UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Padronização de técnica para produção em massa de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

Marco Jacometto Marchi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Delsio Natal

São Paulo
2014

Padronização de técnica para produção em massa de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

Marco Jacometto Marchi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Delsio Natal

São Paulo

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por sua infinita sabedoria, por ter nos proporcionado tudo que podemos ou não ver, conseguimos ou não compreender e por ter nos ofertado, principalmente, o dom de sentir e amar...

Aos meus pais e avós, pela educação, pelo exemplo e por tudo que tive, pelos conselhos valiosos durante toda a minha infância, adolescência e que recebo até hoje...

Ao meu irmão Cassiano, companheiro de todas as horas, pelo ensinamento de que através da nossa confiança e dedicação tudo se torna possível.

À minha esposa Flavia, parceira incondicional, conselheira amigável e fiel que muito me proporcionou, orientou e continua a ajudar por meio de seu espírito laborioso.

A todos os meus amigos e amigas distribuídos por São Paulo, Guarujá, Florianópolis e algumas outras cidades do Brasil e do mundo, por terem participado de minha vida, mesmo que brevemente, mas com fundamental importância para que pudesse me tornar quem eu sou hoje.

Ao meu mestre prof. Delsio Natal, pela ajuda e compreensão durante a minha dissertação, pelos conselhos e pela sua amizade tanto dentro do ambiente de trabalho quanto durante os incontáveis cafés na FSP.

À equipe do Laboratório de Entomologia e dos profissionais da FSP/USP, por me ajudarem, contribuírem na minha formação profissional e pelos laços de amizade que criamos e espero continuarmos tendo.

À equipe do Laboratório de Processos Redox na Inflamação, do Departamento de Bioquímica no Instituto de Química (IQ) da USP, pelo auxílio nos experimentos.

Às técnicas da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela ajuda e fornecimento de material para meus experimentos.

À Regiane Tirone e à Rosa Tubaki da SUCEN, pela orientação, pela amizade e por me ajudarem e incentivarem a realizar o mestrado.

À Neide e equipe do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) pela ajuda com o material de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio com a bolsa de estudos durante toda a minha jornada de mestrado.

À Empresa Metropolitana de Águas e Energia (EMAE), por ter realizado a parceria com a FSP e por viabilizar a estrutura disponível para este estudo.

“Conhecimento não é o suficiente,
precisamos aplicar.
Disposição não é o suficiente,
precisamos fazer.”

(Bruce Lee)

RESUMO

Marchi MJ. **Padronização de técnica para produção em massa de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)** [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Objetivo - Estabelecer um método para produção em massa do mosquito *Culex (Culex) quinquefasciatus* em laboratório, com o intuito de fornecer subsídio ao controle populacional desta espécie por meio da liberação de machos estéreis. **Métodos** – Foi fundada uma colônia de *Cx. quinquefasciatus* a partir de imaturos coletados em janeiro de 2013 no rio Pinheiros, São Paulo/SP, Brasil. Os mosquitos adultos tiveram seus pesos secos mensurados e o desenvolvimento avaliado como o tempo para atingirem o estágio de pupa e a fase adulta. No primeiro experimento foram testadas quatro dietas diferentes (ração de peixe, ração canina, mistura de 50% de ração de peixe e 50% de ração canina e uma mistura de 33,33% de ração de peixe, 33,33% de ração canina e 33,33% de leite em pó) e três temperaturas (27 ± 2°C, 23 ± 2°C e 20 ± 2°C). No segundo experimento testaram-se diferentes quantidades de ração de peixe, densidades larvárias, volume e altura da coluna d'água. **Resultados** - No primeiro experimento não houve diferença estatística significante entre as quatro dietas testadas e o tempo de formação até a fase de pupas e para o peso seco dos adultos. No entanto a ração de peixe proporcionou a menor mortalidade. A maior temperatura (27 ± 2°C) diminuiu o tempo do ciclo de vida dos imaturos, porém gerou adultos com pesos secos menores. No segundo experimento, a condição 0,5 mg/larva, 5 ml/larva em 2,1 cm de coluna d'água e a 27 ± 2°C ofereceu boa produção em massa e gerou maiores taxas de desenvolvimento, menor mortalidade de imaturos e maior peso seco em adultos. **Conclusão** - Não foi definida uma dieta ideal para uso na produção em massa, considerando os parâmetros analisados. A dieta menos custosa é a ração canina, porém deve ser moída manualmente ou em máquina, tornando a ração de peixe mais eficiente para ser diretamente aplicada nas bandejas de produção. O estudo sugere que a melhor condição para a produção massa do *Cx. quinquefasciatus* foi 0,5 mg de ração de peixe/dia por larva num

volume de 5 ml/larva em 2,1 cm de coluna d'água e a 27 ± 2°C. O estudo sugere que esta técnica pode auxiliar no controle populacional dessa espécie.

Palavras chave: Mosquitos, *Culex quinquefasciatus*, produção em massa.

ABSTRACT

Marchi, M. J. **Standardization of technique for mass production of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)** [Master Dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Objective – To establish a method for mass rearing of *Culex (Culex) quinquefasciatus* mosquitoes in laboratory, in order to provide subsidy to the population control of this species through the release of sterile males. **Methods** - A colony of *Cx. quinquefasciatus* was founded from immature collected in January 2013 in the Pinheiros River, São Paulo/SP, Brazil. Adult mosquitoes had their dry weights measured and the development was evaluated as the time to reach pupae and adult phase. In the first experiment it was tested four different diets (fish food, dog food, a mix of 50% fish and 50% dog food or a mix of 33.33% fish 33.33% dog food and 33.33% milk powder) and three temperatures (27 ± 2°C, 23 ± 2°C and 20 ± 2°C). In the second experiment it was tested several conditions of food amounts (mg/day), larvae densities (ml of water/larva) and water column height that would generate high development rate, low immature mortality and high adult dry weight. **Results** - In the first experiment there was no statistically significant difference in the time for the development to pupae stage or in the total dry weight of adults among the four experimental diets. However, fish food provided less immature mortality. The highest temperature (27 ± 2°C) decreased the time of the immature life cycle, but generated adults with lower dry weights. In the second experiment, the condition 0.5 mg/larva, 5 ml/larva in 2.1 cm of water column and 27 ± 2°C offered good mass rearing and generated higher development rate, lower immature mortality and higher adult dry weights. **Conclusion** – No ideal diet was defined for mass rearing in the parameters analyzed. The less expensive diet was the dog food, but this should be milled by hand or machine, which makes the fish food more practical in the production trays. This study suggested that the best condition for mass rearing of *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes was 0.5 mg of daily fish food/larva, 5 ml/larva in 2.1 cm of water column and 27 ± 2°C. The study suggests that this technique can assist in population control of this species.

Key words: Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*, mass rearing.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO **8**

1.1. OS MOSQUITOS E A VEICULAÇÃO DE PATÓGENOS 8

1.2. *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 – POSIÇÃO SISTEMÁTICA, ASPECTOS BIOLÓGICOS E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA 9

1.3. FORMAS DE CONTROLE DISPONÍVEIS 13

1.4. ALTERNATIVAS DE CONTROLE AOS INSETICIDAS E A TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL (SIT - *STERILE INSECT TECHNIQUE*) 15

1.5. PRODUÇÃO EM MASSA DOS INSETOS 18

1.6. JUSTIFICATIVA 21

2- OBJETIVOS **22**

2.1. GERAL 22

2.2. ESPECÍFICOS 22

3- MATERIAIS & MÉTODOS **23**

3.1. ÁREAS DE ESTUDO 23

3.2. PROCEDIMENTOS EM CAMPO 24

3.3. PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO 25

3.3.1. Desenvolvimento das larvas e pupas de *Cx. quinquefasciatus* coletadas em campo 25

3.3.2. Colônia de Mosquitos 25

3.3.3. Alimentos larvários 28

3.4. EXPERIMENTOS 30

3.4.1. Experimento A – Desenvolvimento de larvas de *Cx. quinquefasciatus* de 1º instar submetidas a diferentes dietas e temperaturas 30

3.4.2. Experimento B – Proporções ideais para desenvolvimento de larvas de 1º instar de *Cx. quinquefasciatus*: densidade larvária/quantidade de alimento/volume e altura d'água 32

3.5. TRATAMENTO DOS DADOS 33

4- RESULTADOS 35

4.1 EXPERIMENTO A - DIETAS LARVÁRIAS E TEMPERATURAS 35

4.1.1. Dietas larvárias 35

4.1.2. Temperaturas 53

4.1.3. Tempo de desenvolvimento das larvas até obtenção de pupas de *Cx. quinquefasciatus* 61

4.2. EXPERIMENTO B - PROPORÇÕES IDEAIS: DENSIDADE LARVÁRIA/QUANTIDADE DE ALIMENTO/VOLUME E ALTURA D'ÁGUA 66

4.2.1. Mortalidade dos imaturos nos tratamentos 66

4.2.2. Peso seco 70

4.2.3. Tempo de desenvolvimento das larvas em cada tratamento até obtenção de pupas de *Cx. quinquefasciatus* 74

5- DISCUSSÃO 78

5.1. EXPERIMENTO A - DIETAS LARVÁRIAS E TEMPERATURAS 78

5.2. EXPERIMENTO B - PROPORÇÕES IDEAIS: DENSIDADE LARVÁRIA/QUANTIDADE DE

ALIMENTO/VOLUME E ALTURA D'ÁGUA 81

6- CONCLUSÕES 88

7- REFERÊNCIAS 90

1- INTRODUÇÃO

1.1. OS MOSQUITOS E A VEICULAÇÃO DE PATÓGENOS

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) são insetos presentes em todo o território global, exceto a Antártida (WRBU, 2013), com 3535 espécies descritas e reconhecidas até o presente momento (HARBACH, 2013), sendo que no Brasil são encontradas 473 destas espécies (WRBU, 2013), dentre as quais pouco além de 20 possuem importância na saúde pública (NEVES, 2001). São insetos holometábolos, ou seja, há metamorfose completa, e que passam por quatro estágios biológicos distintos: ovo, larva (com quatro instares), pupa e adulto (LOZOVEI, 2001). Os três primeiros ocorrem na água e a quarta etapa é classificada como fase aérea (TAIPE-LAGOS e NATAL, 2003).

Esses dípteros cotidianamente nutrem-se de carboidratos. Procuram substâncias açucaradas como, por exemplo, o néctar de flores e os açúcares de frutas para que possam desenvolver funções básicas de sua sobrevivência como o voo, a dispersão e outras necessidades biológicas, exceto para maturação de seus ovos. Para a última função, as fêmeas adultas de culicídeos, em geral, necessitam de fontes proteicas e, dessa forma, o fazem ingerindo sangue de muitos vertebrados, nos quais se incluem os seres humanos (FORATTINI, 2002).

Essa família de insetos tem sido estudada desde o final do século XIX quando foram relacionados à transmissão de parasitas causadores de doenças ao homem e outros vertebrados. Os gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* são os principais vetores de agentes patogênicos para os seres humanos e transmitem, respectivamente: dengue, filariose e malária (FORATTINI, 2002; TAIPE-LAGOS e NATAL, 2003). Nas últimas duas décadas, houve um aumento significativo na morbidade e na mortalidade decorrentes das doenças cujos agentes são transmitidos por mosquitos (NICHOLSON, 2007). Os vírus da dengue, veiculados pelo *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e pelo *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), afetam aproximadamente 100 milhões de pessoas por ano em todo mundo (CUMBERLAND, 2009). No ano de 2012 os plasmódios da malária, transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles*, foram

endêmicos em 104 países. Em 2011 aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas ao redor do mundo viviam em zonas de risco de infecção. No ano de 2010 foram estimados 219 milhões de casos, com 660 mil mortes em decorrência de malária (WHO, 2013).

1.2. *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 – POSIÇÃO SISTEMÁTICA, ASPECTOS BIOLÓGICOS E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

O gênero *Culex* foi definido por Linnaeus em 1758, agrupa a maior diversidade de espécies entre os culicídeos, com ampla variedade de nichos ecológicos (FORATTINI, 2002). Abriga mais de 300 espécies descritas, entre as quais algumas com capacidade vetora e, dessa forma, são de interesse epidemiológico. Entre as espécies de interesse à Saúde Pública está o mosquito *Culex quinquefasciatus* (Figura 1), o qual representa desafio à Saúde Pública devido a sua capacidade vetora para a filariose e também diversos arbovírus, além de apresentar distribuição em quase todo o território brasileiro (TAIPE-LAGOS e NATAL, 2003). A espécie *Culex quinquefasciatus* pertence à ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Culicini, gênero e subgênero *Culex* (WRBU, 2013).

Figura 1: Fêmea de mosquito *Culex quinquefasciatus* realizando hematofagia. Fonte: http://phil.cdc.gov/phil/details.asp. Acesso em: 10 dez. 2013.

O nome popular mosquito doméstico tropical, durante cinco décadas, foi referido à espécie *Culex fatigans* Wiedemann, 1828. Foi então que Alan Stone, no final da década de 50, revisou a nomenclatura e alterou o nome para *Culex quinquefasciatus.* John Belkin, após vasto estudo do material-tipo dessas espécies, comprovou que *Cx. fatigans* e *Cx. quinquefasciatus* se tratavam, na realidade, da mesma espécie (BELKIN, 1977; MORAIS, 2006). O mosquito *Cx. quinquefasciatus* faz parte do complexo *Culex pipiens* Linnaeus, 1758. A característica morfológica usada para distinguir *Cx. pipiens* de *Cx. quinquefasciatus* é baseada em diferenças quantitativas em estruturas da genitália dos mosquitos machos. Os dois taxa são validados e considerados espécies distintas (SIRIVANAKARN e WHITE, 1978; HARBACH et al., 1985; WRBU, 2013). Segundo FORATTINI (2002) há diferença entre as fêmeas adultas analisando-se o comprimento da veia subcosta, ligada à veia costa, em relação à bifurcação da veia radial R_{2+3}.

A espécie *Cx. quinquefasciatus*, considerada cosmopolita, está distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais. No Continente Americano estende-se desde as regiões Centrais e Sul dos Estados Unidos até a Argentina (FORATTINI, 2002; WRBU, 2013). Nos EUA, o *Cx. pipiens* é encontrado nas zonas temperadas e mais frias, enquanto o *Cx. quinquefasciatus* habita zonas mais tropicais e quentes. Nas áreas intermediárias, podem encontrar-se ambas as espécies, inclusive podendo estas copular e formar híbridos (BARR, 1957). Na América do Sul, mosquitos híbridos *Cx. pipiens/quinquefasciatus* estão distribuídos no Uruguai e na porção central da Argentina, enquanto *Cx. pipiens* são encontrados em regiões no sul da Argentina (MORAIS et al., 2012).

A espécie *Cx. quinquefasciatus* pode veicular diversos arbovírus, agentes etiológicos de doenças como encefalite do vírus do Nilo Ocidental (WNV), encefalite de Saint Louis (SLEV). Nestes casos as aves são os principais reservatórios dos arbovírus principalmente os passeriformes que se aproximam mais das áreas urbanizadas. O *Cx. quinquefasciatus* também já foi incriminado vetor de agentes etiológicos como o vírus Oropouche (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), e de filaríases, a exemplo da dirofilariose (doença cardíaca de

cachorro) cujo agente etiológico é a *Dirofilaria immitis* (AHID e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999) e *Wuchereria bancrofti*, agente da filaríase humana (REY, 2001).

O mosquito *Cx. quinquefasciatus* é uma espécie domiciliada e antropofílica, pois tanto machos como fêmeas estão adaptadas a se refugiar em domicílios humanos. Em um estudo realizado em Belém do Pará, as coletas de adultos demonstraram a presença desta espécie dentro das casas em 97,8% dos casos, contra 2,1% fora das residências. A densidade de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*, encontrada em áreas endêmicas de filaríase, chega a ser altíssima, podendo variar de 300 a 500 insetos por residência, em determinados meses do ano (DEANE et al., 1953; DEANE, 1961; REY, 2001).

Esse mosquito possui considerável capacidade de voo, e pode cobrir vários quilômetros de distância, além de se desenvolver em criadouros dos mais diversos, que incluem: água de chuva acumulada em recipientes (como latas e pneus), reservatórios, canais, fossas e esgoto a céu aberto. Os ovos são colocados lado a lado pelas fêmeas, sobre a superfície d'água, formando jangadas que podem passar de 200 ovos. Após algum tempo, as larvas eclodem e completam essa fase entre quatro a cinco dias, e as pupas, em mais dois. O ciclo completo requer 10 ou 11 dias (REY, 2001). A fase de pupa corresponde a um período de intensa atividade bioquímica onde acontecerá a transição entre a larva de quarto estádio para mosquito adulto. Nessa etapa, o mosquito sofre mudanças fisiológicas e morfológicas significativas, pois utiliza a matéria ingerida e a energia acumulada na fase larvária (FORATTINI, 2002).

Após a emergência, o mosquito adulto estará apto para o voo e é estimulado para a cópula (REY, 2001). Entretanto, durante o primeiro dia após a emergência dos machos, há uma rotação do oitavo ao décimo segmento abdominal, processo denominado "inversão". Isso talvez explique a emergência dos adultos machos um dia antes das fêmeas (CLEMENTS, 1999). A fêmea armazena os espermatozóides oriundos do macho numa estrutura chamada espermateca. As espermatecas, ou receptáculo seminal, das fêmeas do gênero *Culex* são triplas e, após a cópula, a fêmea armazenará esperma suficiente para fertilizar todos os ovos que produzirá durante seu ciclo de vida (REY, 2001; FORATTINI, 2002). As fêmeas, durante o

dia, ficam em repouso, e iniciam a sua atividade de repasto sanguíneo a partir do crepúsculo, podendo picar durante a noite inteira (REY, 2001). Após o acasalamento, as fêmeas são estimuladas a obter alimento e podem fazê-lo por meio de sucos e néctares vegetais, além do repasto sanguíneo, fundamental para desenvolvimento dos ovários e para maturação dos oócitos (GOMES et al., 2003).

O processo de urbanização, em geral, pode resultar em condições propícias para a proliferação de mosquitos, pois diversas espécies possuem alta capacidade de adaptação às modificações ambientais (MARCONDES, 2001). Conseguem, assim, se beneficiar de criadouros artificiais ou de poças d'água resultantes da presença humana, e se reproduzirem com facilidade. Desta forma, com a proliferação do número desses insetos próximos a áreas urbanas, aumenta-se o risco de casos de doenças humanas relacionadas aos mosquitos, bem como o risco de epidemias (MARCONDES, 2001; PATERNO e MARCONDES, 2004).

O *Cx. quinquefasciatus* é uma espécie resistente a diversos graus de poluição de água, como no caso do rio Pinheiros, localizado em São Paulo/SP, Brasil. O rio Pinheiros recebe cargas de efluentes de 290 indústrias e dejetos de mais de 400 mil famílias (SMA 2002). Este rio não possui fluxo constante de água, exceto em períodos de chuvas em que as comportas da usina de Traição são elevadas, ocasionando um escoamento das águas em direção à Represa Billings. Isso faz com que o rio, na maior parte do tempo, constitua um enorme criadouro, por causa da água estagnada (MORAIS, 2006). A capacidade dessa espécie de mosquito de sobreviver em coleções hídricas poluídas com dejetos domésticos e industriais propicia a ausência de predadores naturais e de competidores por nichos ecológicos similares, que não sobrevivem à toxicidade deste tipo de água, o que causa um desequilíbrio ecológico e leva a população de mosquitos a atingir densidades altíssimas (MERRITT et al., 1992).

Além disso, MORAIS (2006) relatou a coleta de diversos mosquitos adultos, tanto machos como fêmeas, às margens do rio Pinheiros. Isso se deve à presença da vegetação presente nesses locais, onde os mosquitos encontram abrigo contra as condições não favoráveis do clima, tais como altas temperaturas e chuvas. Segundo BECK (1980) são comportamentos dos insetos que durante as horas claras do dia

respondem fotonegativamente. Isso faz com que fiquem abrigados nas vegetações durante as altas temperaturas do dia, que poderiam causar perda de água e mesmo a morte (CLARK et al., 1967).

1.3. FORMAS DE CONTROLE DISPONÍVEIS

A importância dos insetos na economia humana é imensurável, seja pelas perdas que ocasionam na produção de alimentos, como lavouras, pelas doenças causadas ao gado e às doenças causadas aos seres humanos, por intermédio dos insetos vetores. Após a 2ª Guerra Mundial, os mecanismos de combate aos artrópodes aumentaram consideravelmente, pela descoberta de inseticidas com ação residual. Dessa forma, pensou-se que a luta contra os vetores e os parasitas, havia sido simplificada. Isso refletiu num abandono dos trabalhos entomológicos e de formação de especialistas nesta área, durante algumas décadas. O problema ressurgiu quando ficou comprovado o aparecimento de resistência dos insetos aos diversos inseticidas que vinham sendo utilizados nas áreas de controle dos mesmos. Assim, foi necessária a diversificação e a integração das técnicas de controle dos insetos para que houvesse sucesso no controle de pragas e vetores (REY, 2001).

A maioria dos inseticidas atua sobre o sistema nervoso dos insetos, e por muitos deles não apresentarem especificidade ou seletividade adequada, permitem que morram concomitantemente espécies nocivas aos seres humanos e as importantes ao meio ambiente (ex: que participam da polinização). Além disso, podem causar efeitos tóxicos sobre outros animais, como aves e mamíferos, e até mesmo para o homem. As classes de inseticidas orgânicos sintéticos são: Os organoclorados, como o DDT; o hexaclorociclo-hexano (HCF ou BHC), o dieldrin, entre outros; os organofosforados (ex: malation;) os carbamatos (carbaril, propoxur); os piretróides (REY, 2001).

Desde a década de 40 o *Cx. quinquefasciatus* tem sido alvo de controle pelo poder público. Nesse período foram utilizados produtos arsênicos inorgânicos, como o Verde Paris, e depois o orgânico-sintético clorado DDT. Posteriormente foram usados produtos da classe dos orgânico-sintéticos fosforados, especialmente o

malation, o larvicida temefós e os adulticidas clorpirifós e diazinon (BRACCO, 1998).

O controle do *Cx. quinquefasciatus* é realizado, desde 1977, pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Desde esta data até o ano 2000 foi realizado o controle de larvas por meio do organofosforado temefós e, posteriormente, foi utilizado o Vectolex®G a base do agente *Bacillus sphaericus* (*Bs*). O controle rotineiro de adultos era realizado por meio do inseticida piretróide a base de Betacyfluthrin (Responsar® SC 1,25 SP) e também o piretróide Cipermetrina (Fersol® 40 PM), ao longo das margens do rio Pinheiros. Entretanto, segundo informações do CCZ, o controle de adultos não tem sido realizado há aproximadamente dois anos, por falta de recursos disponíveis. Outra forma de controle realizado pelo poder público de São Paulo, são as constantes limpezas de vegetação das margens do rio Pinheiros que poderiam servir de abrigo para os mosquitos adultos (MORAIS, 2006).

Foi comprovado, em 1998, que a população de *Cx. quinquefasciatus* do rio Pinheiros apresentava indivíduos resistentes aos inseticidas organofosforados malation, propoxur e fenitrotion e tolerância ao temefós. Essa população estava suscetível ao piretróide permetrina e também ao DDT (BRACCO, 1998). Alguns trabalhos comprovam a resistência adquirida por populações de campo do *Cx. quinquefasciatus* submetidos a tratamentos intensivos com *Bacillus sphaericus* (RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995; YUAN et al., 2000). A “knockdown resistance” (ou kdr), termo utilizado para descrever casos de resistência a DDT e a inseticidas piretróides, foi detectada quando da utilização dos últimos em *Aedes aegypti* na Indonésia e em Porto Rico, e em *Cx. quinquefasciatus* no estado norte-americano da Louisiana. Outras formas de resistência, como a multirresistência (quando dois ou mais mecanismos de resistência ocorrem no mesmo inseto) podem ocorrer quando programas de controle fazem uso de várias classes de inseticidas em sequência (BROGDON e MCALLISTER, 1998).

A resistência aos inseticidas se desenvolveu nos principais insetos vetores de doenças de cada gênero. A partir de 1992, a lista de espécie vetoras resistentes a inseticidas já incluía 56 anofelinos, 39 culicíneos, triatomíneos, piolhos, percevejos, nove espécies de carrapatos e oito espécies de pulgas. Outros insetos de importância em saúde pública, tais como moscas e baratas, também apresentaram resistência em

todos os seus gêneros. Espera-se que a resistência a inseticidas ameace o controle de doenças pelo mundo (WHO, 1992). Até o ano de 2011 foi detectada a resistência dos mosquitos causadores da malária a pelo menos um tipo de inseticida, em 64 países (WHO, 2013).

1.4. ALTERNATIVAS DE CONTROLE AOS INSETICIDAS E A TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL (SIT - *STERILE INSECT TECHNIQUE*)

O conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) foi desenvolvido por AXTELL e ARENDS (1990), e alerta que o controle com inseticidas deva ser feito apenas como último recurso e em cenários de epidemia. As prioridades do MIP baseiam-se no ordenamento ambiental, controle biológico e conscientização da população. Seu objetivo é tornar mais eficiente o controle das populações de mosquitos e preservar o meio ambiente de contaminações.

De acordo com REY (2001), várias alternativas têm sido estudadas na busca de soluções para o controle de insetos. Entre elas estão: a) o estudo de produtos naturais com ação inseticida, encontrados em plantas (como as piretrinas), em artrópodes (toxinas e venenos), em bactérias (como as exotoxinas de *Bacillus thuringiensis*), em fungos, etc; b) uso de feromônios sexuais que possam atrair insetos para armadilhas ou locais contendo inseticidas, ou que perturbem o encontro dos sexos por desorientar os machos na atração pelas fêmeas. Como os feromônios possuem alta especificidade, não prejudicarão espécies que não sejam o alvo do controle; c) estudo dos hormônios juvenis e de seus antagonistas para bloquear o desenvolvimento larvário ou pupal, e que possa diminuir a população de insetos adultos; d) controle biológico, que pode incluir o uso de espécies predadoras, de parasitos e de outros agentes patogênicos específicos; e) emprego de técnicas para induzir a esterilidade dos machos, os quais seriam utilizados como competidores das populações de machos normais.

O controle dos vetores de agentes de doenças e de pragas agrícolas sem que haja agressão ao ambiente, é indiscutivelmente o principal desafio das pesquisas voltadas para a área da saúde e da agricultura. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas visando à introdução de insetos estéreis na natureza e a capacidade de monitoramento desse processo. Uma alternativa que tem sido usada como ferramenta para o controle de insetos é a SIT – *Sterile Insect Technique* (KNIPLING, 1955). Nesta técnica, o processo de esterilização é realizado com produtos químicos ou radiação ionizante, e consiste na produção em massa de machos estéreis e a subsequente liberação destes insetos na natureza, de modo a provocar uma redução da população alvo (ROBINSON, 2002).

A SIT é uma forma de controle espécie específica, não agride o meio ambiente nem libera agentes exóticos na Natureza. Também não insere novos genes na população alvo, tendo em vista que os indivíduos liberados são estéreis (HENDRICHS et al., 2002). A técnica SIT possui uma vantagem em relação ao uso de agentes químicos e remoção de criadouros, pois utiliza o fato de que machos são competentes na busca por fêmeas da mesma espécie, aumentando a efetividade da técnica conforme a população é reduzida (ALPHEY, 2002; ALPHEY et al., 2008; WILKE et al., 2009).

O acasalamento dos machos estéreis com as fêmeas selvagens leva a uma diminuição no potencial reprodutivo das fêmeas. Dessa forma, para que ocorra uma diminuição drástica da população de insetos vetores de patógenos de doenças humanas, animais e de pragas agrícolas deve haver um estudo prévio da população de insetos nas áreas onde os machos estéreis serão introduzidos. Os machos estéreis devem ser capazes de concorrer com os machos férteis e copularem com as fêmeas selvagens (WILKE et al, 2009).

A necessidade de liberação exclusiva de mosquitos machos é segura à saúde pública e deve-se ao fato destes não exercerem a hematofagia, pois são as fêmeas adultas que se alimentam de sangue e transmitem os agentes patogênicos (WILKE et al., 2009). Por este motivo, a liberação de uma população de machos estéreis na natureza deve ser cuidadosamente inspecionada para que não haja contaminação desta população com fêmeas estéreis, pois estas podem comprometer o sucesso do

programa ao inibir o acasalamento dos machos estéreis com as fêmeas selvagens, com risco de efeito neutralizador (MCINNIS et al., 1994).

Embora a técnica SIT venha sendo usada por mais de 50 anos no controle de pragas agrícolas, ela não foi utilizada eficientemente e com resultados positivos contra os mosquitos, pois as doses de radiação utilizadas sugerem enfraquecer os machos. Sabe-se que a esterilização por irradiação é capaz de provocar redução na expectativa de vida de mosquitos e perda drástica na capacidade de acasalamento dos insetos irradiados, quando comparados com machos selvagens (ALPHEY, 2002; CUMBERLAND, 2009). A tolerância à radiação varia entre as espécies de inseto e pode levar à perda de "fitness", inviabilizando sua utilização em insetos mais sensíveis à radiação (ROBINSON, 2002).

De acordo com MARRELLI et al. (2006) "fitness" é definido como o grau de eficácia de um genótipo em transmitir seus genes para a geração seguinte. Os componentes principais envolvidos são a reprodução e a sobrevivência, que podem ser avaliados utilizando parâmetros como: fertilidade, fecundidade, produção de biomassa larvária, taxa de desenvolvimento, emergência dos adultos, proporção de machos e competitividade para acasalamento.

Alguns experimentos têm sido conduzidos no sentido de liberar machos estéreis de mosquitos no ambiente, como no caso do *Anopheles arabiensis* Patton, 1905 no Sudão (HELINSKI et al., 2008) e *Ae. aegypti* na Inglaterra (CUMBERLAND, 2009). Tais experimentos demonstraram que existem algumas dificuldades a serem solucionadas. Contudo, esses estudos apontam que a SIT é uma ferramenta viável a ser utilizada para combater doenças como a malária e as arboviroses (CUMBERLAND, 2009).

Existem exemplos bem sucedidos da utilização da SIT, como as erradicações da mosca *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) nos EUA, México e em países da América Central (DAME, 1985; SNOW 1987; WYSS, 2000; CUMBERLAND, 2009), da mosca tsetse *Glossina austeni* na ilha de Zanzibar (VREYSEN et al., 2000) e o controle da mosca da fruta do Mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (DYCK et al., 2005).

1.5. PRODUÇÃO EM MASSA DE INSETOS

A capacidade de produzir e manter insetos em condições adequadas e controladas há tempos é considerada necessária para auxiliar nas pesquisas em entomologia. Uma das descobertas mais fascinantes nessa área é a de que os próprios insetos ou produtos derivados dos mesmos podem ser usados para o controle de insetos. O interesse quanto às características do desenvolvimento e do comportamento dos insetos tem crescido cada vez mais entre os cientistas, como, por exemplo, o período entre o tempo de emergência do inseto e sua aptidão para a cópula, ou até que possa depositar os primeiros ovos. Além disso, é importante o entendimento do comportamento em relação a estímulos para acasalamento e para alimentação, além de outras formas de atratividade dos insetos. Uma completa investigação a respeito da fisiologia da espécie a ser controlada é essencial para que estejamos à frente da luta contra os problemas causados por insetos. Além da pesquisa e observações laboratoriais, é crucial a investigação acerca das populações de campo dos insetos (KNIPLING, 1966).

Para que a técnica SIT seja viabilizada, é necessário que haja uma produção em massa da espécie-alvo. De acordo com CHAMBERS (1977), a produção em massa é definida como a produção de insetos competentes para alcançar as metas do programa de controle, com uma relação de custo benefício aceitável e um número de descendentes por geração de números entre dez mil a um milhão de vezes a produtividade média da população nativa de fêmeas. A qualidade do produto, no caso os mosquitos, também é de suma importância para que o programa de controle da espécie-alvo seja bem sucedido.

Algumas técnicas genéticas, como a de Substituição Populacional ou de Supressão Populacional também necessitam que haja produção em massa dos insetos-alvo. Na primeira, pode-se realizar a modificação do código genético de mosquitos de interesse epidemiológico com intuito de torná-los resistentes a patógenos; a segunda baseia-se em causar a morte do mosquito em algum estágio específico do seu ciclo de vida (HANDLER, 2002). Um exemplo desta última técnica é o sistema de Liberação de Insetos Carregando um Gene Letal Dominante (RIDL – *Release* of *Insects* carrying a *Dominant Lethal* gene). Nele, os mosquitos

transgênicos machos possuem como base um gene efetor letal que inviabilizará a prole resultante da cópula com fêmeas selvagens (ALPHEY, 2002).

Outra técnica análoga à SIT, usada para a supressão de populações naturais de artrópodes, é a da Incompatibilidade Citoplasmática, a qual também necessita que haja produção em massa do inseto-alvo e soltura de machos incompatíveis no ambiente (KRAFSUR, 1998; LAVEN, 1967). Nesta técnica, bactérias do gênero *Wolbachia* são utilizadas para causar mortalidade na fase embrionária ou reduzir o tempo de vida de mosquitos vetores de doenças, como o *Cx. pipiens,* quando machos infectados com a bactéria copulam com fêmeas que não são infectadas ou que já possuam outra linhagem de *Wolbachia.* Como machos não infectados podem copular com fêmeas infectadas, a bactéria e seus genes podem rapidamente se espalhar numa população de mosquitos (BOURTZIS et al., 1998, 2003; RASGON e SCOTT, 2003; BIAN et al., 2010). Essas bactérias são utilizadas como condutores para espalhar genes resistentes a doenças em mosquitos, tornando-os refratários, e podem inibir a replicação viral, a disseminação e a transmissão do vírus da dengue em mosquitos *Aedes aegypti* (BIAN G. et al, 2010).

O tempo necessário para a cópula após a emergência do adulto ou a frequência de acasalamento de um inseto podem ser fatores importantes a serem estudados para a aplicação da SIT (KNIPLING, 1966). Machos estéreis utilizados para programas de SIT são geralmente derivados a partir de colônias de insetos que são produzidos em condições de laboratório durante vários anos. Isso pode resultar em divergência genética significativa entre as populações colonizadas e as selvagens (OROZCO-DAVILA et al., 2007). Alguns problemas podem acometer a colônia, tais como endogamia (ARMBRUSTER et al., 2000), o efeito fundador, efeito gargalo, deriva genética e seleção (ex: de comportamentos anômalos para realizar a cópula), que podem induzir uma redução na variabilidade genética, levando a possíveis perdas na aptidão (“fitness”) fisiológica e reprodutiva do inseto (MACKAUER, 1972, 1976; VERNICK et al., 2005).

Ao se estudar a fisiologia de qualquer inseto, um parâmetro essencial a ser considerado é o tamanho corporal. Principalmente em mosquitos, determinações do peso corpóreo podem ser enganosas, exceto ao se considerar o peso seco do mesmo

(BRIEGEL, 2003). De acordo com BLACKMORE e LORD (2000) há uma correlação positiva para o peso de pupas e o tamanho das asas de mosquitos adultos da espécie *Aedes albopictus*. O tamanho do corpo está também associado com muitos componentes do "fitness" de insetos e de mosquitos de importância médica (HONEK, 1993). Também se relaciona com variáveis ecológicas e fisiológicas, tais como fecundidade, longevidade e a quantidade de repasto sanguíneo (SILVER e RANSHAW, 1999). Para que os mosquitos machos adultos mantidos em laboratório tenham eficácia em competir com os machos selvagens, um fator crucial é a boa capacidade de voo (BENEDICT et al., 2009).

Em busca de produção em massa de algum inseto, é fundamental a procura por dietas que garantam as necessidades básicas das larvas. Além disso, os alimentos devem garantir facilidades no preparo, emprego e estocagem. De preferência devem ser utilizados alimentos facilmente disponíveis. São prioridades dietas que promovam um crescimento larval mais rápido, homogêneo, com taxas de sobrevida elevadas que produzam adultos saudáveis (BERGO et al., 1990). Alguns estudos indicam que o estresse larvário causado pela limitação de alimentos em habitats pode afetar a sobrevivência larval, as taxas de crescimento e o "fitness" de adultos (FISH e CARPENTER, 1982; MOGI, 1984; HARAMIS, 1985; HAWLEY, 1985).

Após a emergência dos adultos, os insetos entram num "período de maturação", a fase teneral. Nos mosquitos, esta dura cerca de um dia. Muitos efeitos se dão nessa importante fase, tais como: diferenciação anatômica, maturação comportamental, sistemas digestivo e endócrino, vitelogênese e músculos de voo. As células de gordura corporal de larvas completamente desenvolvidas de mosquitos *Cx. pipiens* possuem gotículas de gorduras e proteínas, além de reservas de glicogênio (BOISSEZON, 1930, 1932). Essas reservas são transportadas até a fase adulta, onde desaparecem na medida em que vão sendo utilizadas (CLEMENTS, 1955). Desta forma, as reservas energéticas adquiridas na fase larvária se tornam fundamentais para a fase adulta (BRIEGEL 1990a, 1990b; FORATTINI, 2002).

1.6. JUSTIFICATIVA

Na cidade de São Paulo, o rio Pinheiros compõe cenário típico onde se somam condições favoráveis para a explosão populacional do *Cx. quinquefasciatus*. As aplicações de larvicidas e adulticidas neste local não influenciam nas frequências de mosquitos adultos (MORAIS, 2006). Com isso, há a elevação do risco de introdução de vírus exóticos, com potencial de gerar processo epidêmico. Dentre as arboviroses salienta-se a possibilidade de introdução do WNV, em nosso país. Estudos apontam o Brasil na rota de migração de aves, as quais podem trazer o risco dessa infecção para nossa realidade (LUNA e PEREIRA, 2003; NATAL e UENO, 2004). Alerta-se para a reprodutividade desse quadro epidemiológico na maioria das cidades brasileiras (NATAL et al., 2004). Um estudo apontou por meio do método ELISA, a presença de anticorpos para o WNV em amostras retiradas de 13 equinos e cinco aves. A presença do vírus em quatro dessas amostras de equinos foi confirmada por outra técnica (PRNT90). Os animais estudados foram coletados numa área entre os biomas do Pantanal e da Amazônia (OMETTO et al., 2013).

Diante do exposto justifica-se esse estudo que visa dois elementos: padronizar uma técnica de produção em massa de *Cx. quinquefasciatus*; e gerar mosquitos que possuam bom desempenho após serem esterilizados, para posteriormente concluir os objetivos de sua soltura, como descreveria CHAMBERS (1977). Por desempenho entende-se obter adultos machos mais aptos, vigorosos e saudáveis, com maiores reservas energéticas. Um aparelho irradiador de raios-X está à disposição do laboratório de pesquisa situado à margem do rio Pinheiros, próximo à sede da EMAE (Empresa Metropolitana de Águas e Energia) para realizar a esterilização dos mosquitos. Após a irradiação dos machos produzidos em laboratório, possivelmente as suas reservas energéticas aumentarão a capacidade dos mosquitos para competir com machos selvagens na busca pelas fêmeas. Dessa forma, esse trabalho forneceria subsídios ao controle integrado populacional do mosquito *Cx. quinquefasciatus* na cidade de São Paulo, especialmente para a técnica SIT. Atualmente não há programas que envolvam a SIT como ferramenta de controle desta espécie no Brasil.

2- OBJETIVOS

2.1. GERAL

Desenvolver técnica para produção em massa de *Culex quinquefasciatus* em laboratório.

2.2. ESPECÍFICOS

- Obter o maior número de mosquitos em condições ideais no menor intervalo de tempo possível;
- Padronizar técnicas de produção eficientes;
- Contribuir para o estudo de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* que poderá ser utilizado como subsídio no controle populacional desta espécie.

3- MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. ÁREAS DE ESTUDO

Em janeiro/2013, foram coletados imaturos (larvas e pupas) de *Cx. quinquefasciatus* diretamente do rio Pinheiros (Figura 2) numa localidade ao lado da Marginal Pinheiros, localizado próximo aos bairros Vila Cruzeiro e Jardim Caravelas, na cidade de São Paulo/SP (S 23º37’58” e W 46º43’02”). O local foi selecionado, visto que, o rio Pinheiros representa um grande e extenso sítio de oviposição para as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* que se abrigam em seu entorno. O Parque Burle Marx, próximo ao local de coleta, possui criadouros em seu interior e apresenta cobertura vegetal para abrigar tais populações. Além disso, possui populações de aves cujo sangue, a exemplo do sangue dos humanos que frequentam ou trabalham no parque, servem como fonte de alimento para os mosquitos. O entorno do rio Pinheiros possui áreas comerciais e residenciais, e apresenta circulação de centenas de milhares de pessoas por dia, que podem servir de alvo para repasto das fêmeas dessa espécie.

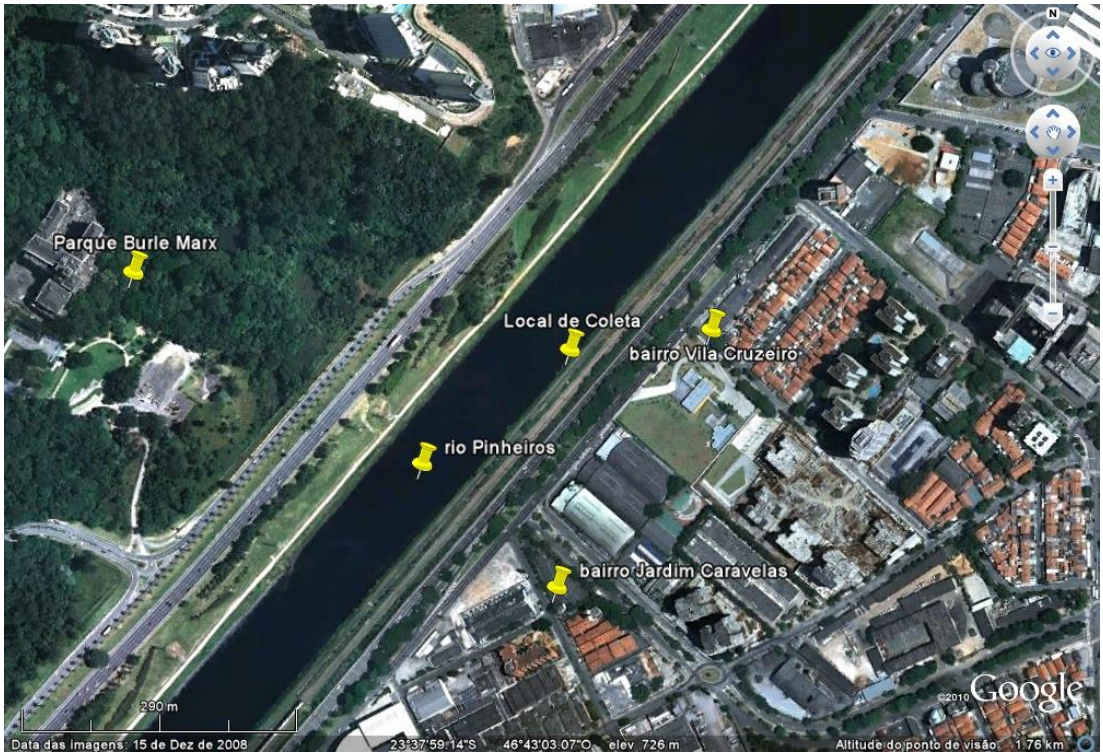

Figura 2: Local de coleta de formas imaturas de *Cx. quinquefasciatus* no Rio Pinheiros, São Paulo/SP, Brasil (Fonte: Google Earth®).

3.2. PROCEDIMENTOS EM CAMPO

Para as coletas no local descrito foram utilizadas conchas entomológicas, que foram mergulhadas no criadouro aproximadamente cinco vezes. Larvas e pupas coletadas foram transferidas com pipetas para potes devidamente etiquetados e em seguida foram transportadas ao laboratório de pesquisa situado na margem do rio Pinheiros. A partir dessa coleta foi estabelecida uma colônia com o objetivo de obter populações geneticamente similares às populações selvagens presentes nas margens do rio Pinheiros para que, futuramente, pupas machos procedentes dessa colônia e submetidas à irradiação resultem em adultos machos estéreis. Quando liberados em campo, estes poderão competir com machos selvagens no acasalamento com fêmeas selvagens, inviabilizando descendentes dessas fêmeas. O local de coleta foi novamente visitado em outubro/2013. Novos imaturos foram coletados e adicionados às larvas e pupas da colônia já estabelecida, para aumentar o número de indivíduos, e evitar efeitos indesejados na colônia, os quais serão discutidos mais adiante. Os

imaturos foram também utilizados como controle no experimento descrito na página 32.

3.3. PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO

3.3.1. Desenvolvimento das larvas e pupas de *Cx. quinquefasciatus* coletadas em campo

A alimentação das larvas coletadas no rio Pinheiros foi realizada diariamente com ração para peixes (Hai Feng Super Red®). As larvas e pupas obtidas foram agrupadas em bacias plásticas contendo 1,5 l de água.

3.3.2. Colônia de mosquitos

Na colônia os mosquitos foram mantidos em temperatura de 27ºC (± 2ºC), umidade relativa aproximada de 70-80% e fotoperíodo (período luminoso) com a duração de 12 horas. Os adultos foram alimentados com solução de sacarose 10% e semanalmente alimentados com sangue de cavalo ou cachorro. O sangue foi obtido por meio de doação junto ao Banco de Sangue Veterinário da USP. As amostras de sangue foram testadas para parasitas e foi comprovada a esterilidade das mesmas. O sangue foi mantido em geladeira, a aproximadamente 4°C até o momento de sua utilização para o repasto sanguíneo.

A alimentação por fonte sanguínea foi realizada por meio de um alimentador artificial (Figura 3), que cicla a água de um banho-maria em temperatura aproximada de 37ºC, além de parafilm® e do sangue. Foram utilizados tubos Falcon (50mL) que tiveram suas tampas modificadas com posterior adição de plástico PVC ou membrana de tripa de porco hidratada. Outros tubos plásticos e espigões de metal devidamente vedados foram conectados aos tubos Falcon. Para a ciclagem da água foi utilizada uma bomba de aquário de 4 W de potência.

Figura 3: Alimentador artificial de mosquitos desenvolvido pelos alunos de pós-graduação da Faculdade de Saúde Pública/USP Marco Jacometto Marchi e Frederico Alves D'Ávila. Laboratório de pesquisa situado na margem do rio Pinheiros, São Paulo, SP.

Quatro dias após o repasto sanguíneo, realizado às escuras por período de duas horas, foi colocado um recipiente contendo água autoclavada no interior de cada uma das gaiolas para que as fêmeas realizassem a postura dos ovos. A água autoclavada serve como estímulo para a eclosão das larvas de forma sincronizada, pois possui uma tensão de oxigênio reduzida (NAYAR 1967, 1968). Após 24 horas os recipientes contendo os ovos (Figura 4) foram retirados das gaiolas e acompanhados até a eclosão das larvas.

Figura 4: Ovos dispostos em jangadas, e larvas de *Cx. quinquefasciatus* obtidas no laboratório de pesquisa situado na margem do rio Pinheiros, São Paulo, SP.

Boa parte das larvas eclodidas foram então coletadas e distribuídas em bacias plásticas contendo 1,5 l de água, utilizadas para a manutenção da colônia; a outra parcela foi separada para a realização dos experimentos explicitados nas páginas 30 a 33. A alimentação das larvas foi realizada diariamente com ração para peixes (Hai Feng Super Red®). As pupas obtidas foram separadas em machos e fêmeas, por meio de um aparelho separador (Figura 5) similar ao utilizado por CARVALHO et al. (2014). Após a emergência os adultos foram colocados em gaiolas entomológicas de 30 cm^3.

Figura 5: Aparelho separador de pupas, mostrando estratificação das pupas de *Cx. quinquefasciatus* (machos menores, mais abaixo; fêmeas maiores, mais acima). Laboratório de pesquisa situado na margem do rio Pinheiros, São Paulo, SP.

3.3.3. Alimentos larvários

Todas as dietas utilizadas na alimentação dos mosquitos cumpriam as especificações nutricionais para o desenvolvimento adequado, por possuírem os componentes básicos necessários para as larvas (DADD e KLEINJAN, 1979; DADD, 1980, 1983; DADD et al., 1987; MERRIT et. al, 1992).

- Ração de peixe (Hai Feng Super Red®)

Composição básica: Farinha de algas marinhas, farinha de soja, lecitina de soja, soro de leite em pó, ácido cítrico, caulim, premix (vitamínico mineral), farinha de peixe, antioxidante, farinha de milho, farinha de trigo, fosfato monocálcico, germen de trigo, L-Lisina, spirulina desidratada.

Níveis de Garantia: Umidade (Máx.) 10%, Cloreto de sódio (máx.) 2%, Extrato Etéreo (mín.) 5%, Matéria Fibrosa (máx.) 4%, Matéria Mineral (máx.) 16%, Proteína Bruta (mín.) 38%.

- Ração de cão (Dogchow® filhotes raças pequenas)

Composição básica: Milho integral moído*, farinha de subprodutos de frango, farelo de glúten de milho*, farelo de soja*, gordura animal estabilizada, farinha de carne e ossos, quirera de arroz, cloreto de sódio (sal comum), fosfato bicálcico, cloreto de potássio, inulina, hidrolisado de fígado de ave e suíno, vitamina E, ácido ascórbico (fonte de vitamina C), cloreto de colina, L-lisina, DL-metionina, corantes (amarelo 5, amarelo 6, vermelho 40, azul 2 e dióxido de titânio), premix vitamínico, premix mineral, antioxidante BHT. *Ingredientes Transgênicos - Espécies doadoras do gene: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus thuringiensis* e *Streptomyces viridochromogenes.*

Níveis de Garantia: Umidade (máx.) 120 g/kg, Proteína Bruta (mín.) 270 g/kg, Extrato Etéreo (mín.) 100 g/kg, Matéria Fibrosa (máx.) 35 g/kg, Matéria Mineral (máx.) 80 g/kg, Cálcio (mín./máx.) 11 g/kg-14 g/kg, Fósforo (mín./máx.) 9.000 mg/kg- 13 g/kg, Potássio (mín.) 5.500 mg/kg, Sódio (mín.) 2.000 mg/kg, Lisina (mín.) 7.000 mg/kg, Metionina (mín.) 4.000 mg/kg, Vitamina E (mín.) 450 UI/kg, Vitamina C (mín.) 70 mg/kg, Inulina (mín.) 3.000 mg/kg.
Enriquecimento por quilograma do produto (mín): Vitamina A (9.000UI), Vitamina D3 (600 UI), Vitamina B1 (3 mg), Vitamina B2 (3 mg), Vitamina B6 (4 mg), Vitamina B12 (20 µg), Niacina (20 mg), Ácido pantotênico (10 mg), Ácido fólico (1 mg), Colina (1.100 mg), Zinco (110 mg), Ferro (70 mg), Cobre (10 mg), Manganês (7 mg), Iodo (1,4 mg), Selênio (0,1 mg).

- Leite em pó (Ninho® fortificado com Ferro, Vitaminas A, C e D)

Composição básica: Leite integral, vitaminas (A, C e D), pirofosfato férrico e emulsificante lecitina de soja (Tabela 1).

Tabela 1: Informação Nutricional de Leite em pó Ninho - porção de 26 g

Quantidade por porção		% VD(*)
Valor energético	130 kcal = 546 kJ	7%
Carboidratos	9,9 g	3%
Proteínas	6,8 g	9%
Gorduras totais	7,0 g	13%
Gorduras saturadas	3,9 g	18%
Gorduras trans	Não contém	(**)
Fibra alimentar	0 g	0%
Sódio	95 mg	4%
Cálcio	246 mg	25%
Ferro	5,2 mg	37%
Vitamina A	225 µg RE	38%
Vitamina D	1,8 µg	36%
Vitamina C	17 mg	38%

(*)% Valores diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ
(**)VD não estabelecido

3.4. EXPERIMENTOS

3.4.1. Experimento A – Desenvolvimento de larvas de *Cx. quinquefasciatus* de 1º instar submetidas a diferentes dietas e temperaturas

Após separar as larvas de 1º instar com auxílio de pipeta e de microscópio estereoscópio (Motic® SMZ-168), estas foram colocadas em quatro bandejas plásticas de medidas iguais (24,5 x 14,5 x 6,0 cm), com a mesma quantidade de água de torneira em cada uma (500 ml). Os experimentos foram realizados conforme descrito na Tabela 2, de forma que em todos os recipientes havia quantidade inicial de 100 larvas de 1º instar em cada um deles. No primeiro deles foi usada a ração de peixe moída da marca Hai Feng Super Red® como alimentação (20 mg/dia). No

segundo recipiente foi testada a ração canina moída da marca Dogchow® (20 mg/dia). No terceiro foi feita uma mistura em partes iguais de ração de peixe e de ração canina moídas, totalizando 20 mg/dia. Por fim, no quarto recipiente, fez-se uma mistura em partes iguais de ração de peixe, ração canina (moídas) e de leite em pó integral da marca Ninho® no total de 20mg/dia. O leite em pó foi escolhido para o estudo, pois agregados de larvas de *Cx. quinquefasciatus* são atraídos à caseína (BARBER et. al, 1983), e esta é uma das proteínas mais abundantes no leite em pó. As temperaturas testadas foram: 27 ± 2°C; 23 ± 2°C; 20 ± 2°C. As larvas dos mosquitos dos recipientes foram alimentadas durante 10 dias consecutivos, desde o início dos experimentos.

Tabela 2: Parâmetros do experimento de dietas larvárias e temperaturas, realizado no Laboratório de pesquisa situado na margem do rio Pinheiros, São Paulo, SP (RP = ração de peixe, RC = ração canina, L = leite em pó).

Recipiente	Dieta	Quantidade de alimento (mg/dia)	Volume d´água (ml)	Altura da coluna d'água (cm)
1	RP	20	500	1,2
2	RC	20	500	1,2
3	RP+RC	20	500	1,2
4	RP+RC+L	20	500	1,2

Nos recipientes utilizados para este experimento, as larvas ficaram numa coluna d'água de aproximadamente 1,2 cm de altura. De acordo com BRIEGEL (2003) esta é uma profundidade adequada para que haja um desenvolvimento considerado ótimo (entre 1 e 2 cm) para larvas de cinco espécies de culicídeos testados (*Cx. pipiens*, *Aedes aegypti* e três espécies de *Anopheles*).

Foram mensurados os dias do início do experimento até a formação das pupas, bem como o tempo para a emergência dos adultos. Após a formação de pupas, estas eram separadas individualmente em copos plásticos (50 ml) e colocadas individualmente em gaiolas entomológicas de 30 cm^3. Logo após a emergência dos adultos nas gaiolas, estes foram colocados em potes plásticos e mortos em freezer (-20°C). Posteriormente, no Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP), esses adultos foram colocados em estufa (60°C) por 48h, e tiveram seus pesos secos mensurados em balança de precisão (Figura 6), individualmente e com três

medições; quando houve divergência nos valores pesados, foi realizada uma média simples para determinar o peso final. Os mosquitos foram então acondicionados em caixas entomológicas contendo naftalina e cristais de sílica, para material testemunho. Foram realizadas três réplicas desse experimento.

Figura 6: Procedimento de pesagem de mosquito *Cx. quinquefasciatus* utilizando balança de precisão, localizada no Instituto de Química (IQ) da USP.

3.4.2. Experimento B – Proporções ideais para desenvolvimento de larvas de 1º instar de *Cx. quinquefasciatus*: densidade larvária/quantidade de alimento/volume e altura d'água

Larvas de 1º instar foram pipetadas e acondicionadas em recipientes com medidas (8,0 x 8,0 x 14,5 cm). As larvas deste experimento foram alimentadas por 10 dias consecutivos, desde o início dos experimentos. A temperatura utilizada neste experimento foi de 27 ± 2°C. A ração utilizada foi a de peixe (Hai Feng Super Red®). Seguiram-se os procedimentos descritos no último parágrafo da página 31 para a obtenção do peso seco dos mosquitos. Os diferentes tratamentos foram comparados com o controle, no qual os imaturos foram coletados diretamente do rio Pinheiros e mantidos em água do rio, sem adição de alimentos. O controle foi

mantido na mesma temperatura e umidade que os outros recipientes/tratamentos. As proporções utilizadas nos tratamentos estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros do experimento de proporções ideais, realizado no Laboratório de pesquisa situado na margem do rio Pinheiros, São Paulo, SP.

Recipiente	Quantidade de larvas (L1)	Quantidade de alimento (mg/dia)	Volume d'água (ml)	Altura da coluna d'água (cm)
A	50	10	50	1,1
B	50	10	100	2,1
C	50	10	250	4,6
D	50	05	100	2,1
E	50	20	100	2,1
F	20	10	100	2,1
G	100	10	100	2,1

3.5. TRATAMENTO DOS DADOS

Análise de variância paramétrica (ANOVA) e análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis (H) foram utilizadas objetivando:

Verificar diferença significante ($p<0,05$) em relação ao peso seco dos machos e fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujos imaturos (larvas e pupas) foram submetidas a três variações de temperatura (27 ± 2ºC, 23 ± 2ºC e 20 ± 2ºC) e, cujas larvas que originaram esses mosquitos adultos receberam alimentação distinta por tratamento.

Verificar diferença significante ($p<0,05$) na mortalidade de imaturos de *Cx. quinquefasciatus*, mantidos a 27 ± 2ºC, cujas larvas foram alimentadas com ração de peixe, em relação a três volumes distintos de água (50 ml, 100 ml e 250 ml), de experimento realizado em triplicata.

Verificar diferença significante ($p<0,05$) na mortalidade de imaturos de *Cx. quinquefasciatus*, mantidos a 27 ± 2ºC, em volume de 100 ml, quando as larvas são submetidas a três dietas distintas e diárias (5mg, 10mg e 20mg).

A análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis (H) só foi utilizada quando não foi possível obter a normalidade e homocedasticidade de variância em relação à distribuição dos dados que se objetivava comparar.

Em todas as ocasiões em que se obteve ANOVA significante ($p<0,05$) foi realizado o teste de pós-hoc de Tukey com o objetivo, na comparação duas a duas entre as variáveis, encontrar qual teria sido "responsável" pela significância desse teste de inferência estatística.

As análises para os experimentos de dietas larvárias foram também realizadas separando as pupas conforme os dias de duração das mesmas nesse estágio e comparando os valores de peso seco de adultos pareados para cada ração (usando o teste t de Student pareado), numa determinada temperatura.

Para comparar o peso seco de machos e fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas e pupas submetidas a distintos tratamentos em relação ao controle, foi utilizado o teste t de Student com nível de significância de 5% ($p<0,05$), em função da normalidade e homogeneidade de variância dos dados.

Os dados foram organizados e tratados com a utilização da planilha do Excel 2007 da Microsoft Office e analisados por meio do programa BioEstat versão 5.0.

4- RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados mostram dois experimentos em que adultos machos e fêmeas da espécie *Cx. quinquefasciatus*, procedentes de larvas e pupas submetidas a tratamentos distintos, com relação à dieta larvária, variações de temperatura, variações de volume de água contida nos recipientes utilizados em laboratório como criadouro foram verificadas quanto ao peso seco. Também foi verificado o tempo de formação das pupas desde a eclosão das larvas e a mortalidade das formas imaturas submetidas aos diferentes tratamentos.

4.3. EXPERIMENTO A - DIETAS LARVÁRIAS E TEMPERATURAS

4.3.1. Dietas larvárias

As análises para os experimentos de dietas larvárias foram realizadas por meio da separação das pupas conforme os dias de duração das mesmas nesse estágio e a comparação dos valores de peso seco de adultos pareados para cada ração (usando o teste t de Student), numa determinada temperatura; depois se unificaram esses valores e compararam-se os valores de peso secos das rações entre si (usando análise paramétrica de ANOVA), também para cada temperatura.

4.3.1.1. Análises das dietas

4.3.1.1.1. Machos

- 27 ± 2°C

A Figura 7 apresenta a distribuição dos pesos secos dos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 27 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares, adultos machos de *Cx. quinquefasciatus*, derivados das formas imaturas submetidas às dietas ração de peixe, ração canina, mistura de ração de peixe

e canina (P+C) e mistura de ração de peixe, canina e leite em pó (P+C+L) foram respectivamente: 0,3636 ± 0,0139; 0,4086 ± 0,0261; 0,2998 ± 0,0143 e 0,3138 ± 0,0156. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que existe diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) com 3 graus de liberdade (g.l.) ($F= 7,7383$; $p< 0,001$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que as comparações entre a ração de peixe com a mistura P+C, bem como a ração canina comparada às dietas P+C e P+C+L foram as responsáveis pela diferença estatística significante da ANOVA.

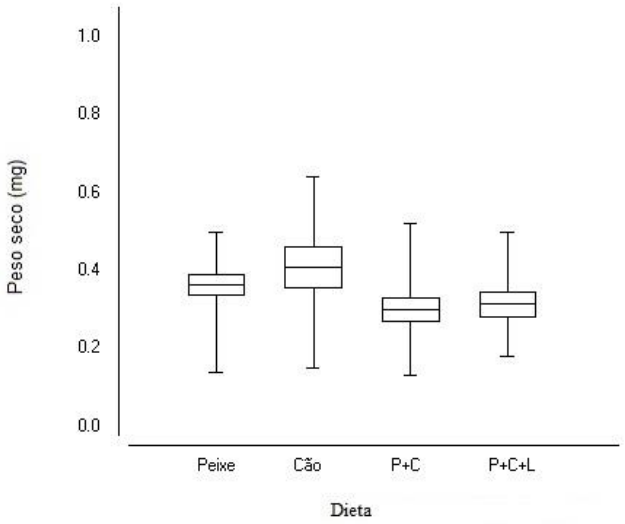

Figura 7: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas mantidas a partir de diferentes dietas, mantidas em temperatura 27 ± 2°C. [P+C= mistura de ração de peixe e ração canina; P+C+L= mistura de ração de peixe, ração canina e leite em pó].

- 23 ± 2°C

A Figura 8 apresenta a distribuição dos pesos secos dos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 23 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram submetidas às dietas ração de peixe, ração canina, mistura de ração de peixe e canina (P+C) e mistura de ração de peixe, canina e leite em pó (P+C+L) foram respectivamente: 0,3984 ± 0,0184; 0,3431 ± 0,0158; 0,3875 ± 0,0138 e 0,3521 ± 0,0114. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que houve diferença estatística significante ($p<0,05$), com 3 g.l. ($F= 3,1615$; $p= 0,0258$), entre as

diferentes dietas para essa temperatura. O teste pós-hoc de Tukey mostrou que a ração de peixe comparada à ração canina foi a responsável pela diferença estatística significante de ANOVA.

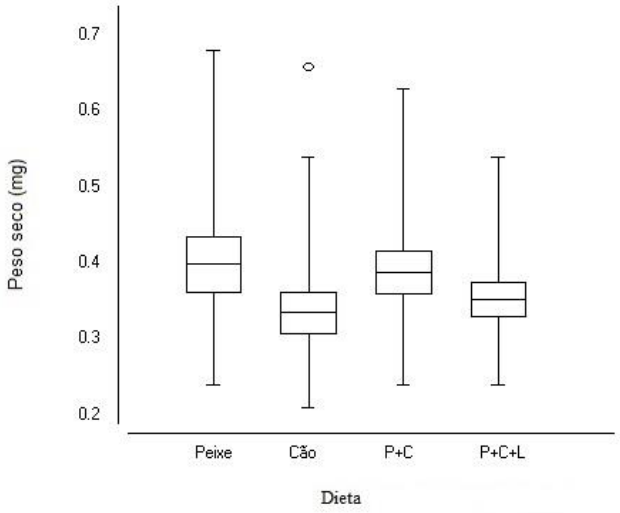

Figura 8: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas mantidas a partir de diferentes dietas, mantidas em temperatura 23 ± 2°C. [P+C= mistura de ração de peixe e ração canina; P+C+L= mistura de ração de peixe, ração canina e leite em pó].

- 20 ± 2°C

A Figura 9 apresenta a distribuição dos pesos secos dos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 20 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram submetidas às dietas ração de peixe, ração canina, mistura de ração de peixe e canina (P+C) e mistura de ração de peixe, canina e leite em pó (P+C+L) foram respectivamente: 0,4040 ± 0,0108; 0,3789 ± 0,0109; 0,4568 ± 0,0141 e 0,4775 ± 0,0145. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que existe diferença estatística significante ($p<0,05$) com 3 g.l. ($F= 13,5177$; $p<0,001$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou a ração de peixe comparada às outras duas dietas (P+C e P+C+L), bem como a ração canina comparada às outras duas dietas (P+C e P+C+L) foram as responsáveis pela diferença estatística significante da ANOVA.

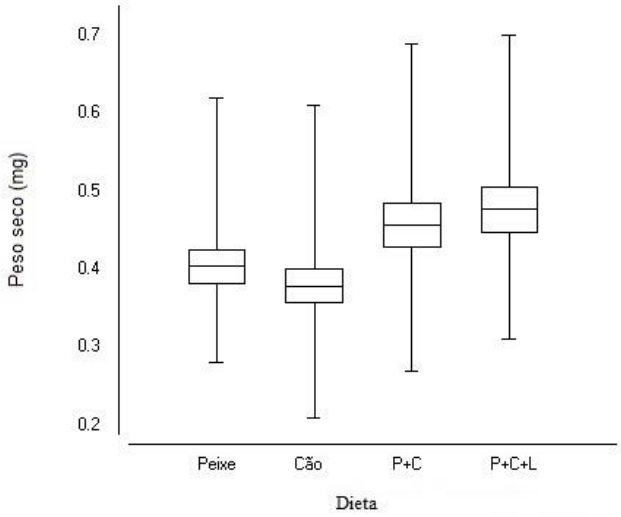

Figura 9: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas mantidas a partir de diferentes dietas, mantidas em temperatura 20 ± 2°C. [P+C= mistura de ração de peixe e ração canina; P+C+L= mistura de ração de peixe, ração canina e leite em pó].

4.3.1.1.2. Fêmeas

- 27 ± 2°C

A Figura 10 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 27 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram submetidas às dietas ração de peixe, ração canina, mistura de ração de peixe e canina (P+C) e mistura de ração de peixe, canina e leite em pó (P+C+L) foram respectivamente: 0,5000 ± 0,0292; 0,6076 ± 0,0224; 0,6229 ± 0,0332 e 0,6224 ± 0,0304. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que existe diferença estatística significante ($p<0,05$) com 3 g.l. ($F= 4,0806$; $p= 0,0088$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que as comparações entre a ração de peixe com as três outras rações e misturas foram duas a duas, as responsáveis pela diferença estatisticamente significante da ANOVA.

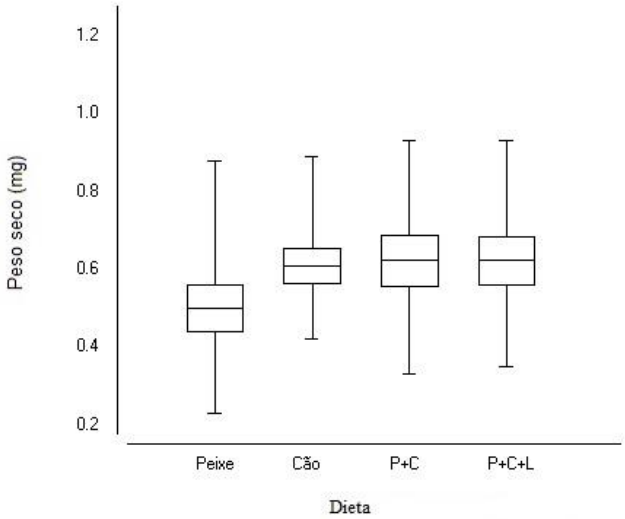

Figura 10: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas mantidas a partir de diferentes dietas, mantidas em temperatura 27 ± 2°C. [P+C= mistura de ração de peixe e ração canina; P+C+L= mistura de ração de peixe, ração canina e leite em pó].

- 23 ± 2°C

A Figura 11 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 23 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram submetidas às dietas ração de peixe, ração canina, mistura de ração de peixe e canina (P+C) e mistura de ração de peixe, canina e leite em pó (P+C+L) foram respectivamente: 0,7042 ± 0,0237; 0,6396 ± 0,0219; 0,7287 ± 0,0282 e 0,7198 ± 0,0208. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que existe diferença estatística significante ($p<0,05$) com 3 g.l. ($F= 3,131$; $p= 0,027$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que as comparações entre a ração canina e a mistura de ração de peixe e canina foram as responsáveis pela diferença estatística significante da ANOVA.

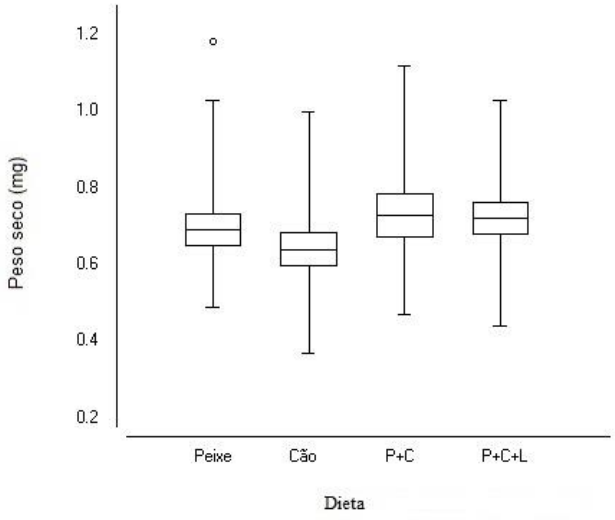

Figura 11: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas mantidas a partir de diferentes dietas, mantidas em temperatura 23 ± 2°C. [P+C= mistura de ração de peixe e ração canina; P+C+L= mistura de ração de peixe, ração canina e leite em pó].

.

- 20 ± 2°C

A Figura 12 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 20 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram submetidas às dietas ração de peixe, ração canina, mistura de ração de peixe e canina (P+C) e mistura de ração de peixe, canina e leite em pó (P+C+L) foram respectivamente: 0,7993 ± 0,0260; 0,7419 ± 0,0299; 0,7239 ± 0,0256 e 0,8057 ± 0,0289. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que não houve diferença estatística significante ($p>0,05$), com 3 g.l. ($F= 2,1941$; $p= 0,089$), entre as diferentes dietas para essa temperatura.

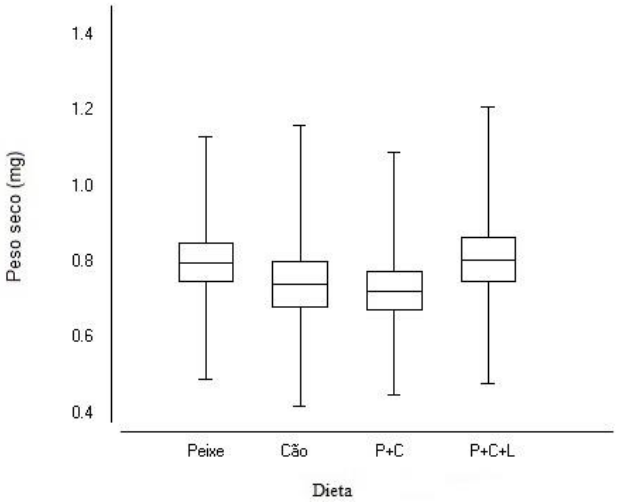

Figura 12: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas mantidas a partir de diferentes dietas, mantidas em temperatura 20 ± 2°C. [P+C= mistura de ração de peixe e ração canina; P+C+L= mistura de ração de peixe, ração canina e leite em pó].

4.3.1.2. Análise dos pesos secos de adultos conforme o tempo de duração do período pupal

4.3.1.2.1. Machos

A figura 13 apresenta a distribuição dos pesos secos dos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 27 ± 2°C e submetidas a diferentes dietas larvárias. Verificou-se se houve diferença estatística significante entre o peso seco dos adultos quando pareados conforme os dias de duração de seus períodos no estágio de pupa, para cada tipo de dieta.

Nota-se que a média para os adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos de pupas cujas larvas receberam ração de peixe foi maior para aqueles que emergiram em um dia (P1) comparado aos que emergiram em dois dias (P2) de desenvolvimento no estágio de pupa. A média no primeiro caso foi de (0,3989 ± 0.0082) e a de P2 foi de (0,3076 ± 0,0291) (figura 13). No entanto o teste t de Student pareado demonstrou que houve diferença estatística significante ($p<0,05$) entre peso seco de adultos para as pupas que se desenvolveram ao longo dos dias,

com 16 g.l (t= 2.7537; p= 0,0141) e com 95% de intervalo de confiança (IC) igual a [0,0211 a 0,1624].

Com relação ao peso dos adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* oriundos de pupas cujas larvas se alimentaram de ração canina observa-se na figura 13, que o peso dos que se desenvolveram em um dia (C1) foi superior ao peso dos que se desenvolveram em dois dias (C2) de desenvolvimento no estágio de pupa, respectivamente com média e erro de (0,4713 ± 0,0572) e (0,3729 ± 0,0211). Contudo, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante (p>0,05) com 7g.l. (t=1,19980; p= 0,2692). O IC (95%) foi de [-0,0716 a 0,2191].

Para o peso dos adultos machos que se originaram de pupas cujas larvas receberam como dieta a mistura de rações de peixe e canina, verifica-se na figura 13 que, o peso dos que emergiram em um dia de desenvolvimento no estágio de pupa (PC1), a exemplo do experimento anterior, também superou o peso das que emergiram após dois dias nesse estágio (PC2), com média e erro de (0,3777 ± 0,0181) e (0,2660 ± 0,0154). O teste t de Student pareado mostrou diferença estatística muito significante com 12 g.l (t=4,9965; p<0,0001) e no IC (95%) igual a [0,0655 a 0,1668].

Para a mistura de rações de peixe, canina e leite em pó, observa-se na figura 13 que o peso dos machos de *Cx. quinquefasciatus* procedentes de pupas cujas larvas que se alimentaram dessa dieta, também apresentaram média maior no primeiro dia de desenvolvimento (PCL1) comparada à média daqueles que emergiram de pupas com duração de dois dias (PCL2) nesse mesmo estágio. Respectivamente, a média e o erro padrão foram de (0,4100 ± 0,0324) e (0,2842 ± 0,0135). Neste caso, o teste t de Student pareado mostrou que a diferença entre as médias foi significante (p<0,05). O valor de t com 7 g.l. foi de (t=3,0874; p=0,0176) com IC(95%) de [0,0281 a 0,2119].

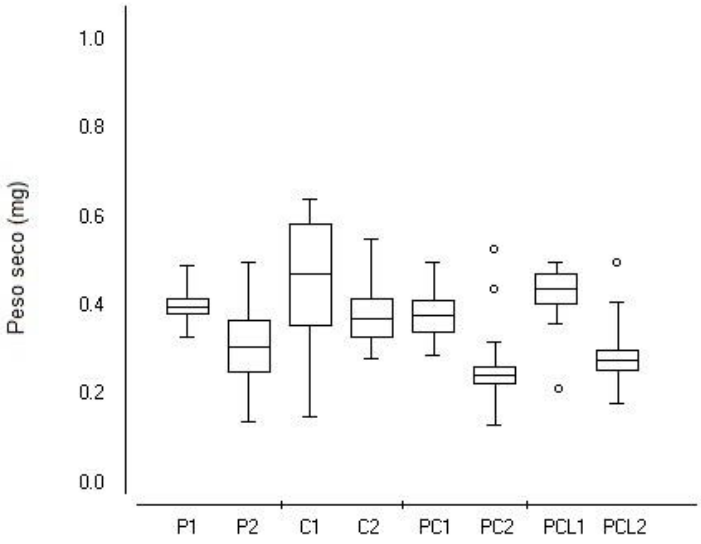

Figura 13: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos conforme o período de duração das pupas, que foram produzidas a partir de diferentes dietas e mantidas em temperatura 27 ± 2°C. [P1= machos emergidos após 1 dia, produzidos com ração de peixe; P2= machos emergidos após 2 dias, produzidos com ração de peixe; C1= machos emergidos após 1 dia, produzidos com ração canina; C2= machos emergidos após 2 dias, produzidos com ração canina; PC1= machos emergidos após 1 dia, produzidos com mistura de rações de peixe e canina; ; PC2 machos emergidos após 2 dias, produzidos com mistura de rações de peixe e canina; PCL1= machos emergidos após 1 dia, produzidos com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó; PCL2= machos emergidos após 2 dias, produzidos com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó].

- 23 ± 2°C

A figura 14 apresenta a distribuição dos pesos secos dos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 23 ± 2°C, e foram submetidas a quatro diferentes dietas larvárias. Verificou-se se houve diferença estatística significante entre o peso seco dos adultos quando pareados conforme o período de duração no estágio de pupa, para cada tipo de dieta.

Quando se comparou o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos de pupas cujas larvas receberam ração de peixe submetida a 23 ± 2ºC (figura 14) verificou-se que a média de peso seco dos adultos que se formaram após dois dias (P2) de duração no período de pupa foi inferior à média dos que duraram três dias (P3) nesse estágio. O valor da média respectivamente para cada

experimento, com seu erro padrão foi de (0,4325 ± 0,0761) e (0,3944 ± 0,0189). Contudo, o teste t de Student pareado revelou que essa diferença não foi significante ao nível de 5% com 3 g.l foi de (t= 1,9314; p= 0,1489), com IC (95%) de [-0,0793 a 0,3243].

Observa-se na figura 14 que a média para o peso seco dos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos de pupas cujas larvas se alimentaram de ração de cão, foi maior no experimento em que as pupas tiveram período de desenvolvimento de três dias (C3) comparado à média dos que tiveram pupas com dois dias de duração (C2) nesse mesmo estágio, e foram respectivamente de (0,3724 ± 0,0193) e (0,2764 ± 0,0144). O teste t de Student pareado revelou que essa diferença foi significante (p<0,05) com 10 g.l (t= - 2.9591; p= 0.0143) com IC (95%) igual a [-0.0845 a –0.0119].

No caso em que as larvas receberam a dieta de ração de peixe misturada com a de cão, a média do peso seco dos machos emergidos das pupas que duraram dois dias nessa fase (PC2) foi maior comparada à média do peso seco dos adultos cujas pupas duraram três dias (PC3), e as médias e erros padrão foram de (0,4325 ± 0,0189) e (0,3830 ± 0,0149) respectivamente. Contudo o teste t Student pareado com 3 g.l não foi significante (p<0,05) ao nível de 5% (t= 2,4715; p= 0,0899) com IC (95%) igual a [-0,0280 a 0,2230].

Da mesma forma, o peso seco de adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* oriundos de larvas alimentadas com dieta de ração de peixe, de cão e leite em pó apresentaram peso seco maior nos oriundos de pupas que tiveram tempo de desenvolvimento de dois dias (PCL2) comparados aos originados de pupas desenvolvidas em três dias (PCL3). A média e erro padrão para o peso seco dos machos em cada um dos experimentos foi de (0,3822 ± 0,0316) e (0,3441 ± 0,0117). No entanto o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante ao nível de 5% (α = 0.05) (t=1.2260; p= 0,2550) com 8 g.l e IC (95%) igual a [-0,0431 a 0,1408].

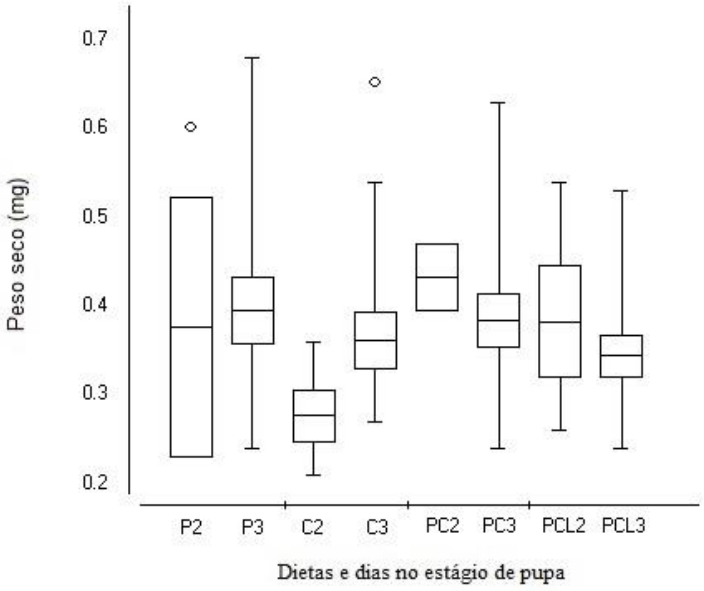

Figura 14: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos conforme o período de duração das pupas, que foram produzidas a partir de diferentes dietas e mantidas em temperatura 23 ± 2°C. [P2= machos emergidos após 2 dias, produzidos com ração de peixe; P3= machos emergidos após 3 dias, produzidos com ração de peixe; C2= machos emergidos após 2 dia, produzidos com ração canina; C3= machos emergidos após 3 dias, produzidos com ração canina; PC2= machos emergidos após 2 dias, produzidos com mistura de rações de peixe e canina; ; PC3 machos emergidos após 3 dias, produzidos com mistura de rações de peixe e canina; PCL2= machos emergidos após 2 dias, produzidos com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó; PCL3= machos emergidos após 3 dias, produzidos com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó].

- 20 ± 2°C

A figura 15 apresenta a distribuição dos pesos secos dos machos de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 20 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. Foi verificado se houve diferença estatística significante entre o peso seco dos adultos quando pareados conforme os dias de duração dos seus períodos de pupa, para cada tipo de dieta.

Conforme a figura 15 nota-se que a média do peso seco dos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos de pupas cujas larvas receberam dieta de ração de peixe e as pupas tiveram período de desenvolvimento no decorrer de três dias (P3) foi maior comparado ao peso dos nos quais as pupas levaram quatro dias (P4) para se desenvolverem. A média e o erro padrão de cada um foram, respectivamente,

(0,41046 ± 0,0140) e (0,3893 ± 0,0155). O teste t de Student pareado revelou que essa diferença foi significante ($p<0,05$) com 14 g.l ($t= 2,4653$; $p= 0,0272$) com IC (95%) igual a [0,0064 a 0.0923].

Ainda de acordo com a figura 15 nota-se que a média do peso seco dos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos de pupas cujas larvas receberam dieta de ração canina e as pupas tiveram período de desenvolvimento no decorrer de três dias (C3) foi maior quando se comparou com a média do peso seco dos emergidos de pupas que apresentaram tempo de desenvolvimento de quatro dias (C4). A média e o erro registrado para cada um dos experimentos foi respectivamente de (0,3992 ± 0,0124) e (0,3260 ± 0,0161). O teste t de Student pareado indicou que houve diferença estatística significante ($p<0,01$) com 5% de significância. O teste t com 14 g.l foi igual a ($t= 3,9595$; $p= 0,0014$). O IC (95%) foi de [0,0431 a 0,1449].

O peso seco dos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos de pupas cujas larvas receberam dieta de ração de peixe e canina e que as pupas tiveram período de desenvolvimento no decorrer de três dias (PC3) teve média maior comparado ao peso seco dos emergidos de pupas com tempo de desenvolvimento de quatro dias (PC4), conforme a figura 15. A média e o erro padrão do peso desses machos foram respectivamente de (0,4848 ± 0,0184) e (0,4000 ± 0,0186). O teste t de Student ($t = 2,7556$; $p = 0,0147$) foi significante com 15 g.l., ($p<0,05$) e IC (95%) de [0,0143 a 0,1119].

Conforme a figura 15, o peso seco dos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos de pupas cujas larvas receberam dieta de ração de peixe, canina e leite em pó nos quais as pupas tiveram período de desenvolvimento no decorrer de três dias (PCL3) teve média maior comparado ao peso seco daqueles emergidos de pupas com tempo de desenvolvimento de quatro dias (PC4). As médias de peso seco e erro padrão foram respectivamente para PCL3 e PCL4 de (0,5027 ± 0,0192) e (0,4382 ± 0,0198). No entanto, a diferença entre essas médias não foi significante com t de Student pareado revelando um valor de ($t= 1,5941$; $p= 0,1304$) com 16 g.l e IC (95%) igual a [-0,0165 a 0,1165].

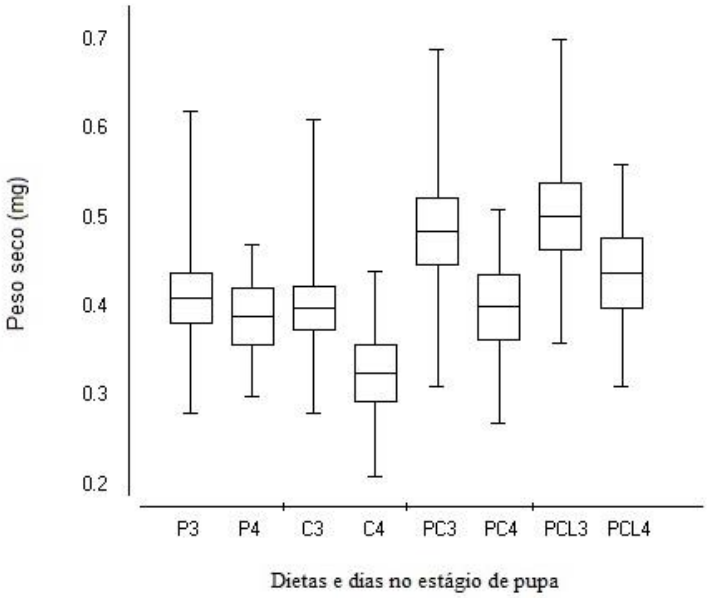

Figura 15: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* emergidos conforme o período de duração das pupas, que foram produzidas a partir de diferentes dietas e mantidas em temperatura 20 ± 2°C. [P3= machos emergidos após 3 dias, produzidos com ração de peixe; P4= machos emergidos após 4 dias, produzidos com ração de peixe; C3= machos emergidos após 3 dias, produzidos com ração canina; C4= machos emergidos após 4 dias, produzidos com ração canina; PC3= machos emergidos após 3 dias, produzidos com mistura de rações de peixe e canina; ; PC4 machos emergidos após 4 dias, produzidos com mistura de rações de peixe e canina; PCL3= machos emergidos após 3 dias, produzidos com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó; PCL4= machos emergidos após 4 dias, produzidos com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó].

4.3.1.2.2. Fêmeas

- 27 ± 2°C

A figura 16 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 27 ± 2°C, e foram submetidas a quatro diferentes dietas larvárias. Foi verificado se houve diferença estatística significante entre o peso seco dos adultos quando pareados entre os dias de duração de seus períodos pupais, conforme cada tipo de dieta.

Observou-se que a média do peso seco das fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas receberam ração de peixe foi maior para aquelas em que as pupas tiveram período de desenvolvimento em um dia (P1) comparado às que tiveram dois dias de desenvolvimento nesse estágio (P2). A média e erro padrão no

primeiro caso foram de (0,5917 ± 0,0746) e do segundo foram de (0,4750 ± 0,0299) (figura 16). No entanto o teste t de Student pareado demonstrou que não houve diferença estatística significante (p>0,05) entre peso seco de adultos para as pupas que se desenvolveram ao longo dos dias, com 5 g.l (t= 2,0968; p= 0,09) e com IC (95%) igual a [-0,0388 a 0,3822].

Com relação ao peso seco das fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* oriundos de larvas que se alimentaram de ração canina, observa-se na figura 16 que o peso seco das que se desenvolveram em um dia (C1) na fase de pupa foi superior ao peso das que se desenvolveram em dois dias (C2) nesse mesmo estágio, respectivamente com média e erro padrão de (0,6160 ± 0,0733) e (0,6058 ± 0,0234). Contudo, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante (p>0,05) com 4 g.l. (t= -0,3897; p= 0,7166). O IC (95%) foi de [-0,3574 a 0,2694].

Para o peso das fêmeas adultas que se originaram de larvas que receberam como dieta a mistura de rações de peixe e canina, verifica-se na figura 16 que, o peso das que emergiram após dois dias na fase de pupa (PC2) superou o peso das que emergiram após um dia (PC1) nesse estágio, e tiveram respectivamente médias e erros padrão de (0,6420 ± 0,0439) e (0,5882 ± 0,0494). No entanto, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante (p>0,05) com 10 g.l. (t= 0,6558; p= 0,5268). O IC (95%) foi de [-0,0872 a 0,1599].

Para a mistura de rações de peixe, canina e leite em pó, se observa na figura 16 que o peso das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* procedentes de larvas que se alimentaram dessa dieta apresentou média maior após um dia desenvolvimento nessa fase (PCL1) comparada à média das que emergiram de pupas com dois dias de duração nesse estágio (PCL2). Respectivamente, a média e o erro padrão foram de (0,7480 ± 0,0488) e (0,5910 ± 0,0327). Neste caso, o teste t de Student pareado mostrou que a diferença entre as médias foi significante (p<0,05). O valor de t com 4 g.l. foi de (t= 5,3300; p= 0,0060) com IC (95%) = [0,1466 a 0,4654].

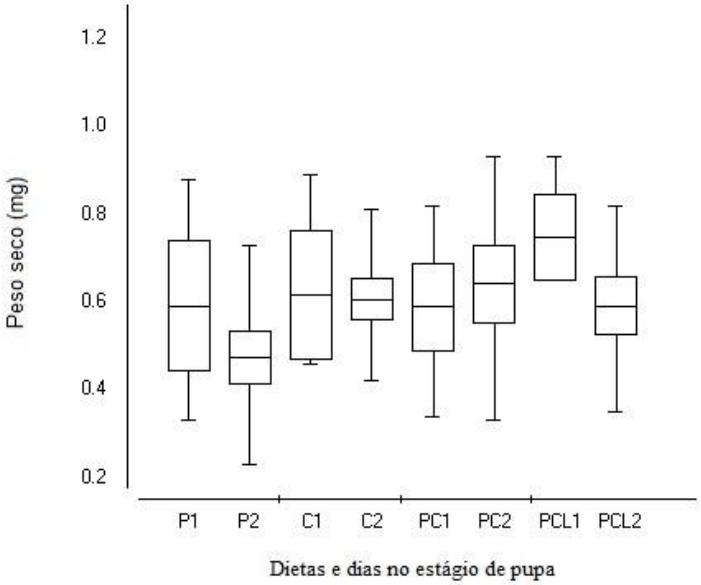

Figura 16: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* emergidas a partir do período de duração das pupas, que foram produzidas a partir de diferentes dietas e mantidas em temperatura 27 ± 2°C. [P1= fêmeas emergidas após 1 dia, produzidas com ração de peixe; P2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com ração de peixe; C1= fêmeas emergidas após 1 dia, produzidas com ração canina; C2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com ração canina; PC1= fêmeas emergidas após 1 dia, produzidas com mistura de rações de peixe e canina; ; PC2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com mistura de rações de peixe e canina; PCL1= fêmeas emergidas após 1 dia, produzidas com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó; PCL2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó].

- 23 ± 2°C

A figura 17 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 23 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. Foi averiguado se havia diferença estatística significante entre o peso seco dos adultos quando pareados conforme os dias de duração dos seus períodos de pupa, para cada tipo de dieta.

Observou-se que a média do peso seco para as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* emergidas de larvas que receberam ração de peixe foi maior para aquelas que emergiram em três dias após a formação das pupas (P3) comparado à média das que emergiram após dois dias (P2) de desenvolvimento nesse estágio. A média no primeiro caso foi de (0,7139 ± 0,0261) e a do segundo foi de (0,6400 ± 0,0460) (figura 17). No entanto o teste t de Student pareado demonstrou que não houve diferença estatística significante ($p>0,05$) entre peso seco de adultos para as

pupas que se desenvolveram ao longo dos dias, com 4 g.l (t= 1,6444; p= 0,1754) e com IC (95%) igual a [-0,0261 a 0,1021].

Com relação ao peso seco das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* oriundos de larvas se alimentaram de ração canina observa-se na figura 16, que o peso seco das que se desenvolveram em três dias após a formação das pupas (C3) foi superior ao peso das que se desenvolveram em dois dias (C2), respectivamente com média e erro de (0,6562 ± 0,0226) e (0,5962 ± 0,0527). Entretanto, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante (p>0,05) com 12 g.l. (t= 1,5089; p= 0,1571). O IC (95%) de confiança foi igual a [-0,0321 a 0,1767].

Para o peso das fêmeas cujas larvas receberam como dieta a mistura de rações de peixe e canina, verifica-se na figura 17 que o peso das que emergiram em três dias (PC3) após a formação das pupas superou o peso das que emergiram em dois dias (PC2) com média e erro de (0,7438 ± 0,0325) e (0,6600 ± 0,0448). Neste caso, o teste t de Student pareado mostrou que a diferença entre as médias foi significante (p<0,05). O valor de t com 6 g.l. foi de (t= 3,2413; p= 0,0176) com IC (95%) de [0,0315 a 0,2256].

Para a mistura de rações de peixe, canina e leite em pó, se observa na figura 17 que o peso das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas que se alimentaram dessa dieta foi maior nas que emergiram em três dias (PCL3) após a formação das pupas superou o peso das que emergiram em dois dias (PCL2). Respectivamente, a média e o erro padrão foram de (0,7303 ± 0,0260) e (0,6946 ± 0,0340). Contudo, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante (p>0,05) com 12 g.l. (t= 1,9244; p= 0,0783). O IC (95%) foi igual a [-0,0090 a 0,1443].

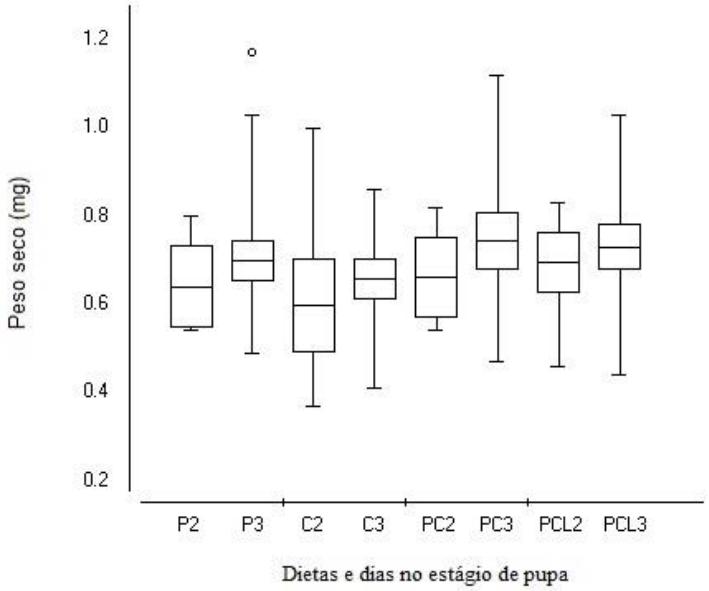

Figura 17: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* emergidas a partir do período de duração das pupas, que foram produzidas a partir de diferentes dietas e mantidas em temperatura 23 ± 2°C. [P2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com ração de peixe; P3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com ração de peixe; C2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com ração canina; C3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com ração canina; PC2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com mistura de rações de peixe e canina; ; PC3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com mistura de rações de peixe e canina; PCL2= fêmeas emergidas após 2 dias, produzidas com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó; PCL3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó].

- 20 ± 2°C

A figura 18 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram mantidas em temperatura 20 ± 2°C, e foram submetidas a diferentes dietas larvárias. Foi verificado se havia diferença estatística significante entre o peso seco dos adultos quando pareados entre os dias de duração de seus períodos pupais, conforme cada tipo de dieta.

Observou-se que a média para as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas receberam ração de peixe foi maior para aquelas que emergiram em quatro dias (P4) após a formação das pupas, comparadas às que tiveram três dias (P3) de desenvolvimento nesse estágio. A média no primeiro caso foi de (0,8375 ± 0,0842) e a do segundo foi de (0,7913 ± 0,0265), como se pode observar na figura 18. Neste caso, o teste t de Student pareado mostrou que a diferença entre as médias foi

significante ($p<0,05$). O valor de t com 7 g.l. foi de ($t= -2,4004$; $p= 0,0474$) com IC (95%) igual a [-0,4864 a -0,0036].

Com relação ao peso seco das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas se alimentaram de ração canina, observa-se na figura 18 que o peso das que se desenvolveram em três dias (C3) após a formação das pupas foi superior ao peso das que se desenvolveram em quatro dias (C4) nessa fase, respectivamente com média e erro de (0,7703 ± 0,0328) e (0,6480 ± 0,0635). Contudo, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante ($p>0,05$) com 9 g.l. ($t= -1,1101$; $p= 0,2957$). O IC (95%) foi de [-0,2582 a 0,0882].

Para o peso das fêmeas cujas larvas receberam como dieta a mistura de rações de peixe e canina, verifica-se na figura 18 que o peso das que emergiram em três dias (PC3) após a formação das pupas superou o peso das que emergiram em quatro dias (PC4) com média e erro de (0,7682 ± 0,0353) e (0,6400 ± 0,0259). Neste caso, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante ($p>0,05$) com 14 g.l. ($t= 0,9676$; $p= 0,3496$). O IC (95%) foi de [-0,0511 a 0,1351].

Para a mistura de rações de peixe, canina e leite em pó, observa-se na figura 18 que o peso das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas se alimentaram dessa dieta apresentou média maior no terceiro dia (PCL3) após a formação das pupas comparado às fêmeas que se desenvolveram em quatro dias (PCL4) nesse estágio. Respectivamente, a média e o erro padrão foram de (0,8392 ± 0,0339) e (0,7264 ± 0,0491). Entretanto, o teste t de Student pareado indicou que essa diferença não foi significante ($p>0,05$) com 10 g.l. ($t= 0,3761$; $p= 0,7147$). O IC (95%) foi de [-0,0851 a 0,1196].

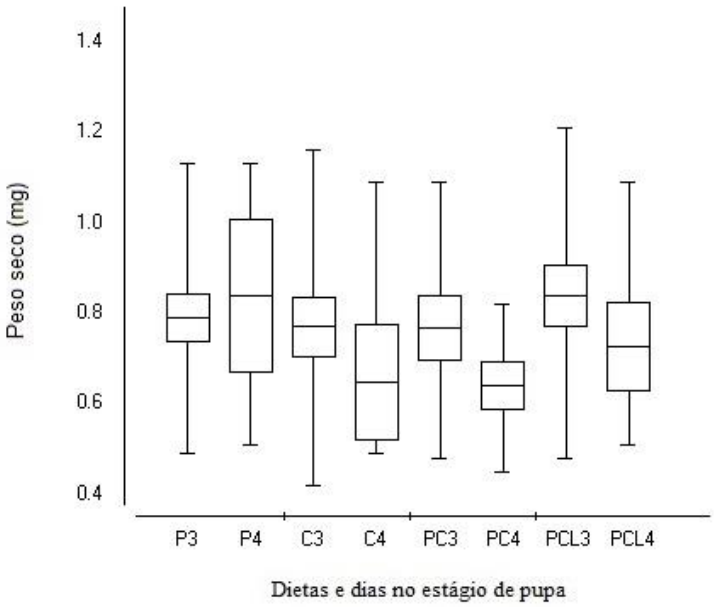

Figura 18: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* emergidas a partir do período de duração das pupas, que foram produzidas a partir de diferentes dietas e mantidas em temperatura 20 ± 2°C. [P3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com ração de peixe; P4= fêmeas emergidas após 4 dias, produzidas com ração de peixe; C3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com ração canina; C4= fêmeas emergidas após 4 dias, produzidas com ração canina; PC3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com mistura de rações de peixe e canina; ; PC4= fêmeas emergidas após 4 dias, produzidas com mistura de rações de peixe e canina; PCL3= fêmeas emergidas após 3 dias, produzidas com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó; PCL4= fêmeas emergidas após 4 dias, produzidas com mistura de rações de peixe, canina e leite em pó].

4.3.2. Temperaturas

4.3.2.1. Machos

A figura 19 apresenta a distribuição dos pesos secos de mosquitos machos, provenientes de larvas alimentadas com ração de peixe e submetidas, assim como na fase de pupas, a três variações de temperatura. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* derivados das formas imaturas supracitadas, submetidas às temperaturas de 27 ± 2°C, 23 ± 2°C e 20 ± 2°C foram respectivamente: 0,3636 ± 0,0139; 0,3984 ± 0,0184 e 0,4040 ± 0,0108. Apesar da temperatura 20 ± 2°C apresentar a maior média de pesos secos (figura 19), a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, com dois graus de liberdade

(2 g.l.), (H = 2,440; p= 0,295) mostrou que não há diferença estatística significante (p>0,05) entre as médias dos pesos secos dos exemplares machos.

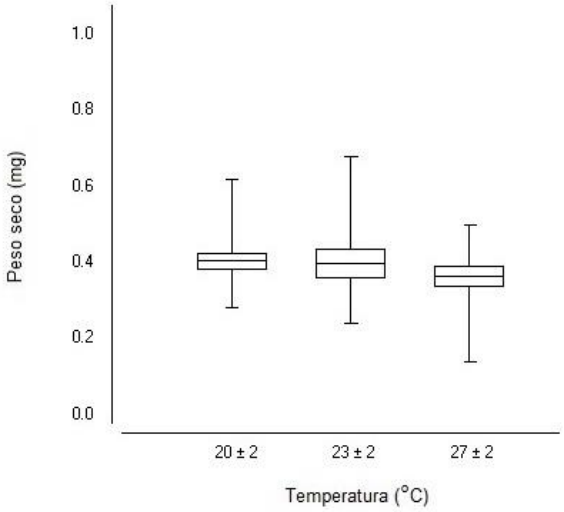

Figura 19: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de larvas mantidas a partir de dieta de ração de peixe, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

Com relação, a distribuição dos pesos secos de mosquitos machos de *Cx. quinquefasciatus* procedentes de larvas alimentadas com ração de cão que juntamente com suas pupas foram submetidas a três variações de temperatura (Figura 20), nota-se que os machos, cujas formas imaturas foram submetidas à temperatura de 27 ± 2ºC apresentaram peso seco maior com média e erro padrão igual a (0,4086 ± 0,026), quando comparados aos machos cujas formas imaturas foram submetidas às temperaturas de 23 ± 2°C (0,3431 ± 0,0158) e 20 ± 2°C (0,3789 ± 0,0109). A análise de variância paramétrica ANOVA, mostrou que essa diferença foi significante (p<0,05) com 2 g.l. (F= 3.485; p= 0,033). A análise pós-hoc de Tukey mostrou que a comparação das médias do peso seco dos machos submetidos a temperaturas de 27 ± 2ºC e 23 ± 2ºC com p<0,05 foram os responsáveis pela significância da ANOVA.

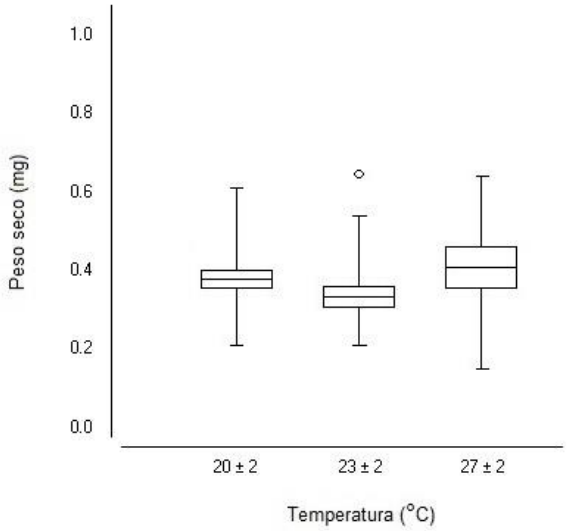

Figura 20: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas foram mantidas a partir de dieta de ração de cão, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

A figura 21 apresenta a distribuição dos pesos secos de mosquitos machos oriundos de larvas alimentadas com mistura de rações de peixe e de cão e submetidas, assim como na fase de pupas, a três variações de temperatura. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* derivados das formas imaturas supracitadas, submetidas às temperaturas de 27 ± 2°C, 23 ± 2°C e 20 ± 2°C foram respectivamente: 0,2998 ± 0,0143; 0,3875 ± 0,0138 e 0,4568 ± 0,0141. A ANOVA mostrou que existe diferença estatística muito significante entre essas médias com 2 g.l (F= 31,1421; p<0,0001). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que, todas as comparações, duas a duas, das médias dos pesos das formas imaturas, submetidas as três variações de temperatura foram responsáveis pela análise significante de ANOVA.

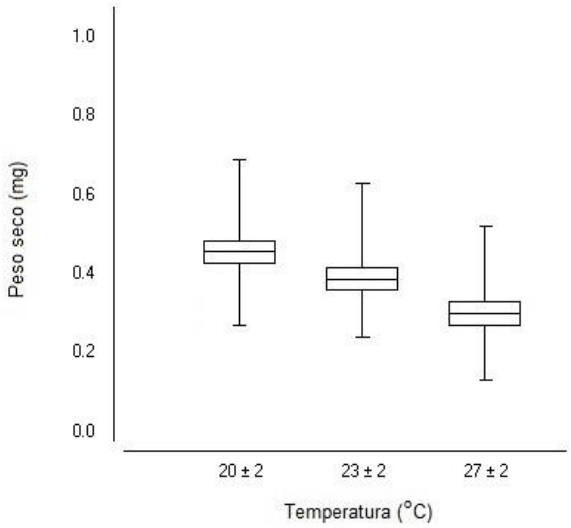

Figura 21: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas foram mantidas com dieta de mistura de rações de peixe e de cão, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

A figura 22 apresenta a distribuição dos pesos secos de mosquitos machos cujas larvas foram alimentadas com mistura de rações de peixe e de cão e leite em pó e foram, assim como na fase de pupas, submetidas a três diferentes variações de temperatura. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos machos de *Cx. quinquefasciatus* derivados das formas imaturas supracitadas, submetidas às temperaturas de 27 ± 2°C, 23 ± 2°C e 20 ± 2°C foram respectivamente: 0,3138 ± 0,0156; 0,3521 ± 0,0114 e 0,4775 ± 0,0145. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que existe diferença estatística muito significante com 2g.l. ($F= 38,1220$; $p<0,0001$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que, a comparação entre os pesos médios das formas imaturas submetidas a 27 ± 2°C com os submetidos a 20 ± 2°C, bem como, a comparação dos pesos secos dos submetidos a temperaturas de 23 ± 2°C com 20 ± 2°C, foram os responsáveis pela diferença significante com $p<0,05$ de ANOVA.

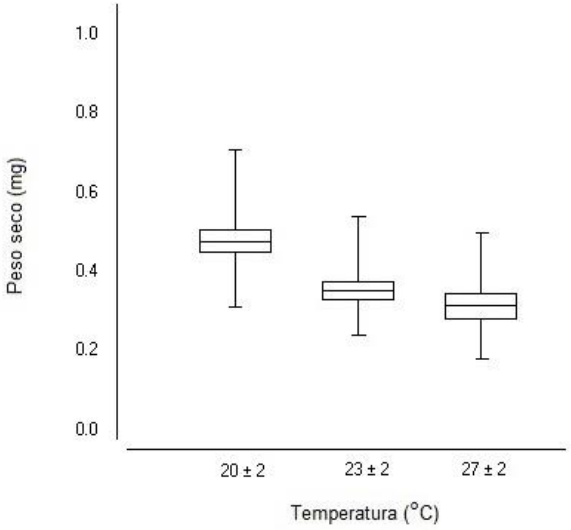

Figura 22: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de machos de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas foram mantidas a partir de dieta de mistura de rações de peixe, cão e leite em pó, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

4.3.2.2. Fêmeas

A figura 23 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram alimentadas com ração de peixe e submetidas, da mesma forma que as pupas, a três diferentes variações de temperatura. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* derivados das formas imaturas supracitadas, submetidas às temperaturas de 27 ± 2°C, 23 ± 2°C e 20 ± 2°C foram respectivamente: 0,5000 ± 0,0292; 0,7042 ± 0,0237e 0,7993 ± 0,0260. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que existe diferença estatística muito significante com 2 g.l. (F= 30,221 ; p<0,0001). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que as comparações duas a duas entre todas as três variações de temperatura foram responsáveis pela diferença estatisticamente significante da ANOVA.

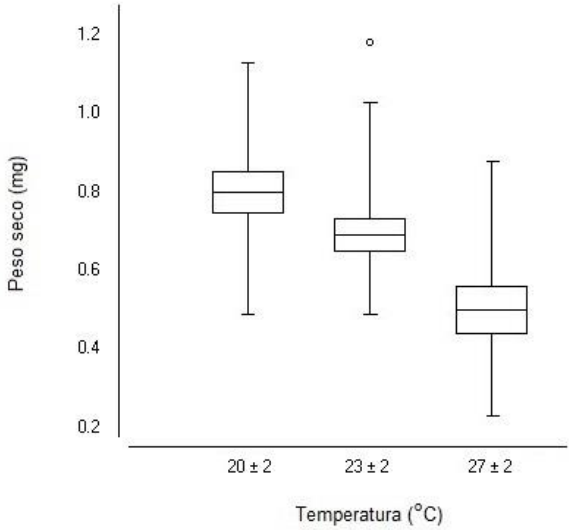

Figura 23: Box-plot com médias e erro padrão para peso seco de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas receberam dieta de ração de peixe, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

A figura 24 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas foram alimentadas com ração de cão, e assim como as pupas, submetidas a três diferentes temperaturas. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* derivados das formas imaturas supracitadas, submetidas às temperaturas de 27 ± 2°C, 23 ± 2°C e 20 ± 2°C foram respectivamente: 0,6076 ± 0,0224; 0,6396 ± 0,0219 e 0,7419 ± 0,0299. A análise de variância paramétrica ANOVA mostrou que a diferença entre as médias de peso das fêmeas procedentes das formas imaturas submetidas as três variações de temperatura foi significante com 2 g.l (F= 7,168; p= 0,002). O teste pós-hoc de Tukey apontou que essa diferença estatisticamente significante é devida a comparação entre as médias dos pesos secos para as temperaturas de 27 ± 2°C com 20 ± 2°C e de 23 ± 2°C com 20 ± 2°C, todas significantes ($p<0,05$).

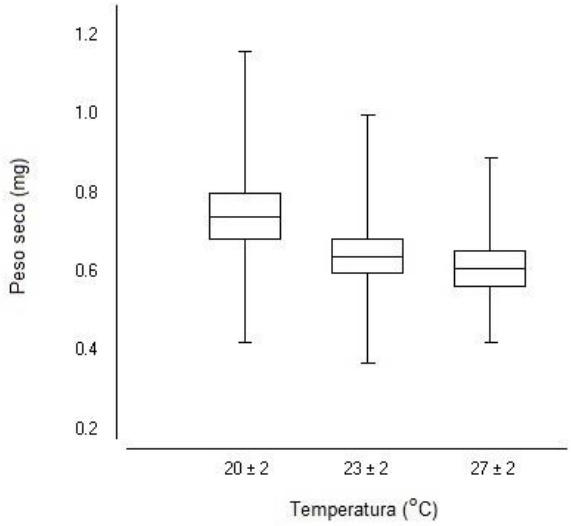

Figura 24: Box-plot com médias e erro padrão para o peso seco de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* oriundas de larvas que receberam dieta de ração de cão, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

A figura 25 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas foram alimentadas com mistura de rações de peixe e de cão, e submetidas, da mesma forma que as pupas, a três variações de temperatura. Observa-se que a média dos imaturos submetidos à temperatura de 23 ± 2°C (0,7287 ± 0,0282) foi maior comparado aos submetidos à temperatura 27 ± 2°C (0,6229 ± 0,0332) e à temperatura 20 ± 2°C (0,7239 ± 0,0256). A análise ANOVA mostrou que existe diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) quando se compara as médias do peso seco das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* submetidas a este tratamento, com 2 g.l. ($F= 3,889$; $p= 0,023$). O teste pós-hoc de Tukey apontou que essa diferença significante é devida, a comparação das médias dos pesos das fêmeas, cujos imaturos foram submetidos a 27 ± 2°C contra 23 ±2°C e 27 ± 2°C contra 23 ± 2°C, cujas comparações evidentemente mostraram-se significantes.

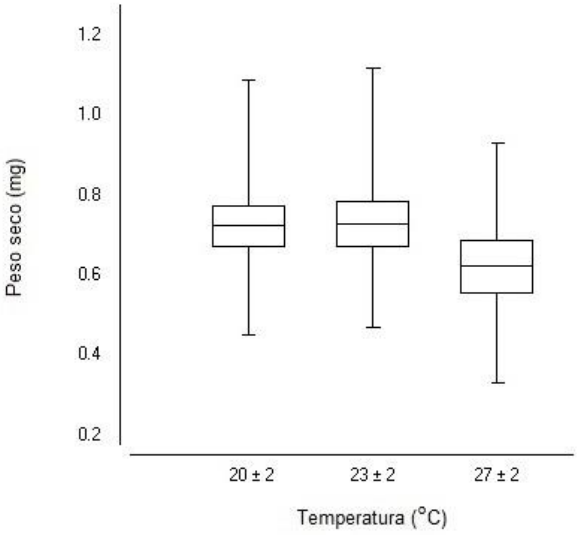

Figura 25: Box-plot com médias e erro padrão para peso seco das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cujas larvas receberam dietas de mistura de rações de peixe e de cão, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

A figura 26 apresenta a distribuição dos pesos secos das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, cujas larvas foram alimentadas com mistura de rações de peixe e de cão e leite em pó e, assim como a fase de pupas, submetidas a três variações de temperatura. A média e o erro padrão para o peso seco dos exemplares adultos fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* derivados das formas imaturas supracitadas, submetidas às temperaturas de 27 ± 2°C, 23 ± 2°C e 20 ± 2°C foram respectivamente: 0,6224 ± 0,0304; 0,7198 ± 0,0208 e 0,8057 ± 0,0289. A análise de variância paramétrica ANOVA, mostrou haver diferença estatística muito significante entre os pesos secos das fêmeas submetidas ao tratamento supracitado nas diferentes variações de temperatura. Essa diferença com 2 g.l. foi de ($F= 10,482$; $p= 0,0002$). O teste pós-hoc de Tukey indicou que todas as comparações para o tratamento nas três variações de temperatura, duas a duas, foram significantes ($p<0,05$) e, portanto foram responsáveis pela diferença significante de ANOVA.

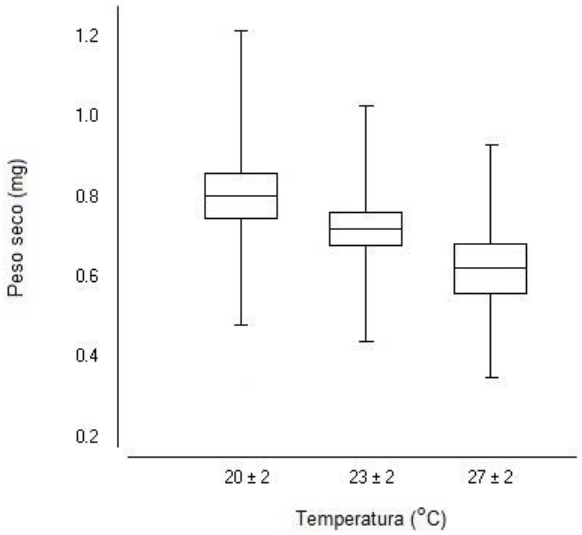

Figura 26: Box-plot com médias e erro padrão para peso seco de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* cuja larvas receberam dieta de mistura de rações de peixe, cão e leite em pó, e assim como as pupas, submetidas a três variações de temperatura.

4.3.3. Tempo de desenvolvimento das larvas até obtenção de pupas de *Cx. quinquefasciatus*

- 27 ± 2°C

A figura 27 mostra os gráficos de tempo de formação das pupas após o início de cada experimento. Todas as dietas apresentaram o maior pico de formação de pupas entre os dias 7 e 9 após o início dos experimentos. Todas também apresentaram um segundo pico de formação de pupas, correspondendo ao dia 12, e apresentando um declínio no número de formação das pupas após esse dia, até chegarem a zero. A mortalidade dos imaturos para cada dieta específica foi: ração de peixe (19%), ração para cão (40%), mistura de rações de peixe e cão (12%) e mistura de peixe, cão e leite em pó (25%).

As pupas que se desenvolveram em menor período de tempo, 19 dias, tiveram como dieta a ração de peixe; as que se desenvolveram em maior período, 24 dias, foram aquelas submetidas à mistura de peixe, cão e leite em pó. Foi realizada a análise de variância ANOVA para verificar se havia relação entre a quantidade de

pupas e o tempo de formação delas para as diferentes dietas testadas. No entanto, não foi constatada diferença estatística significante (p>0,05) entre as amostras (F= 0,205; p= 0,892) para 3 graus de liberdade (g.l.). A ração de peixe foi a que apresentou o maior número de pupas (69) formadas entre os doze primeiros dias desde o início dos experimentos (período que compreende os dois maiores picos de formação das pupas para todas as dietas), seguido pela dieta com mistura de rações de peixe e cão (63), pela mistura de rações de peixe, de cão e leite em pó (60) e por fim a ração canina (57).

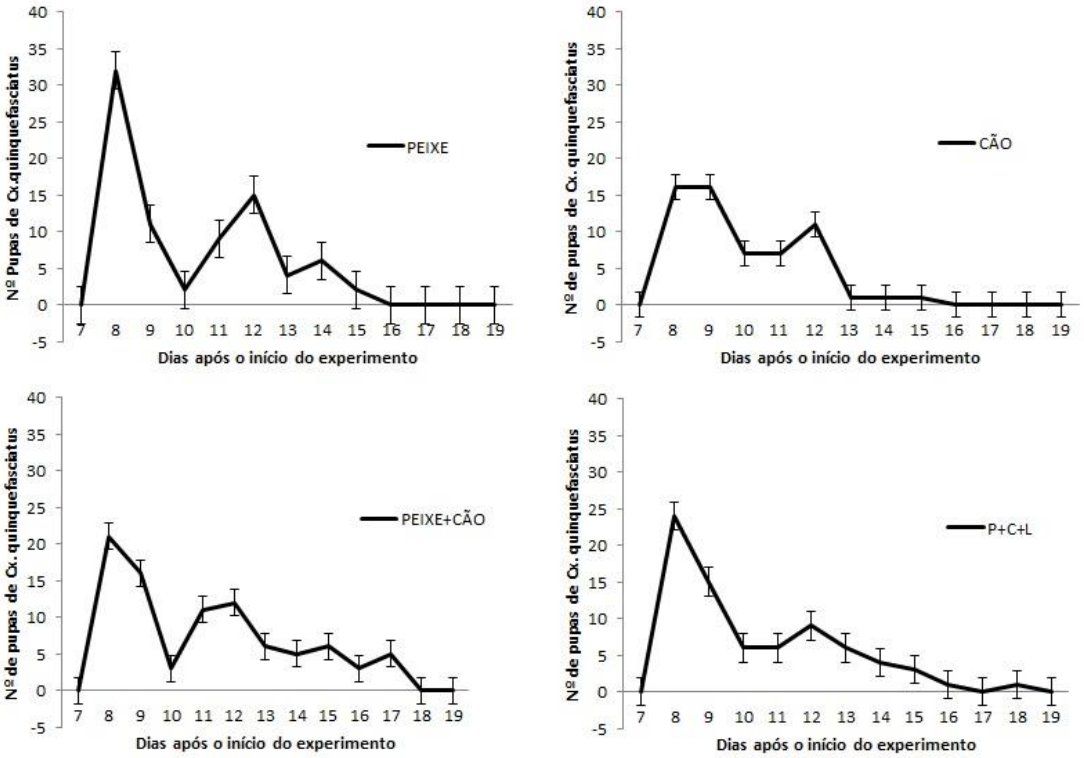

Figura 27: Número de pupas de *Cx. quinquefasciatus* formadas após o início de cada experimento, conforme diferentes tipos de dieta para a temperatura 27 ± 2°C. (Peixe+Cão= mistura de rações de peixe e de cão; P+C+L= mistura de rações de peixe, canina e leite em pó).

- 23 ± 2°C

A figura 28 mostra os gráficos de tempo de formação das pupas após o início de cada experimento. Todas as dietas apresentaram um primeiro pico de formação de pupas entre os dias 7 e 8 após o início dos experimentos e um período grande de pupas formadas entre os dias 7 e 14, com declínio posteriormente. A mortalidade dos

imaturos para cada dieta específica foi: ração de peixe (6%), ração para cão (4%), mistura de rações de peixe e cão (11%) e mistura de peixe, cão e leite em pó (1%).

As pupas que se desenvolveram em menor período de tempo, 18 dias, tiveram como dieta a ração de peixe; as que se desenvolveram em maior período foram aquelas submetidas a ração de cão e também a mistura de peixe, cão e leite em pó, ambos os tratamentos se desenvolvendo em 20 dias. Foi realizado um teste de ANOVA para verificar se havia relação entre a quantidade e o tempo de formação de pupas para as diferentes dietas. No entanto, não foi constatada diferença estatística significante ($p>0,05$) entre as amostras ($F= 0,041$; $p= 0,988$) para 3 graus de liberdade (g.l.). A ração de peixe foi a que apresentou o maior número de pupas (86) formadas entre os 14 primeiros dias desde o início dos experimentos (período que compreende o maior número de formação das pupas para todas as dietas), seguido pela dieta com mistura de rações de peixe e cão e leite em pó (84), pela mistura de rações de peixe e de cão (79) e por fim a ração canina (71). No entanto, se considerarmos os 15 primeiros dias de formação das pupas, a mistura de ração de peixe, cão e leite em pó supera a ração de peixe, em número de pupas, sendo 94 e 88, respectivamente.

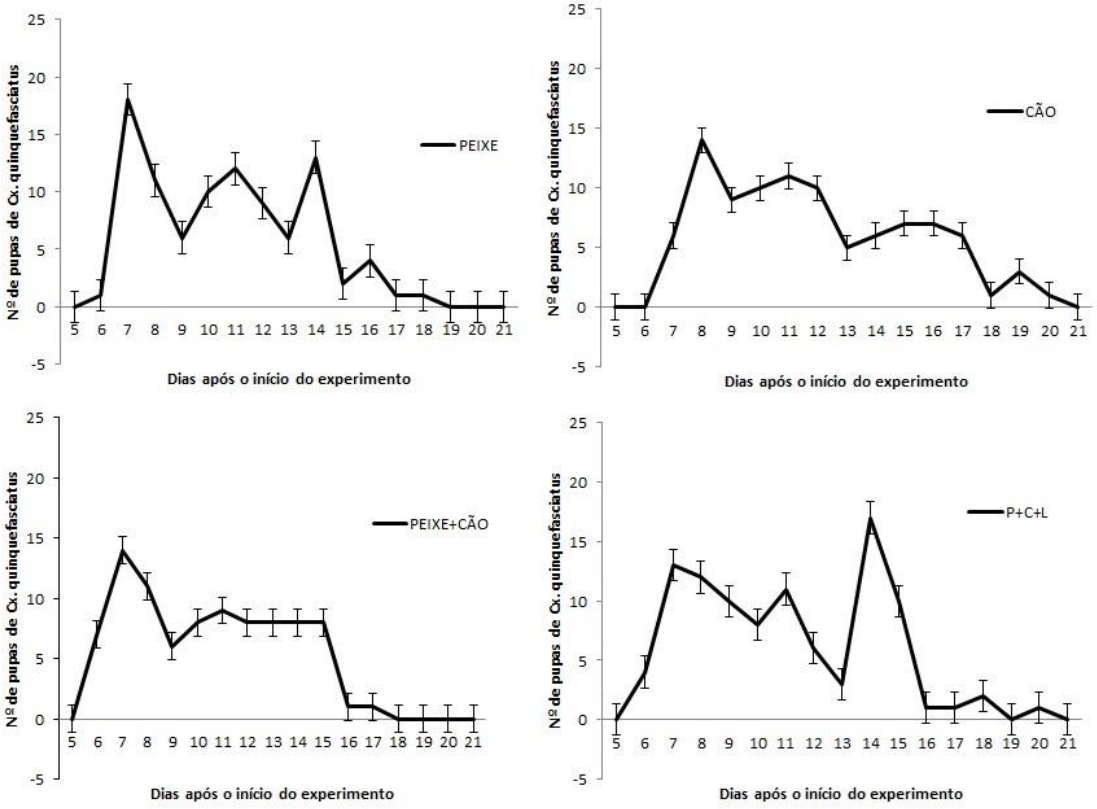

Figura 28: Número de pupas de *Cx. quinquefasciatus* formadas após o início de cada experimento, conforme diferentes tipos de dieta para a temperatura 23 ± 2°C. (Peixe+Cão= mistura de rações de peixe e de cão; P+C+L= mistura de rações de peixe, canina e leite em pó).

- 20 ± 2°C

A figura 29 mostra os gráficos de tempo de formação das pupas após o início de cada experimento. Todas as dietas apresentaram um primeiro pico de formação de pupas entre os dias 11 e 12 após o início dos experimentos e também um 2º pico entre os dias 16 e 17, declinando após esse período. A mortalidade dos imaturos para cada dieta específica foi: ração de peixe (3%), ração para cão (3%), mistura de rações de peixe e cão (8%) e mistura de peixe, cão e leite em pó (19%).

As pupas que se desenvolveram em menor período de tempo, 20 dias, tiveram como dieta a ração de peixe e a ração canina; as que se desenvolveram em maior período foram aquelas submetidas à dieta de mistura de rações de peixe e cão, as quais se desenvolveram em 24 dias. Foi realizada a análise de variância paramétrica ANOVA para verificar se havia relação entre a quantidade de pupas e o tempo de formação das mesmas para as diferentes dietas. No entanto, não foi constatada diferença estatística significante ($p>0,05$) entre as amostras ($F= 0,08$; $p= 0,97$) para 3

g.l. A ração canina foi a que apresentou o maior número de pupas (94) entre os 18 primeiros dias desde o início dos experimentos (período que compreende o maior número de formação das pupas para todas as dietas), seguido pela ração de peixe (93) e pela mistura de rações de peixe e cão (78) e, por fim, a mistura das rações de peixe, ração canina e leite em pó (70).

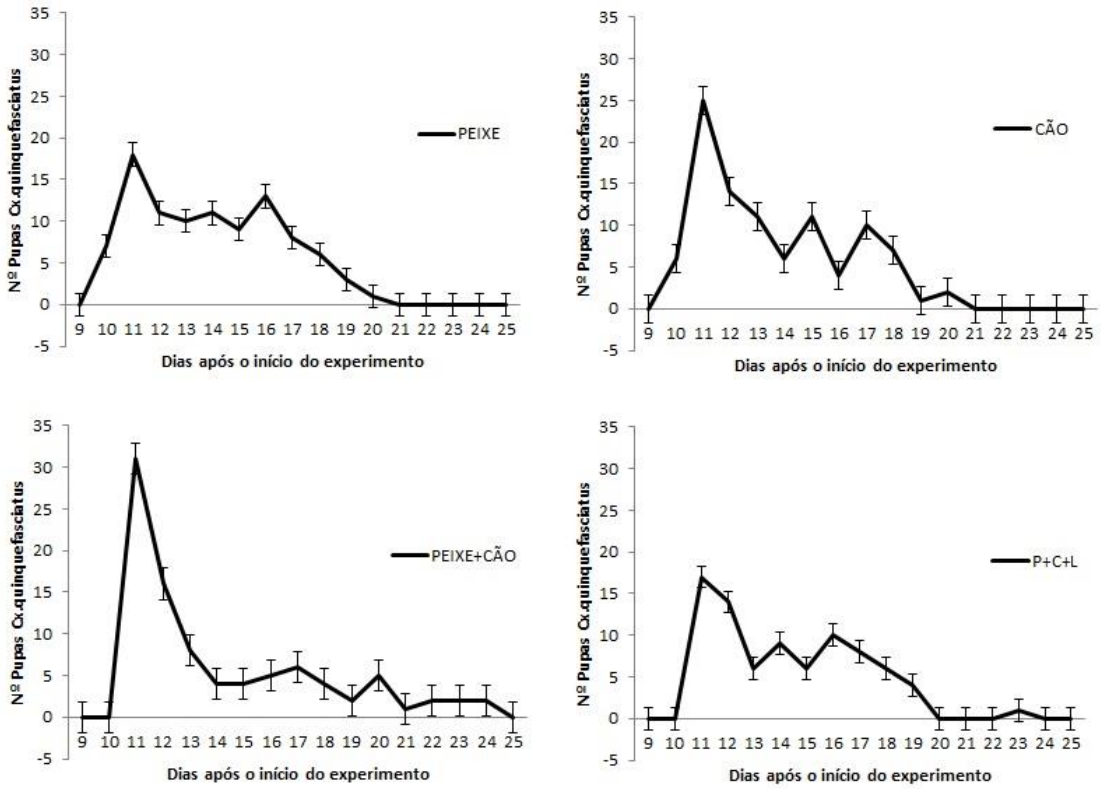

Figura 29: Número de pupas de *Cx. quinquefasciatus* formadas após o início de cada experimento, conforme diferentes tipos de dieta para a temperatura 20 ± 2°C. (Peixe+Cão= mistura de rações de peixe e de cão; P+C+L= mistura de rações de peixe, canina e leite em pó).

4.4. EXPERIMENTO B - PROPORÇÕES IDEAIS: DENSIDADE LARVÁRIA/QUANTIDADE DE ALIMENTO/VOLUME E ALTURA D'ÁGUA

4.4.1. Mortalidade dos imaturos nos tratamentos

A figura 30 mostra a mortalidade de formas imaturas submetidas à temperatura de 27 ± 2º C, cujas larvas receberam ração de peixe como alimentação e que foram mantidas juntamente com as pupas, até completar o seu ciclo aquático, em três volumes diferentes de água em triplicata. Observa-se que, em média o percentual de mortalidade foi maior na primeira réplica para os imaturos submetidos a 50 ml. Na segunda réplica a maior mortalidade foi registrada para os imaturos submetidos a 100 ml. Já na terceira réplica, aparentemente foi registrada a mesma proporção de mortalidade para os imaturos submetidos a 50 e 250 ml. No entanto, a análise de variância de ANOVA ($F= 0,464$; $p= 0,653$) registrou que não houve diferença estatística significante ($p>0,05$) entre as médias dos tratamentos.

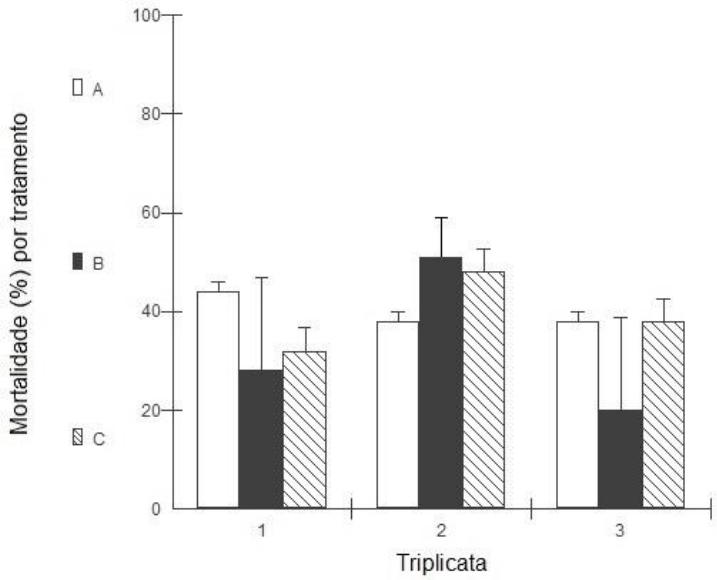

Figura 30: Média e erro padrão da mortalidade (%) de imaturos (50 L1) de *Cx. quinquefasciatus* mantidos com ração de peixe (10 mg/dia) a partir de diferentes tratamentos com volumes d'água diferentes [A= 50 ml; B= 100 ml; C= 250 ml], com três triplicatas, em temperatura 27 ± 2°C.

A figura 31 registra a mortalidade dos imaturos de diferentes tratamentos de proporções ideais. As larvas de *Cx. quinquefasciatus* mantidas a temperatura de 27 ± 2º C e, em volume de 100 ml receberam três distintas proporções diárias em miligramas de ração de peixe (B=10mg/dia, D=5mg/dia, E=20mg/dia), em triplicata. Observa-se que a maior proporção de mortalidade foi registrada para as larvas que receberam 5mg diária de alimentação comparada a mortalidade das larvas que receberam os outros tratamentos alimentares nas triplicatas. A ANOVA mostrou que existe diferença estatisticamente significante com 2 g.l. (F= 14,505; p= 0,006) quando se compara as mortalidades dos diferentes tratamentos supracitados. O teste de pós-hoc de Tukey apontou que essa diferença estatisticamente significante é devida a comparação entre as porcentagens de mortalidade entre os tratamentos B e D, bem como entre os tratamentos E e D. O tratamento D apresentou a maior mortalidade para as três triplicatas realizadas.

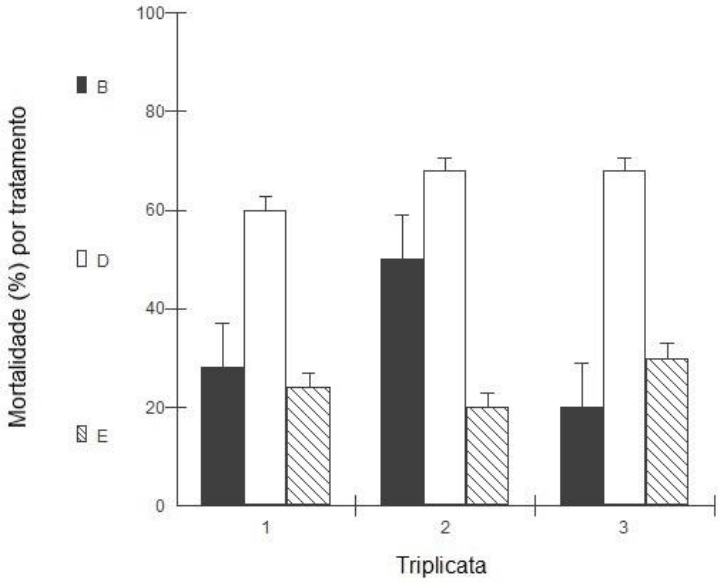

Figura 31: Média e erro padrão da mortalidade (%) de imaturos de *Cx. quinquefasciatus* mantidos com ração de peixe e volume d'água de 100 ml, a partir de diferentes tratamentos com quantidades de alimento diferentes [B= 10 mg/dia; D= 5 mg/dia; E= 20mg/dia], com três triplicatas, em temperatura 27 ± 2°C.

A figura 32 mostra a mortalidade dos imaturos de diferentes tratamentos de proporções ideais. Utilizou-se a mesma quantidade de alimento (F e G=10 mg/dia) e de volumes d'água (F e G= 100 ml), e variou-se a quantidade de larvas (F= 20 e G= 100 larvas L1). O teste t de Student para amostras independentes revelou que houve diferença estatística significante ($p<0,05$) entre as proporções de mortalidades com 4 g.l. ($t= -11,95$; $p= 0,0003$), sendo que a média da mortalidade do tratamento F foi de 21,67% e do tratamento G foi de 72,67%.

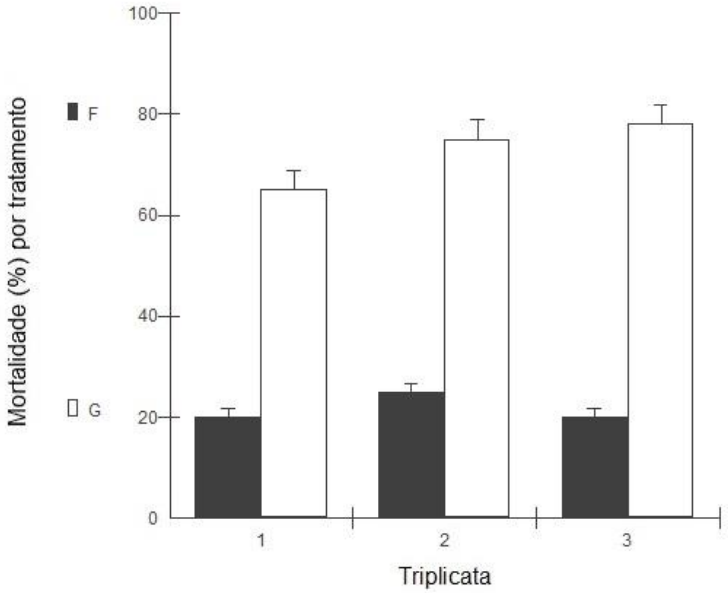

Figura 32: Média e erro padrão da mortalidade (%) de imaturos de *Cx. quinquefasciatus* mantidos com ração de peixe, a partir de tratamentos com diferentes quantidades de larvas e a mesma quantidade de alimento e de volume d'água [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água: F= 0,5/1/5; G= 0,1/1/1], com três triplicatas, em temperatura 27 ± 2°C.

A figura 33 mostra os tratamentos (E e F) que apresentaram as menores porcentagens de mortalidade de imaturos. Utilizou-se o mesmo volumes d'água (E e F= 100 ml), e variou-se a quantidade de larvas (E= 50 e F= 20 larvas L1) e a quantidade de alimento (E= 20 mg e F= 10 mg/dia). Optou-se por utilizar o teste t de Student para amostras independentes, pois os parâmetros para manter os imaturos foram diferentes. O teste t de Student para amostras independentes mostrou que não houve diferença estatística significante ($p<0,05$) entre as proporções de mortalidades com 4 g.l. ($t= 0,8955$; $p= 0,4211$), sendo que a média da mortalidade do tratamento E foi de 24,67% e do tratamento F foi de 21,67%.

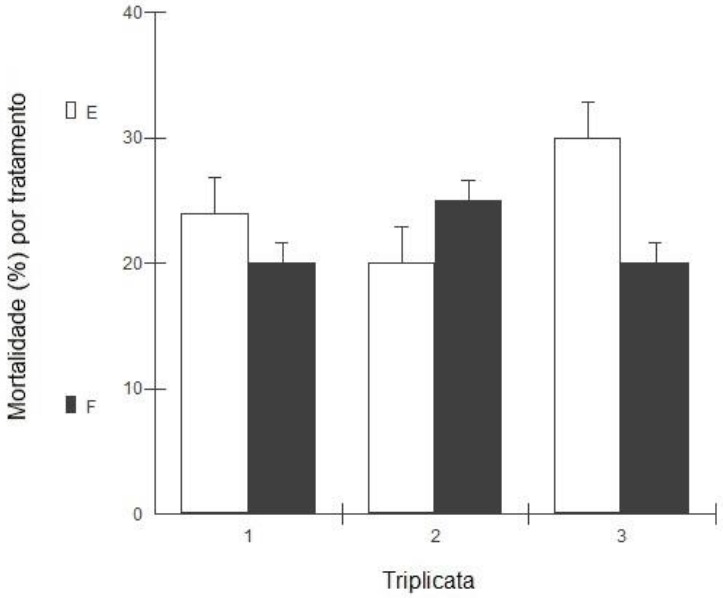

Figura 33: Média e erro padrão da mortalidade (%) de imaturos de *Cx. quinquefasciatus* mantidos com ração de peixe, a partir de tratamentos com diferentes números de larvas (E= 50 e F= 20) e quantidade de alimento (E=20mg/dia e F=10mg/dia). [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água: E= 0,4/1/2; F= 0,5/1/5], com três triplicatas, em temperatura 27 ± 2°C.

4.4.2. Peso seco

4.4.2.1. Fêmeas

Com relação ao peso seco das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, a tabela 4 e a figura 34 registram a comparação da média e do erro padrão de imaturos dessa espécie submetidos a distintos tratamentos e ao controle (água do rio Pinheiros). Nota-se que, comparado à média obtida para o controle (0,765 ± 0,0189), as três maiores médias de peso seco foram registradas para as fêmeas cujas larvas receberam o tratamento F (0,748 ± 0.0211), seguida pelas que receberam o tratamento E (0,640 ± 0,0263) e em terceiro pelas que receberam o tratamento C (0,572 ± 0,0191). O menor valor da média comparado ao controle foi registrado para o tratamento D (0,365 ± 0,0263). A análise de t de Student revelou que, todas as comparações de média de peso seco das fêmeas provenientes dos diferentes

tratamentos, com exceção do tratamento F, resultaram em diferenças estatísticas significantes quando comparadas as médias das fêmeas provenientes do controle.

A análise de variância paramétrica ANOVA foi realizada entre os tratamentos AxBxC, para verificar se o parâmetro volume d'água teve influência no peso seco das fêmeas de mosquitos adultos. Essa análise indicou haver diferença estatística significante ($p<0,05$) entre os tratamentos ($F= 6,219$; $p= 0,003$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que essa diferença foi devida à comparação entre os tratamentos A e C.

A análise de ANOVA foi realizada entre os tratamentos BxDxE para verificar se o parâmetro quantidade de alimento influenciou no peso seco das fêmeas de mosquitos adultos. O resultado do teste mostrou que houve diferença estatística significante ($p<0,05$) entre os tratamentos ($F= 23,315$; $p<0,0001$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que essa diferença foi devida à comparação entre todos os tratamentos, quando combinados dois a dois.

Tabela 4: Média do peso seco/indivíduo de fêmeas de *Cx quinquefasciatus* para cada tratamento, mostrando o erro padrão, o valor do teste t de Student e a significância do teste, para cada tratamento em relação ao controle [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água por tratamento: A= 0,2/1/1; B=0,2/1/2; C= 0,2/1/5; D= 0,1/1/2; E= 0,4/1/2; F= 0,5/1/5; G= 0,1/1/1]. (* não significante)

Tratamento	Média do Peso seco/indivíduo (mg) e Erro padrão (EP)	Valor do teste t de Student com nível de significância de 5% (α=0.05)	Valor de p do teste t de Student para cada tratamento em relação ao controle
A	0,453 ± 0,0257	-9,7731	p < 0,05
B	0,520 ± 0,0261	-7,5988	p < 0,05
C	0,572 ± 0,0191	-7,1826	p < 0,05
D	0,365 ± 0,0270	-12,5116	p < 0,05
E	0,640 ± 0,0263	-3,8535	p < 0,05
F	0,748 ± 0,0211	-0,5901	p > 0,05(*)
G	0,285 ± 0,0289	-13,7040	p < 0,05
Controle	0,765 ± 0,0189	-	-

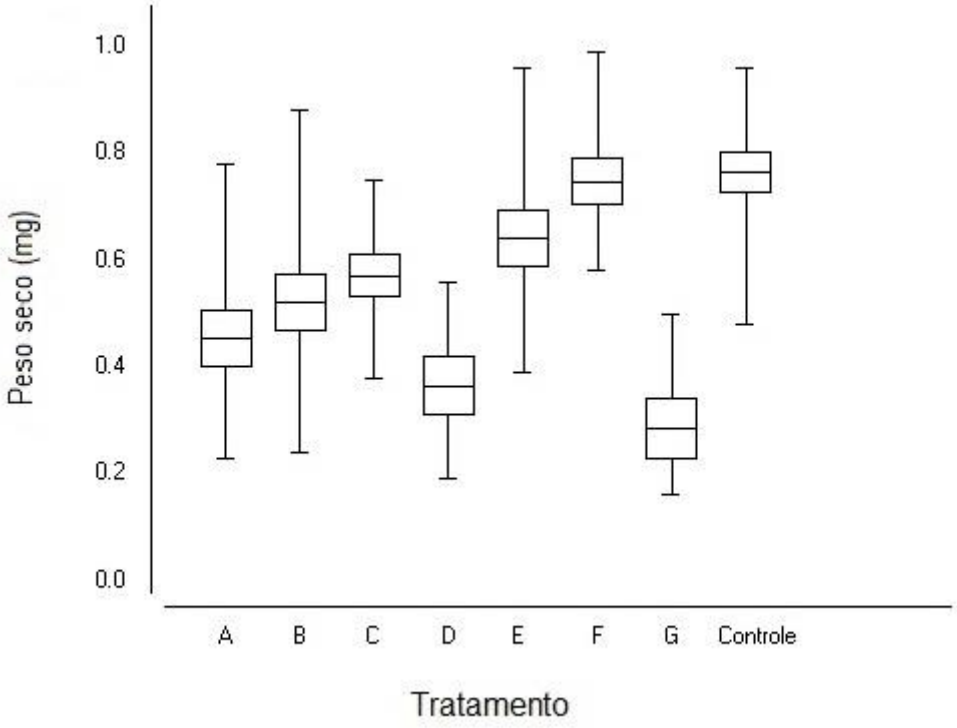

Figura 34: Média e erro padrão do peso seco/indivíduo de fêmeas de *Cx quinquefasciatus* para cada tratamento. [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água por tratamento: A= 0,2/1/1; B=0,2/1/2; C= 0,2/1/5; D= 0,1/1/2; E= 0,4/1/2; F= 0,5/1/5; G= 0,1/1/1].

4.4.2.2. Machos

Com relação ao peso seco dos machos de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de imaturos submetidos a diferentes tratamentos comparados aos provenientes do controle (imaturos criados na água do rio Pinheiros), a tabela 5 e figura 35 mostram que a maior média foi registrada para o tratamento F (0,572 ± 0.0191) quando comparada ao controle (0,524 ± 0,0148), como ocorreu para as fêmeas dessa espécie. A segunda maior média (0,339 ± 0,0120) foi registrada para o tratamento A seguida da média registrada para o tratamento C (0,334 ± 0,0140) praticamente similar ao tratamento D (0,334 ± 0,0114), quando comparadas à média do controle. A menor média (0,259 ± 0,0125) foi registrada para o tratamento G. O teste t de Student revelou que todas as comparações feitas para as médias dos tratamentos em relação à média do controle, novamente excetuando-se o tratamento F, tiveram diferenças estatisticamente significantes no nível de significância de 5% (tabela 5).

A análise de variância paramétrica ANOVA foi realizada entre os tratamentos AxBxC, para verificar se o parâmetro volume d'água influenciava o peso seco dos mosquitos machos adultos. Essa análise revelou haver diferença estatística significante ($p<0,05$) entre os tratamentos ($F= 3,840$; $p= 0,025$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que essa diferença foi devida à comparação entre os tratamentos A e B.

A análise de ANOVA foi realizada entre os tratamentos BxDxE, para verificar se o parâmetro quantidade de alimento influenciava o peso seco dos mosquitos machos adultos. O resultado mostrou que houve diferença estatística significante ($p<0,05$) entre os tratamentos ($F= 5,458$; $p= 0,006$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou que essa diferença foi devida à comparação entre os tratamentos E e B e os tratamentos E e D.

Tabela 5: Média do peso seco/indivíduo de machos de *Cx quinquefasciatus* para cada tratamento, mostrando o erro padrão, o valor do teste t de Student e a significância do teste, para cada tratamento em relação ao controle. [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água por tratamento: A= 0,2/1/1; B=0,2/1/2; C= 0,2/1/5; D= 0,1/1/2; E= 0,4/1/2; F= 0,5/1/5; G= 0,1/1/1]. (* não significante)

Tratamento	Média do Peso seco/indivíduo (mg) e Erro padrão (EP)	Valor do teste t de Student com nível de significância de 5% (α=0,05)	Valor de p do teste t de Student para cada tratamento em relação ao controle
A	0,339 ± 0,0120	-9,6423	$p < 0,05$
B	0,291 ± 0,0140	-11,3912	$p < 0,05$
C	0,334 ± 0,0140	-9,3332	$p < 0,05$
D	0,278 ± 0,0116	-12,8944	$p < 0,05$
E	0,334 ± 0,0114	-10,2054	$p < 0,05$
F	0,522 ± 0,0130	-0,1281	$p > 0,05$(*)
G	0,259 ± 0,0125	-13,6829	$p < 0,05$
Controle	0,524 ± 0,0148	-	-

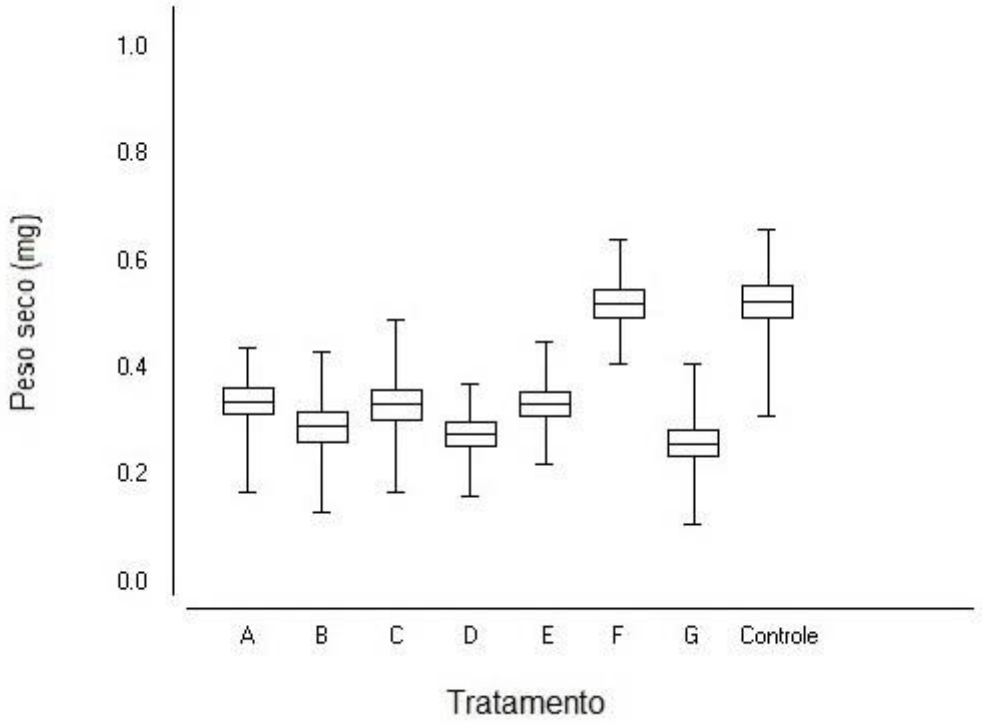

Figura 35: Média e erro padrão do peso seco/indivíduo de machos de *Cx quinquefasciatus* para cada tratamento. [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água por tratamento: A= 0,2/1/1; B=0,2/1/2; C= 0,2/1/5; D= 0,1/1/2; E= 0,4/1/2; F= 0,5/1/5; G= 0,1/1/1].

4.2.3. Tempo de desenvolvimento das larvas em cada tratamento até obtenção de pupas de *Cx. quinquefasciatus*

A Figura 36 mostra o tempo de formação de pupas, considerando apenas variações nos volumes d'água para cada tratamento. Os tratamentos apresentaram os maiores valores de velocidade de formação das pupas entre os dias 8 e 12 após o início dos experimentos. O tratamento C apresentou ligeira vantagem em relação aos outros. Foi realizada análise de variância ANOVA para esses três tratamentos (A, B e C), e essa demostrou não haver diferença estatística significante ($p>0,05$) entre os tratamentos ($F= 0,007$; $p= 0,993$).

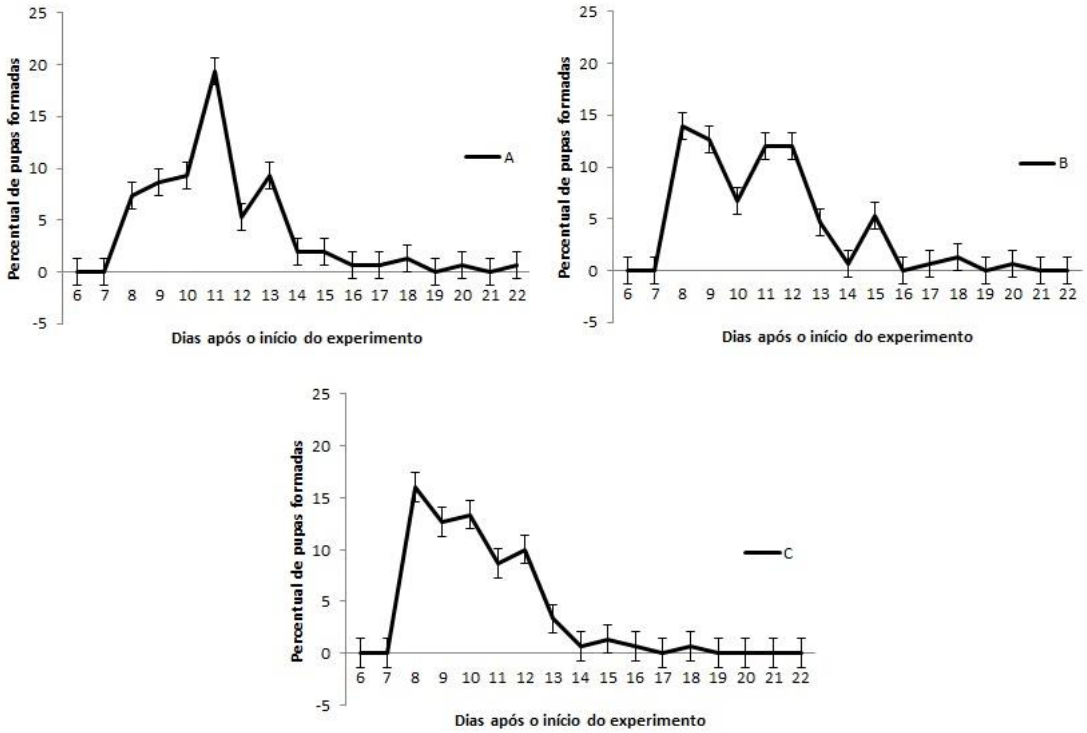

Figura 36: Percentual de pupas de *Cx. quinquefasciatus* formadas após o início de cada tratamento, conforme variações nos volumes d'água, em temperatura 27 ± 2°C. [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água por tratamento: A= 0,2/1/1; B=0,2/1/2; C= 0,2/1/5].

A Figura 37 mostra o tempo de formação de pupas, considerando apenas variações nas quantidades de alimento disponibilizadas às larvas para os tratamentos B, D e E. Todos os experimentos tiveram o período de pico para formação das pupas entre os dias 7 e 11 após o início dos experimentos. O tratamento E foi o que apresentou os melhores resultados. Entretanto a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis (H) não revelou diferença estatística significante ($p>0,05$) entre eles ($H= 0,454$; $p= 0,797$).

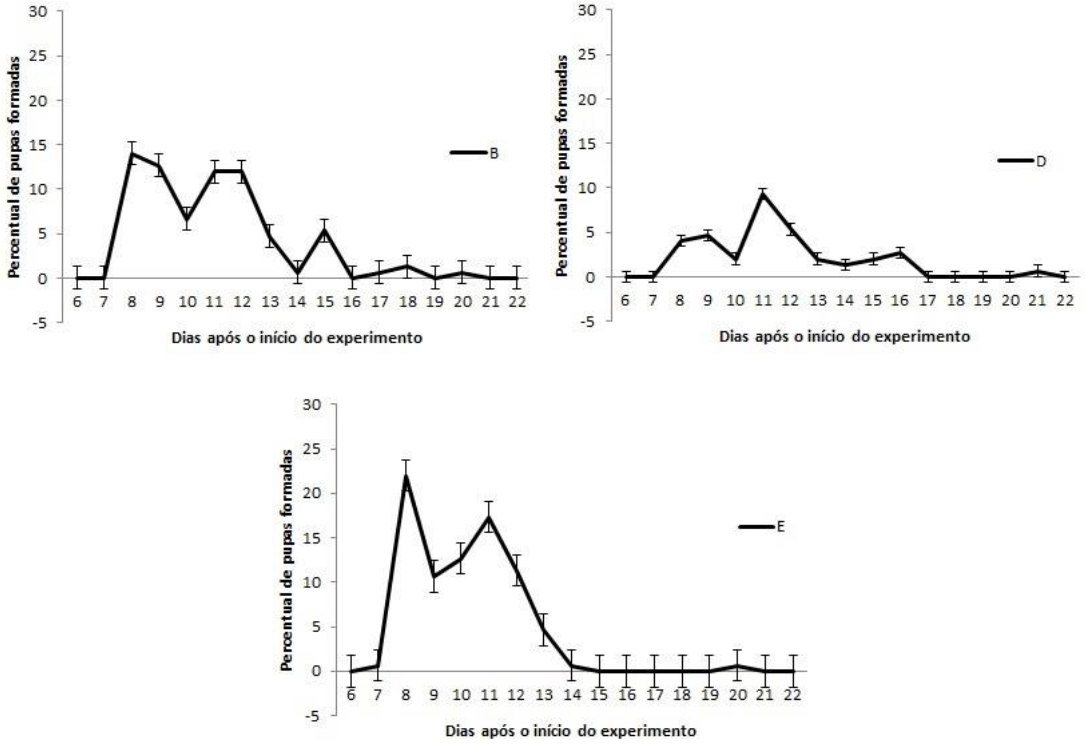

Figura 37: Percentual de pupas de *Cx. quinquefasciatus* formadas após o início de cada tratamento, conforme quantidades de alimento disponibilizadas para as larvas, em temperatura 27 ± 2°C. [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água por tratamento: B=0,2/1/2; D= 0,1/1/2; E= 0,4/1/2;].

A Figura 38 mostra o tempo de formação de pupas, considerando extremos de variações no número de larvas, nas quantidades de alimento disponibilizadas e no volume d'água para os tratamentos F e G. No entanto a figura é apenas ilustrativa, e não foi feita nenhuma análise estatística, pois não há como verificar qual dos fatores influenciou positivamente ou negativamente os resultados, ou mesmo se houve uma soma de fatores. O tratamento F foi o que apresentou os melhores resultados, pois o tempo de formação de pupas, entre os dias 7 e 10 após o início do experimento, correspondeu a aproximadamente 80% do total de imaturos do tratamento. O tratamento G apresentou uma curva bastante desigual, sem picos definidos para a formação de pupas.

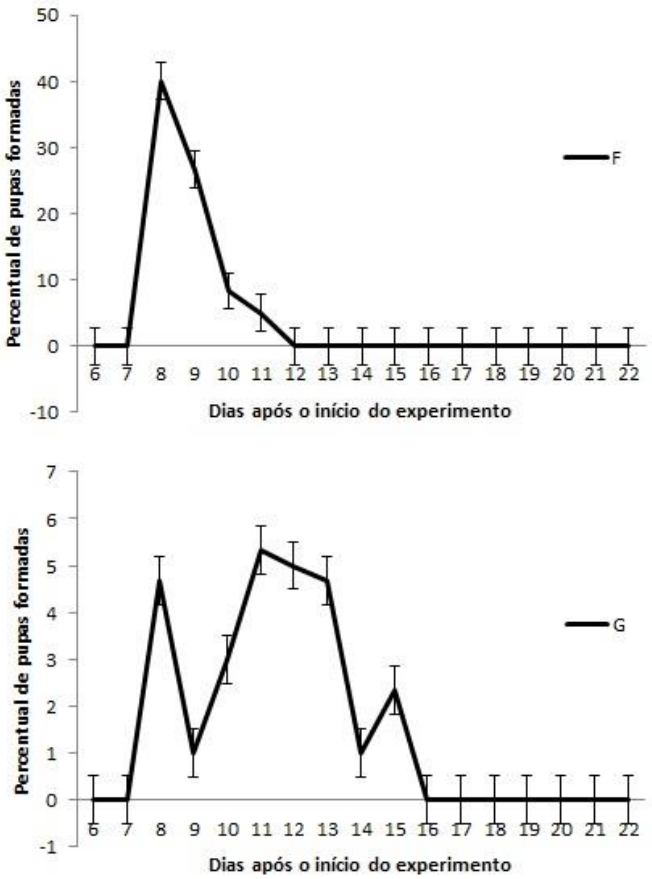

Figura 38: Percentual de pupas de *Cx. quinquefasciatus* formadas após o início de cada tratamento, conforme quantidade de alimento disponibilizada para as larvas, em temperatura 27 ± 2°C. [Proporções entre quantidade de alimento diária/larva/volume d'água por tratamento: B=0,2/1/2; D= 0,1/1/2; E= 0,4/1/2;].

5- DISCUSSÃO

5.1. EXPERIMENTO A - DIETAS LARVÁRIAS E TEMPERATURAS

Ácidos graxos alimentares são um fator crucial para o desenvolvimento bem-sucedido dos mosquitos (DADD et al., 1987). Sem as enzimas específicas, é essencial que o ácido araquidônico ou um fator relacionado a fosfolipídeos de animais seja adquirido através da dieta larval para o bom funcionamento da fisiologia do inseto (DADD e KLEINJAN, 1979; DADD, 1980, 1983). Para o gênero *Aedes* o ácido araquidônico materno é depositado na gema dos ovos, permitindo assim a conclusão do desenvolvimento embrionário, apesar da possível escassez desse componente no alimento larval (DADD, 1985). A espécie *Ae. aegypti* parece ser a espécie mais bem adaptada a vários tipos de dietas. Na gema materna, depósitos de fatores essenciais adquiridos por sucessivos repastos sanguíneos tornam possível a suplementação não obtida na fase larvária, como visto acima com o ácido araquidônico. Isso talvez explique o grande sucesso adaptativo a novos hábitats e continentes pelo *Ae. aegypti* (TIMMERMANN e BRIEGEL, 1996).

Os resultados explicitados nas figuras 7 a 12 mostraram que não houve uma dieta larvária utilizada que apresentou resultados ótimos para gerar maiores pesos secos em adultos de *Cx. quinquefasciatus*. As quatro rações testadas nos vários experimentos, para três faixas de temperaturas diferentes, tiveram resultados bem distintos. Apesar da ANOVA ter mostrado haver diferença estatística significante entre as diferentes dietas, nas diferentes temperaturas, não se conseguiu padronizar qual a melhor ração para a dieta, referente ao peso seco dos adultos. No entanto, a sobrevivência dos imaturos foi maior utilizando-se a ração de peixe para as faixas de temperatura 27 ± 2ºC e 23 ± 2ºC. Dessa forma, optou-se por esta ração para os experimentos de proporções ideais, e também por ser a mais utilizada em trabalhos relatados na literatura (MCDONALD et. al, 1978; BLAUSTEIN e KOTLER, 1993; CARVALHO et al., 2014). Além disso, a ração de peixe possui flocos com maior superfície de contato para as larvas (mais “finos” e que podem ser facilmente moídos

ou triturados, ao contrário da ração canina, que é mais difícil de ser macerada), é facilmente encontrada em lojas e estocada em laboratório (BERGO et. al, 1990).

MCDONALD et al. (1978) testaram para a espécie *Culex annulirostris* Skuse 1889, diferentes dietas larvárias, porém não observaram diferença estatística significante entre os vários tipos de nutrientes e a sobrevivência dos imaturos. Os autores utilizaram como dieta larvária: infusão de erva (*Dactylis glomerata* L,), sangue de ovelha, mistura de DogChow® e levedura, ração de peixe Liquifry® e infusão de trigo. Segundo YE-EBYIO et al. (2000) uma quantidade muito maior de larvas de *An. arabiensis* se desenvolvem mais rapidamente até a fase pupal quando as larvas de primeiro instar recém-eclodidas são submetidas a uma dieta de pólen de milho, comparadas às larvas que receberam essa suplementação mais tardiamente e às que não se alimentaram de pólen. Além disso o tamanho dos adultos, verificado por morfometria alar, demonstrou que estes eram maiores quando as larvas haviam se alimentado de pólen, em relação aos que não tiveram essa dieta. Sugere-se que, num estudo posterior, seja testada essa dieta a base de pólen de milho, para averiguar se ela pode influenciar positivamente no tempo de desenvolvimento dos imaturos e no peso seco, diretamente proporcional ao tamanho, de adultos de *Cx. quinquefasciatus*.

O desenvolvimento larvário nas espécies de mosquitos *Cx. pipiens*, *Anopheles albimanus* Wiedemann 1820 e *Ae. aegypti* até a formação de pupas foi notadamente mais acelerado com dietas a base de produtos animais, como ração de peixe, ao invés de dietas vegetais e de fungos. Para a espécie *Cx. pipiens*, a sobrevivência das larvas e pupas também foi maior com este tipo de ração, bem como o tamanho do mosquito (medido pelo tamanho da asa), suas reservas proteicas e de lipídeos (TIMMERMANN e BRIEGEL, 1996).

O tamanho corpóreo, que é diretamente proporcional ao peso seco, em insetos adultos é determinado geneticamente e modificado por variações ambientais durante o desenvolvimento larvário, como tipo de dieta e diferentes temperaturas. Além disso, outros fatores como alimentos e recursos disponíveis para os adultos também determinarão, por exemplo, a massa e o número de ovos que serão produzidos (HONEK, 1993).

Mosquitos da mesma espécie podem variar o seu tamanho corpóreo, e consequentemente o peso seco, (FEINSWOD e SPIELMAN, 1980), sendo que os maiores adultos possuem uma tendência de maior longevidade (AMENESHEWA e SERVICE, 1996). A longevidade do inseto (as fêmeas, no caso dos mosquitos) pode contribuir fortemente para a capacidade de transmissão de patógenos, pois aumenta o potencial de picadas infectivas aos hospedeiros (GARRET-JONES e SHIDRAWI, 1969; SILVER e RENSHAW, 1999).

Os resultados mostrados nas figuras 19-26, com exceção da figura 20, mostraram que as médias de pesos secos dos adultos de *Cx. quinquefasciatus* foram maiores, tanto para machos quanto para fêmeas, quando as larvas foram mantidas na menor temperatura testada, 20 ± 2°C. De acordo com AYTEKIN et al. (2009) as comparações das medidas de centroides das asas de mosquitos *Anopheles superpictus* Grassi, 1899 mostraram que o tamanho das asas, bem como o tamanho dos indivíduos, lembrando ainda que são diretamente proporcionais ao peso seco, foram menores em resposta a maiores temperaturas, para ambos os sexos. Resultados similares foram observados para as espécies *Anopheles quadrimaculatus* Say, 1824 (LANCIANI, 1992) e para *Aedes punctor* (Kirby, 1837) (PACKER e CORBET, 1989).

Sabe-se que os mosquitos imaturos desenvolvem bem o seu ciclo aquático durante os períodos de chuva, quando se registram temperaturas em torno de 23ºC a 27ºC, ocasião em que se registra uma grande abundância de adultos (FORATTINI, 2002; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Quanto ao tempo de desenvolvimento dos imaturos, nota-se nas figuras 27-29 que nas três temperaturas testadas, as formas imaturas tiveram menor tempo de desenvolvimento quando submetidas à dieta ração de peixe. No entanto a diferença foi pequena comparada às outras dietas e não foi estatisticamente significante ($p>0,05$). A maior temperatura testada (27 ± 2°C) também acelerou o ritmo de desenvolvimento das formas imaturas, gerando a maior quantidade de pupas entre 7 e 12 dias após o início do experimento. Segundo MORAIS (2006) na extremidade sul do rio Pinheiros a temperatura da água é mais elevada comparada à extremidade norte (exceto em dias de chuva), o que favorece proliferação excessiva de mosquitos, mesmo em pleno inverno.

Ao analisarmos o tempo de duração dos estágios de pupas (Figuras 13 a 15), notou-se que os machos que emergem após curto período na fase de pupa foram indivíduos com maiores pesos secos, comparados aos que emergem após um período mais longo nesse estágio, com exceção dos tratamentos com rações de peixe e canina, para temperatura 23 ± 2ºC (Figura 14). Uma seleção artificial poderia ser feita em laboratório, selecionando os machos que emergem primeiramente, com vistas em produzir uma colônia com genótipos favoráveis para gerarem adultos maiores. Para fêmeas não pareceu existir tal regra, sendo que os pesos secos foram aleatórios entre os adultos emergidos, independentemente do tempo que passaram na fase de pupa (Figuras 16 a 18). O período pupal de *Cx. quinquefasciatus* dura cerca de 48 horas, em temperatura 29 ± 1°C (DE MEILLON e THOMAS, 1966).

Em nosso experimento houve mortalidade dos imaturos e estes foram contabilizados, tanto larvas quanto pupas. Notou-se que, na maioria dos tratamentos, faltavam indivíduos quando se somaram os adultos emergidos com os imaturos mortos, comparados ao número de indivíduos que haviam iniciado os experimentos. Supôs-se então que algumas larvas foram devoradas pelas outras. De acordo com TIMMERMANN e BRIEGEL (1996), durante o quarto e último instar da fase larval ocorre de 80 a 90% do crescimento e da biossíntese do mosquito. Se a quantidade de alimento não foi suficientemente acumulada, as larvas podem esperar por duas a três semanas até que finalmente virem pupas ou morram. Caso o último ocorra, estes imaturos podem servir de alimento adicional para as demais larvas. De fato, observações de comportamentos predatórios e, talvez, canibalismo, já foram reportados em outro estudo, para as espécies *Anopheles gambiae* s,s, Giles, 1902 e *Cx. quinquefasciatus* (MUTURI et al., 2010).

5.2. EXPERIMENTO B - PROPORÇÕES IDEAIS: DENSIDADE LARVÁRIA/QUANTIDADE DE ALIMENTO/VOLUME E ALTURA D'ÁGUA

Neste experimento buscou-se obter densidade larvária, quantidade de dieta, volume e altura da coluna d'água do criadouro em laboratório que proporcionassem produção em massa de pupas e adultos de *Cx. quinquefasciatus* que possam auxiliar novos estudos como, por exemplo, o de dose ideal para esterilização dos mosquitos machos na fase de pupas por meio de raios-X, buscando o controle populacional por meio da cópula entre os machos estéreis com as fêmeas selvagens.

As tabelas 4 e 5, bem como as figuras 34 e 35, demonstram que a média do peso seco entre os diferentes tratamentos, analisados individualmente com o controle (usando o teste t de Student), tiveram diferenças estatísticas significantes ($p<0,05$) para todos os tratamentos em relação ao controle, exceto para o **F** (20 larvas; 10 mg ração de peixe/dia; 100 ml água; 2,1 cm coluna d'água). Nesse último, o valor de t do teste de Student foi $t = -0,5901$ para machos e $t = -0,1281$ para fêmeas, ambos resultando em valores estatísticos não significantes ($p>0,05$), demonstrando que as médias dos pesos secos, tanto para machos quanto para fêmeas, foram similares entre o tratamento **F** e o controle. Logo, deduz-se que esse tratamento foi o que apresentou a melhor proporção de quantidade de alimento/larva/volume e altura da coluna d'água para a produção de adultos de mosquitos (machos e fêmeas) com pesos secos similares aos das populações que vivem próximas ao rio Pinheiros.

Ainda de acordo com as mesmas tabelas e figuras, os segundos melhores resultados para maiores pesos secos dos adultos foram, para fêmeas, resultantes do tratamento E (50 larvas; 20 mg ração de peixe/dia; 100 ml água; 2,1 cm coluna d'água); para os machos foram os tratamentos A (50 larvas; 10 mg ração de peixe/dia; 50 ml água; 1,1 cm coluna d'água), seguido pelo tratamento E. Os piores tratamentos, que resultaram em menores valores de peso seco para os mosquitos adultos (tanto machos quanto fêmeas) foram o tratamento G (100 larvas; 10 mg ração de peixe/dia; 100 ml água; 2,1 cm coluna d'água), seguido pelo tratamento D (50 larvas; 05 mg ração de peixe/dia; 100 ml água; 2,1 cm coluna d'água).

Os resultados explicitados nos dois parágrafos acima corroboram com os estudos realizados por NAYAR e SAUERMAN (1970a, b), que relacionaram os efeitos de quantidade de alimento e densidade larvária com o crescimento de adultos (logo após a emergência) de 11 espécies de culicídeos, incluindo o *Cx. quinquefasciatus*. A temperatura para a manutenção dos insetos em laboratório foi de

27°C e fotoperíodo de 12 horas (similar às usadas no presente estudo). Em quase todas as espécies estudadas, inclusive o *Cx. quinquefasciatus*, os percentuais de lipídeos e reservas de glicogênio são mais abundantes em adultos com características morfológicas e pesos secos maiores, em relação àqueles que exibem características morfológicas e pesos secos menores. Os padrões de porcentagens de lipídeos e glicogênio presentes após a emergência dos adultos são específicos para cada espécie de mosquito, algumas apresentando porcentagens maiores, outras menores.

Larvas de diversas espécies mantidas com ração básica (270mg de Fermento Fleischmann's® e 10 mg de fígado em pó, distribuídos nos 7 primeiros dias desde a eclosão dos ovos), em densidades de 75 e 200 larvas por recipiente (350mL) e com salinidade de 1/20 de água do mar, resultaram em adultos que foram significativamente ($p<0,05$) menores em características morfológicas, pesos secos e porcentagem de gorduras, comparados às larvas tratadas com o dobro da quantidade de ração básica. Entretanto, quando as larvas tiveram ofertas quatro vezes maiores de ração básica, em densidades de 75 e 200 larvas por recipiente, os adultos foram menores em todas as características acima, comparados aos que tiveram o dobro da ração básica na fase larvária (NAYAR e SAUERMAN, 1970b).

Os adultos com maiores pesos secos e reservas (glicogênio e lipídeos) foram obtidos com o dobro da quantidade de ração básica e densidade de 75 larvas por recipiente. Já os com menores pesos secos e reservas foram obtidos com quantidade básica de ração e densidade de 200 larvas por recipiente. O aumento da salinidade do meio não alterou as características dos adultos, de uma forma geral. As proporções aproximadas desse experimento: 0,51 mg de fermento e 0,02 mg de fígado em pó diários – 1 larva (L1) – 4,66 ml de água (com diferentes salinidades) para recipientes com 75 larvas, 0,2 mg de fermento e 0,01 mg de fígado em pó diários – 1 larva (L1) – 4,66 ml de água para recipientes com 200 larvas (NAYAR e SAUERMAN, 1970b). Foi demonstrado que quando 200 larvas de *Cx. quinquefasciatus* receberam apenas a quantidade básica de alimento, tiveram a duração do período larval até formação de pupas entre 5 a 9 dias, regularmente distribuídos. Quando receberam o dobro da quantidade básica de alimento tiveram um pico de formação de pupas entre 5 e 7 dias após a eclosão das larvas, declinando após esse período (NAYAR e SAUERMAN, 1970a).

Foi demonstrado que o glicogênio é a principal fonte imediata de energia para o voo na espécie *Culex pipiens.* Os lipídeos foram utilizados para sustentar voos muito longos e o sangue ingerido pelas fêmeas também pode ser utilizado como fonte energética para o voo dos mosquitos (CLEMENTS, 1955). O desempenho de voo de fêmeas adultas das espécies *Culex tarsalis* Coquillett, 1896 e *Ae. aegypti* diminuíram conforme os mosquitos avançavam em idade, especialmente após a 2ª semana de vida. Fêmeas de *Ae. aegypti* com idades entre 1 a 12 dias utilizaram quase todo o glicogênio disponível em voos exaustivos. Durante a terceira e quarta semanas, as reservas de glicogênio nas fêmeas exaustas aumentava na medida em que a capacidade de voo diminuía (ROWLEY e GRAHAN, 1968; ROWLEY, 1970).

No trabalho de DE MEILLON e THOMAS (1966), foram encontrados bons resultados para a produção de *Cx. pipiens fatigans* (atualmente reconhecido como *Cx. quinquefasciatus*) na faixa de temperatura 29°C ± 1°C e com proporção ideal de 1,33 mg de biscoito canino diários(*) – 1 larva (L1) – 2,5 a 5 ml de água. (*)Biscoito canino Spratt's Bonio®. De acordo com o fabricante e com estudos mais detalhados, os componentes alimentares são: proteínas (13%), carboidratos (69%), óleos (1,18%), fibras alimentares (0,57%), cinzas (3,97%), fósforo (0,48%), cálcio (0,85%) e sódio (0,41%), vitamina B1 (µg% 183), vitamina B2 (µg% 60) e ferro (mg% 12,94).

Num estudo realizado para a produção em massa da espécie *Cx. annulirostris*, a proporção ideal estabelecida foi de 0,2 mg de ração (Dogchow® e levedura) diária – 1 larva (L1) – 5 ml de água, mantidos em temperatura 26°C ± 1°C. À medida que se aumentava o número de larvas dos experimentos (25, 50, 75 e 100), utilizando-se a mesma quantidade de alimento, tanto a taxa de desenvolvimento quanto a sobrevivência das larvas diminuíram (MCDONALD et al., 1978).

Quanto ao tempo de desenvolvimento larvário até a fase de pupas (Figura 38), o tratamento **F** (20 larvas; 10 mg ração de peixe/dia; 100 ml água; 2,1 cm coluna d'água) foi novamente o que apresentou os resultados mais efetivos, sendo que aproximadamente 80% do total de pupas (de cada triplicata) foram formadas entre os dias 7 e 10 após o início dos experimentos (comparados a períodos maiores nos outros tratamentos, representados nas figuras 36 e 37). Além disso, o tratamento **F**

foi o que apresentou o menor índice de mortalidade das formas imaturas (larvas e pupas), comparado a todos os outros tratamentos. O segundo tratamento que apresentou menores valores de mortalidade de imaturos foi o E (Figura 33), o qual não apresentou diferença estatística significante (p>0,05) para o tratamento **F**. O que apresentou maior mortalidade de larvas e pupas foi o tratamento G (100 larvas; 10 mg ração de peixe/dia; 100 ml água; 2,1 cm coluna d'água), seguido pelo tratamento D (50 larvas; 05 mg ração de peixe/dia; 100 ml água; 2,1 cm coluna d'água).

Quantidades de alimento insuficientes e altas densidades larvárias retardam a pupação, reduzem a sobrevivência na fase adulta e geram adultos pequenos, geralmente sem uniformidade de tamanho. Há uma correlação linear entre densidade larvária, oferta de alimentos e tamanho de adultos, o qual está diretamente relacionado à fecundidade (IKESHOJI, 1965; AGNEW et al., 2000; JIRAKANJANAKIT et al., 2007). Foi demonstrado que larvas de 3º instar de *Cx. quinquefasciatus*, mantidas em densidades larvárias altas (de cinco a sete larvas por ml de água) produzem substâncias químicas altamente tóxicas para as larvas de 1º instar desse mosquito, assim como para as espécies *Ae. aegypti*, *An. albimanus* e *Cx. tarsalis*. Isso resultou em redução no crescimento e desenvolvimento de imaturos, bem como deformações morfológicas nas larvas (IKESHOJI e MULLAI, 1970).

No rio Pinheiros os mosquitos *Cx. quinquefasciatus* constituem, até o presente momento, a única espécie da família Culicidae que se desenvolve no grau de poluição aquática que este apresenta. Dessa maneira, essa espécie encontra todas as condições necessárias para se desenvolver com a maior quantidade de recursos alimentares disponíveis, já que o rio recebe grande carga de matéria orgânica, além da ausência de predadores naturais (MORAIS, 2006). *Cx. quinquefasciatus*, espécie onívora, a exemplo de larvas de outros mosquitos, alimentam-se de detritos submersos de origem animal e vegetal, assim como de microrganismos associados. Quanto mais tempo os detritos ficam presentes no habitat das larvas, maior é o resultado da degradação microbiana, que por sua vez, pode permitir um aumento na absorção e no metabolismo das larvas (DE MEILLON e THOMAS, 1966; CUMMINS e KLUG, 1979). Os microrganismos ingeridos pelos culicídeos são, principalmente, bactérias e protistas, incluindo algas. Na superfície d'água, forma-se uma "película de superfície", a qual possui alta atividade biológica e é rica em

proteínas, polissacarídeos e ácido húmico, com poucos lipídeos. Os detritos e microrganismos podem estar suspensos na coluna d'água ou em depósitos nos substratos submersos (MERRIT et al., 1992).

O comportamento de alimentação de larvas de mosquitos pode ser dividido em três atividades: movimento em direção a uma fonte alimentar; captura do alimento por um comportamento adequado conforme a fonte alimentar; e a coordenação dos movimentos bucais da larva (CLEMENTS, 1999). Quanto às formas de se alimentar: coletora-filtradora, coletora-reunidora, dilaceradora, raspadora e predadora, as larvas de *Cx. quinquefasciatus* se incluem na primeira classe e podem remover partículas suspensas na superfície ou na coluna d'água do rio Pinheiros. Salienta-se, contudo, que uma determinada espécie raramente restringe-se a apenas um único modo de se alimentar (MERRIT et al., 1992).

Essa abundância de matéria orgânica talvez possa explicar os maiores valores de pesos secos dos mosquitos machos (Tabela 5, Figura 35) e fêmeas (Tabela 4, Figura 34) mantidos em águas do rio Pinheiros (controle), comparados aos mosquitos tratados com rações, misturas e proporções diferentes em laboratório (exceto os do tratamento **F**). Possivelmente, a abundância de matéria orgânica presente na "película de superfície" e na coluna d'água do rio possa ter propiciado uma adaptação no comportamento das larvas, levando-as a nadarem pouco ou mesmo a não desanexarem-se da superfície aquática para buscarem alimentos. Isso poderia refletir numa economia energética e, talvez, gerar adultos com maiores pesos secos. Muito provavelmente as larvas de *Cx. quinquefasciatus* no rio Pinheiros não necessitam desanexarem-se da superfície aquática em função da alta disponibilidade de alimentos. Segundo MELLANBY (1958) larvas com densidades menores do que 1,0 (ex: *Ae. aegypti*) devem nadar para submergir, mas podem ascender passivamente; larvas com densidades relativas maiores que 1,0 (caso do *Cx. pipiens*) afundam após desanexarem-se da superfície aquática, e devem nadar para retornar à superfície.

Para a produção em massa do mosquito *Cx. quinquefasciatus* este estudo recomenda a utilização de temperatura em **27 ± 2°C**, por acelerar o ciclo de vida dos imaturos, contribuindo para o número de mosquitos produzidos semanalmente, apesar de diminuir o peso seco dos mosquitos adultos. A técnica com a proporção

ideal entre alimento (ração de peixe) diário, larva (L1) e volume/altura da coluna d'água padronizada neste estudo foi: **0,5 mg/larva, 5 ml de água/larva, mantidos em 2,1 cm de coluna d'água.**

As bandejas para produção em massa do laboratório, por medirem, (34,0 x 23,0 x 12,5 cm) terão uma profundidade d'água variando de um a dois cm de altura (1,5 l d'água, aproximadamente) e poderão abrigar centenas ou milhares de larvas de *Cx. quinquefasciatus*, considerando que as pupas, ao se formarem, ocupam em média (8,0 x 2,2 x 1,5 mm) de espaço físico, cada uma. Sugere-se a criação de um armário com várias bandejas em forma de gavetas com grandes áreas de superfície (que auxiliam na aeração) e de, no máximo, dez centímetros de altura cada, para economizar espaço e aperfeiçoar a produção em massa (MCDONALD et al., 1978).

6- CONCLUSÕES

- Este estudo possibilita a utilização de uma técnica para produção em massa do mosquito *Cx. quinquefasciatus*.

- A melhor técnica encontrada foi a que utilizou a proporção de **0,5 mg de ração de peixe diários, por larva (L1), em cada 5 ml de água, mantidos em 2,1 cm de coluna d'água**. Nesses parâmetros obtiveram-se fêmeas e machos de *Cx. quinquefasciatus* com maior relação peso seco/indivíduo adulto.

- Nenhuma relação foi observada entre os quatro tipos de dietas testadas e o tempo de desenvolvimento do ciclo de vida das larvas, nem com a média do peso seco/indivíduo adulto.

- Os primeiros machos adultos a emergirem possuem maiores pesos secos quando comparados aos que emergem posteriormente, dado um mesmo tratamento.

- A sobrevivência das formas imaturas foi maior utilizando-se ração de peixe, nas faixas de temperatura 27 ± 2ºC e 23 ± 2ºC.

- A maior temperatura testada (**27 ± 2ºC**) acelerou o desenvolvimento do ciclo de vida das fases imaturas dos mosquitos *Cx. quinquefasciatus*, porém gerou machos e fêmeas com menores pesos secos. Quanto menor a temperatura (entre outras duas experimentadas, 23 ± 2ºC e 20 ± 2ºC), maior a média dos pesos secos dos mosquitos adultos e maior o tempo de desenvolvimento do ciclo de vida das formas imaturas.

- A ração de peixe é mais prática para ser utilizada como alimento larvário, pois é mais facilmente moída em grãos menores. A ração de cão, por ser dificilmente macerada manual ou mecanicamente, não é recomendada.

- Este estudo, possivelmente, poderá auxiliar em programas de controle populacional do mosquito *Cx. quinquefasciatus*, tal como o que utiliza a técnica SIT. Machos esterilizados, com maiores reservas energéticas, provavelmente serão mais vigorosos e aptos a competirem com machos selvagens na busca por fêmeas no meio ambiente, o que pode levar a uma diminuição da população alvo.

7- REFERÊNCIAS

AGNEW, P.; HAUSSY, C.; MICHALAKIS, Y. Effects of density and larval competition on selected life history of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v, 37, n, 5, p, 732-735, 2000.

AHID, S. M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquitos vetores potenciais de dirofilarios canina na Região Nordeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 6, p. 560-65, 1999.

ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1243-1247, 2002.

ALPHEY, L.; NIMMO, D.; O'CONNELL, S.; ALPHEY, N. Insect Population Suppression Using Engineered Insects. In: Aksoy, S. Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease. Ed. Springer, 2008. p. 93-103.

AMENESHEWA, B.; SERVICE, M. W. The relationship between female body size and survival rate of the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Ethiopia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 10, p. 170–172, 1996.

ARMBRUSTER, P.; HUTCHINSON, R. A.; LINVELL, T. Equivalent inbreeding depression under laboratory and field conditions in a tree-hole breeding mosquito. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1456, p. 1939-1945, 2000.

AXTELL, R.C.; ARENDS, J. J. Ecology and Management of Arthropod Pests of Poultry. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 101-126, 1990.

AYTEKIN, S.; AYTEKIN, A. M.; ALTEN, B. Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 1, p. 32-42, 2009.

BARBER, J. T.; ELLGAARD, E. G.; HERSKOWITZ, K. The attraction of larvae of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae (Diptera:Culicidae) in response to amino acids. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, p. 641-43, 1983.

BARR, A. R. The distribution of *Culex p. pipiens* and *Culex p. quinquefasciatus* in North America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 1957; 6: 153-165.

BECK, S. D. **Insect photoperiodism**. New York: Academic Press, 1980. 387 p.

BELKIN, J. N. Quinquefasciatus or fatigans for the tropical (Southern) house mosquito (Diptera: Culicidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**. v. 79, n. 1, p. 45-52. 1977.

BENEDICT, M. Q. et al. Colonization and mass rearing: learning from others. **Malaria Journal**, v. 8, 2009. Suplemento 2, S4.

BERGO, E, S. et al. Avaliação do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratório sob diferentes dietas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 95-100, 1990.

BIAN, G. et al. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000833, 2010.

BLACKMORE, M. S.; LORD, C. C. The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology**, v. 25, n. 2, p. 212-217, 2000.

BLAUSTEIN, L.; KOTLER, B. P. Oviposition habitat selection by the mosquito, *Culiseta longiareolata*: effects of conspecifics, food and green toad tadpoles. **Ecological Entomology**, v. 18, n. 2, p. 104-108, 1993.

BOISSEZON, P. Contribution a l'étude de la biologie et de l'histophysiologie de *Culex pipiens* L. **Archives de Zoologie expérimentale et generale**, v. 70, p. 281-431, 1930.

BOISSEZON, P. Localisation du glycogène et du fer chez *Culex pipiens*. **Comptes Rendus des Seánces et Mémoires de la Societé de Biologie**, p. 866-867, 1932.

BOURTZIS, K.; BRAIG, H.; KARR, T. L. Cytoplasmic incompatibility. **Insect Symbiosis**, p. 217–246, 2003.

BOURTZIS, K.; DOBSON, S. L.; BRAIG, H. R.; O'NEILL, S. L. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. **Nature,** v. 391, p. 852–853, 1998.

BRACCO, J. E. Avaliação da resistência a inseticidas em populações de Cule*x quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) do rio Pinheiros (São Paulo, Brasil).

Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo. 1998.

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity in *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, p. 165-172, 1990a.

BRIEGEL, H. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, p. 839-850, 1990b.

BRIEGEL, H. Physiological bases of mosquito ecology. **Journal of Vector Ecology**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2003.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide Resistance and Vector Control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605-613, 1998.

CARVALHO, D. O. et al. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, v. 83. 2014. Disponível em: < http://www.jove.com/>. Acesso em: 19 jan. 2014.

CHAMBERS, D. L. Quality control in mass rearing. **Annual Review of Entomology**, v. 22, p. 289-308, 1977.

CLARK, L. R. et al. **Ecology of insect populations in theory and practice**. London: Methuen, 1967.

CLEMENTS, A. N. The sources of energy for flight in mosquitoes. **Journal of Experimental Biology**, v. 32, n. 3, p. 547-554, 1955.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes**: Vol 2, Sensory reception and behavior. Wallingford, UK: CABI Publishing, 1999. 752 p.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 225 p.

CUMBERLAND, S. Mosquito wars. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 87, n. 3, p. 167-168, 2009.

CUMMINS, K. W.; KLUG, M. J. Feeding ecology of stream invertebrates. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 10, p. 147-172, 1979.

DADD, R. H. Essential fatty acids for the mosquito *Culex pipiens*. **Journal of Nutrition**, v. 110, p. 1152-l160, 1980.

DADD, R. H. Essential fatty acids: insects and vertebrates compared. In: T. E. Mittler & R. H. Dadd (eds). **Metabolic Aspects of Lipid Nutrition in Insects**. Boulder, Colorado: Westview Press, 1983. p. 107-147.

DADD, R. H. Nutrition: Organisms. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press, v. 4, 1985. p. 313-390.

DADD, R. H.; KLEINJAN, J. E. Essential fatty acid for the mosquito *Culex pipiens*: arachidonic acid. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, p. 495-502, 1979.

DADD, R. H.; KLEINJAN, J. E.; STANLEY-SAMUELSON, D. W. Polyunsaturated fatty acids of mosquitoes reared with single dietary polyunsaturates. **Insect Biochemistry**, v. 17, p.7-16, 1987.

DAME, D. A. Genetic control by sterilized mosquitoes. **Reprints-US Department of Agriculture, Agricultural Research Service**, v. 160, 1985.

DEANE, L. M. Observações sobre alguns hábitos de adultos de *Culex fatigans*, o principal transmissor da filariose em Belém, Pará. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 4, p. 423-464, 1961.

DEANE, L. M.; DAMASCENO, R. G.; AROUCK, R. Distribuição vertical de mosquitos em uma floresta dos arredores de Belém, Pará. **Folia Clinica et Biologica**, v. 20, p. 101-110, 1953.

DE MEILLON, B.; THOMAS, V. *Culex pipiens fatigans* Wied. In: SMITH, C. N. Insect Colonization and Mass Production. New York: Academic Press, 1966. p. 101-114.

DYCK, A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A.S. **The Sterile Insect Technique, Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management**. Heidelberg, Germany: Springer, 2005.

FEINSWOD, F.M.; SPIELMAN, A. Nutrient mediated juvenile hormone secretion in mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 26, p. 113–117, 1980.

FISH, D.; CARPENTER, S. R. Leaf litter and larval mosquito dynamics in treehole ecosystems. **Ecology**, v. 63, n. 2, p. 283-288, 1982.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**: identificação, biologia, epidemiologia. Vol 2. São Paulo: Editora da USP, 2002. 860 p.

GARRETT-JONES, C.; SHIDRAWI, G.R. Malaria vectorial capacity of a population of Anopheles gambiae: an exercise in epidemiological entomology. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 40, p. 531–545, 1969.

GOMES, A. C. et al. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of São Paulo, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 28, p. 74-78, 2003.

HANDLER, A. M. Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods. **Genetica,** v. 116, p. 137–149, 2002.

HARAMIS, L. D. Larval nutrition, adult body size, and the biology of *Aedes triseriatus*. In: Ecology of Mosquitos: Proceedings of a Workshop. Vero Beach, FL: Florida Medical Entomology laboratory, 1985. p. 431-437.

HAWLEY, W. A. The effect of larval density on adult longevity of a mosquito, *Aedes sierriensis*: epidemiological consequences. **Journal of Animal Ecology**, v. 54, p. 955-964, 1985

HELINSKI, M. E. H. et al. Towards a sterile insect technique field release of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Sudan: Irradiation, transportation, and field cage experimentation. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 65, 2008.

HARBACH, R. **Mosquito Taxonomic Inventory**. 2013. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list#>, ou <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Valid%20Species%20List_14.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2013.

HARBACH, R.E.; DAHL, C.; WHITE, G. B. *Culex (Culex) pipiens* Lin, (Diptera, Culicidae): concepts, type, designation and description**. Entomological Society**, v.87, p. 1-24, 1985.

HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S.; CAYOL, J.P.; ENKERLIN, W. Medfly area wide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. **Florida Entomologist**, v. 85, p.1-13, 2002.

HONEK, A. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. **Oikos**, n. 66, p. 483-492, 1993.

IKESHOJI, T. The influence of larvae breeding conditions on the fecundity of *Culex pipiens fatigans* Wied. **WHO/Vector Control**, v. 135, n. 65, 1965.

IKESHOJI, T.; MULLAI, M. S. Overcrowding Factors of Mosquito Larvae1, 2. **Journal of Economic Entomology**, v. 63, n. 1, p. 90-96, 1970.

JIRAKANJANAKIT, N. et al. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p, 1354-1360, 2007.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **Journal of Economic Entomology**, v. 48, n. 4, p. 459-462, 1955.

KNIPLING, E. F. Introduction. In: SMITH, C. N. Insect colonization and Mass production. New York: Academic Press, 1966. p. 1-12.

KRAFSUR, E. S. Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect population: 55 years and counting. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 15, n. 4, p. 303–317, 1998.

LANCIANI, C.A. Photoperiod and the relationship between wing length and body weight in *Anopheles quadrimaculatus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 8, p. 297-300, 1992.

LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. **Nature**, v. 261, p. 383–384, 1967.

LOZOVEI, A, L. Culicídeos (Mosquitos). In: MARCONDES, C. B. Entomologia Médica e Veterinária. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p. 59-103.

LUNA, E. J. A.; PEREIRA, L. E.; DE SOUZA. R. P. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 1, p. 7-19, 2003.

MACKAUER, M. Genetic aspects of insect production. **Entomophaga**, v. 17, p. 27-48, 1972.

MACKAUER, M. Genetic problems in the production of biological control agents. **Annual Review of Entomology**, v. 21, p. 369-385, 1976.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Ed, Atheneu, 2001.

MARRELLI, M. T. et al. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 197-202, 2006.

MCDONALD, G.; SMITH, I. R.; SHELDEN, G. P. Laboratory rearing of *Culex annulirostris* Skuse (Diptera: Culicidae). **Australian Journal of Entomology**, v. 16, n. 4, p. 353-358, 1978.

MCINNIS, D. O. et al. Population suppression and sterility rates induced by variable sex-ratio, sterile insect releases of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 2, p. 231-240, 1994.

MELLANBY, K. The alarm reaction of mosquito larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 1, p. 153-160, 1958.

MERRITT, R.W.; DADD, R. H.; WALKER, E. D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 349–76, 1992.

MOGI, M. Distribution and overcrowding effects in mosquito (Diptera: Culicidae) inhabiting taro axils in the Ryulyus, Japan. **Journal of Medical Entomology**, v. 21, p. 63-68, 1984.

MORAIS, S. A. **Aspectos da infestação de *Culex (Culex) quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) no rio Pinheiros, São Paulo (São Paulo, Brasil), e considerações sobre as aplicações de controle da população**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

MORAIS, S.A. et al. Low genetic diversity in Wolbachia-Infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, p. 325-9, 2012.

MUTURI, E. J. et al. Interspecies predation between *Anopheles gambiae* ss and *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of medical entomology**, v. 47, n. 2, p. 287-290, 2010.

NATAL, D. et al. O mosquito das águas poluídas. **Saneas**, 2004.

NATAL, D.; UENO. H. M. Vírus do Nilo Ocidental: Características da transmissão e implicações vetoras. **Entomologia y Vectores**, v. 11, n. 3, p. 417-433, 2004.

NAYAR, J. K. The pupation rhythm in *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), II. Ontogenetic timing, rate of growth and endogenous diurnal rhythm of pupation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, p. 946-71, 1967.

NAYAR, J. K. Biology of *Culex nigripalpus* Theobald (Diptera: Culicidae), Part I: Effects of rearing conditions on growth and the diurnal rhythm of pupation and emergence. **Journal of Medical Entomology**, v. 5, p. 39-46, 1968.

NAYAR, J. K.; SAUERMAN, D. M. A comparative study of growth and development in Florida mosquitoes: Part 1, Effects of environmental factors on ontogenetic timing, endogenous diurnal rhythm and synchrony of pupation and emergence. **Journal of medical entomology**, v. 7, n. 2, p. 163-174, 1970a.

NAYAR, J. K.; SAUERMAN, D. M. A comparative study of growth and development in Florida mosquitoes: Part 2: Effects of larval nurture on adult characteristics at emergence. **Journal of medical entomology**, v. 7, n. 2, p. 235-241, 1970b.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 428p.

NICHOLSON, G,M. Fighting the global pest problem: preface to the special toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 413–422, 2007.

OMETTO, T. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723-730, 2013.

OROZCO-DAVILA, D. et al. Sexual competitiveness and compatibility between mass-reared sterile flies and wild populations of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) from different regions in Mexico. **Florida Entomologist**, v. 90, p. 19-26, 2007.

PACKER, M. J.; CORBET, P. S. Size variation and reproductive success of female *Aedes punctor* (Diptera: Culicidae). **Ecological Entomology**, v. 14, n. 3, p. 297-309, 1989.

PATERNO, U.; MARCONDES, C.B. Mosquitos antropofílicos de atividade matutina em Mata Atlântica, Florianópolis, SC**. Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 1, p. 133-135, 2004.

RAO, D. R. et al. Development of a high-level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, p. 1–5, 1995.

RASGON, J. L.; SCOTT, T. W. Wolbachia and Cytoplasmic Incompatibility in the California *Culex pipiens* Mosquito Species Complex: Parameter Estimates and Infection Dynamics in Natural Populations. **Genetics**, v. 165, p. 2029-2038, 2003.

REY, L. **Parasitologia**. 3a ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan SA, 2001. 856 p.

ROBINSON, A.S. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. **Genetica**, v. 116, p. 5–13, 2002.

ROWLEY, W. A.; GRAHAM, C. L. The effect of age on the flight performance of female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 14, n. 5, p. 719-728, 1968.

ROWLEY, W. A. Laboratory flight ability of the mosquito, *Culex tarsalis* Coq. **Journal of Medical Entomology**, v. 7, n. 6, p. 713-716, 1970.

SILVA-FILHA, M. H. et al. Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 525–530, 1995.

SILVER, J. B.; RENSHAW, M. Are mosquitoes from lower latitudes smaller? **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, p. 219-223, 1999.

SIRIVANAKARN S, WHITE GB. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 80, p. 360-372, 1978.

SMA - São Paulo, Secretaria do Estado do Meio Ambiente, Coordenadoria de Planejamento Ambiental, Informações básicas para o planejamento ambiental, **SMA**, 2002.

SNOW, J. W. **Radiation, insects and eradication in North America, An overview from screwworm to bollworm**. Modern Insect Control: Nuclear Techniques and Biotechnology. Proceedings of a symposium jointly organized by IAEA/FAO, Vienna; IAEA-SM-301/29, 1987.

TAIPE-LAGOS, C. B.; NATAL, D. Culicidae mosquito abundance in a preserved metropolitan area and its epidemiological implications. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 275-279, 2003.

TIMMERMANN, S. E.; BRIEGEL, H. Effect of plant, fungal, and animal diets on mosquito development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 173-176, 1996.

VERNICK, K. D. et al. Molecular genetics of mosquito resistance to malaria parasites. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 295, p. 383-415, 2005.

VREYSEN, M. J. B. et al. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 123-135, 2000.

WHO - World Health Organization. Vector resistance to insecticides. 15th Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 818, p. 1-62, 1992.

WHO - World Health Organization. **World Malaria Report 2012**. Geneva, Switzerland: WHO, 2013.

WILKE, A. B. B. et al. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 5, p. 869-874, 2009.

WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit. **Systematic Catalog of Culicidae**. 2013. Disponível em: <http://www.mosquitocatalog.org/main.asp>. Acesso em: 06 nov. 2013.

WYSS, J, H, Screwworm eradication in the Americas. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 916, n. 1, p. 186-193, 2000.

YE-EBIYO, Y.; POLLACK, R. J.; SPIELMAN, A. Enhanced development in nature of larval *Anopheles arabiensis* mosquitoes feeding on maize pollen. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. (1,2), p. 90-93, 2000.

YUAN, Z. M. et al. Highlevel field resistance to Bacillus sphaericus C3–41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 41–49, 2000.