**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

Manutenção de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório: Uma revisão sistemática

PEDRO HENRIQUE HERCULANO

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

**Área de Concentração: Taxonomia e
Bioecologia de artrópodes de interesse
em saúde pública**

**Orientadora: Prof^a Dra Tamara Nunes
de Lima Camara**

**São Paulo
2020**

Pedro Henrique Herculano

Manutenção de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório: Uma revisão sistemática

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

Área de Concentração: Taxonomia e Bioecologia de artrópodes de interesse em saúde pública

Orientadora: Prof^a Dra Tamara Nunes de Lima Camara

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Herculano, Pedro Henrique

Manutenção de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório: Uma revisão sistemática / Pedro Henrique Herculano; orientadora Tamara Nunes de Lima Camara. -- São Paulo, 2020.

77 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2020.

1. Mosquitos. 2. Manutenção em laboratório. 3. Alimentação artificial. I. Nunes de Lima Camara, Tamara, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a minha filha Marina, que no decorrer deste curso, nasceu lutando pela vida, sobreviveu a inúmeras batalhas, e hoje faz de mim o pai mais feliz do mundo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças nos momentos onde mais precisei, e pelo conhecimento e paciência para conseguir realizar meus objetivos.

A todos, que de alguma forma me apoiaram nessa longa jornada, com palavras, conselhos, ideias e incentivo para seguir em frente.

A minha esposa, por me apoiar e acreditar em meu potencial desde o início, por ser uma companheira fundamental nesse tempo de mestrado, como em dias em que mais precisei de sua ajuda para conseguir estudar, pensar, elaborar ideias e desenvolver este trabalho.

A meu primo Thiago, por me inspirar com sua determinação nos estudos, e por ajudar com algumas questões que anteciparam meu ingresso ao mestrado.

A todos meus amigos da turma do mestrado profissional, por compartilhar dias incríveis na faculdade, almoços e café da tarde pra descontrair um pouco os estudos, e longos dias em sala de aula.

Um agradecimento especial a minha orientadora, professora Dr^a Tamara Nunes de Lima Camara, por aceitar o desafio e acreditar em meu projeto desde o início, pela contribuição com novas ideias e observações precisas para conclusão de uma boa revisão sobre este tema que tanto gostamos de conversar, os mosquitos.

Gostaria de agradecer também professora Dr^a Eunice A. B. Galati, pelo apoio e ajuda em um momento crítico, onde precisei optar entre a empresa em que trabalhei por anos com pesquisas em Entomologia e a continuidade do curso. Os conselhos e conversas que tivemos me ajudaram bastante para continuar até o final deste curso.

Agradeço aos professores Dr^o Fredy Gavis e Dr^a Denise Pimentel Bergamaschi, pelo apoio na reta final de minha dissertação, e pela ajuda no desenvolvimento de um artigo relacionado ao tema deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a minha mãe, por me apoiar desde sempre, contribuindo muitas vezes a distancia, mas sempre de forma fantástica em minha vida. A ela devo todo meu conhecimento e determinação para buscar de novos desafios.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

HERCULANO, P. H. Manutenção de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório: Uma revisão sistemática (Dissertação). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública; 2020.

O crescimento populacional no mundo, junto com o aumento desenfreado dos grandes centros urbanos, com condições precárias de saneamento e infraestrutura, favorecem o desenvolvimento e a proliferação de algumas espécies de mosquitos. O comportamento e fácil adaptação de *Ae. aegypti* favoreceram sua dispersão pelos mais diferentes tipos de ambientes, sendo encontrado principalmente no intra e peridomicílio, onde há elevada presença humana, abrigos e criadouros potenciais. As fêmeas possuem hábito alimentar diurno, sendo os picos de maior atividade no amanhecer e durante o crepúsculo vespertino. Entretanto, podem picar o homem e outros animais a qualquer hora do dia, pois são muito oportunistas. No Brasil, a grande importância de *Ae. aegypti* se dá ao fato de ser considerado o principal vetor da febre amarela urbana, dengue, chikungunya e Zika. Já o mosquito *Culex quinquefasciatus* geralmente está relacionado em áreas de saneamento precário, próximo às zonas periféricas. As fêmeas também são hematófagas e estão associadas aos locais de habitações humanas, onde encontram abrigo, criadouros e fontes de alimentação. Possuem hábitos noturnos e crepusculares e, eventualmente, podem picar durante o dia. A presença deste mosquito na área urbana gera desconforto ao ser humano, causando irritação e diminuição da qualidade de vida, devido ao incômodo causado pelas picadas e perturbação noturna. Além disso, algumas áreas infestadas por *Cx. quinquefasciatus* são propícias a problemas relacionados com saúde pública, pois esse mosquito é considerado vetor de agentes patogênicos, como a filariase bancroftiana, causada pelo verme *Wuchereria bancrofti*. A manutenção de insetos em laboratório, assim como outros animais, possibilita entender melhor sua biologia, dinâmica de populações, desenvolvimento das espécies e melhores condições para confinamento e reprodução. Procedimentos de alimentação, reprodução e acondicionamento de mosquitos são alguns dos principais elementos para o desenvolvimento de colônias em larga escala em laboratório, além das condições ambientais, como temperatura, umidade e fotoperíodo. Formas imaturas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* podem ser mantidas para desenvolvimento nos mais variados tipos de recipientes. A manutenção de mosquitos adultos em laboratório é realizada através do confinamento destes insetos em gaiolas teladas, que podem variar de tamanho e material. A fonte alimentar para machos e fêmeas adultas de mosquitos se dá a partir de soluções açucaradas. Para reprodução de mosquitos em laboratório é essencial o fornecimento de alimentação sanguínea para fêmeas adultas, pois somente dessa forma haverá a maturação dos ovos. Alimentadores artificiais vêm sendo desenvolvidos e utilizados constantemente em procedimentos para manutenção de mosquitos em laboratório, sendo alguns mais complexos e outros mais simples. Estes alimentadores, normalmente, são compostos por um ou mais reservatórios sanguíneos, onde é estocado o volume de sangue para alimentação das colônias de insetos. Geralmente, estes reservatórios são cobertos por membranas finas que facilitam a penetração e alimentação dos mosquitos. Nesta revisão, foi observado que a maioria das técnicas para alimentação sanguínea artificial de mosquito, apresentaram bons resultados em relação a taxa de alimentação, fecundidade e sobrevivência dos insetos, sendo assim, uma boa alternativa para manutenção de colônias de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em laboratório.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, alimentação artificial sanguínea, manutenção de mosquitos.

ABSTRACT

HERCULANO, P. H. Maintenance of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae) in laboratory conditions: A systematic review (Dissertation). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública; 2020.

The population increase in the world, with the increase in large urban areas, with poor sanitation and infrastructure conditions, favor the development and proliferation of some species of mosquitos. The behavior and easy adaptation of *Ae. aegypti* favored its dispersion in the most different types of environments, being found mainly within and around the home, where there is a high human presence, shelters and potential breeding sites. Females have diurnal eating habits, with the highest activity peaks at dawn and during evening twilight. However, they can bite man and other animals at any time of the day, as they are very opportunistic. In Brazil, the great importance of *Ae. aegypti* is due to the fact that it is considered the main vector of urban yellow fever, dengue, chikungunya and Zika. The *Culex quinquefasciatus* mosquito is generally found in areas of poor sanitation, near to peripheral areas. Females are also hematophagous and are associated with human habitation sites, where they find shelter, breeding grounds and source of food. They have nocturnal and twilight habits and, eventually, they can bite during the day. The presence of this mosquito in the urban area generates discomfort to humans, causing irritation and decreased quality of life, due to the discomfort caused by the bites and night disturbance. In addition, some areas infested by *Cx. quinquefasciatus* are conducive to problems related to public health, as this mosquito is considered a vector of pathogens, such as bancroftian phyliasis, caused by the *Wuchereria bancrofti* worm. The maintenance of insects in the laboratory, as well as other animals, makes it possible to better understand their biology, population dynamics, species development and the best conditions for confinement and reproduction. Procedures for feeding, breeding and conditioning mosquitos are some of the main elements for the development of large-scale colonies in the laboratory, in addition to environmental conditions such as temperature, whet and photoperiod. Immature forms of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* can be kept for development in the most varied types of containers. The maintenance of adult mosquitoes in the laboratory is carried out by confining these insects in screened cages, which can vary in size and material. The food source for adult male and female mosquitoes is from sugary solutions. For reproduction of mosquitoes in the laboratory, it is essential to provide blood supply to adult females, as only in this way will the eggs mature. Artificial feeders have been developed and used constantly in procedures for maintenance mosquitos in the laboratory, some of which are more complex and others simpler. These feeders are usually composed of one or more blood reservoirs, where the volume of blood is stored to feed insect colonies. Generally, these depot are covered by thin membranes that facilitate the penetration and feeding of mosquitoes. In this review, it was observed that most techniques for artificial mosquito blood feeding, showed good results in relation to the feeding rate, fertility and survival of insects, this offer a good option for maintenance colonies of *Ae.aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* in laboratory.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, blood artificial feeding, maintenance of mosquitos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida de um mosquito (<i>Aedes aegypti</i>), mostrando as fases de ovo, larva, pupa e adulto.....	15
Figura 2 -	(A) Fêmea de <i>Ae. aegypti</i> ingurgitada com sangue; (B) Destaque do tórax da fêmea de <i>Ae. aegypti</i> indicando as escamas branco-prateadas organizadas em em desenho de lira.....	18
Figura 3 -	(A) Fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> pousada em um recipiente plástico após a emergência da fase de pupa; (B) Fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> após repasto sanguíneo dentro da gaiola de manutenção.....	19
Figura 4 -	Jangadas de ovos de <i>Culex quinquefasciatus</i>	20
Figura 5 -	Ciclo de vida do parasito <i>Wuchereria bancrofti</i>	21
Figura 6 -	Fluxograma da revisão bibliográfica realizada para descrever procedimentos utilizados para manutenção de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> em condições de laboratório.....	27
Figura 7 -	Fluxograma da revisão bibliográfica realizada para avaliar técnicas alternativas de alimentação sanguínea artificial em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i>	28
Figura 8 -	(A) Gaiola com estrutura de madeira e fechamento de telas em todas laterais; (B) Gaiola com estrutura metálica, envolvida por telas em todos os lados.....	32
Figura 9 -	(A) Gaiola de papelão, com mangote frontal e tampa plástica telada; (B) Gaiola de vidro, com mangote frontal, e tampa superior telada.....	32
Figura 10 -	Detalhe do mangote frontal de tecido para manutenção dos mosquitos em gaiolas de papelão.....	33
Figura 11 -	(A) Bandejas plásticas brancas para manutenção de mosquitos imaturos; (B) Detalhe das larvas e pupas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> em bandeja para manutenção de imaturos.....	34
Figura 12 -	(A) Foto aproximada de larvas de <i>Ae. aegypti</i> em recipientes plásticos transparentes; (B) Estante para armazenamento de recipientes de criação larval.....	35
Figura 13 -	(A e B) Rações em flocos para alimentação de peixes ornamentais; © Ração granulada para alimentação de peixes de lagos.....	36
Figura 14 -	(A) Frasco de vidro (Erlenmeyer) contendo solução açucarada 10%; (B) Detalhe do rolinho de gaze e algodão utilizado para alimentação de mosquitos.....	39

Figura 15 -	(A) Roedor “empastelado”, preso em malha de arame para alimentação de fêmeas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> ; (B) Detalhe das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> picando o rabo do roedor.....	40
Figura 16 -	(A) Gaiola de metal para contenção de codornas; (B) Detalhe da codorna confinada na gaiola de metal para alimentação de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i>	41
Figura 17 -	(A) Meio de postura para mosquitos <i>Ae. aegypti</i> ; (B) Ovos de <i>Ae. aegypti</i> fixados em papel filtro.....	42
Figura 18 -	Ovos de <i>Ae. aegypti</i> em palheta de Eucatex.....	43
Figura 19 -	(A e B) Meio de postura de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> ; (C e D) Jangadas de ovos de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	44
Figura 20 -	Página principal da plataforma on-line para cadastramento de pesquisas envolvendo seres humanos.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros ambientais para manutenção de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> em condições de laboratório.....	30
Tabela 2 -	Suprimentos alimentares utilizados na dieta de larvas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> mantidos em laboratório.....	37
Tabela 3 -	Variações de técnicas artificiais utilizadas para alimentação sanguínea de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em condições de laboratório.....	46
Tabela 4 -	Custo estimado por mililitro para sangue desfibrinado.....	47
Tabela 5 -	Tipos de anticoagulantes utilizados para técnicas artificiais de alimentação sanguínea para mosquitos.....	49
Tabela 6 -	Vantagens e desvantagens na utilização de técnicas artificiais para alimentação sanguínea de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> em condições de laboratório.....	53
Tabela 7 -	Taxa de alimentação, fecundidade e sobrevivência de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> após repasto sanguíneo em dispositivos artificiais.....	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Importância para Saúde Pública	16
1.2. <i>Aedes aegypti</i>	17
1.3. <i>Culex quinquefasciatus</i>	19
1.4. Controle dos vetores.....	22
1.5. Pesquisas com mosquitos em laboratório.....	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. METODOLOGIA	26
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Manutenção de mosquitos em laboratório.....	29
4.1.1 Condições Ambientais.....	30
4.1.2. Manutenção de mosquitos adultos	31
4.1.3. Manutenção de formas imaturas de mosquitos	33
4.1.4. Aspectos nutricionais de mosquitos	35
4.1.4.1. Alimentação de formas imaturas (larvas).....	36
4.1.4.2. Dieta líquida para mosquitos adultos	38
4.1.4.3. Dieta sanguínea para fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i>	39
4.1.4.4. Dieta sanguínea para fêmeas adultas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	40
4.1.5. Meio para postura de ovos de <i>Ae. aegypti</i>	41
4.1.6. Meio para postura de ovos de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	43
4.2. Alimentação sanguínea artificial para mosquitos em laboratório	45
4.3. Técnicas de alimentação sanguínea artificial de mosquitos em laboratório	50
4.3.1. Recipientes plásticos (copos / tubos).....	50
4.3.2. Placas de metal	51
4.3.3. Reservatório membranoso.....	51
4.3.4. Hemotek	52
4.3.5. Reservatório com circulação de água para aquecimento.....	52
4.4. Vantagens e desvantagens na alimentação artificial de mosquitos.....	53
4.5. Influência da alimentação artificial nas taxas de alimentação, fecundidade e sobrevivência de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>.....	54
5. DISCUSSÃO	57

6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO A – Recipientes plásticos usados como reservatório sanguíneo para alimentação de mosquitos em laboratório	68
ANEXO B – Placa de metal utilizada como reservatório sanguíneo.....	70
ANEXO C – Reservatório membranoso para armazenamento de sangue.....	71
ANEXO D – Hemotek.....	72
ANEXO E – Reservatório sanguíneo com circulação de água para aquecimento	73

1. INTRODUÇÃO

Há pouco mais de um século, animais vêm sendo utilizados para pesquisas de laboratório em estudos onde são avaliados comportamentos, aspectos fisiológicos, taxonômicos, virológicos e outros diversos, permitindo avanços tecnológicos para o meio científico. Anteriormente, animais de laboratório eram usados como “simples” instrumentos de pesquisa, com pouca ou nenhuma ética, sem ao menos analisar sua qualidade genética ou sanitária. Hoje, são utilizados como principais instrumentos dentro de um estudo e fundamentais para desfecho de algumas pesquisas (ANDRADE et.al., 2002).

A manutenção de insetos em laboratório, assim como outros animais, possibilita entender melhor sua biologia, dinâmica de populações, desenvolvimento das espécies e melhores condições para confinamento e reprodução (RESENDE e GAMA, 2006).

Algumas espécies de mosquitos são muito estudadas, devido à transmissão de patógenos ao ser humano e sua importância em saúde pública.

Os mosquitos são insetos que pertencem ao Filo Arthropoda, sendo a maioria das espécies de pequeno porte, chegando a poucos milímetros. São classificados como dípteros nematóceros e pertencem à família Culicidae (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). Duas subfamílias compõem a família Culicidae, sendo elas: Anophelinae, que é composta por três gêneros e onde estão as espécies de mosquitos vetores do agente etiológico da malária, e Culicinae, composta por 35 gêneros divididos em 11 tribos (FORATTINI, 2002). Dessas tribos, destacam-se Aedini e Culicini como as que possuem o maior número de espécies com importância para saúde pública, sendo *Aedes* e *Culex* os principais gêneros envolvidos na transmissão de patógenos ao homem (FORATTINI, 2002).

No Brasil, dependendo da região, os mosquitos são conhecidos por diferentes nomes populares, tais como muriçoca, pernilongo e carapanãs. São insetos holometábolos, pois efetuam metamorfose completa, em que o desenvolvimento passa por quatro estágios de vida: ovo, larva, com 4 estádios, pupa e adulto (**Figura 1**) (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 1: Ciclo de vida de um mosquito (*Aedes aegypti*), mostrando as fases de ovo, larva, pupa e adulto. (Fonte: CARVALHO, 2012)

De modo geral, os ovos de mosquitos são colocados em coleções ou reservatórios de água, que podem ser de origem artificial ou natural. Nesses criadouros (breeding places), ocorre o desenvolvimento das formas imaturas, ou seja, larvas e pupas, até a emergência dos adultos. Dessa forma, enquanto ovos, larvas e pupas de mosquitos são considerados aquáticos, os adultos são considerados terrestres (FORATTINI, 2002). Larvas de mosquito movimentam-se com muita facilidade para todos os lados, seu corpo tem aspecto vermiforme, com divisão bem definida entre a cabeça, tórax e abdome e, neste último, está localizado o sifão respiratório, que pode variar de tamanho e formato de acordo com a espécie. São filtradoras, se alimentam de bactérias, microalgas, partículas orgânicas dispersas na água e no fundo de recipientes. Para respiração, permanecem parte do tempo paradas na lâmina d'água, com o sifão respiratório acima da superfície em busca de oxigênio (CONSOLI e LOURENÇO-DE OLIVEIRA, 1994).

As pupas, assim como as larvas, também são aquáticas, porém seu corpo não possui aspecto vermiforme, mas, sim, de uma vírgula. Essa fase corresponde a um período de grande transformação, em que resulta na formação do adulto e mudança do meio hídrico para o terrestre (FORATTINI, 2002). A coloração da pupa é clara logo após a transformação de fase e vai escurecendo até chegar à uma tonalidade bem escura. Além de não se alimentarem, pupas de mosquitos ficam quase o tempo todo paradas na lâmina d'água com as trombas ou trombetas respiratórias buscando oxigênio. Quando nadam, são bem rápidas, pois possuem um par de paletas no final do abdome, que auxiliam sua locomoção (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Já os adultos apresentam um par de asas, um par de antenas, pernas longas, cabeça globular, tórax comprimido lateralmente e abdome com aspecto cilíndrico (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). Machos e fêmeas adultos se alimentam de açúcares dispersos na natureza, através de plantas, flores, frutos e outros derivados vegetais. Somente as fêmeas se alimentam de sangue, pois necessitam dele para maturação dos ovos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

1.1. Importância para Saúde Pública

O crescimento populacional no mundo, junto com o aumento desenfreado dos grandes centros urbanos, com condições precárias de saneamento e infraestrutura, favorecem o desenvolvimento e a proliferação de algumas espécies de mosquitos com importância em saúde pública (TAUIL, 2001; LAPORTA et. al., 2006; LIMA-CAMARA et al., 2016). A transmissão de patógenos entre mosquitos e seres humanos ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos infectadas. Após o repasto sanguíneo em um indivíduo virêmico, inicia-se o estágio de digestão do sangue, enquanto o patógeno se multiplica em diferentes tecidos do mosquito e alcança a glândula salivar e saliva, por onde será transmitido para o hospedeiro vertebrado através da picada (DARWISH et al., 1985). Este evento é definido como transmissão horizontal (TEIXEIRA; BARRETO 1999). Adicionalmente, conforme apresentado por FERREIRA-DE-LIMA e LIMA-CAMARA (2018), também é possível ocorrer transmissão vertical de alguns arbovírus, como, por exemplo, dengue (DENV) em *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*. Nessa forma de transmissão, os arbovírus são passados de uma fêmea infectada para sua prole, pelo ovário ou durante a oviposição.

A importância de várias espécies de culicídeos é reportada desde o final do século XIX, pois à partir deste período, diversos fatores passaram a ser relacionados com a transmissão de patógenos aos seres humanos, como os vírus Zika, dengue e chikungunya para *Ae. aegypti*, e o vírus West Nile e filárias (filariose bancroftiana) para *Cx. quinquefasciatus* (SERVICE, 1980; PINTO et. al, 2007).

A dengue, que é transmitida por *Ae. aegypti*, afeta principalmente pessoas adultas, sendo que a infecção causada por este vírus, raramente resulta em morte. A maioria dos casos de morte registrados por dengue está relacionada a casos mais graves desta doença. No mundo, dezenas de milhares de casos são registrados todos os anos (WHO, 1997). No ano de 2019, somente no Brasil, registrou-se 1.544.987 casos de dengue, um aumento de 488% em relação

a 2018. Desse total de casos registrados, 782 pessoas morreram em todo o país. Para zika, foram registrados 10.708 casos confirmados, com 3 mortes, e 132.205 casos de chikungunya, com 92 mortes, um aumento, respectivamente, de 52% e de 30% em relação aos casos de 2018. A soma de todos os casos de dengue, zika e chikungunya reflete em um aumento de 248% no registro das doenças transmitidas pelo mosquito do *Aedes aegypti* em 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A doença filariose bancroftiana, causada pela filária da espécie *Wuchereria bancrofti*, transmitida pelo *Cx. quinquefasciatus*, atingiu cerca de 107 milhões de pessoas em partes da China, Índia, sudeste da Ásia, Ilhas do Pacífico, países tropicais na África, América do Sul e América Central. Além de tal importância médica, *Cx. quinquefasciatus* também gera incômodo para as comunidades que vivem próximas aos seus criadouros, em função da elevada antropofilia da espécie (WHO, 1997).

A recente detecção da circulação dos arbovírus chikungunya (CHIKV), Nilo Ocidental (WNV) e Zika (ZIKV) nas Américas, incluindo Brasil, representam desafios às autoridades de saúde pública, devido à suscetibilidade da população, à falta de vacinas e à ausência de tratamento específico para essas doenças (LIMA-CAMARA et al. 2016). Efeitos dessas doenças também podem prejudicar o dia-a-dia de pacientes infectados com estes patógenos e, em alguns casos, incapacitá-los devido aos sintomas desenvolvidos, como a artralgia forte de chikungunya e fadiga extrema do vírus do Nilo Ocidental (LIMA-CAMARA, 2016). Casos mais graves podem ser apresentados em pacientes infectados por ZIKV, pois essa infecção pode colaborar para o desenvolvimento de síndromes de origem auto-imune, como a de Guillain-Barré, que causa fraqueza muscular e paralisia generalizadas nos pacientes, e complicações em mulheres grávidas, devido a associação do ZIKV com casos registrados de microcefalia em recém-nascidos (LIMA-CAMARA, 2016).

1.2. *Aedes aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* tem origem no Velho Mundo, provavelmente da região etiópica. Foi identificado e descrito pela primeira vez no Egito. Essa espécie vem acompanhando a migração do homem por todo o mundo, e se instalando onde as alterações antrópicas foram favorecendo seu desenvolvimento e proliferação. *Ae. aegypti* é considerado uma espécie cosmopolita, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais. Esse mosquito vem sendo disseminado principalmente de forma passiva pelo homem, através de embarcações, transporte aéreo, ferroviário e automotivo (CONSOLI e LOURENÇO-DE-

OLIVEIRA, 1994). Adultos desta espécie possuem coloração escura, com destaque para escamas prateadas em seu escudo, formando em conjunto um desenho classicamente comparado à “lira” (**Figura 2**), onde o contorno externo é constituído por escamas largas, e as “cordas” são formadas por linhas delgadas de elementos prateados estreitos (FORATTINI, 2002).

Figura 2: (A) Fêmea de *Ae. aegypti* ingurgitada com sangue; (B) Destaque do tórax da fêmea de *Ae. aegypti* indicando as escamas branco-prateadas organizadas em desenho de lira (Fonte: Elaborada pelo autor)

O comportamento e fácil adaptação de *Ae. aegypti* favoreceram sua dispersão pelos mais diferentes tipos de ambientes urbanos, sendo raramente encontrado em ambientes silvestres ou semi-silvestres, onde não há presença intensa do homem (BRAGA; VALLE, 2007). Essa espécie é mais frequentemente encontrada em ambientes do intra e peridomicílio, onde há elevada presença humana, abrigos e criadouros potenciais. A maioria dos criadouros de *Ae. aegypti* é artificial, sendo latas, pneus, caixas d'água, vasos de plantas, dentre outros, os principais exemplos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Em alguns casos, podem também utilizar criadouros naturais para depositar seus ovos, como ocos de árvores (LIMA-CAMARA et al., 2016). A somatória das características do ambiente, como presença abundante de criadouros, abrigos e humanos favorece a rápida proliferação dessa espécie de mosquito (PINA; FONSECA, 1999; ZARA, 2016).

O hábito alimentar das fêmeas de *Ae. aegypti* restringem ao período diurno, sendo os picos de maior atividade no amanhecer e durante o crepúsculo vespertino. Entretanto, podem picar o homem e outros animais a qualquer hora do dia, pois são muito oportunistas (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Os ovos são muito resistentes à dissecação, podendo resistir por longos períodos de ausência de água. Essa sobrevivência

pode se prolongar por períodos consideráveis, podendo permanecer viável por mais de um ano (ESPINDOLA et al., 2008). As fêmeas não realizam postura de ovos diretamente na água, mas sim, em superfícies próximas ao contato com o meio líquido dos criadouros. A eclosão das larvas ocorre assim que passem a agir estímulos de variadas naturezas, quando há condições ideais para seu desenvolvimento (FORATTINI, 2002).

No Brasil, a grande importância de *Ae. aegypti* reveste-se no fato de ser considerado o principal vetor da febre amarela urbana, dengue (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002), chikungunya (HONÓRIO et al. 2015) e Zika (FERREIRA-DE-BRITO et al. 2016).

1.3. *Culex quinquefasciatus*

Culex quinquefasciatus é um dos mosquitos mais encontrados em áreas de saneamento precário, relacionado às zonas periféricas de habitações humanas. Este mosquito é conhecido popularmente como pernilongo ou muriçoca (MORAIS et.al., 2007) e apresentam coloração geralmente marrom ou enegrecida (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) (**Figura 3**).

Figura 3: (A) Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* pousada em um recipiente plástico após a emergência da fase de pupa; (B) Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* após repasto sanguíneo dentro da gaiola de manutenção (Fonte: Elaborada pelo autor)

Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* são hematófagas e estão associadas aos locais de habitações humanas, onde encontram abrigo, criadouros e fontes de alimentação (BUSVINE, 1980). Por apresentar comportamento noturno, estes mosquitos geralmente perturbam o sono das pessoas (TAIPE-LAGOS e NATAL, 2003; MORAIS et al., 2007; BORGES, 2014). O ser humano está entre os hospedeiros mais frequentes desta espécie para realização de hematofagia, porém, na sua ausência, uma grande variedade de animais pode servir como fonte de alimento para as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Imaturos desta espécie estão muito bem adaptados para se desenvolverem em águas ricas em matéria orgânica. Além de grandes coleções de água, como rios e córregos, as formas imaturas de *Cx. quinquefasciatus* também podem se desenvolver em criadouros artificiais, na maioria das vezes, de caráter permanente (MORAIS et.al., 2007).

A postura de ovos de *Cx. quinquefasciatus* é realizada de forma agrupada, e não isolada, como acontece com algumas espécies de culicídeos. Os ovos agrupados formam uma “jangada” ou “barca” (**Figura 4**), que permanece flutuando sobre a lâmina d’água. Essas posturas são realizadas frequentemente em locais com matéria orgânica em decomposição e baixa luminosidade (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A coloração dos ovos após a postura é branca, porém, escurece com o passar das horas devido à oxidação (FORATTINI, 2002).

Figura 4: Jangada de ovos de *Culex quinquefasciatus* (Fonte: Elaborada pelo autor)

Quando em grandes quantidades, a presença deste mosquito na área urbana gera desconforto ao ser humano, irritabilidade e diminuição da qualidade de vida, devido ao incômodo causado pelas picadas e perturbação noturna (FORATTINI, 2002). Além disso, algumas áreas infestadas por *Cx. quinquefasciatus* são propícias a problemas relacionados com saúde pública, pois esse mosquito é considerado vetor de alguns agentes patogênicos, que podem provocar doenças a população local (MORAIS et.al., 2007). Por exemplo, a filariase bancroftiana, causada pelo verme *Wuchereria bancrofti*, é transmitida principalmente por *Cx. quinquefasciatus* (WHO, 1997).

A filariose bancroftiana está associada à presença dos parasitos adultos (microfilárias) (**Figura 5**) e possui amplo espectro clínico, variando desde pacientes assintomáticos até os com manifestações relacionadas à inflamação aguda linfática e à patologia linfática crônica. Algumas manifestações menos frequentes e incomuns, como a eosinofilia pulmonar tropical, são resultado de hiper-reatividade imunológica do hospedeiro humano às microfilárias e antígenos do parasito (ROCHA; FONTES, 1998).

Figura 5: Ciclo de vida do parasito *Wuchereria bancrofti* (WHO, 1997)

Adicionalmente, *Cx. quinquefasciatus* é apontado como um dos vetores do arbovírus WNV nos Estados Unidos (CIOTA; KRAMER, 2013), cuja circulação também foi recentemente detectada no Brasil (MARTINS et al. 2019).

1.4. Controle dos vetores

Na ausência de vacinas eficazes que evitem as infecções pelos agentes patogênicos transmitidos por *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, a principal forma de reduzir o número de casos dessas doenças é controlando a população desses vetores, pois a diminuição da densidade destas espécies no meio urbano, reduz as chances de transmissão dos patógenos aos seres humanos. De modo geral, as estratégias para controle de mosquitos envolvem três tipos de ações, como “controle mecânico ou físico”, “biológico” e “químico” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O controle mecânico é direcionado ao uso de práticas para evitar locais de proliferação de formas imaturas (larvas e pupas), e prevenção contra adultos, como por exemplo, a utilização de telas em portas e janelas formando uma barreira física contra os mosquitos. Já no controle biológico, podem ser utilizados larvicidas à base das bactérias *Bacillus thuringiensis israeliensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* (*Bs*) (ESPINDOLA et al., 2008). Em alguns casos, como reservatórios com grandes volumes de água, podem ser utilizados peixes para combate as larvas de mosquitos (ZARA et al., 2016).

Indústrias biológicas, denominadas “biofábricas”, estão produzindo massivamente mosquitos para utilização no controle biológico de *Ae. aegypti*. Mosquitos geneticamente modificados ou com presença de *Wolbachia*, desenvolvidos por técnicas que envolvem processos biológicos, como tratamento químico e até mesmo esterilização por meios de radiação, vêm sendo estudados por muitos pesquisadores e empresas (OLIVEIRA et al, 2011; CARVALHO, 2012; ROSS et al., 2017). Uma técnica onde são utilizados insetos estéreis (SIT – Sterile Insect Technique) envolve a manutenção de mosquitos machos em laboratório para esterilização e, posteriormente, soltura em áreas específicas para o controle da espécie. Estes machos estéreis irão realizar a cópula com fêmeas selvagens e, conseqüentemente, tornarão inviáveis as proles geradas pós-cruzamento (CARVALHO, 2012).

Ainda sobre o controle biológico com mosquitos transgênicos, destaca-se a importância de fazer a sexagem correta de machos em laboratório antes de realizar a soltura no ambiente, pois as fêmeas não devem ser liberadas em nenhum momento. Este cuidado é para prevenir fatores de incômodo e risco de transmissão de doenças (ZARA et al., 2016). A liberação de fêmeas de laboratório no ambiente externo pode inibir a dispersão e atrapalhar o acasalamento de machos estéreis com fêmeas selvagens, trazendo falhas no controle (PAPATHANOS et al., 2018). A liberação de linhagens transgênicas de mosquitos no ambiente para controle vetorial pode se tornar uma ferramenta importante e eficaz para

diminuição populacional e redução da circulação de arbovírus. De acordo com Araújo, Kojin e Capurro (2018), um estudo realizado no Brasil entre os anos de 2010 e 2015 comprovou a eficácia de 70% de controle do *Ae. aegypti* com a utilização da técnicas de liberação de machos transgênicos.

Em relação ao controle químico de mosquitos, é necessária a utilização de inseticidas de grupos químicos como piretróides, neonicotinóides, organofosforados, juvenóides, entre outros pesticidas. Estes compostos podem ser neurotóxicos, análogos ao hormônio juvenil ou inibidores de síntese de quitina. As técnicas utilizadas para aplicação de inseticidas envolvem o uso de equipamentos especializados para sua aplicação, como pulverizadores de compressão prévia, atomizadores e nebulizadores. Os locais de tratamento com compostos químicos, geralmente, são direcionados para vegetação e paredes e superfícies de áreas interna e externa de residências, onde há pouso e repouso de mosquitos (ZARA et al., 2016).

1.5. Pesquisas com mosquitos em laboratório

Dentro de áreas como a biologia, medicina humana e veterinária, o homem está, cada vez mais, buscando atualizações de suas técnicas e procedimentos, sendo que, para isto, ações que envolvem manutenção e experimentação animal são alguns dos pilares de seu desenvolvimento (ANDRADE et.al., 2002).

Colônias de insetos mantidas em laboratório possibilitam a reprodução de diversas espécies em larga escala. Para que isso se torne possível, alguns requisitos são necessários para o sucesso na produção dos insetos. É fundamental que se tenha ambientes controlados, com fotoperíodo, temperatura e umidade adequados de acordo com a necessidade de cada espécie, associado a um ambiente estruturado para manejo dos insetos (PINA; FONSECA, 1999; ANJOLETTE e MACORIS, 2016).

Para desenvolver pesquisas com insetos hematófagos, como mosquitos, é necessário que se tenha um biotério de “animais suporte”, como roedor ou aves, pois estes serão utilizados como fonte sanguínea para alimentação das espécies em estudo (GONZALES e HANSEN, 2016). Entretanto, atualmente, protocolos de Comitê de Ética para experimentação animal estão cada vez mais rígidos e difíceis de aprovação. Com isso, pesquisas que dependem do uso de animais vivos estão sendo revisadas com o objetivo de diminuir a quantidade utilizada em um só experimento, para que o andamento dos estudos não seja prejudicado (GONZALES e HANSEN, 2016).

Alternativas para não se utilizar animais vivos como fonte de alimento para insetos hematófagos vêm sendo desenvolvidas por muitos pesquisadores.

A utilização de técnicas artificiais para alimentação sanguínea de mosquitos adultos elimina a obrigatoriedade de manter um biotério em paralelo ao laboratório. O uso dessas técnicas traz vantagens sobre os métodos tradicionais utilizados até o momento, pois diminui o risco de transmissão de patógenos e aumenta a segurança dos insetários. Além disso, é possível padronizar a fonte de alimento e fazer com que eles estejam disponíveis a qualquer momento (PINA e FONSECA, 1999).

Para alimentação artificial de mosquitos, há possibilidades de utilização do sangue de animais destinados para consumo humano, como aves, bovinos, caprinos e suínos, pois só no Brasil, é gerado aproximadamente um milhão de toneladas de sangue de animais abatidos por ano. Deste total, a maior parte da matéria-prima é transformada em alimento e ingredientes para a alimentação animal como, por exemplo, a farinha de sangue, gerando aproximadamente 114 mil toneladas desse produto ao ano. O restante, do sangue geralmente é desprezado. A alternativa pelo uso desse tipo de sangue em tese é bem interessante, pois pode reduzir os custos brutos para manutenção dos insetos, e eticamente não teria problemas para utilização (PONSE, 2018).

Pesquisas com mosquitos para avaliação de eficácia em inseticidas e repelentes são realizadas com base em manuais técnicos ou normas e protocolos internacionais. Estas referências preconizam a utilização de grandes quantidades de mosquitos, para que os bioensaios apresentem resultados robustos, garantindo a segurança dos produtos testados (ANVISA, 2004; RESENDE e GAMA, 2006).

Laboratórios que produzem mosquitos em larga escala necessitam de protocolos atualizados, com alternativas para melhoramento das colônias, como rapidez no processo de alimentação dos insetos, menor perda de mosquitos adultos, maior produtividade de ovos após repasto sanguíneo, e consequentemente, maior produção de mosquitos. Dessa forma, esta revisão teve como objetivo trazer aspectos envolvidos nos procedimentos da manutenção de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em laboratório, e técnicas alternativas que são utilizadas para alimentação sanguínea de mosquitos adultos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Descrever técnicas utilizadas para manutenção de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em condições de laboratório e alternativas para alimentação sanguínea de mosquitos adultos destas espécies.

2.2. Objetivos específicos

- Apresentar procedimentos gerais utilizados na manutenção das espécies *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em condições de laboratório;
- Apresentar técnicas artificiais utilizadas para alimentação sanguínea de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em condições de laboratório.

3. METODOLOGIA

Para a descrição dos procedimentos utilizados na manutenção das espécies de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, foi abordada uma metodologia adaptada pelo autor do projeto, seguindo protocolo padrão do laboratório onde realizava essas atividades com mosquitos.

Adicionalmente, foram realizadas pesquisas nos Indexadores dos artigos científicos, como PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), SciELO (<https://scielo.org/>), ResearchGate (<https://www.researchgate.net/>) e Lilacs (<https://lilacs.bvsalud.org/>), utilizando as palavras-chave “*Aedes aegypti*”, “*Culex quinquefasciatus*”, “laboratório”, “criação”, “manutenção”, “alimentação”, “reprodução”, “repasto sanguíneo”, “bioensaios”, “eficácia”, “inseticidas”, “larvicidas”, “repelentes” e suas versões em inglês e espanhol.

A combinação de algumas palavras-chave também foi utilizada para refinar a pesquisa sobre o tema relacionado à manutenção de mosquitos em laboratório, pois, dessa forma, o número de artigos obtidos na busca nos indexadores se tornava mais direto e eficaz. Publicações que abordavam temas relacionados à produção de mosquitos em larga escala, controle biológico e testes de eficácia com inseticidas e repelentes foram incluídas na análise. Adicionalmente, foi realizada pesquisa manual de artigos citados na lista de referências do conteúdo bibliográfico utilizado neste trabalho, a fim de incluir o maior número de artigos possível.

Para ilustração da forma de pesquisa levantada nesta metodologia, foi elaborado um fluxograma (**Figura 6**) onde, de forma resumida, são apresentados todos os detalhes de como foi realizada a busca de artigos para revisão sistemática sobre o tema deste trabalho.

Figura 6: Fluxograma da revisão bibliográfica realizada para descrever procedimentos utilizados para manutenção de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em condições de laboratório.

Já para apresentar técnicas utilizadas para alimentação sanguínea artificial de adultos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, a mesma base de dados foi consultada, mas com as palavras-chave e frases: “*Aedes aegypti*”, “*Culex quinquefasciatus*”, “laboratório”, “manutenção”, “criação”, “dieta artificial”, “alimentação artificial”, “membrana”, “fecundidade”, “mortalidade” e suas versões em inglês e espanhol. Também foi realizada a busca com a combinação de algumas palavras-chave para refinar a pesquisa sobre o tema relacionado à alimentação sanguínea artificial para mosquitos em laboratório, além de pesquisa manual de artigos citados na lista de referências levantada para incluir o maior número de artigos possível.

Publicações dos anos de 2009 a 2019, que abordavam temas relacionados à alimentação artificial de mosquitos por membranas e outros dispositivos, foram incluídos na

análise. Para ilustração da forma de pesquisa levantada desta etapa na metodologia, foi elaborado um fluxograma (**Figura 7**), onde de forma resumida, apresenta todos os detalhes de como se realizou a busca de artigos para revisão sistemática sobre o tema deste trabalho.

Figura 7: Fluxograma da revisão bibliográfica realizada para avaliar técnicas alternativas de alimentação sanguínea artificial em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*

4. RESULTADOS

4.1. Manutenção de mosquitos em laboratório

Independente da finalidade da manutenção de mosquitos em laboratório, alguns requisitos mínimos devem ser seguidos para garantir a segurança das pessoas e do ambiente. De acordo com ADEGAS et al. (2005), é fundamental a identificação do nível de biossegurança na entrada do insetário/laboratório que será usado para manutenção de insetos. Neste caso específico, de manutenção de insetos, trata-se de Nível de risco de Biossegurança II. Além disso, é recomendado que o insetário tenha um sistema com porta dupla, que deverá permanecer fechada por sistema mecânico, separado por antecâmara, com fechamento interdependente, para evitar a fuga de insetos voadores (mosquitos ou flebotomíneos, por exemplo). Caso este ambiente tenha janelas, estas devem ser teladas e mantidas sempre fechadas. Conforme citado por GERBERG (1970), a fuga de insetos vetores de patógenos é prejudicial ao ambiente e não pode ser tolerada. A responsabilidade do entomologista ou equipe que manuseia estes insetos é semelhante à responsabilidade de um bacteriologista que cultiva bactérias patogênicas.

Procedimentos de alimentação, reprodução e acondicionamento de mosquitos são alguns dos principais elementos para o desenvolvimento de colônias em larga escala em laboratório (GUNATHILAKA et al., 2017). A atenção aos detalhes diários é o requisito mais importante para se obter uma criação bem-sucedida, sendo que a manutenção dos mosquitos em laboratório requer uma atenção de 24 horas por dia, 7 dias por semana. Basicamente, as regras que devem ser seguidas são: evitar superlotação em criadouros larvais e em gaiolas de adultos, para que não ocorra competição e mortalidade; alimentação ser dosada na quantidade correta e de acordo com a necessidade dos espécimes; evitar a contaminação por pesticidas de modo geral; e padronizar métodos de manejo dos insetos (GERBERG, 1970).

Normalmente, as colônias de mosquitos iniciam com poucos espécimes fornecidos por um instituto de referência, para garantir maior segurança e qualidade da produção. Isso não impede que se utilizem mosquitos adquiridos em coletas no ambiente, porém, os cuidados devem ser redobrados e uma correta identificação taxonômica deve ser realizada para certificar qual espécie está sendo mantida.

4.1.1 Condições Ambientais

As condições ambientais, como temperatura, umidade e fotoperíodo, são parâmetros que necessitam de um bom planejamento para o manejo e desenvolvimento adequado de animais em laboratório. Ao estabelecer colônias de mosquitos em locais confinados, é fundamental que as variações de parâmetros ambientais, quando existentes, não sejam muito grandes, pois podem influenciar no ciclo de vida e reprodução das espécies. Mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* se desenvolvem perfeitamente sob temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar entre 60 e 80%. Entretanto, essa faixa pode ser maior ou menor, dependendo do objetivo da pesquisa, conforme é apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Parâmetros ambientais para manutenção de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em condições de laboratório

ESPÉCIE	PARÂMETROS AMBIENTAIS			REFERÊNCIAS
	T°C	UR (%)	FOTOPERÍODO	
<i>Ae. aegypti</i>	$25,3 \pm 0,1$	$65,0 \pm 0,6$	C:E 12:12	SILVA et al., 1993
<i>Ae. aegypti</i>	$28,0 \pm 1,0$	$80,0 \pm 5,0$	C:E 12:12	SILVA et al., 1998
<i>Ae. aegypti</i>	22,5 a 26,9	87,0	C:E 12:12	SERPA et al., 2008
<i>Ae. aegypti</i>	$26,0 \pm 2,0$	$60,0 \pm 10,0$	C:E 12:12	CASTRO JUNIOR, 2010
<i>Ae. aegypti</i>	$28,5 \pm 1,7$	$66,6 \pm 13,1$	C:E 12:12	OLIVEIRA e SOUZA, 2014
<i>Ae. aegypti</i>	$28,0 \pm 0,5$	$80,0 \pm 5,0$	-	PINA; FONSECA, 1999
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	$27,0 \pm 0,1$	$80,0 \pm 5,0$	C:E 12:12	CAMARGO et al., 1994
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	$27,0 \pm 0,7$	$78,8 \pm 3,6$	-	BRITO et al., 1999
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	$29,0 \pm 1,0$	$70,0 \pm 10,0$	-	AHID et al., 2000
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	$22,5 \pm 7,5$	$80,0 \pm 5,0$	-	RIBEIRO et al., 2004

Legenda: T°C: Temperatura em graus celsius; UR: Umidade relativa do ar; C: Fase clara; E: Fase escura

Para *Ae. aegypti*, a manutenção em laboratório já seguiu temperaturas desde $22,5^\circ\text{C}$ (SERPA et al., 2008) até temperaturas mais altas, como $28,5^\circ\text{C}$ (OLIVEIRA e SOUZA, 2014). A umidade para essa espécie foi mantida entre 60% (CASTRO JUNIOR, 2010) a até 87% (SERPA et al., 2008) (**Tabela 1**). Já para *Cx. quinquefasciatus*, conforme descrito por RIBEIRO et al. (2004), foram observados grandes variações de temperatura durante a manutenção destes mosquitos em laboratório. Com temperaturas mantidas em $22,5 \pm 7,5^\circ\text{C}$ (15 a 30°C), a variação de tempo no desenvolvimento total do ciclo em laboratório foi de 10 a 44 dias (**Tabela 1**). Com esses parâmetros, foi observado influência no período de incubação e viabilidade dos ovos (1 a 3 dias), desenvolvimento larval (7 a 35 dias) e das pupas (1 a 7

dias). A faixa de umidade para *Cx. quinquefasciatus* foi mantida entre 70% (AHID et al., 2000) até 80% (CAMARGO et al., 1994; RIBEIRO et al., 2004) (**Tabela 1**).

Para manter a temperatura na faixa desejada de desenvolvimento dos insetos, equipamentos elétricos como condicionadores de ar ou aquecedores podem ser utilizados. A umidade geralmente é adquirida através de umidificadores elétricos, que liberam microgotas d'água através de nebulização ou vaporização destes equipamentos para o ambiente.

O fotoperíodo e a intensidade luminosa podem afetar diretamente no desenvolvimento de vários estágios de vida dos mosquitos (ANJOLETTE e MACORIS, 2016; GERBERG, 1970). Um ciclo adequado para o desenvolvimento dos mosquitos é de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Essa programação de iluminação pode ser de forma manual ou automatizada através de equipamentos nos quais são programados os horários desejados (GERBERG, 1970).

4.1.2. Manutenção de mosquitos adultos

A manutenção de mosquitos adultos em laboratório exige locais adequados, como gaiolas teladas, que podem variar de tamanho e material, sendo elas em formato quadrado, cilíndrico ou retangular. De acordo com RIBEIRO NETO e ALVES (2013), formas adultas de *Cx. quinquefasciatus* eram mantidas em gaiolas teladas, com dimensões de 60 x 50 x 50 cm. Já para OLIVEIRA e SOUZA (2014), os adultos de *Ae. aegypti* eram mantidos em gaiolas de acrílico quadradas, com medidas de 30 x 30 x 30 cm. As gaiolas para a manutenção dos mosquitos são feitas, na maioria das vezes, de material adaptado ou sob medida, pois o alto custo e difícil acesso a alguns elementos apropriados para este fim dificulta sua padronização. Pouco material para Entomologia é produzido no Brasil, e a grande maioria utilizada em laboratório é de origem estrangeira.

As gaiolas podem ser construídas com estrutura de madeira ou metálicas (**Figura 8-A e B**), possuindo tela nas laterais, as quais podem ser de material metálico, galvanizado ou nylon. As laterais teladas facilitam a ventilação em seu interior, e melhor visualização dos espécimes confinados.

Figura 8: (A) Gaiola com estrutura de madeira e fechamento de telas em todas laterais; (B) Gaiola com estrutura metálica, envolvida por telas em todos os lados (Fonte: Elaborada pelo autor)

Gaiolas de papelão (Figura 9-A) são muito usadas para criação em larga escala de mosquitos. Outras opções também podem ser utilizadas para manutenção de mosquitos, como gaiolas de acrílico, vidro (Figura 9-B) ou plástico. Estas configurações de gaiolas facilitam a visualização na parte interna, permitindo realizar trabalhos fotográficos ou mesmo de vídeo, que para pesquisas de comportamento dos insetos são muito utilizados.

Figura 9: (A) Gaiola de papelão, com mangote frontal e tampa plástica telada; (B) Gaiola de vidro, com mangote frontal, e tampa superior telada (Fonte: Elaborada pelo autor)

Algo essencial para gaiolas de mosquitos é possuir, pelo menos, uma porta de acesso ou mangote (**Figura 10**), que servirá para acessar a parte interna. Isso é fundamental para realização da manutenção das colônias, como a limpeza, troca e reposição de alimentos, manipulação de meio de postura, entre outros detalhes que podem variar com a necessidade de cada laboratório.

Figura 10: Detalhe do mangote frontal de tecido para manutenção dos mosquitos em gaiolas de papelão (Fonte: Elaborada pelo autor)

A manutenção de mosquitos em gaiolas, geralmente, necessita da troca do suporte para o alimento e reposição de solução açucarada três vezes por semana. Uma vez por semana, é necessária uma limpeza parcial das gaiolas, para retirada de insetos mortos. Essa limpeza pode ser realizada com um pedaço de algodão umedecido em água, e passado sobre o piso (parte inferior da gaiola).

4.1.3. Manutenção de formas imaturas de mosquitos

Formas imaturas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* podem ser mantidas para desenvolvimento nos mais variados tipos de recipientes. Grande parte destes recipientes possui o fundo de coloração branca (**Figura 11-A e B**), como bandejas ou bacias, pois facilitam a visualização das larvas pequenas (1º e 2º estádios), e favorecem a limpeza. De

acordo com OLIVEIRA e SOUZA (2014), a manutenção de formas imaturas de *Ae. aegypti* em laboratório era realizada através de bandejas plásticas 40 x 27 x 8 cm, com volume aproximado de 1 litro de água. Seguindo padrões semelhantes, SILVA et al. (1998) utilizavam bacias esmaltadas de cor branca para manejo de larvas de *Ae. aegypti*. Estas bacias possuíam as medidas de 30 cm de diâmetro x 7 cm de altura, com capacidade para 1,5 litros de água.

Figura 11: (A) Bandejas plásticas brancas para manutenção de mosquitos imaturos; (B) Detalhe das larvas e pupas de *Cx. quinquefasciatus* em bandeja para manutenção de imaturos (Fonte: Elaborada pelo autor)

Entretanto, dependendo da disponibilidade de espaço no laboratório e de recursos para desenvolvimento das colônias de mosquitos, podem ser utilizados frascos com menor volume e de custo mais barato.

Frascos transparentes (**Figura 12-A e B**), com diversos volumes, são encontrados facilmente em mercados de material descartável, e são ótimos para manutenção de mosquitos. Para produção de mosquitos em larga escala, estes frascos menores são muito utilizados quando há limitação de espaço. Um ponto negativo quando a opção for por frascos pequenos, é que a densidade larval deve ser pequena, fazendo com que se use um maior número de recipientes.

Figura 12: (A) Foto aproximada de larvas de *Ae. aegypti* em recipientes plásticos transparentes; (B) Estante para armazenamento de recipientes de criação larval (Fonte: Elaborada pelo autor)

Segundo ESPINDOLA et al. (2008), a opção por frascos menores para manutenção de mosquitos apresenta resultados satisfatórios em laboratório. Eles utilizaram recipientes com volume de 200 ml, sendo que em cada um dos recipientes (copos plásticos) tinha o volume de água de, aproximadamente, 100 ml, e as larvas permaneciam dentro deles até a fase de pupa.

As pupas de *Aedes* e *Culex* começam a surgir após 6 a 8 dias da eclosão das larvas, em condições ideais. Pode haver uma variação maior de tempo se houver condições desfavoráveis, como baixa temperatura, falta de alimento ou densidade de larvas muito grande por criadouro. Elas devem ser retiradas diariamente com auxílio de uma pipeta de Pasteur e colocadas em copos plásticos (50 ml) para serem introduzidas nas gaiolas de mosquitos adultos.

4.1.4. Aspectos nutricionais de mosquitos

Os mosquitos se alimentam de diferentes tipos de alimentos durante as fases de sua vida. Quando nas formas imaturas, vivem em ambiente aquático, se alimentando de bactérias, matéria orgânica e partículas presentes na água. Já na fase adulta, vivem no ambiente terrestre, alimentando-se de néctar, seiva de plantas, flores e frutos. Essas fontes de carboidratos são fundamentais para atividade de voo e longevidade dos mosquitos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Para que a reprodução de mosquitos seja possível em laboratório, é essencial o fornecimento de uma alimentação sanguínea para as fêmeas, pois somente dessa forma haverá a maturação dos ovos (DENG et al., 2012).

4.1.4.1. Alimentação de formas imaturas (larvas)

Rações utilizadas para alimentação das larvas de mosquitos são facilmente encontradas em lojas que comercializam peixes ornamentais ou “Pet Shop”. As rações em flocos “Alcon Basic” e “Tetramin Flakes” (**Figura 13 A e B**), que foram desenvolvidas para alimentação de peixes ornamentais de água doce em aquários, são muito utilizadas para alimentação de larvas pequenas (1º e 2º estágio), devido à facilidade de manipulação e trituração dos flocos (CAMARGO et al., 1994; AHID et al., 2000; ESPINDOLA et al., 2008; CARVALHO et al., 2014). Antes da utilização deste tipo de alimento, é fundamental triturar ou macerar os flocos de ração, para que se tenha apenas um pó bem fino, que deve ser peneirado para eliminação dos resíduos maiores de ração. Este alimento macerado pode ser mantido refrigerado (2 – 8°C) e estocado em Eppendorf® ou tubos de ensaio tampados, para evitar contaminação de ácaros ou outros patógenos nocivos às larvas de mosquitos.

As larvas de 1º e 2º estágio devem ser alimentadas pelo menos duas vezes ao dia, sempre em pequenas quantidades (1,0 a 2,0 gramas de ração por bandeja) para evitar o acúmulo de sujeira nos recipientes.

Figura 13: (A e B) Rações em flocos para alimentação de peixes ornamentais; (C) Ração granulada para alimentação de peixes de lagos (Fonte: <https://www.petz.com.br/peixe/racoes-e-alimentos/racoes>)

Também é possível utilizar rações granuladas, como a “Sera Koi Royal Large” (**Figura 13-C**), que é destinada para alimentação de peixes de lagos ornamentais. Essa opção facilita a distribuição entre as bandejas de larvas maiores (3º e 4º estágio), pois basta

adicionar 1 a 3 grânulos diariamente por recipiente com aproximadamente 500 larvas, que serão totalmente consumidos.

Entretanto, o tipo de alimento utilizado para alimentação de larvas de mosquitos não se limita apenas a rações para peixes. Larvas de culicídeos ingerem quase tudo o que é oferecido para sua manutenção em laboratório (BRITO et al., 1999). Alimentos sólidos, como rações de animais, são muito utilizados em dietas para larvas de mosquitos, pois geralmente a composição das rações é mais equilibrada e rica em nutrientes, como proteínas, fibras, cálcio, fósforo e vitaminas (ANJOLETTE e MACORIS, 2016).

As opções disponíveis para alimentação das formas imaturas são as mais variáveis possíveis, desde dietas refinadas até infusões preparadas com excrementos de cobaias (BRITO et al., 1999) (**Tabela 2**).

BRITO et al. (1999) utilizaram três dietas diferentes (leite desnatado, ração para cães e ração para camundongos) para alimentação de *Cx. quinquefasciatus* e não observaram diferenças significativas sobre o desenvolvimento das larvas e aceitação dos alimentos. A alimentação com leite desnatado apresentou algumas vantagem em relação aos alimentos sólidos, pois ofereceu melhores condições de limpeza dos recipientes contendo os imaturos, além de ser mais solúvel em água, facilitando o acesso para larvas mais jovens.

Tabela 2: Suprimentos alimentares utilizados na dieta de larvas de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* mantidos em laboratório

TIPO DO ALIMENTO	DOSE (por recipiente)	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
Leite desnatado	-	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BRITO et al. (1997)
Leite desnatado	0,5 g	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BRITO et al. (1999)
Ração para cães	0,5 g	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BRITO et al. (1999)
Ração para camundongos	0,5 g	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	BRITO et al. (1999)
Ração para camundongos	20,0 g	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	ALVES (2017)
Ração para gatos	1,9 g	<i>Ae. aegypti</i>	SILVA et al. (1998)
Ração para gatos	1,0 g	<i>Ae. aegypti</i>	DIAS et al. (2018)
Ração para gatos	1,0 g	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	DIAS et al. (2018)
Ração para peixes + Ração para gatos	-	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	AHID et al. (2000)
Ração para aves	0,5 g	<i>Ae. aegypti</i>	AZEVEDO (2015)
Ração para ratos	-	<i>Ae. aegypti</i>	CALHEIROS et al. (1998)
Ração para ratos	-	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	CALHEIROS et al. (1998)

Já para ALVES (2017) e CALHEIROS et al. (1998), larvas de *Cx. quinquefasciatus* eram alimentadas com ração de roedores (camundongos e ratos). CALHEIROS et al. (1998)

ainda faz observações sobre a necessidade de esterilização do alimento em autoclave antes da utilização, pra eliminação de microrganismos prejudiciais a criação dos mosquitos imaturos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.

Rações para gatos em pellets foram usadas para manutenção das colônias de *Ae. aegypti* por SILVA et al. (1998) e para colônias de *Cx. quinquefasciatus*, por AHID et al. (2000), juntamente com ração de peixes trituras. DIAS et al. (2018) também utilizaram rações para gatos na alimentação de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, porém com dosagem a cada três dias por colônia. Essa dosagem em dias alternados também foi observada por AZEVEDO (2015), sendo que o alimento utilizado era ração para aves triturada em colônias de *Ae. aegypti*.

4.1.4.2. Dieta líquida para mosquitos adultos

A fonte alimentar de carboidratos para machos e fêmeas adultas de mosquitos se dá a partir de soluções açucaradas. Uma fórmula clássica é a solução composta por 10% de açúcar, glucose de milho ou mel + 90% de água. Exemplo: 100 g de açúcar + 900 ml de água.

Da mesma forma, SILVA et al. (1998) e ESPINDOLA et al. (2008) usaram solução de açúcar diluído em água para manter mosquitos criados em laboratório para utilização em experimento. Já SERPA et al. (2008) e RIBEIRO NETO e ALVES (2013), a solução açucarada para alimentação de mosquitos adultos era à base de mel.

Soluções açucaradas podem ser preparadas em grande volume e, quando possível, armazenadas em refrigerador (2 – 8°C) para ter maior estabilidade e evitar contaminação bacteriana. Para utilização dessas soluções que foram armazenadas em baixas temperaturas, o ideal é retirar do refrigerador alguns minutos antes do fornecimento aos mosquitos, a fim de que ela fique em temperatura ambiente. Isso porque se nota que, quando utilizada gelada, o frasco de alimentação fica cheio de gotículas na parte externa. Essas pequenas gotas d'água podem causar mortalidade de alguns adultos, pois durante o voo, os mosquitos podem ficar grudados acidentalmente no frasco de alimentação.

Os frascos utilizados como reservatórios de solução açucarada podem variar de acordo com o formato, volume e aplicabilidade em cada estudo. Um exemplo de frasco que possui ótimo desempenho é o Erlenmeyer de vidro (**Figura 14-A e B**).

Figura 14: (A) Frasco de vidro (Erlenmeyer) contendo solução açucarada 10%; (B) Detalhe do rolinho de gaze e algodão utilizado para alimentação de mosquitos (Fonte: Elaborada pelo autor)

Nestes frascos, são colocados aproximadamente 65 ml de solução açucarada, e em seguida adicionado um rolinho feito de gaze e algodão, para facilitar a alimentação dos mosquitos, pois o líquido sobe por capilaridade até a parte superior do frasco.

Curiosamente, SILVA et al. (1998) relataram o uso de absorvente feminino O.B. (Johnson & Johnson®) para absorção da solução açucarada, onde ele era imerso até que ficasse completamente embebido. Para facilitar a alimentação, esse dispositivo de algodão ficava fixado pelo próprio cordão e um clipe na parte interna da gaiola de mosquitos. A vantagem dessa opção é que ela mostrou-se bem resistente ao desenvolvimento de fungos e bactérias.

4.1.4.3. Dieta sanguínea para fêmeas adultas de *Aedes aegypti*

Esta alimentação, na maioria das vezes, é realizada com a utilização de animais vivos anestesiados. O procedimento para alimentação sanguínea de *Ae. aegypti* pode ser realizado com ratos da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar. Esses ratos devem ser previamente sedados com anestésico injetável (Ketamina), na dose de 1 ml / kg – via intramuscular ou via subcutânea – pois, dessa forma, há uma diminuição do estresse do animal e ao estar desmaiado, facilita a alimentação das fêmeas de mosquitos. Após a sedação, cada rato deve permanecer dentro da gaiola com os mosquitos por um período de 30 – 40 minutos. Ao término desse procedimento, o animal deve retornar para o biotério, e ser colocado em uma caixa de criação com água e alimento. O ideal é ter vários ratos no biotério, para alternar o uso para alimentação das colônias de mosquitos.

De acordo com AZEVEDO (2015), a alimentação sanguínea de *Ae. aegypti* era realizada através de hamster (*Mesocricetus auratus*). Estes roedores permaneciam sedados por cerca de 30 minutos dentro da gaiola com mosquitos. Já para SERPA et al. (2008), fêmeas de *Ae. aegypti* com três a quatro dias de idade eram alimentadas com porquinho da Índia (*Guinea pig*). Essas cobaias eram mantidas nas gaiolas com mosquitos por aproximadamente 3 horas, para a alimentação sanguínea das fêmeas.

Ainda sobre a alimentação de *Ae. aegypti*, uma opção pouco utilizada nos dias de hoje, devido exigências do comitê de ética, é o uso de um animal “empastelado” (**Figura 15-A**). Essa técnica trata de envolver o animal dentro de um pacote de arame em formato retangular, no qual é realizado fechamento das laterais com dobras do arame ou grampeador. O termo “empastelamento ou empastelado” é caracterizado pela aparência após imobilização do rato entre os arames.

Figura 15: (A) Roedor “empastelado”, preso em malha de arame para alimentação de fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti*. Procedimento realizado em laboratório, de acordo com comitê de ética animal; (B) Detalhe das fêmeas de *Ae. aegypti* picando o rabo do roedor (Fonte: Elaborada pelo autor)

4.1.4.4. Dieta sanguínea para fêmeas adultas de *Culex quinquefasciatus*

Para alimentação sanguínea de *Cx. quinquefasciatus*, geralmente são utilizadas codornas vivas. O referido procedimento é realizado sem sedação animal. No dia de alimentação sanguínea dos mosquitos, a codorna será colocada em uma pequena gaiola

metálica (**Figura 16-A**) para confinamento, e em seguida, inserida dentro da gaiola de criação de mosquitos.

Esse procedimento normalmente é realizado sempre no final do dia, pois os mosquitos *Cx. quinquefasciatus* possuem hábitos noturnos, e se alimentam, com elevada frequência, durante a noite. Por esse motivo, a codorna permanece dentro da gaiola de mosquitos durante a noite toda. No dia seguinte, a codorna é retirada da gaiola de mosquitos, e retorna para seu ambiente de criação e manejo.

Figura 16: (A) Gaiola de metal para contenção de codornas; (B) Detalhe da codorna confinada na gaiola de metal para alimentação de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* (Fonte: Elaborada pelo autor)

Em um estudo semelhante de laboratório, o manejo e a reprodução de *Cx. quinquefasciatus* foram realizados através da utilização de pombos no lugar da codorna, como fonte de alimentação sanguínea para os mosquitos (BRITO et al. 1997).

4.1.5. Meio para postura de ovos de *Ae. aegypti*

Mosquitos *Ae. aegypti* possuem, entre outras características reprodutivas, o comportamento de distribuir seus ovos em vários locais diferentes, comumente ovipondo em criadouros artificiais comuns em ambientes urbanos, tais como caixa d'água, recipientes plásticos, pneus abandonados, vasos de plantas e qualquer outro local que acumule água. Segundo FARNESI et al. (2018), os odores liberados por locais com presença de água acumulada (possíveis criadouros) refletem na atratividade para postura de *Ae. aegypti*, assim como a presença de formas imaturas da mesma espécie, composição do substrato, umidade próxima ao local e até luminosidade.

Em função desse comportamento, no laboratório procuramos simular um ambiente perfeito para postura dos ovos, pois será fundamental no sucesso da colônia. Para realização desse procedimento, deve ser utilizado papel toalha umedecido com água, colocado nas paredes internas de recipientes plásticos (**Figura 17**), que serão preenchidos com água em cerca de 50% do volume do recipiente.

Figura 17: (A) Meio de postura para mosquitos *Ae. aegypti*; (B) Ovos de *Ae. aegypti* fixados em papel filtro (Fonte: Elaborada pelo autor)

Utilizando o mesmo tipo de técnica, SOARES-PINHEIRO et al. (2017) e FARNESI et al. (2018) montavam os meios de postura para coleta de ovos de mosquitos *Ae. aegypti* em criações de laboratório. Estes recipientes com papel filtro devem ser colocados dentro da gaiola, com mosquitos entre dois e três dias após o fornecimento de sangue. Após a postura de ovos, o meio de postura é retirado da caixa de reprodução e permanece em repouso com umidade para completar o desenvolvimento embrionário dos ovos (2 – 5 dias). Após completar os dias para desenvolvimento embrionário, os papéis contendo ovos de *Ae. aegypti* devem ser colocados em uma bandeja plástica para secagem. Quando secos, é recomendado armazená-los em envelopes plásticos ou de papel, sempre bem fechados, para evitar que parasitas possam entrar e causar um prejuízo no material biológico. Dessa forma, estes ovos podem ser armazenados por meses, que ainda se tornam viáveis.

Para a reativação dos ovos de *Ae. aegypti*, é necessário colocar o papel contendo os ovos secos dentro de um recipiente plástico, onde será adicionada água para eclosão das larvas. Após algum tempo de imersão do papel toalha contendo ovos de mosquitos, começam

a eclodir as primeiras larvas. Estas larvas serão distribuídas em vários recipientes plásticos com água e alimento.

De acordo com ANJOLETTE e MACORIS (2016), além da técnica citada anteriormente, com papel filtro ou papel toalha em recipientes plásticos, pode ser usado palheta de Eucatex para oviposição de *Ae. aegypti* (**Figura 18**).

Figura 18: Ovos de *Ae. aegypti* em palheta de Eucatex (Fonte: Elaborada pelo autor)

Os recipientes onde essas palhetas serão inseridas devem conter água e um substrato atrativo para oviposição (feno a 10%). Esse tipo de material é muito utilizado para coletas em campo, em dispositivos chamados de “ovitrampa”, pois servem como auxílio no monitoramento de espécies de importância em saúde pública, como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (DIBO et al., 2005; HEINISCH et al., 2019; HONORIO et al., 2009; RESENDE et al., 2013).

4.1.6. Meio para postura de ovos de *Cx. quinquefasciatus*

No caso de *Cx. quinquefasciatus*, suas características reprodutivas e comportamento de postura de ovos é diferente de *Ae. aegypti*. Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* costumam colocar seus ovos em locais com altos índices de matéria orgânica, como córregos, valas e rios poluídos, e também alguns criadouros artificiais. Em função desse comportamento, procuramos simular, em laboratório, ambientes que sejam ideais para realização da postura de

ovos, pois é fundamental para o sucesso da colônia dessa espécie. Para realização desse procedimento, devem ser utilizados recipientes plásticos (1.000 ml) com cerca de 50% do volume total completado com água (**Figura 19**). Nesta água, deve ser adicionada uma porção de, aproximadamente, 10 gramas de ração para peixes, 0,5 – 1,0 ml de glucose de milho ou mel, gramíneas trituradas e algumas larvas e pupas vivas de *Cx. quinquefasciatus*.

Figura 19: (A e B) Meio de postura de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*; (C e D) Jangadas de ovos de *Cx. quinquefasciatus* (Fonte: Elaborada pelo autor)

Esses recipientes devem ser colocados dentro da gaiola com mosquitos entre três e cinco dias do fornecimento de sangue. Após a postura de ovos, o meio de postura é retirado da caixa de reprodução e as jangadas (aglomerado de ovos) (Figura 16 C e D) são transferidas para bandejas plásticas com água limpa. Em algumas horas após a postura de ovos, as primeiras larvas começam a eclodir. Estas larvas serão distribuídas em vários recipientes plásticos com água e uma pequena quantidade de alimento.

4.2. Alimentação sanguínea artificial para mosquitos em laboratório

Alimentadores artificiais vêm sendo desenvolvidos e utilizados constantemente em procedimentos para manutenção de mosquitos em laboratório, sendo alguns mais complexos e outros mais simples (GUNATHILAKA et al., 2017; ROSS et al., 2019). Estes alimentadores, normalmente, são compostos por um ou mais reservatórios sanguíneos, onde é estocado o volume de alimento para alimentação das colônias de insetos. Geralmente, estes reservatórios de sangue são cobertos por membranas finas que facilitam a penetração e alimentação dos mosquitos (ROSS et al., 2019). Entre uma técnica e outra (**Tabela 3**), existem diferenças em relação à composição do reservatório, membranas para contenção do sangue e formas de aquecimento (LUO, 2014).

A utilização de reservatórios artificiais de sangue, cobertos por membranas, que possibilitam a alimentação dos mosquitos, está cada vez mais aprimorada, eficaz e segura (DENG et al., 2012). De acordo com PHASOMKUSOLSIL et al. (2013), a alimentação artificial facilita a experimentação de forma controlada, reduzindo os riscos atribuídos com a transmissão de patógenos durante a alimentação do mosquito.

A manutenção de colônias de mosquitos necessita de alimentação sanguínea constantemente. Dependendo do tipo de suprimento (vertebrados vivos) utilizado, essa manutenção pode se tornar cara, com custos elevados pra produção dos insetos. A opção por alimentação artificial das colônias pode ser uma alternativa interessante para eliminar estes custos elevados, além de trazer um padrão e maior segurança na criação dos mosquitos em laboratório.

O uso de sangue para alimentação artificial de mosquitos deve atender alguns padrões de qualidade para ser classificado como eficaz. As fêmeas devem ingerir prontamente o sangue em quantidades suficientes para digestão e vitelogênese. Além disso, fêmeas alimentadas artificialmente devem produzir grandes lotes de ovos, de tal forma que possa ser comparado a uma alimentação natural, direta no hospedeiro e o comportamento e imunidade dos mosquitos não devem ser afetados (GONZALES e HANSEN, 2016).

Tabela 3 – Variações de técnicas artificiais utilizadas para alimentação sanguínea de mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em condições de laboratório

RESERVATÓRIO	TIPO DE MEMBRANA	SANGUE	T°C DO SANGUE	ANTICOAGULANTE	REFERÊNCIA
Copo Plástico	Parafilm-M	Humano	37,0 °C	-	COSTA-DA-SILVA et al., 2013
Copo plástico	Tecido TNT	Bovino	40,0°C	Heparina	ANJOLETTE e MACORIS, 2016
Copo Plástico	PTFE	Bovino	37,0 °C	EDTA	SIRIA et al., 2018
Hemotek	membrana de colágeno	Bovino (desfibrinado)	35 ± 1 °C	-	DAMIENS et al., 2013
Hemotek	Parafilm-M	Frango	37,0 °C	EDTA	GUNATHILAKA et al., 2017
Hemotek	Membrana de colágeno	Humano	37-40 ° C	-	ROSS et al., 2019
Membranoso	Membrana de Porco	Roedor	38,0 ± 1,0 °C	EDTA	DENG et al., 2012
Placa de alumínio	Parafilm-M	Cabra/Ovelha	-	-	CARVALHO et. al., 2014
Placa de metal	Parafilm-M	Humano	37,0 °C	EDTA	GUNATHILAKA et al., 2017
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Revestimento de salsicha	Roedor	37,0 °C	-	PHASOMKUSOLSIL et al., 2013
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Revestimento de salsicha	Humano	37,0 °C	-	PHASOMKUSOLSIL et al., 2013
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Revestimento de salsicha	Ovelha (desfibrinado)	37,0 °C	-	PHASOMKUSOLSIL et al., 2013
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Revestimento de linguiça	Porco	38,5 ° C	Citrato	LUO, 2014
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Intestino de porco	-	37,0 °C	-	DUTRA et al., 2017
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Parafilm-M	Bovino	37,0 °C	EDTA	GUNATHILAKA et al., 2017
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Parafilm-M	Ovelha	37,0 °C	Citrato	DIAS et al., 2018
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Parafilm-M	Coelho	37,0 °C	Citrato	DIAS et al., 2018
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Parafilm-M	-	38,0 °C	-	WITMER et al., 2018
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Parafilm-M	Humano	37,0 °C	-	DHAR et al., 2019

LEGENDA: (°C) Graus Celsius; (EDTA) ácido etilenodiamino tetra-acético; (PTFE) politetrafluoretileno; (-) Não informado pelo autor

Alguns tipos de sangue de animais vertebrados que são utilizados para alimentação de artrópodes são comercializados (**Tabela 4**) (GONZALES e HANSEN, 2016). As técnicas de alimentação artificial, geralmente, utilizam sangue de ganso, frango, boi, porco, camundongo, roedores (ratos), coelhos e até de humano (LUO, 2014). De acordo PHASOMKUSOLSIL et al. (2013), dos tipos sanguíneos comercializados, o de ovelha é o mais usado devido à sua disponibilidade e baixo custo.

Tabela 4 – Custo estimado por mililitro para sangue desfibrinado. (Fonte: GONZALES e HANSEN, 2016)

TIPO DE SANGUE	VALORES (US \$)
Bovino	0,14 – 0,60
Coelho	0,39 – 0,73
Ovelha	0,05 – 0,38

Legenda: (US) Dólar americano

O sangue humano, quando doado, torna-se também uma opção para alimentação de mosquitos. Porém, os riscos de contaminação por patógenos para as colônias de mosquitos são maiores, além de se ter regulamentações mais rigorosas para seu uso do que o sangue de animais (GONZALES e HANSEN, 2016).

Quando se pretende utilizar sangue humano, em primeiro lugar é necessário buscar aprovação de um CEP/CONEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COSTA-DA-SILVA et al., 2013). Para isso, a pesquisa deve ser cadastrada na Plataforma Brasil (<http://plataformabrasil.saude.gov.br>) (**Figura 20**), que é gerenciada pelo Ministério da Saúde. Nesta plataforma on-line será realizado todo o acompanhamento do projeto, até aprovação final para utilização do sangue.

Figura 20: Página principal da plataforma on-line para cadastramento de pesquisas envolvendo seres humanos (Fonte: <<http://plataformabrasil.saude.gov.br>> acessado em 22 fev. 2020)

Um planejamento bem elaborado é necessário para otimizar a utilização do sangue na manutenção das gaiolas de mosquitos, para que se possa reduzir o tempo de manuseio, evitando perdas de material e, conseqüentemente, reduzir o custo operacional (DAMIENS et al., 2013). O sangue para alimentação dos mosquitos deve ser tratado com anticoagulantes, e ser mantido refrigerado, para conservação e estabilidade do material biológico (GONZALES e HANSEN, 2016).

O uso de anticoagulantes sanguíneos é indispensável para técnicas de alimentação artificial de mosquitos. Sem eles, é impossível manter a composição sanguínea por muito tempo, pois acabam formando coágulos nos reservatórios. Com isso, a alimentação dos insetos hematófagos torna-se difícil, pois eles precisam sugar o concentrado de células do sangue armazenado no reservatório (LUO, 2014).

Nesta revisão, foi observado que entre as técnicas de alimentação sanguínea para mosquitos, são utilizados praticamente três tipos de anticoagulantes, conforme descrito abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 – Tipos de anticoagulantes utilizados para técnicas artificiais de alimentação sanguínea para mosquitos

ANTICOAGULANTE	REFERÊNCIA DE USO DO REAGENTE
Citrato	LUO (2014)
Citrato	DIAS et al. (2018)
EDTA	DENG et al. (2012)
EDTA	GUNATHILAKA et al. (2017)
EDTA	SIRIA et al. (2018)
Heparina	ANJOLETTE e MACORIS (2016)

No passado, era muito comum o uso de tecidos animais, como membrana de pele de coelho, membrana de pele de galinha e ratos, membrana de bexiga e camada externa do ceco bovino (LUO, 2014). A conscientização e regulamentação ética sobre o bem-estar animal, juntamente com a inconveniência do uso de animais vivos como hospedeiros de sangue, proporcionaram o desenvolvimento de membranas artificiais para experimentos em laboratório (DENG et al., 2012).

A seleção e opção de uso dos mais variados tipos de membranas é de extrema importância, pois além dos custos, alguns materiais podem influenciar na alimentação dos mosquitos. A membrana de revestimento de linguiça e o Parafilm-M são utilizados com maior frequência, devido ao baixo custo do material e alta qualidade na manutenção dos mosquitos (LUO, 2014).

Em relação às condições ambientais e aquecimento do sangue, RUTLEDGE (1964) descreve que o ambiente onde os mosquitos serão alimentados pode variar de 23°C a 38°C, sendo que o alimentador artificial que contém a fonte de alimento (sangue) deve manter uma temperatura constante de $38 \pm 1^\circ\text{C}$. Recentemente, em experimentos realizados por GUNATHILAKA et al. (2017) e ROSS et al. (2019), a faixa de temperatura usada nos alimentadores artificiais foi mantida entre 37 - 40°C.

Para manter a temperatura adequada do sangue nos reservatórios de alimentadores artificiais, são necessárias algumas estratégias, que podem variar de acordo com a técnica utilizada para este procedimento. O sangue pode ser mantido aquecido através de equipamentos eletrônicos, como Hemotek (**Anexo D - Figura 1**), ou por dispositivo que seja conectado a uma fonte de energia e emita calor sobre uma base cerâmica para o aparato sanguíneo (**Anexo C - Figura 2**) (DENG et al., 2012; DHAR et al., 2019). Alimentadores artificiais que possuem um fluxo de água circulante entre os reservatórios de sangue (**Anexo**

E - Figuras 6) utilizam equipamento para aquecimento da água (banho-maria) (PHASOMKUSOLSIL et al., 2013; DIAS et al., 2018; SIRIA et al., 2018).

De forma menos complexa, o aquecimento do sangue pode ser realizado através de água aquecida que, após atingir a temperatura desejada, deve ser adicionada dentro de copos plásticos (ANJOLETTE e MACORIS, 2016; SIRIA et al., 2018). De acordo com COSTA-DASILVA et al. (2013), em vez de água, pode ser utilizado glicerol aquecido como fonte de calor para o sangue, desde que o sangue seja inserido separado nos tubos de alimentação (**Anexo A - Figura 3-A**).

4.3. Técnicas de alimentação sanguínea artificial de mosquitos em laboratório

4.3.1. Recipientes plásticos (copos / tubos)

O alimentador denominado como “Glytube” (**Anexo A - Figura 3**) é formado por um tubo cônico, produzido com material plástico que, normalmente, é utilizado para centrifugação de materiais em laboratório. Este dispositivo possui volume interno de 50 ml, abertura com orifício de 2,5 cm em apenas uma das extremidades e fechamento através de tampa de rosca. A parte interna do tubo serve como reservatório do material responsável pelo aquecimento (Glicerol). A tampa, além de servir como vedação do tubo, armazena o volume de sangue destinado para alimentação dos insetos. Para que este dispositivo se torne funcional, é necessário realizar um corte em formato de círculo na tampa (**Anexo A - Figura 3-A**). Em seguida, este orifício é vedado através de membrana nas duas extremidades, e rosqueado novamente no tubo cônico. A capacidade de armazenamento de sangue neste recipiente é de aproximadamente 1,5 ml (COSTA-DASILVA et al, 2013).

O Glytube é um sistema bem simples, de fácil construção e manutenção. Qualquer laboratório analítico possui todos os componentes necessários para montagem deste dispositivo. Para funcionamento deste alimentador, não é necessário o uso de materiais especiais ou elementos complexos de aquecimento. Uma vez que as temperaturas pré-aquecidas definidas para sangue (37°C) e glicerol (50°C), a resposta alimentar dos mosquitos é semelhante à alimentação com animais vivos (COSTA-DASILVA et al, 2013).

De acordo com ANJOLETTE e MACORIS (2016) e SIRIA et al. (2018), outra técnica simples e de fácil reprodução para alimentação artificial de mosquitos em laboratório utiliza copos descartáveis como reservatório de sangue. A fixação destes tipos de dispositivos pode ser através de barbantes (**Anexo A - Figura 1-A**), que são amarrados na borda superior de

cada copo plástico, e em seguida inseridos dentro de gaiolas com mosquitos, ou em uma base de madeira (**Anexo A - Figura 2-B**), onde os copos são acoplados e colocados sobre as gaiolas de mosquitos.

A base do copo invertida serve como reservatório sanguíneo e, para manter este sangue aquecido, é adicionada água aquecida (40°C) na parte interna do copo plástico (ANJOLETTE e MACORIS, 2016).

4.3.2. Placas de metal

Em experimentos para criação de mosquitos, CARVALHO et. al. (2014) e GUNATHILAKA et al. (2017) utilizaram placas metálicas como reservatório sanguíneo. Essas placas, possuem formato quadrado (**Anexo B - Figura 1-A**) e medidas aproximadas de 9 cm x 9 cm (largura x comprimento). Estas placas são revestidas por membranas, para que se possa armazenar o volume de sangue a ser utilizado na alimentação dos mosquitos. Um saco de malha (**Anexo B - Figura 2-B**), preenchido capazes de armazenar calor, como sílica ou grãos de feijão (CARVALHO et. al., 2014), é colocado sobre a placa com sangue, para que seja mantida a temperatura ideal para atrair os mosquitos até a fonte de alimento.

4.3.3. Reservatório membranoso

O reservatório membranoso refere-se a um dispositivo para alimentação de mosquitos que é constituído apenas por membranas para armazenamento de sangue. Um invólucro sanguíneo ou bolsa de sangue feita com membrana de colágeno bovina foi utilizada por DENG et al. (2012) em estudos para avaliação de fecundidade e desenvolvimento de formas imaturas de *Ae. aegypti*. Para utilização, as membranas de colágeno bovino devem ser inseridas em água quente (fervendo) durante o período de uma hora e, em seguida, a gordura presente nela deve ser removida com auxílio de um papel absorvente.

Pronta para uso, a membrana é preenchida de sangue com anticoagulante e fechada nas duas extremidades, formando uma espécie de “salsicha de sangue” (**Anexo C - Figuras 1 e 2**). Este dispositivo deve ser inserido sobre uma superfície com aquecimento, para que o sangue consiga chegar a temperaturas semelhantes a um hospedeiro vivo, fazendo com que, assim, exista uma maior atratividade dos mosquitos (DENG et al., 2012).

4.3.4. Hemotek

O dispositivo Hemotek é um aparelho eletrônico que permite regulagens de acordo com a faixa desejada, mantendo a temperatura constante. Este aparelho possui uma conexão de cabo flexível e extensão para uma pequena placa de alumínio, com 3,7 cm de diâmetro e espessura de 1,3 cm (**Anexo D - Figura 1**). Esta placa de alumínio é capaz de armazenar até 5 ml de sangue (DAMIENS et al., 2013). Para manter o sangue armazenado na placa de alumínio, são utilizadas membranas finas, capazes de penetração e resistentes a calor (GUNATHILAKA et al., 2017).

Uma adaptação a este dispositivo foi desenvolvida e testada por DAMIENS et al. (2013), pois a versão original do equipamento não permite alimentar grandes populações de mosquitos (10.000 por gaiola). Dessa forma, a nova versão de placa aumentou em dez vezes a capacidade de armazenamento de sangue, passando de 5 ml para 50 ml por placa (**Anexo D - Figura 2-A**). As placas modificadas passaram a possuir as medidas de 17 cm de diâmetro e 1 cm de espessura.

4.3.5. Reservatório com circulação de água para aquecimento

De acordo com RUTLEDGE et al. (1964) e GERBERG (1970), a técnica de alimentação artificial para fornecimento de sangue para artrópodes é bem sucedida e garante qualidade e padronização de experimentos em laboratório. Recipientes de vidro ou plástico, cobertos por membrana e conectados com mangueiras a um equipamento de aquecimento da água, facilitam a alimentação de várias colônias de mosquitos ao mesmo tempo (**Anexo E - Figura 4-A**).

O alimentador de vidro possui conexões para entrada e saída de água (**Anexo E - Figura 1**), um reservatório para armazenamento do sangue e câmara interna por onde a água aquecida circula (RUTLEDGE, 1964). A circulação da água é realizada através de uma bomba submersa, que fica dentro do equipamento para aquecimento da água (banho-maria) (**Anexo E - Figura 2**). Essa bomba é conectada a uma mangueira de silicone, que faz ligação com o tubo de entrada d'água do dispositivo de vidro. O tubo de saída deste dispositivo é conectado em outra mangueira de silicone, e tem a função de devolver a água bombeada para o equipamento de aquecimento. Dessa forma, a água fica constantemente circulando dentro do dispositivo, fazendo com que, assim, o sangue oferecido aos mosquitos permaneça sempre aquecido (LUO, 2014).

A temperatura da água, e consequentemente do sangue armazenado no reservatório, pode ser regulada conforme a necessidade do experimento. Geralmente, o equipamento de aquecimento da água é regulado em alguns graus acima do desejado para fonte sanguínea, para que o sangue armazenado permaneça com temperatura aproximada de 37°C (GUNATHILAKA et al., 2017). Essa temperatura elevada favorece a atratividade dos mosquitos em busca da fonte de alimento (GERBERG, 1970).

4.4. Vantagens e desvantagens na alimentação artificial de mosquitos

Entre as técnicas apresentadas nesta revisão, existem vantagens e desvantagem quando aplicadas para manutenção de mosquitos (**Tabela 6**). Todas elas apresentam fatores relevantes que favorecem sua utilização e servem como alternativa para alimentação sanguínea de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.

Tabela 6 – Vantagens e desvantagens na utilização de técnicas artificiais para alimentação sanguínea de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em condições de laboratório

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Copo / Tubo Plástico	» Baixo custo.	» Pequena área para alimentação dos mosquitos; » Temperatura do sangue baixo muito rápido; » A fixação do dispositivo precisa ser adaptada de acordo com tipo de gaiola de mosquitos; » Pouco espaço para armazenamento de sangue.
Hemotek	» Aquecimento do sangue é constante; » Permite a alimentação de mais de uma colônia de mosquitos ao mesmo tempo.	» Necessita de fonte de energia para manter aquecimento do sangue.
Placa de metal	» Baixo custo.	» Bolsa térmica deve ser aquecida diversas vezes ao longo do procedimento de alimentação das colônias de mosquitos; » Temperatura do volume sanguíneo não é constante.
Reservatório membranoso	» Aquecimento do sangue é constante; » Grande espaço para armazenamento de sangue; » Superfície para alimentação dos mosquitos é grande.	» Não é possível reaproveitar o reservatório de sangue; » Dependendo do tipo de membrana, não fica totalmente esticada para o procedimento de alimentação dos mosquitos.
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	» Aquecimento do sangue é constante; » Possibilita a alimentação de várias colônias de mosquitos ao mesmo tempo.	» Necessita de um reservatório externo com água para aquecimento do sangue.

4.5. Influência da alimentação artificial nas taxas de alimentação, fecundidade e sobrevivência de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

A fonte sanguínea (hospedeiro) pode apresentar influências na taxa de alimentação dos mosquitos (**Tabela 6**). Além disso, determinados tipos de sangue também são relevantes para a alimentação artificial, pois, em alguns casos, são considerados determinantes para a sobrevivência e a fecundidade dos mosquitos (PHASOMKUSOLSIL et al., 2013).

Experimentos realizados em laboratório avaliaram a taxa de alimentação e fecundidade e sobrevivência de *Ae. aegypti* através do uso de dispositivos com circulação de água para aquecimento do sangue. Nestes experimentos, a taxa média de alimentação dos mosquitos foi superior a 65,0%, sendo que quando observado por DIAS et al. (2018), essa taxa foi de 98,0%. A fecundidade média de *Ae. aegypti* avaliada nestes estudos apresentou resultados que variaram de 15 - 101 ovos por fêmea após alimentação artificial (PHASOMKUSOLSIL et al. (2013); LUO (2014); GUNATHILAKA et al. (2017); DIAS et al. (2018) e DHAR et al. (2019). A sobrevivência dos mosquitos após a alimentação artificial de sangue nos dispositivos com circulação de água variou de 84,2 à 100,0% (PHASOMKUSOLSIL et al. (2013); LUO (2014).

Já para alimentação de *Ae. aegypti* através da técnica com reservatório membranoso com sangue, a taxa de alimentação dos mosquitos foi de 88.2%, com uma produção média de 71 ovos por fêmea, e sobrevivência de 80,0% dos mosquitos alimentados artificialmente (DENG et al., 2012).

Entre as técnicas de alimentação artificial de *Ae. aegypti* com o uso de copos/tubos plásticos (COSTA-DA-SILVA et al., 2013; SIRIA et al., 2018), Hemotek e placa de metal (GUNATHILAKA et al., 2017), foi observado menor fecundidade de ovos por fêmea quando comparado as técnicas citadas anteriormente.

Tabela 7 – Taxa de alimentação, fecundidade e sobrevivência de mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* após repasto sanguíneo em dispositivos artificiais

Reservatório Sanguíneo	Fonte Sanguínea	Espécies de mosquitos	Taxa de Alimentação (%)	Fecundidade n° ovos/mosquito	Taxa de Sobrevivência (%)	Referência
Copo / Tubo Plástico	Humano	<i>Ae. aegypti</i>	51,3	-	-	COSTA-DA-SILVA et al., 2013
Copo / Tubo Plástico	Bovino	<i>Ae. aegypti</i>	100,0	13,1 $\pm$ 1,7	-	SIRIA et al., 2018
Hemotek	Frango	<i>Ae. aegypti</i>	79.7 $\pm$ 0.9	12.7 $\pm$ 0.3	-	GUNATHILAKA et al., 2017
Placa de metal	Humano	<i>Ae. aegypti</i>	97.3 $\pm$ 0.9	14.8 $\pm$ 0.4	-	GUNATHILAKA et al., 2017
Reservatório membranoso	Roedor	<i>Ae. aegypti</i>	88.2 $\pm$ 3.3	71.2 $\pm$ 1.7	80,0	DENG et al., 2012
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Bovino	<i>Ae. aegypti</i>	89.7 $\pm$ 0.9	15.5 $\pm$ 0.3	-	GUNATHILAKA et al., 2017
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Porco	<i>Ae. aegypti</i>	89,7	49,9 $\pm$ 7,9	100,0	LUO, 2014
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Ovelha	<i>Ae. aegypti</i>	97,0	50,0	-	DIAS et al., 2018
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Coelho	<i>Ae. aegypti</i>	98,0	58,0	-	DIAS et al., 2018
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Ovelha	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	45,0	39,0	-	DIAS et al., 2018
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Coelho	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	48,0	44,0	-	DIAS et al., 2018
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Roedor	<i>Ae. aegypti</i>	66.7 $\pm$ 16.6	61.7 $\pm$ 13,6	99,3 $\pm$ 1,2	PHASOMKUSOLSIL et al., 2013
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Humano	<i>Ae. aegypti</i>	67.0 $\pm$ 19.9	101.0 $\pm$ 21,0	100,0 $\pm$ 0,0	PHASOMKUSOLSIL et al., 2013
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Ovelha	<i>Ae. aegypti</i>	86.7 $\pm$ 8.5	42.3 $\pm$ 14,0	84,2 $\pm$ 17,4	PHASOMKUSOLSIL et al., 2013
Vidro/Acrílico (com circulação de água)	Humano	<i>Ae. aegypti</i>	74.4	94,7	-	DHAR et.al, 2019

LEGENDA: (-) Não informado pelo autor

A taxa de alimentação de fêmeas de *Ae.aegypti* alimentadas artificialmente com reservatórios sanguíneos feito com copos/tubos plásticos apresentou variações de 51,3% (COSTA-DA-SILVA et al., 2013) até 100,0% (SIRIA et al., 2018), e de 79,7% com Hemotek (GUNATHILAKA et al., 2017) até 97,3% com Placa de metal (GUNATHILAKA et al., 2017). Nestes estudos não foram avaliadas as taxa de sobrevivência das fêmeas após alimentação sanguínea.

Para os experimentos realizados com *Cx. quinquefasciatus* através do uso de dispositivos com circulação de água para aquecimento do sangue, houve uma variação da taxa média de alimentação entre 45,0 à 48,0%, e fecundidade de 39 a 44 ovos por fêmea. Não foi avaliada sobrevivência dos mosquitos após alimentação nestes dispositivos (DIAS et al., 2018).

5. DISCUSSÃO

Conforme amplamente mencionado na literatura, existem inúmeras técnicas para realizar o manejo e reprodução de mosquitos em laboratório. Esse manejo de mosquitos deve seguir alguns requisitos básicos para obter sucesso no desenvolvimento das colônias. Cuidados com o acondicionamento das espécies e alimentação devem ser realizados com muita atenção, pois podem influenciar no desenvolvimento dos mosquitos (GERBERG, 1970; ANJOLETTE e MACORIS, 2016; GUNATHILAKA et al., 2017).

O início das colônias de mosquitos em laboratório geralmente ocorre através da utilização de ovos ou imaturos coletados em campo, ou cepas fornecidas por institutos de referência, pois são mais seguras em relação à susceptibilidade dos espécimes e eliminação de riscos relacionados à transmissão de patógenos. Porém, uma vez instaladas, estas colônias se tornam altamente produtivas, e o meio de ampliação das colônias é realizado através da coleta de ovos depositados em meios de postura.

Resultados apresentados neste trabalho mostram diferenças em relação aos meios de postura para *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. A intenção destes meios é simular um ambiente próximo ao natural para que as espécies depositem seus ovos, sendo que, os odores liberados por locais com presença de água acumulada (possíveis criadouros) refletem na atratividade para realização da postura (FARNESI et al., 2018). Em laboratório, são montados recipientes plásticos, revestidos por papel toalha/filtro, com pouco volume (200 a 500 ml) de água limpa para *Ae. aegypti*, pois essa espécie prefere águas mais limpas para formação de criadouros e depósito dos ovos (SOARES-PINHEIRO et al., 2017). O contrário disto é observado em *Cx. quinquefasciatus*, pois, naturalmente, seus criadouros são formados em córregos e coleções de águas ricas em matéria orgânica (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) e, com isso, em laboratório, são adicionados elementos na água para ajudar na atratividade das fêmeas para realização da postura de ovos. Geralmente, são adicionadas gramíneas secas, ração de animais, soluções açucaradas, como glucose de milho ou mel, ou algumas larvas e pupas dentro do recipiente. Esta última observação, sobre adição de larvas e pupas, está relacionada a estimular a atração das fêmeas para estes locais, pois é possível que a presença de formas imaturas no meio de postura indique para as fêmeas grávidas que aquele é um local seguro para criação de sua prole (BARBOSA, 2007).

Uma alimentação equilibrada e rica em nutrientes é fundamental para o bom desenvolvimento das larvas e, conseqüentemente, para adultos maiores (ANJOLETTE e MACORIS, 2016). Durante a revisão sobre técnicas de alimentação para mosquitos, foi

observado que o alimento mais utilizado na dieta de larvas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foi a ração para peixes em flocos, devido à fácil manipulação para triturar e seus aspectos nutricionais. Porém, foi identificado que várias outras possibilidades de alimentos também podem ser oferecidas para estas espécies, pois as larvas não são tão criteriosas em relação ao tipo e aspecto, e se desenvolvem perfeitamente com qualquer suprimento que for adicionado em seus criadouros em laboratório. Diversos autores utilizaram ração de gatos para manutenção de larvas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (SILVA et al., 1998; AHID et al., 2000; DIAS et al., 2018), outros optaram por ração de roedores (CALHEIROS et al., 1998; BRITO et al., 1999; ALVES, 2017). Curiosamente, foram encontrados dois trabalhos em que utilizavam leite desnatado para alimentação de *Cx. quinquefasciatus* (BRITO et al., 1997; BRITO et al., 1999).

Mosquitos adultos necessitam de fontes de carboidratos em sua alimentação logo após a emergência, para conseguir voar e copular. Alimentos açucarados são encontrados naturalmente através de flores, frutas e diversas plantas. Em condições de laboratório, são fornecidos basicamente alimentos formulados com açúcar, mel ou glucose de milho diluídos em água (CAMARGO et al., 1994; CALHEIROS et al., 1998; SILVA et al., 1998; BRITO et al., 1999; ESPINDOLA et al., 2008; CARVALHO et al., 2014), e embebidos em algodão, gaze (DIAS et al., 2018) ou até absorvente feminino (SILVA et al., 1998).

Para reprodução em laboratório destas espécies de mosquitos, é necessário que haja o fornecimento de sangue para as fêmeas, que normalmente é fornecido através de animais de biotério, como ratos, coelhos, codornas e outros. É importante que se tenha uma padronização dos procedimentos para o desenvolvimento de novas pesquisas, pois dessa forma, é possível reproduzir as técnicas em diversos institutos que desempenham a mesma atividade.

A manutenção de um biotério “suporte” apresenta algumas desvantagens relacionadas com a utilização de mamíferos e outros animais para fonte de alimentação sanguínea em mosquitos, como estrutura e área física para manejo dos animais, demanda de pessoal especializado e gerenciamento de recursos (DIAS et al., 2018). De acordo com SERPA et al., 2008 e AZEVEDO, 2015, para que os procedimentos de alimentação dos mosquitos ocorram, é necessário fazer a sedação dos animais (vertebrados) através do uso de anestésicos, pois dessa forma há uma diminuição de atividade do animal, poupando ele do estresse gerado com as picadas dos mosquitos, e além disso, fornecer melhores condições para alimentação das colônias de insetos.

Porém, alguns estudos ainda são realizados com animais sem sedação para o fornecimento de sangue aos mosquitos. Essa é uma prática geralmente usada na alimentação

de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*, com o uso de codornas ou outras aves de pequeno porte (BRITO et al. 1997; RIBEIRO NETO e ALVES, 2013).

Atualmente, devido exigências do Comitê de Ética animal, está cada vez mais difícil à utilização de animais vivos em experimentos laboratoriais. Isto está relacionado com a ética em relação ao bem-estar animal e inconvenientes gerados pelo uso deles como fonte de alimento (GONZALES e HANSEN, 2016). Protocolos como os mencionados anteriormente, onde aves são utilizadas sem sedação, requer uma justificativa bem elaborada e apresentação da necessidade de se utilizar este procedimento.

Novas tecnologias onde há necessidade de "produção em massa de mosquitos" estão sendo desenvolvidas, para alimentação sanguínea de fêmeas adultas de forma artificial, sem o uso de animais vivos. Diversos dispositivos foram desenvolvidos, vêm sendo estudados e estão sendo utilizados para alimentação de colônias de mosquitos em laboratório. Basicamente, estes dispositivos são compostos por um reservatório para armazenamento de sangue, que é envolvido por películas finas, denominadas como membranas, que podem ser de origem artificial ou natural, e que permitem a penetração da probólide das fêmeas dos mosquitos, para alimentação do concentrado de células sanguíneas. A forma de atrair as fêmeas para estes dispositivos artificiais dá-se pelo fato de aquecer este sangue confinado no reservatório. Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, alguns dispositivos possuem um sistema de circulação de água, nos quais mangueiras são conectadas e interligadas entre os dispositivos com sangue e um reservatório de água aquecida (PHASOMKUSOLSIL et al., 2013; LUO, 2014; DUTRA, 2017; GUNATHILAKA et al., 2017; DIAS et al., 2018; DHAR et.al, 2019). Dispositivos que não possuem circulação de água mantêm o sangue aquecido através do abastecimento em compartimentos internos com líquido aquecido, como água ou glicerol (COSTA-DA-SILVA et al, 2013). ANJOLETTE e MACORIS (2016) e SIRIA et al. (2018). Também foi observado que o aquecimento do sangue pode ser realizado através de uma bolsa térmica (CARVALHO et al., 2014; GUNATHILAKA et al., 2017), cerâmica com conexão elétrica para aquecimento (DENG et al., 2012) ou equipamento eletrônico com placa metálica aquecida (DAMIENS et al., 2013; GUNATHILAKA et al., 2017).

De acordo com os resultados apresentados para de alimentação artificial sanguínea, foi verificado que a taxa de alimentação, fecundidade e sobrevivência de mosquitos pode variar de acordo com a técnica utilizada, tipo de sangue e membrana. Portanto, é fundamental a elaboração de um protocolo bem definido para utilização dessas técnicas artificiais para manutenção de colônias de mosquitos em laboratório.

6. CONCLUSÕES

A manutenção de espécies de mosquitos em laboratório, assim como outros artrópodes considerados pragas urbanas, é fundamental para entendimento sobre sua biologia, comportamento e desenvolvimento de técnicas para controle. As técnicas para manejo das espécies *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em laboratório são bem similares umas das outras. Poucas particularidades apresentadas por alguns autores fogem do padrão de manejo e reprodução dos mosquitos em ambientes confinados.

Nota-se que os padrões de qualidade para estabelecimento das colônias foram bastante citados, como cuidados com acondicionamento dos espécimes, alimentação e formas de reprodução para criação em larga escala. A variedade nas opções de alimentos para dietas de imaturos é muito grande, porém, a maioria dos trabalhos descreve a utilização de ração de peixes em flocos devido a fácil manipulação e fornecimento para larvas menores.

Com relação à alimentação sanguínea de mosquitos adultos, ainda são encontrados muitos trabalhos nos quais animais vivos são utilizados como fonte de sangue para manutenção das colônias. Historicamente, esse processo de alimentação sanguínea utilizando animais vivos sempre foi utilizado em laboratórios para criação de mosquitos e outros artrópodes hematófagos, pois os resultados de multiplicação das colônias são bem satisfatórios e, em alguns casos, é a única alternativa para manter vivas as espécies em estudo. Muitos pesquisadores, na necessidade de manter vivos alguns espécimes de mosquitos de difícil manutenção ou com pouca investigação prévia, fornecem seu próprio sangue para alimentação.

Comitês de ética para utilização de animais em laboratório restringem demais algumas pesquisas, tornando assim, alguns objetivos inviáveis em relação ao tempo de resposta e aprovação para sua utilização. Diante disto, técnicas alternativas para alimentação sanguínea de mosquitos vêm se tornando cada vez mais ativas em pesquisas de laboratório. Muito ainda é necessário se estudar, para definição de protocolos robustos e de fácil reprodução em laboratório. Alguns aspectos relacionados à utilização de anticoagulantes precisam ser melhorados para evitar a mortalidade de insetos alimentados artificialmente, e diminuição na produtividade de ovos. De qualquer forma, as técnicas artificiais para alimentação e manutenção de mosquitos vêm sendo cada vez mais aprimoradas e trazendo bons resultados.

A tendência para o futuro é que cada vez mais se utilize quantidades reduzidas de animais vivos em pesquisas de laboratório para fornecimento de sangue para a manutenção de mosquitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGAS, M. G. et al. **Parâmetros de Biossegurança para Insetários e Infectórios de Vetores: aplicação e adaptação das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2005, 64p.

AHID, S. M. M. et al. Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* Say from Different Regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 6, p. 769-775, nov./dec. 2000.

ALVES, K, F. **Alterações bioquímicas e morfológicas em larvas de *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) submetidas a exposição do óleo essencial do alecrim do campo – *Baccharis dracunculifolia* (Asteracea)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis, 2017.

ANDRADE, A. et al. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro, Fiocruz, 2002, 388p.

ANJOLETTE, A. F.; MACORIS, M. L. G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 13, n. 156, p. 19-29, 2016.

ARAÚJO, H. R. C. et al. Sex determination and *Aedes* population control. **Parasites & Vectors**, São Paulo, v. 11, n. 2, p.107-113, dez. 2018.

AZEVEDO, J. B. **Análise do ciclo biológico do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposto a cenários de mudanças climáticas previstas pelo IPCC**. 2015. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, 2015.

BARBOSA, R. M. R. **Aperfeiçoamento e avaliação da armadilha de oviposição BR-OVT para *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

BORGES, V. A. R. Avaliação da infestação do mosquito *Culex quinquefasciatus* no entorno do rio Palmeiras, no município de Pratápolis (MG). **Ciência et Praxis**, v. 7, n. 14, 2014.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, out-dez, 2007.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Manual de protocolos para testes de eficácia em produtos desinfestantes**. Brasília, 1ª edição, 2004, 32p.

BRITO, A. C. et al. A Comparison of Two Brazilian Populations of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) from Endemic and Non-endemic Areas to Infection with *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 1, p.33-36, fev. 1997.

BRITO, A. C. et al. Desenvolvimento larvario de *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: culicidae) sob três diferentes dietas. **Revista de Patologia Tropical**, Maceió, v. 28, n. 1, p. 72-77, jan./jun.1999.

BUSVINE, J. R. Cryptic species of insect disease vectors and their importance. **Endeavour**, London, v. 4, n. 3, p. 108-112, 1980.

CABRINI, I.; ANDRADE, C. F. S. Resposta de fêmeas de mosquitos ao hospedeiro – Busca por alimentação sanguínea – Uma revisão. **Unicamp**, Campinas, nov. 2006.

CALHEIROS, C. M. L. et al. Experimental Infection of *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* and *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* with *Wuchereria bancrofti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 6, p. 855-860, dez. 1998.

CAMARGO, M. F. et al. Ciclo evolutivo do *Culex quinquefasciatus* (Wiedmann,1828) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 23, n. 2, p. 191-195, jul./dez. 1994.

CARVALHO, D. O. **Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti***. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CARVALHO, D. O. et al. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, n. 83, p. e3579, p. 1-10, jan.2014

CASTRO JÚNIOR, F. P. **Ciclos de vidas comparados e variabilidade genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do semi-árido paraibano**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2010.

CIOTA, A.T.; KRAMER, L.D. (2013) Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3021-3047, dez. 2013.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994, 228p.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. e53816, jan.2013.

DAMIENS, D. et al. Different Blood and Sugar Feeding Regimes Affect the Productivity of *Anopheles arabiensis* Colonies (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 336-343, mar. 2013.

DARWISH, M. et al. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. **World Health Organization - Technical Report Series**, p. 1-116, 1985.

DENG, L. et al. A novel mosquito feeding system for routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Tropical Biomedicine**, v. 29, n. 1, p. 169-174, 2012.

DHAR, I. et al. Development of a cheap and simple artificial feeding device for studying dengue virus transmission in *Aedes aegypti* mosquito at the resource-poor setups. **International Journal of Mosquito Research**, v. 6, n. 5, p. 57-62, 2019.

DIAS, L. S. et al. Artificial blood feeding for Culicidae colony maintenance in laboratories: does the blood source condition matter? **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 60, p. e45, 2018.

DIBO, M. R. et al. Identification of the best ovitrap installation sites for gravid *Aedes (Stegomyia) aegypti* in residences in Mirassol, state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 339-343, Jul. 2005.

DUTRA, H. L. C. **Uso da cepa wMel de *Wolbachia* como forma alternativa de controle do vírus Zika**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2017.

ESPINDOLA, C. B. et al. Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas Imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório. **EntomoBrasilis**, v. 1, n. 1, p. 10-13, jan./abr. 2008.

FARNESI, L. C. et al. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 4, p. e170362, fev. 2018.

FERREIRA-DE-BRITO, A. et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 10, p. 655-658, out. 2016.

FERREIRA-DE-LIMA, V. H.; LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, São Paulo, v. 77, n. 11, p.1-8, 2018.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica** - Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo, EdUSP, 2002, 594p.

GONZALES, K. K.; HANSEN, I. A. Artificial Diets for Mosquitoes. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 13, n. 12, p. e1267, 2016.

GUNATHILAKA, N. et al. Efficacy of Blood Sources and Artificial Blood Feeding Methods in Rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for Sterile Insect Technique and Incompatible Insect Technique Approaches in Sri Lanka. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-7, 2017.

GERBERG, E. J. **Manual for mosquito rearing and experimental techniques**. 5^a ed. Baltimore, American Mosquito Control Association, Mosquito News, 1970.

HEINISCH, M. R. S. et al. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. **Acta Tropica**, v. 189, p. 104-113, 2019.

HONORIO, N. A. et al. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, p. 1203-1214, Jun. 2009.

HONORIO, N. A. et al. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 1-3, mai. 2015.

LAPORTA, G. Z. et al. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 125-127, mar. 2006.

LAPORTA, G. Z. **Ecologia de *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus* no parque ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil**. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev. Saude Publica**, v. 50, n. 36, p. 1-7, 2016.

LUO, Y. P. 2014 - A novel multiple membrane blood-feeding system for investigating and maintaining *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 39, n. 2, p. 271-277, dez. 2014.

MARTINS, L.C. et al. First isolation of West Nile virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, p. e180332, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus***. Brasília, Ministério da Saúde, 2011, 76p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. **Boletim epidemiológico**, Brasília, DF, v. 51, n. 2, 16 p., jan. 2020.

Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

MORAIS, S. A. et al. O mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em município cortado por rio com elevada carga poluidora. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 06, p. 21-26, abr. 2007.

OLIVEIRA, N. C.; SOUZA, A. P. Aumento da Sobrevivência de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus), em Condições de Laboratório, pela Ingestão de Néctar Extrafloral de *Euphorbia milii* Des Moul. (*Euphorbiaceae*). **Entomobrasilis**, Mato Grosso do Sul, v. 7, n. 1, p. 48-51, jan. 2014.

PAPATHANOS, P. A. et al. A perspective on the need and current status of efficient sex separation methods for mosquito genetic control. **Parasites & Vectors**, Jerusalém, v. 11, n. 2, p. 165-171, dez. 2018.

PHASOMKUSOLSIL, S. et al. Maintenance of mosquito vectors: effects of blood source on feeding, survival, fecundity, and egg hatching rates. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, n. 1, p. 38-45, jun. 2013.

PINA, I. G.; FONSECA, A. H. Comportamento de *Aedes aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae) alimentados artificialmente com sangue de diferentes espécies de doadores. **Revista de Patologia Tropical**, v. 28, n. 1, p. 64-71, jan./jun. 1999.

PINTO, A. S. et al. **Manejo de Pragas Urbanas**. Piracicaba, CP 2, 2007, 208p.

PONSE, N. Reciclagem animal: O uso do sangue de boi no dia a dia é mais comum do que você imaginava. **Revista Feed & Food**, Abr. 2018. Disponível em: <<http://www.feedfood.com.br/pt/da-semana/outro/o-uso-do-sangue-de-boi-no-dia-a-dia-e-mais-comum-do-que-voce-ima>>. Acesso em: 08 abr. 2020.

RESENDE, M. C.; GAMA, R. A. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 72-75, jan./fev. 2006.

RESENDE, M. C. et al. A comparison of larval, ovitrap and MosquiTRAP surveillance for *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 8, p. 1024-1030, Dez. 2013.

RIBEIRO, P. B. et al. Exigências térmicas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 94, n. 2, p. 177-180, jun. 2004.

RIBEIRO NETO, J. A.; ALVES, S. N. Aspectos éticos na utilização de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) nas pesquisas entomológicas: Relato de experiência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 250-254, 2013.

ROCHA, E. M. M.; FONTES, G. Filariose bancroftiana no Brasil - **Rev. Saúde Pública**, v. 32, n. 1, p. 97-105, 1998.

ROMANO, D. et al. Artificial blood feeders for mosquitoes and ticks—Where from, where to? **Acta Tropica**, v. 183, p. 43-56, jul. 2018.

ROSS, P. A. et al. Maintaining *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with *Wolbachia*. **Journal of Visualized Experiments**, v. 126, p. e56124, ago. 2017.

ROSS, P. A. Does membrane feeding compromise the quality of *Aedes aegypti* mosquitos? **Plos One**, v.14, n. 11, p. e0224268, nov. 2019.

RUTLEDGE, L.C. et al. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosq News**, v. 24, n. 4, p. 407-419, dez. 1964.

SERPA, L. L. N. et al. Efeito da água de criação larval na oviposição de *Aedes aegypti* em laboratório. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p.515-517, set./out. 2008.

SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. **Entomologia & Acarologia na Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, L. F. Livros, 2006, 200p.

SERVICE, M. W. **A guide to medical entomology**. London, Macmillan Tropical & Sub-Tropical Medical Texts, 1980, 226p.

SILVA, I. G. et al. Ciclo evolutivo de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA, CULICIDAE). **Revista de Patologia Tropical**, v. 22, n. 1, p. 43-48, jan./jun. 1993.

SILVA, H. H. G. et al. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 53-63, jan./jun. 1998.

SIRIA, D. J. et al. Evaluation of a simple polytetrafluoroethylene (PTFE)-based membrane for blood-feeding of malaria and dengue fever vectors in the laboratory. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1: 236, abr. 2018.

SOARES-PINHEIRO, V. C. et al. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 77, n. 2, p. 396-401, 2017.

SOUZA, K. R. et al. Saberes e práticas sobre controle do *Aedes aegypti* por diferentes sujeitos sociais na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 1-13, 2018.

TAIPE-LAGOSA, C. B.; NATAL, D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 275-9, 2003.

TAUIL, P. L. Urbanização e Ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Vector Control - Methods for Use by Individuals and Communities**. Geneva, 1997.

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

WITMER, K. et al., 2018 - An inexpensive open source 3D-printed membrane feeder for human malaria transmission studies. **Malaria Journal**, v. 17: 282, 2018.

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, abr./jun. 2016.

ANEXO A – Recipientes plásticos usados como reservatório sanguíneo para alimentação de mosquitos em laboratório

Figura 1: (A e B) Copo descartável com alça de barbante; (C) Copo plástico virado com borda inferior cheia de sangue, coberta por membrana de TNT, e fechada com elástico; (D) Aplicação do volume sanguíneo na cavidade inferior do copo plástico; (E) Alimentador artificial inserido dentro da gaiola de criação de *Ae. aegypti* (Fonte: ANJOLETTE e MACORIS, 2016)

Figura 2: (A) Copo de isopor virado com a base para cima, e com sangue armazenado na cavidade inferior; (B) Recipientes contendo sangue encaixados em suporte de madeira sobre uma gaiola com mosquitos ; (C) Detalhe da fêmea de *Ae. aegypti* se alimentando de sangue através da membrana plástica (Fonte: SIRIA et al., 2018)

Figura 3: (A) Imagem com descrição de cada item utilizado no alimentador artificial; (B) Alimentador artificial colocado sobre uma gaiola de mosquitos (Fonte: COSTA-DA-SILVA et al., 2013)

ANEXO B – Placa de metal utilizada como reservatório sanguíneo

Figura 1: (A) Placa de metal quadrada; (B) Placa de metal com sangue exposta sobre a área telada da gaiola para alimentação dos mosquitos (Fonte: GUNATHILAKA et al., 2017)

Figura 2: (A) Sangue armazenado sobre a Placa de metal revestida por membrana plástica; (B) Bolsa térmica para aquecimento do sangue armazenado na Placa de metal (Fonte: CARVALHO et al., 2014)

ANEXO C – Reservatório membranoso para armazenamento de sangue

Figura 1: Desenho representando técnica descrita por DENG et al. (2012), para alimentação sanguínea de mosquitos em laboratório (Fonte: ROMANO et al., 2018)

Figura 2: Imagem original de técnica para alimentação de mosquitos, através de reservatório membranoso recheado com sangue (Fonte: DENG et al., 2012)

ANEXO D – Hemotek

Figura 1: Equipamento Hemotek para aquecimento sanguíneo, e alimentação de mosquitos através de membrana (Fonte: GUNATHILAKA et al., 2017)

Figura 2: (A) Placa sanguínea de alumínio modificada, coberta por uma membrana de colágeno mantida em posição por um anel de plástico; (B) Sangue injetado entre a placa e a membrana através de uma seringa descartável (Fonte: DAMIENS et al., 2013)

ANEXO E – Reservatório sanguíneo com circulação de água para aquecimento

Figura 1: Desenho original de reservatório de vidro para armazenamento sanguíneo, e circulação de água para aquecimento (Fonte: RUTLEDGE et al., 1964)

Figura 2: Dispositivo de vidro conectado ao banho-maria para aquecimento e circulação da água (Fonte: GUNATHILAKA et al., 2017)

Figura 3: (A) Rolo de Parafilm-M®; (B) Dispositivo de vidro conectado a mangueiras para circulação da água aquecida; (C) Detalhe de dispositivo contendo sangue conectado entre a gaiola de mosquitos e o banho-maria pra aquecimento da água (Fonte: DIAS et al., 2018)

Figura 4: (A) Esquema de montagem de vários alimentadores de vidro conectados por mangueiras de silicone para circulação da água aquecida; (B) Mosquitos *Ae. aegypti* se alimentando de sangue através da membrana de intestino de porco (Fonte: DUTRA, 2017)

Figura 5: Desenho representando o sistema de alimentação múltipla por membrana. (a) Entrada de água, (b) Saída de água, (c) Sangue armazenado no tubo de ensaio, (d) Membrana, (e) Cilindro acrílico, (f) Revestimento de malha de nylon, (g) Tubo acrílico contendo mosquitos (Fonte: LUO, 2014)

Figura 6: (A e B) Conexões sanguíneas ligadas ao mesmo meio de aquecimento e circulação da água; (C) Detalhe dos mosquitos se alimentando através da membrana com armazenamento de sangue (Fonte: LUO, 2014)