade (IQ) dos diferentes métodos e alimentos oferecidos para mosquitos da espécie *Anopheles darlingi*. (A) Alimentos ofertados com membrana; (B) Alimentos ofertados em gotículas.



## 5. DISCUSSÃO

Mesmo que a oferta de repasto sanguíneo em animais vivos como ratos ou coelhos, seja utilizada rotineiramente em criação e manutenção de mosquitos, as suas implicações com questões éticas e alto custo para o mantimento de biotérios acaba sendo oneroso para instituições de pesquisas. A técnica de alimentação por membrana artificial com sangue tem sido utilizada, por, pelo menos, 40 anos, para manutenção e infecção de mosquitos de diversas espécies em laboratório (AWONO-AMBENE et al., 2001; GRAVES, 1980; MAGNARELLI et al., 1987; LUO, 2014). Ao longo dos anos alguns trabalhos também tentaram substituir o sangue na biologia reprodutiva de mosquitos visando diminuir riscos atrelados a manipulação sanguínea (KOOGAN, 1990; STOBART, 1992; GRIFFITH e TURNER, 1996; PITTS, 2014; GONZALES et al., 2015; TALYULI et al. 2015).

No presente trabalho foi verificado a resposta de indivíduos de *An. darlingi* a diferentes dietas administradas artificialmente através de membrana. Foi observado que em membrana um maior número de mosquitos se ingurgitaram com sangue quando comparado com o número de mosquitos ingurgitados com os alimentos alternativos oferecidos. Uma possível explicação para esse fenômeno é que os mosquitos têm um aparato responsável por monitorar a qualidade do alimento como, as sensilas e quimiorreceptores do cibário, quimiosensilas nos tarsos, labela e labro, que ajudam a identificar as substâncias alimentares determinando a aceitabilidade e o destino do alimento (DAY, 1954; OWEN, 1963; SALAMA 1966; LEE, 1974; CLEMENTS, 1999).

Propriedades químicas e osmóticas podem determinar a ativação do ingurgitamento nos insetos (FRIEND e SMITH, 1977). Apesar de sais (cloreto de sódio e bicarbonato de sódio) serem oferecidas em quantidades parecidas aquelas encontradas no sangue, a quantidade de proteína nos alimentos alternativos foi três vezes (200 mg/ml) e sete vezes (400 mg/mL) maior do que as encontradas no sangue (PETERS, 1996). Foi observado que com o aumento da concentração de BSA houve um menor número de mosquitos ingurgitados, a pressão osmótica isotônica ao sangue é essencial para obter um melhor ingurgitamento (HOSOI, 1959; GALUN et al, 1985).

As membranas de peles de animais parecem ser mais adequadas para a alimentação dos mosquitos mostrando sempre uma maior porcentagem de mosquitos ingurgitados quando comparados com as membranas sintéticas. Para *Aedes aegypti* as peles de rato e codorna mostraram uma maior porcentagem de mosquitos ingurgitando

com sangue, 83% e 76%, respectivamente (NOVAK et al., 1991). No mesmo trabalho os autores testaram também uma membrana de látex e a porcentagem de mosquitos ingurgitados foi de 0,66%. Em *Anopheles stephensis* a porcentagem de mosquitos ingurgitados em membrana animal foi de 82% contra 67% em parafilm® (RUTLEDGE et al, 1964). Apesar dos resultados divergentes, as membranas sintéticas são largamente utilizadas na alimentação de *An. darlingi*, principalmente em experimentos com infecções (ALVES et al., 2005; BHARTI et al. 2006). Nesse estudo foi utilizada uma membrana sintética de TEFLON para a administração dos alimentos, e a porcentagem de mosquitos ingurgitadas foi de 75,95% em sangue.

Em relação a administração de diferentes soluções em membrana, que não o sangue, em anofelinos, o número de mosquitos ingurgitados pode variar entre as espécies. Em *An. darlingi* o ingurgitamento diminuiu conforme a composição do alimento alternativo, tendo uma porcentagem de 25,1% em S-A, 15,6% em SF-AL200 e 7,5% em SF-AL400. Quando oferecido apenas uma solução fisiológica para *An. stephensi*, *An. gambiae*, *An. freeborni* e *An. dirus*, a porcentagem de mosquitos ingurgitados foi de 87%, 80%, 70%, 24%, respectivamente, porém quando adicionado BSA na solução *An. dirus* aumentou a porcentagem de mosquitos ingurgitados para 64% (GALUN et al., 1985). Em *Culiseta inornata* quando oferecido uma solução de Ringer (solução isotônica ao sangue) a porcentagem de mosquitos ingurgitados foi de 36,20% (FRIEND, 1978).

Quando os alimentos alternativos foram oferecidos em gotículas foi observado que mais de 90% dos mosquitos estavam ingurgitados independentemente do tipo de alimento oferecido, ressaltando que na formulação desses alimentos foi adicionado um fagoestimulante (sacarose 10%). No trabalho de Friend (1978), a porcentagem de mosquitos da espécie *Culiseta inornata* que se ingurgitaram apenas de açúcar a 1M foi de 98% e no trabalho de Hosoi (1958) que mostrou que líquidos adoçados com glicose foi possível quase 100% dos mosquitos da espécie *Culex pipiens* se ingurgitaram. Em trabalhos com a utilização de iscas açucaradas tóxicas, que usam o açúcar como um fagoestimulante para a ingestão da isca, foi observado uma porcentagem de 65-82% em *Aedes aegypti* criados em laboratório (BARBOSA, 2016) e 86% de *Culex quinquefasciatus* (STEWART et al., 2013), corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Já para as espécies *An. gambiae* e *An. arabiensis*, a porcentagem de ingurgitamento de solução açucarada foi menor que as encontradas no presente estudo, 68% e 64%, respectivamente (STEWART et al., 2013).

Nos culicídeos, a ingestão do açúcar é regulada por receptores gustativos presentes nas sensilas, que estão localizadas no aparelho bucal e nos tarsos. Quando os tarsos dos mosquitos tocam uma fonte açucarada as sensilas são estimuladas. A ponta da probóscide é colocada em contato com o alimento e as sensilas da superfície dorsal da labela são estimuladas, ocorrendo a separação dos lóbulos. Após essa estimulação é dado início a sucção, que é feita através da ação combinada do cibário e da faringe (CLEMENTS, 1999).

O açúcar é o alimento básico dos mosquitos adultos, sendo o único nutriente para os machos e provavelmente o mais comum para fêmeas, apesar de sua necessidade de sangue de vertebrados para produzir ovos (NAYAR e SAUERMAN, 1975). A maioria das fêmeas de mosquitos tem o açúcar como sua primeira fonte de alimentação disponível, e algumas espécies preferem o açúcar do que o sangue e só fazem repasto após terem realizado uma alimentação açucarada (FOSTER, 1995).

As fêmeas preferem fazer uma alimentação açucarada após a emergência, tanto em campo quanto em laboratórios fêmeas se alimentaram de açúcar logo após a emergência ou dentro de intervalos de 24-48hs (NAYAR e SAUERMAN, 1975). Os mosquitos, algumas vezes percorrem longas distâncias para encontrar a fonte de alimentação sanguínea, experimentos de liberação-recaptura mostraram que fêmeas de *An. gambiae* continham açúcar em seus intestinos logo após sua emergência (GILLIES, 1961), melhorando, assim, a sua capacidade de dispersão para busca desse recurso, como previamente observada nos mosquitos *Culex nigripalpus* (HANCOCK e FOSTER, 1997, 2000), *Cantans ochlerotatus* (RENSHAW et al., 1994) *Aedes aegypti* (BRIEGEL et al., 2001).

Existem poucos trabalhos que abordem outras formas de administração de alimentos, que possam desencadear a ovogênese, que não seja com a utilização de membranas. Trabalhos como o de Lea et al. (1956) e Dimond et al. (1956) disponibilizaram aminoácidos com sacarose em chumaços de algodão para *Aedes aegypti* e quando a solução continha aminoácidos essenciais foi observada a produção de ovos. Uma linhagem de *Aedes aegypti* foi mantida com a administração de sacarose e albumina de ovo disponibilizadas em bolas pequenas de vidros (Ballotini) (STOBBART, 1992) mostrando que outras formas de administrar o alimento para a produção de ovos podem ser bem-sucedidas.

No presente trabalho foi possível observar que as dietas com concentrações mais altas de BSA, administradas em gotículas, não levaram a uma maior mortalidade dos

mosquitos em relação ao controle (Fig. 18), apesar dos alimentos alternativos terem uma maior concentração de proteína (*BSA*) e conseqüentemente obterem uma maior concentração de aminoácidos na hemolinfa quando comparadas com aquelas fêmeas que se alimentaram com sangue (BELLAMY e BRACKEN, 1971). Sabe-se que em seres humanos a concentração de albumina é de 30-50mg/mL (LEHENINGER, 2008; PETERS, 1996), bem mais baixa do que a concentração oferecida no presente trabalho, isso poderia ter causado um desequilíbrio osmótico, pois a osmolaridade e densidade da hemolinfa dos mosquitos aumentam após a refeição do sangue (MACK e VANDERBERG, 1978). Os mosquitos também produzem grandes quantidades de compostos nitrogenados como resultado da desaminação de aminoácidos, como nos alimentos alternativos a quantidade de proteína ingerida é maior, isso poderia ter resultado em um aumento desses compostos no organismo podendo ser tóxico aos mosquitos (BRIEGEL, 1986; SCARAFFIA et al., 2005; 2008; 2010), porém foi observado que a quantidade de proteínas oferecida para *An. darlingi*, não acarretou na diferença da mortalidade dos mosquitos.

A ingestão de proteínas pelos mosquitos desencadeia várias alterações morfológicas e bioquímicas no intestino médio, necessárias para sua digestão. Entre essas alterações, há um grande aumento na atividade da tripsina, que é uma enzima responsável por quebrar as proteínas e polipeptídios (BRIEGEL e LEA, 1975). Segundo os mesmos autores, o aumento da concentração de proteína ingerida pelos mosquitos provoca o aumento da atividade das tripsinas. As proteínas são então digeridas em aminoácidos livres, os quais são transportados através de células epiteliais do intestino para a hemolinfa. Os aminoácidos têm uma contribuição significativa para a pressão osmótica na hemolinfa, causando desequilíbrio osmótico temporário (BOROVSKY, 2003).

Fêmeas de mosquitos anautógenas necessitam da ingestão de sangue para a produção de ovos (FORATTINI, 1992), pois o sangue constitui uma fonte rica em aminoácidos para os mosquitos. Na *BSA* podemos encontrar os aminoácidos arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (PRATA, 2008; 2005) que são aminoácidos considerados essenciais para a produção de ovos em *Aedes aegypti* (DIMOND et al., 1956). Em relação ao desencadeamento da ovogênese e início da vitelogênese, podemos observar que em *An. darlingi*, independente da forma de administração, concentração de *BSA* ou da presença da solução fisiológica, todas as dietas foram capazes de desencadear tais processos biológicos, mostrando que apenas a presença

da proteína no organismo do mosquito é necessária para dar continuidade na maturação dos oócitos.

Em algumas espécies de mosquitos, o tipo de sangue ingerido pode influenciar no tamanho da postura (CLEMENTS 1963; CONSOLI et al. 1981), mas, geralmente nos culicídeos, em condições naturais, o tamanho da postura das fêmeas pode variar de 50 a 500 ovos (FORATTINI, 2002). No presente estudo, a média de ovos postos nos mosquitos alimentados com sangue foi de 122.

Alguns parâmetros do ciclo biológico de populações de *An. darlingi* foram estudados por Santos et al. (1981), que verificaram que fêmeas de *An. darlingi* oriundas do campo e alimentadas em *Gallus gallus*, ovipuseram uma média de 110, bem parecida com o encontrado no nosso estudo. Em populações de *An. darlingi* colonizados no Peru, a média de ovos foi de 73 ovos postos por fêmea ao longo de 6 gerações (MORENO et al., 2014) e 17 para fêmeas alimentadas com apenas um tipo de sangue animal e 26 para fêmeas que se alimentavam de sangue de vaca e frango (VILARREAL-TREVINO et al., 2015).

Além disso, a média de ovos postos em dietas artificiais pode variar dependendo da espécie. *Aedes albopictus* ovipôs uma média de 92 ovos em uma solução com BSA 200mg/mL, maior que a média de ovos obtidos para sangue e para solução de BSA 100mg/mL que alcançaram uma média de 83,7 e 57, respectivamente (PITTS, 2014), nos alimentos alternativos ao sangue ministrados em gotículas as médias de ovos postos variaram de 75-95,2 para *An. darlingi*. (Fig. 20). Em *Aedes aegypti* quando alimentados com BSA 200mg/mL as médias de ovos postos dependeram da composição da solução fisiológica que foi feita a diluição, as médias variaram de 37 (NaPBS), 42 (PBS) 52 (KPBS) e 66 (APS), compostas por cloreto de sódio e potássio, fosfato dissódico e monopotássico, cloreto de magnésio e bicarbonato de sódio em diferentes concentrações e pH, mostrando que a produção de ovos em *Ae. aegypti* pode estar ligada a concentração de cátions na solução fisiológica (GONZALEZ et al. 2015).

Os dados encontrados nos alimentos alternativos no presente estudo corroboram com os de dados encontrados por Pitts (2014), onde a média de ovos postos é maior nas concentrações mais altas de BSA. Griffith e Turner (1996) criaram mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* em uma dieta artificial baseada em ovoalbumina, leite de soja, globulinas e trifosfato de adenosina (ATP) produziram em média 85% do número de ovos das fêmeas que se alimentavam de sangue, ou seja, fêmeas alimentadas com a dieta alternativa produziam em média 156 ovos contra 183 ovos das fêmeas alimentadas com

sangue. Dados bem parecidos foram encontrados no nosso estudo, pois em S2 as fêmeas produziram 84% do número de ovos produzidos pelas fêmeas alimentadas com sangue (Fig. 20).

A produção de ovos viáveis em mosquitos é derivada não apenas de nutrientes que foram armazenados na fase larval, mas também de alimentos que os mosquitos ingerem quando adultos. Em insetos, aminoácidos derivados da alimentação sanguínea são utilizados por células do corpo gorduroso para a síntese de proteínas do vitelo. Essas proteínas são sintetizadas pelo corpo gorduroso e então secretadas na hemolinfa e subsequentemente absorvidas pelos ovários sendo assim depositadas nos oócitos (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992). Uma dessas proteínas sintetizadas é a vitelina, que tem como função suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos (FAGOTTO, 1990; YAMAMOTO e TAKAHASHI, 1993; LOGULLO et al., 1998). Em animais ovíparos, o desenvolvimento embrionário ocorre fora do organismo materno, desse modo todos os nutrientes essenciais a embriogênese são depositados nos ovócitos pela progenitora (MATOVA e COOLEY, 2011). Logo, uma vez fora do organismo materno o embrião em formação necessita destas reservas depositadas nos ovos para não haver comprometimento de sua formação (CHINZEI e YANO, 1984).

Todas as dietas oferecidas foram capazes de produzir larvas (Figs 21 e Tab.1), porém a produção média de larvas por fêmea foi bem menor em comparação com a média larval das fêmeas alimentadas com sangue (Fig 21). Esse fato pode ter ocorrido devido a composição geral dos alimentos alternativos que pode ter gerado um vitelo sem nutrientes suficientes para nutrir o embrião, principalmente pela ausência de vitaminas.

Lipídios, carboidratos e vitaminas também estão presentes no sangue de mamíferos (LENTNER, 1985) e alguns destes componentes podem ser importantes para a criação bem-sucedida de mosquitos a longo prazo (ROSALES-RONQUILLO et al., 1973). No sangue humano são encontrados diferentes tipos de vitaminas como a A e E e vitaminas do complexo B (KREBS, 1950). As vitaminas do complexo B funcionam como coenzimas em funções metabólicas, das quais são comuns em todos os seres vivos. Através de uma série de trabalhos, generaliza-se que os insetos necessitam de pelo menos sete vitaminas do complexo B: riboflavina, tiamina, ácido nicotínico, ácido fólico, ácido pantotênico e biotina (DADD, 1985; e DADD, 1967).

As vitaminas são passadas de reservas da mãe para o ovo e a falta delas na alimentação da progenitora pode ocasionar um efeito deletério nas larvas (VANDERZANT, 1974). Dadd (1965) mostrou que larvas oriundas de fêmeas mantidas

em dietas com baixo teor de vitaminas necessitavam de mais vitaminas solúveis na água e que alguns adultos do pulgão *Myzus persicae* criados desde o nascimento em dietas pobres em vitaminas depositaram um número menor de larvas vivas e essas não foram capazes de crescer e se desenvolver adequadamente.

A importância das reservas maternas de vitaminas, principalmente a biotina, foi demonstrado em besouros *Scolytus multistriatus*, pois quando a dieta das mães foi suplementada com biotina adicional antes da formação do ovo, a sobrevivência das larvas aumentou significativamente (GALFORD, 1972). Um efeito semelhante também foi indicado para outras vitaminas das quais a eliminação completa da dieta das mães de algumas espécies de insetos causaram uma mortalidade completa de ovos (DADD, 1985).

Em insetos nectarívoros, a vitamina B é necessária pois, sem esse nutriente na dieta das fêmeas adultas a produção de ovos tende a diminuir e uma grande proporção dos ovos não eclodem (DADD, 1985). A mosca da azeitona, *Dacus oleae*, requer além de minerais e aminoácidos, vitaminas B e E para garantir longevidade, produção máxima de ovos e eclosão larval (TSIROPOULOS, 1980). Quando a vitamina E foi retirada da alimentação das fêmeas de moscas da espécie *Agria affinis*, a produção de foi de 0,6 larvas por fêmeas e quando a vitamina E estava presente na dieta das fêmeas o número de larvas produzidos por fêmeas foi de 7,2 (HOUSE, 1966).

Mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* foram criados por 50 gerações em uma dieta alternativa que continha leite de soja, podendo essa ser a fonte de vitaminas dos mosquitos (GRIFFITH e TURNER, 1996). Assim, podemos observar que, pelo menos alguns insetos requerem certas vitaminas para o funcionamento normal de seu metabolismo.

Pouco se sabe sobre a fertilidade de *An. darlingi*, mas foi observado uma produção de 86 larvas naquelas fêmeas que se alimentaram com sangue (Fig. 21), no estudo de Santos et al. (1981) uma média de 83 larvas de fêmeas de *An. darlingi* foi obtida a partir de fêmeas de campo, alimentadas com sangue de galinha. Para *An. darlingi* colonizado, essa média diminuiu sendo observada uma produção média de 53 larvas por fêmeas durante 6 gerações (MORENO et al., 2014). Em relação a produção larval com alimentos alternativos para *An. darlingi* ainda não foram encontradas publicações, até mesmo para outras espécies de culicídeos, os dados sobre fertilidade quando alimentados com dietas alternativas são pouco explorados. Pitts (2014) observou que mosquitos da espécie *Ae. albopictus* alimentados com BSA na concentração de 200mg/mL produziram

uma média de 30 larvas por fêmea, maior do que a obtida com alimentos alternativos nas mesmas concentrações, i.e., S2 e S4, para *An. darlingi* (Fig. 21)

Em relação a índice de qualidade utilizado nesse estudo, essa não é uma abordagem utilizada com frequência nos trabalhos de dietas alimentares artificiais em insetos (BAVARESCO et al. 2004; MANFREDI et al., 2005; PITTS, 2014; GONZALES et al. 2015; MENDONZA et al., 2016). No entanto, permite abordar o efeito dos cinco parâmetros estudados de maneira simultânea nos mosquitos alimentados com as dietas alternativas. Como foi visto nos alimentos alternativos administrados em membranas (Figs 15, 16 e Tab. 1), o sangue sempre se mostrou melhor nas comparações em relação aos parâmetros individuais, quando os parâmetros foram analisados simultaneamente esse padrão permaneceu, tendo um melhor índice de qualidade no sangue quando comparado com os demais alimentos alternativos.

Já nos alimentos administrados em gotículas, quando os parâmetros individuais foram analisados, alguns se mostraram melhores que o sangue (Fig. 17 e Tab. 3), outros não mostraram diferença em relação ao sangue (Figs. 18, 19 e 20) e alguns foram inferiores (Fig. 21) ou apenas diferentes (Figs 19 e 20). Quando analisados todos os parâmetros simultaneamente para os alimentos oferecidos em gotículas, foi observado que não houve uma diferença significativa. No entanto, considerando-se a produção larval (Fig. 21) como atividade fim, os alimentos alternativos ainda estão bastante aquém da produção obtida com sangue (controle).

A partir dos presentes resultados foi observado que os alimentos alternativos ao sangue utilizados no presente trabalho funcionam porém, para confirmar a eficiência da substituição completa mais estudos são necessários nos diferentes parâmetros da biologia dos mosquitos dessa espécie, e a partir do índice de qualidade criado neste trabalho recomenda-se continuar os trabalhos a partir do alimento S3.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nessa dissertação nos permitem concluir:

1. Os mosquitos ingurgitam de forma variável nos alimentos alternativos oferecidos por membrana, mas todos os mosquitos se ingurgitam nos alimentos alternativos oferecidos em gotículas misturados com açúcar;
2. Os alimentos alternativos não afetaram a sobrevivência dos mosquitos até a oviposição.
3. A fecundidade foi afetada pelos alimentos alternativos em relação ao controle (sangue) exceto o alimento S2, assim como a fertilidade, que independente do método de administração foi significativamente afetada pelos alimentos alternativos.
4. Os alimentos alternativos e metodologias de administração testadas são capazes de induzir o ciclo gonótrofico completo de *Anopheles darlingi*:
5. Considerando-se o índice de qualidade criado neste trabalho, os alimentos alternativos administrados em gotículas são mais promissores para dar continuidade ao trabalho.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Enriquecer os alimentos alternativos com vitaminas buscando uma maior produção de larvas;
- Testar os alimentos alternativos em diferentes espécies, principalmente em espécies colonizadas para observar se existe alguma diferença nos parâmetros biológicos;
- Observar perfil proteico dos ovos de fêmeas alimentadas com sangue e com os alimentos alternativos;
- Observar a prole dos mosquitos que foram alimentados com os alimentos alternativos, observando se há malformações ou alterações cromossômicas nas larvas;
- Testar a relação dos alimentos com relação a biologia dos plasmódios.

## REFERÊNCIAS

- AHUMADA, Martha Liliana et al. Comportamiento de picadura de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) y su asociación con la transmisión de malaria en Villavicencio (Colombia). **Biomédica**, v. 33, n. 2, p. 241-250, 2013.
- AKHAVAN, D. et al. Costeffective malaria control in Brazil. Cost-effectiveness of a malaria control program in the Amazon Basin of Brazil, 1988-1996. **Society of Science and Medicine**, 49: 1385-1399, 1999.
- ALVES, F. P. et al. Asymptomatic carriers of *Plasmodium spp.* as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian. **Amazon.Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 777-779. 2005.
- AWONO-AMBENE, H.P.; DIAWARA, L; ROBERT, V. Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 1, p. 32-34, 2001.
- BARBOSA, D. S. Avaliação de Iscas Atraentes Tóxicas Açucaradas em *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) em laboratório. Dissertação de Mestrado. Pgs 64. 2016.
- BASS, C. et al. Identification of the main malaria vectors in the *Anopheles gambiae* species complex using a TaqMan real-time PCR assay. **Malaria journal**, v. 6, n. 1, p. 155, 2007.
- BAVARESCO, A. et al. Adequação de uma dieta artificial para a criação de *Spodoptera cosmioides* (Walk.)(Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório.**Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 155-161, 2004.
- BELLAMY, R. E.; BRACKEN, G. K. Quantitative aspects of ovarian development in mosquitoes. **The Canadian Entomologist**, v. 103, n. 05, p. 763-773, 1971.
- BHARTI, Ajay R. et al. Experimental infection of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 4, p. 610-616, 2006
- BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. **In: Biology of the insect midgut**. Springer Netherlands, p. 3-30, 1996.
- BOROVSKY, D. Biosynthesis and control of mosquito gut proteases. **IUBMB life**, v. 55, n. 8, p. 435-442, 2003..
- BRIEGEL, H. Protein catabolism and nitrogen partitioning during oögenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 32, n. 5, p. 455-462, 1986.
- BRIEGEL, H.; GUT, T.; LEA, A. O. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of insect physiology**, v. 49, n. 3, p. 249-260, 2003.

- BRIEGEL, H; KNUSEL, I.; TIMMERMANN, S. E. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. **Journal of Vector Ecology**, v. 26, p. 21-31, 2001.
- BRIEGEL, H; LEA, A. O. Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 9, p. 1597-1604, 1975.
- BROWN, M.R. et al. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes, **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 7, p. 3967-3971, 1998.
- BRUCE-CHWATT, L. J. et al. Essential malariology. William Heinemann **Medical Books Ltd.**, 1980.
- BUSTAMANTE, F. M. Distribuição geográfica e periodicidade estacional da malária no Brasil e sua relação com os fatores climáticos. Situação atual do problema. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 9, n. 1, p. 181-190, 1957.
- CAMARGO, P.C. Malária, maleita, paludismo. **Revista Ciências e Cultura: Temas e Tendências – endemias**, v. 55, n. 1, p. 26-30, 2003.
- CAROCCI, A. S. et al. Two digestive trypsins occur in three species of neotropical anophelines. **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 6, p. 991-995, 2003.
- CHARLWOOD, J. D. Biological variation in *Anopheles darlingi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 391-398, 1996.
- CHINZEI, Y.; YANO, I. Vitellin is the nutrient reserve during starvation in the nymphal stage of a tick. **Experientia**, v. 41, n. 7, p. 948-950, 1985.
- CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. Vol. 2. Sensory reception and behaviour. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1999.
- CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. Vol. I. Development, nutrition and reproduction. 1992.
- COETZEE M. Editorial distribution of the African Malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex. **Am.J.Trop.Med.HYG.**, 70(2):103-104, 2004.
- CONSOLI, R.A.G.B.; DE OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **SciELO-Editora FIOCRUZ**, 1994.
- DADD, R. H.; KRIEGER, D. L. Dietary amino acid requirements of the aphid, *Myzus persicae*. **Journal of Insect Physiology**, v. 14, n. 6, p. 741-764, 1968.
- DADD, R. H.; KRIEGER, D. L.; MITTLER, T. E. Studies on the artificial feeding of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer)—IV. Requirements for water-soluble vitamins and ascorbic acid. **Journal of Insect Physiology**, v. 13, n. 2, p. 249-272, 1967.
- DADD, R. H.; M, T. E. Studies on the artificial feeding of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer)—III. Some major nutritional requirements. **Journal of insect physiology**, v. 11, n. 6, p. 717-743, 1965.
- DAY, M. F. **The mechanism of food distribution to midgut or diverticula in the mosquito**. Australian journal of biological sciences, v. 7, n. 4, p. 515-524, 1954.
- DEANE, L.M - Vetores de malária no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 81: 5-14, 1986.

- DESPOMMIER, G.; HOTEZ, K. **Parasitic Diseases**. Fifth Edition ed. 2005.
- DIMOND, J. B. et al. The amino acids required for egg production in *Aedes aegypti*. **Can. Entomol.** 88: 57-62. 1956.
- FAGOTTO, F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 14, n. 4, p. 217-235, 1990.
- FARLEY, A; HENDRY, C; MCLAFFERTY, E. Blood components. **Nursing Standard**, v. 27, n. 13, p. 35-42, 2012.
- FEITOSA, F.M. et al. A transcriptome analysis of the *Aedes aegypti* vitellogenic fat body. **Journal of Insect Science**. V.6, p.1-26, 2006.
- FLEMING, G. Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas, in: **Washington, D.O.P.d.I.S.** (Eds.). 1992
- FORATTINI O. P. **Culicidologia Médica**, Vol 2, Univ. São Paulo, São Paulo, 860 pp. 2002.
- FORATTINI, O.P. Comportamento exófilo de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 21, p. 291-304, 1987.
- FORATTINI, O.P., 1973. **Entomologia médica**, São Paulo.
- FOSTER, W. A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annual review of entomology**, v. 40, n. 1, p. 443-474, 1995.
- FRIEND, W. G. Physical Factors Affecting the Feeding Responses of *Culiseta inornata* to Atp, Sucrose, and Blood. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 71, n. 6, p. 935-940, 1978.
- FRIEND, W. G.; SMITH, J. J. B. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. **Annual review of entomology**, v. 22, n. 1, p. 309-331, 1977.
- GALFORD, J. R. Some basic nutritional requirements of smaller European elm bark beetle larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 65, n. 3, p. 681-684, 1972.
- GALUN, R.; KOONTZ, L. C.; GWADZ, R. W. Engorgement response of anopheline mosquitoes to blood fractions and artificial solutions. **Physiological entomology**, v. 10, n. 2, p. 145-149, 1985.
- GAMA, R.A. et al. Periodicity of capture of the *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in Porto Velho, Rondônia, Brazil. **Neotropical entomology**, v. 38, n. 5, p. 677-682, 2009.
- GIL, L. H. S. et al. Seasonal distribution of malaria vectors (Diptera: Culicidae) in rural localities of Porto Velho, Rondônia, Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 3, p. 263-267, 2015.
- GIL, L.H. et al. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in brazilian amazon. **Journal Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p.636-641, 2003.

- GILLIES M.T. Studies on the dispersion and survival of *Anopheles gambiae* Giles in East Africa, by means of marking and release experiments. **Bull. Entomol. Res.** ;52:99–127. 1961.
- GONZALES, K.K.; TSUJIMOTO, H.; HANSEN, I. A. Blood serum and BSA, but neither red blood cells nor hemoglobin can support vitellogenesis and egg production in the dengue vector *Aedes aegypti*. **PeerJ**, v. 3, p. e938, 2015.
- GOODING, R. H. The digestive processes of haematophagous insects: IV. Secretion of trypsin by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **The Canadian Entomologist**, v. 105, n. 04, p. 599-603, 1973.
- GRAF, R. et al. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). **Cell and tissue research**, v. 245, n. 1, p. 19-27, 1986.
- GRAVES, P. M. Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with Plasmodium falciparum. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 738-742, 1980.
- GRIFFITH, J. S.R; TURNER, G. D. Culturing *Culex quinquefasciatus* mosquitoes with a blood substitute diet for the females. **Medical and veterinary entomology**, v. 10, n. 3, p. 265-268, 1996.
- GU, W. et al. Natural plant sugar sources of Anopheles mosquitoes strongly impact malaria transmission potential. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15996, 2011.
- HANCOCK, R. G.; FOSTER, W. A. Exogenous juvenile hormone and methoprene, but not male accessory gland substances or ovariectomy, affect the blood/nectar choice of female *Culex nigripalpus* mosquitoes. **Medical and veterinary entomology**, v. 14, n. 4, p. 376-382, 2000.
- HANCOCK, R. G.; FOSTER, W. A. Larval and adult nutrition effects on blood/nectar choice of *Culex nigripalpus* mosquitoes. **Medical and veterinary entomology**, v. 11, n. 2, p. 112-122, 1997.
- 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.
- HIWAT, H. et al. Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 3, p. 207-213, 2010.
- HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 177, 2011.
- HOSOI, T. Identification of blood components which induce gorging of the mosquito. **Journal of insect physiology**, v. 3, n. 3, p. 191-218, 1959.
- HOUSE, H. L. Effects of vitamins E and A on growth and development, and the necessity of vitamin E for reproduction in the parasitoid *Agria affinis* (Fallen)(Diptera, Sarcophagidae). **Journal of insect physiology**, v. 12, n. 4, p. 409-417, 1966.

- JAMES, A.A.; BLACKMER, K; RACIOPPI, J.V. A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Gene**, v. 75, n. 1, p. 73-83, 1989.
- KANTELE, A.; JOKIRANTA, S. Plasmodium knowlesi--the fifth species causing human malaria. **Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja**, v. 126, n. 4, p. 427-434, 2010.
- KITCHEN, A. D.; CHIODINI, P. L. Malaria and blood transfusion. **Vox Sanguinis**, 90: 77–84. doi: 10.1111/j.1423-0410.2006.00733, 2006.
- 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, 1991a.
- 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, 1991b.
- KOGAN, P. H. et al. Substitute blood meal for investigating and maintaining *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 4, p. 709-712, 1990.
- KREBS, H. A. Chemical composition of blood plasma and serum. **Annual review of biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 409-430, 1950.
- LEA, A.O. The medial neurosecretory cells and egg maturation in mosquitoes. **Journal of insect physiology**, v. 13, n. 3, p. 419-429, 1967.
- LEA, A.O.; DIMOND, J.B.; DELONG, D.M. A chemically defined medium for rearing *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 49, n. 3, p. 313-315, 1956.
- LEE, K.S. et al. *Plasmodium knowlesi*: reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 4, p. e1002015, 2011.
- LENTNER, C. Physical chemistry composition of blood hematology somatometric data. **Geigy Scientific Tables**, Vol. 3, pp. 56-137. 1985
- LIMONGI J.E. et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. **Rev Soc Bras Med Trop** 41: 232-237. 2008.
- LO S.S. et al. Malária em usuários de drogas de administração endovenosa associada à soropositividade para HIV. **Rev Saúde Pública** 1991; 25:17-22.
- LOGULLO, C. et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, n. 06, p. 525-532, 1998.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 501-514, 1989.
- LUO, Yi-Pey. A novel multiple membrane blood-feeding system for investigating and maintaining *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 39, n. 2, p. 271-277, 2014.

- MACK, S. R.; VANDERBERG, J. P. Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 1. Collection procedure and physical characteristics. **The Journal of parasitology**, p. 918-923, 1978.
- MAGNARELLI, L. A. et al. Nectar-feeding by female mosquitoes and its relation to follicular development and parity. **J Med Entomol**, v. 14, p. 527-530, 1978.
- MAGNARELLI, L.A.; FREIER, J.E.; ANDERSON, J.F. Experimental infections of mosquitoes with *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 4, p. 694-695, 1987.
- MANFREDI, F L da F. et al. Efeito de dietas artificiais para a alimentação de adultos de *Bonagota cranaodes* (Meyrick)(Lepidoptera: Tortricidae), em laboratório. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, 2005.
- MANGUIN S., R. D. R., et al. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. **J. Med. Entomol.** 33(2):205-11, 1996.
- MANGUIN, S. et al. Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: an updated review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 4, p. 489-503, 2008.
- MARINOTTI, O; DE BRITO, M; MOREIRA, C.K. Apyrase and  $\alpha$ -glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 4, p. 675-679, 1996.
- MARQUARDT, W.C. **Biology of Disease Vectors**, 2nd ed. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts. Second Edition, 785 p., 2005.
- MARTENS, P.; HALL, L. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. **Emerging infectious diseases**, v. 6, n. 2, p. 103, 2000.
- MATOVA N.; COOLEY L. Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol* 231:291–320. 2001.
- MENDOZA, A. C.; DA ROCHA, A. C.P; PARRA, J. R.P. Lyophilized artificial diet for rearing the Neotropical *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 41, 2016.
- MOFFETT, A.; SHACKELFORD, N.; SARKAR, S. Malaria in Africa: vector species' niche models and relative risk maps. **PLoS One**, v. 2, n. 9, p. e824, 2007.
- MONTOYA-LERMA, J. et al. Malaria vector species in Colombia: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 223-238, 2011.
- MOREIRA-FERRO, C. K.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A. T. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. **Tissue and Cell**, v. 31, n. 3, p. 264-273, 1999.
- MORENO, M. et al. Infection of laboratory-colonized *Anopheles darlingi* mosquitoes by *Plasmodium vivax*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 4, p. 612-616, 2014.

MS. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: Volume Único. [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

NAYAR, J. K.; SAUERMAN, D. M. A comparative study of flight performance and fuel utilization as a function of age in females of Florida mosquitoes. **Journal of insect physiology**, v. 19, n. 10, p. 1977-1988, 1973.

NELSON, David L.; LEHNINGER, Albert L.; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.

NORIEGA, F.G.; COLONNA, A. E.; WELLS, M.A. Increase in the size of the amino acid pool is sufficient to activate translation of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti* midgut. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 3, p. 243-247, 1999.

NOVAK, M. G.; BERRY, W. J.; ROWLEY, W. A. Comparison of four membranes for artificially bloodfeeding mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 2, p. 327-329, 1991.

OLANO, V.A. et al. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. **Biomédica**, v. 21, n. 4, p. 402-408, 2001.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Feeding preference of *Anopheles darlingi* in malaria endemic areas of Rondonia State, northwestern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 601-602, 1992.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Review Malaria in Brazil: an overview. **Malaria J**, v. 9, p. 115, 2010.

OWEN, W.B. The contact chemoreceptor organs of the mosquito and their function in feeding behaviour. **Journal of Insect Physiology**, v. 9, n. 1, p. 73-87, 1963.

PACEY, E. K.; O'DONNELL, M. J. Transport of H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across the posterior midgut of blood-fed mosquitoes (*Aedes aegypti*). **Journal of insect physiology**, v. 61, p. 42-50, 2014.

PAJOT, F.X.; LE PONT, F.; MOLEZ, J.-F. Données sur l'alimentation non-sanguine chez *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae) en Guyane française. 1975.

PETERS T. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. **San Diego, CA: Academic Press**, 1996.

PITTS, R.J. A blood-free protein meal supporting oogenesis in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). **Journal of insect physiology**, v. 64, p. 1-6, 2014.

PÓVOA, M. M. et al. Malaria transmission. **Ciênc. cult.** (São Paulo), v. 52, n. 4/5, p. 208-12, 2000.

PRATA, A.S; SGARBIERI, V. C. Composition and physicochemical properties of two protein fractions of bovine blood serum. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, n. 4, p. 964-972, 2008.

PRATA, A.S; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional das proteínas do soro de sangue bovino. *in vitro*, v. 4, n. 2, p. 4. 2005.

RACHOU, R.G. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 10, p. 145-81, 1958.

RAIKHEL A.S.; DHADIALLA T.S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Ann. Ver. Entom.**, v. 37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A.S. et al. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1275-1286, 2002.

REBÊLO, J.M.M et al. Distribution of species from genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in the State of Maranhão, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 12, p. 2959-2971, 2007.

REINBOLD-WASSON, D. D. et al. Determinantes dos padrões de distribuição sazonal de *Anopheles* em toda uma floresta para gradiente periurbana perto de Iquitos, Peru. **The American Journal of Higiene e Medicina Tropical**, v. 86, n. 3, p. 459-463, 2012.

RENSHAW, M.; SERVICE, M. W.; BIRLEY, M. H. Host finding, feeding patterns and evidence for a memorized home range of the mosquito *Aedes cantans*. **Medical and veterinary entomology**, v. 8, n. 2, p. 187-193, 1994.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A. Brasil, 2001

ROMOSER, W.S. O sistema alimentar vetor. *The Biology of Disease. Vectors*, p. 298-317, 1996.

ROSALES-RONQUILLO, Maria C.; SIMONS, Robert W.; SILVERMAN, Paul H. Aseptic rearing of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, n. 5, p. 949-954, 1973.

ROZENDAAL, J.A. Relations between *Anopheles darlingi* breeding habitats, rainfall, river level and malaria transmission rates in the rain forest of Suriname. **Medical and veterinary entomology**, v. 6, n. 1, p. 16-22, 1992.

RUTLEDGE, L. C.; WARD, R. A.; GOULD, D. J. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosq News**, v. 24, n. 4, p. 407-9, 1964.

SALAMA, H. S. The function of mosquito taste receptors. **Journal of insect physiology**, v. 12, n. 9, p. 1051-1060, 1966.

SANDERS, A. et al. Blood meal induces global changes in midgut gene expression. In the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v.33, p. 1105-1122, 2003.

SANTOS, J.M.M.; CONTEL, E.P.B.; KER, W.E. Biologia de Anofelinos Amazônicos. I. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DipteraCulicidae) da Rodovia Manaus - Boa vista. **Acta Amazonia**, 11: 789 - 797. 1981.

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.

- SCARAFFIA, P. Y. et al. Discovery of an alternate metabolic pathway for urea synthesis in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 518-523, 2008.
- SCHAEFER, C H.; MIURA, T. Sources of energy utilized by natural populations of the mosquito, *Culex tarsalis*, for overwintering. **Journal of insect physiology**, v. 18, n. 4, p. 797-805, 1972.
- SCHMIDT, J. M., W. G. FRIEND. Ingestion and diet destination in the mosquito *Culiseta inornata*: effects of carbohydrate configuration. **Journal of insect physiology** 37.11 (1991): 817-828.
- SERVICE, M.W. Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. **Revista de saúde pública**, v. 25, p. 165-178, 1991.
- SIANTURI, L.J.; SUSAPTO, D.; CHURCH, C. J. Packed red blood cells and bovine serum albumin as a blood meal source for *Anopheles farauti*. **Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News**, v. 12, n. 4, p. 730-731, 1996.
- SINGH B, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, 363:1017-1024, 2004.
- SINGH, K. R. P.; BROWN, A. W. A. Nutritional requirements of *Aedes aegypti* L. **Journal of Insect Physiology**, v. 1, n. 3, p. 199-220, 1957.
- SINKA, M.E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasit Vectors**, v. 5, n. 1, p. 69, 2012.
- STEWART, Z. P. et al. Indoor application of attractive toxic sugar bait (ATSB) in combination with mosquito nets for control of pyrethroid-resistant mosquitoes. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84168, 2013.
- STOBBART, R. H. Selection of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* for cheap and easy maintenance without bloodmeals. **Medical and veterinary entomology**, v. 6, n. 1, p. 87-89, 1992.
- TADEI, W.P et al. - Observações Ecológicas sobre vetores anofelinos de malária na Amazônia brasileira. **Amer. J. trop. Med. Hyg.** 59: 325-335, 1998.
- TADEI, W.P. et al. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian amazon. **American Journal Tropical Medical Hygiene**, v. 59, p. 325-35, 1998.
- TADEI, W.P.; THATCHER, B. D. Malaria vectors in the brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 87-94, 2000.
- TALYULI, Octávio AC et al. The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study *Aedes aegypti* physiology. **Journal of insect physiology**, v. 83, p. 1-7, 2015.
- TELANG, A.; WELLS, M. A. The effect of larval and adult nutrition on successful autogenous egg production by a mosquito. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 7, p. 677-685, 2004.

- TERRA, W.R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**, 181-200, 1990.
- TSIROPOULOS, G. J. The importance of vitamins in adult *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) nutrition. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 73, n. 6, p. 705-707, 1980.
- UCHIDA, K et al. Ovarian development induced in decapitated female *Culex pipiens pallens* mosquitoes by infusion of physiological quantities of 20-hydroxyecdysone together with amino acids. **Journal of insect physiology**, v. 44, n. 5, p. 525-528, 1998.
- UCHIDA, K. et al. Induction of oogenesis in mosquitoes (Diptera: Culicidae) by infusion of the hemocoel with amino acids. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 4, p. 572-575, 2001.
- UCHIDA, K; SUZUKI, K. Elimination of protein-food ingested into the crop, and failure of ovarian development in female mosquitoes, *Culex pipiens pallens*. **Physiological Entomology**, v. 6, n. 4, p. 445-450, 1981.
- VAN HANDEL, Emile. Metabolism of nutrients in the adult mosquito. **Mosq. News**, v. 44, p. 573-579, 1984.
- VANDERZANT, E. S. Development, significance, and application of artificial diets for insects. **Annual Review of Entomology**, v. 19, n. 1, p. 139-160, 1974.
- VILLARREAL-TREVIÑO, Cuauhtémoc et al. Establishment of a free-mating, long-standing and highly productive laboratory colony of *Anopheles darlingi* from the Peruvian Amazon. **Malar J**, v. 14, p. 227, 2015.
- VOORHAM, J. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 75-80, 2002.
- WANDERLEY D.M.V., ANDRADE J.C.R. Malária induzida no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1991; 24:157-161.
- WEIDLICH, S. et al. Environmental control of trypsin secretion in the midgut of the two-spotted field cricket, *Gryllus bimaculatus*. **Journal of Insect Physiology** 58, 1477-1484, 2012.
- WHO. World Malária Report. Disponível em <>. 2014
- WOKE, P. A. Comparative Effects of the Blood of Man and of Canary on Egg-Production of *Culex pipiens* Linn. **The Journal of Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 311-313, 1937.
- YAMAMOTO Y., TAKAHASHI S.Y. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs; role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. **Comp Biochem Physiol** 106B: 35-45. 1993.
- YOELI, M.; MER, G. G. The relation of blood feeds to the maturation of egg in *Anopheles elutus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 4, p. 437-444, 1938.

ZAPATA, M.A. et al. Discrimination of seven anopheles species from san pedro de urabá, antioquia, colombia, by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 1, p. 67-72, 2007.

ZIMMERMAN, R.H. Ecologia de vetores da malária nas Américas e na direção futura. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 87, supl. 3, p. 371-383, 1992. Disponível a partir <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761992000700064&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761992000700064&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 26 de janeiro de 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761992000700064>.