MICHELLE CRISTINE PEDROSA CORTEZ DO AMARAL

CRIAÇÃO EM MASSA DE *AEDES AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE) PARA APLICAÇÃO NO CONTROLE VETORIAL AUTOCIDA: VALIDAÇÃO DE UMA LINHAGEM, OTIMIZAÇÃO E PLANEJAMENTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2018

MICHELLE CRISTINE PEDROSA CORTEZ DO AMARAL

CRIAÇÃO EM MASSA DE *AEDES AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE) PARA APLICAÇÃO NO CONTROLE VETORIAL AUTOCIDA: VALIDAÇÃO DE UMA LINHAGEM, OTIMIZAÇÃO E PLANEJAMENTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro-Guimarães

Versão original.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Amaral, Michelle Cristine Pedrosa Cortez do
Criação em massa de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) para aplicação no controle vetorial autocida: validação de uma linhagem, otimização e planejamento. / Michelle Cristine Pedrosa Cortez do Amaral; orientadora Margareth de Lara Capurro-Guimarães. -- São Paulo, 2018.
147 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Produção de insetos. 2. Biofábrica. 3. Técnica do Inseto Estéril. 4. Manejo integrado do vetor.. 5. Supressão populacional. . I. de Lara Capurro-Guimarães, Margareth , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a):

Título da Tese:

Orientador(a):

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.034/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 022/11/CEUA, prorrogado validade até 01.04.2017 e por solicitação da Profa. Dra. **Margareth de Lara Capurro Guimarães**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Michelle Cristina Pedrosa** ao Projeto de Pesquisa *"Liberação planejada de machos de Aedes aegypti linhagem OX513A para estudos de dispersão"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 08 de abril de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Dedico esse trabalho ao povo brasileiro.

AGRADECIMENTOS

De Minas pra Pernambuco! De PE para a Bahia, diariamente! Da Bahia para São Paulo e de São Paulo para a vida! Foi assim essa trajetória! Muita gente me acompanhou, e por isso agradeço a cada um:

Aos meus pais, Mário e Ivani pelo amor e apoio incondicional! Amo vocês! A minha família querida, que soube compreender minha ausência, os momentos complicados, e até os pedidos de "não venham me visitar"! Não posso deixar de agradecer especialmente ao sobrinho-amigo Álef, por me ouvir, apoiar e por me ajudar diversas vezes quando o computador "superou" minha capacidade (risos)...

Ao meu marido Alexandre, que esteve comigo de todas as formas possíveis: como biólogo, como médico, como amigo, como "comediante", como amante, como companheiro. Sua admiração e orgulho me impulsionam a alçar voos cada vez maiores (e também mais simples)! Você foi fundamental nessa jornada, foi meu porto seguro! Obrigada por entender meus longos períodos de ausência...e por caminhar comigo pela vida! Agradeço também à sua família, em especial à nossa querida Sophia que mesmo sendo tão pequena, também teve que entender a ausência da madrinha...

À minha orientadora, Dra. Margareth Capurro, por confiar em mim desde o princípio! Obrigada pelas oportunidades, pelo aprendizado e pelos muitos bons momentos compartilhados!

À Biofábrica Moscamed Brasil, por permitir e viabilizar a realização de todo esse doutorado! Agradeço especialmente ao diretor, Dr. Jair Fernandes Virginio pelo apoio, compreensão, contribuições técnicas e incentivo! À superintendente Carla, pelo apoio constante e carinho! Aos demais colaboradores da Biofábrica Moscamed Brasil pelo apoio direto ou indireto, pela convivência agradável, por me ensinarem todos os dias o "nordestinês" e me deixarem mostrar um pouquinho da minha "mineiresse". São muitos bons momentos e muito trabalho compartilhado! Meu mais sincero agradecimento a cada um de vocês. Mas não poderia deixar de agradecer especialmente a uma parte da equipe técnica, que esteve comigo todos esses anos: Dra. Maylen, MSc. Luiza, Miriam, Aline Taiane, Jane, Amanda e Nilton e as estagiárias Fernanda e Bianca! Em especial agradeço à Luiza, Miriam e Aline Taiane, pela companhia, carinho, contribuições e apoio constantes! Vocês foram essenciais em muitos momentos! Agradeço especialmente também ao setor de operações, representado aqui por Valença, Odete e Leandro, sempre apoiando e dispostos a atender às demandas prontamente! Leandro, obrigada por me "aguentar" dezenas de vezes na oficina, discutindo dispositivos, gaiolas e outras ideias mirabolantes! Agradeço especialmente ainda, à mãe de todos nós, D. Sandra e também à Aninha, Taís, Sr. José Carlos, Eri e Fabrício pela torcida e papos "desestressantes"!

Ao prof. Dr. Aldo Malavasi, que confiou em mim desde o primeiro dia em que me viu! Obrigada por ter me apresentado a SIT, a pesquisa aplicada e por ter me "impulsionado" para o doutoramento!

Aos amigos-pesquisadores, Dra. Maylen e Dr. Danilo: Maylen, também gerente técnica da Moscamed, precisava agradecê-la também no "plano pessoal"! Nada do que eu disser

aqui demonstrará minha eterna gratidão a você! O que você fez por mim, não sou capaz de descrever aqui! Muchas gracias “la cubanita”! Danilo: de chefe à referência profissional e de referência profissional, a amigo. Acredito que não tenhamos nos encontrado e sim, reencontrado! Você é exemplo de competência, humildade e lealdade. Sou eternamente grata por cada minuto de nossa convivência! Obrigada pela amizade verdadeira, por todo apoio científico (e psicológico!), pelo abrigo em SP e por ter me mostrado a terra da garoa em sua essência.

A todos do Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados da USP e também seus ex-alunos! Obrigada por me fazerem “me sentir no lab” mesmo estando a mais de 2000 km de distância! Obrigada pelo aprendizado, mas também pelos hamburguers fora de hora, pelas risadas, dias/noites agradáveis no lab. e pela ótima convivência! Agradeço muitíssimo à Isabel e Regina, sempre presentes e carinhosas, e que me ajudaram muitas vezes com documentos na Biotec! Agradeço ainda ao amigo Andrezinho, grande profissional e com um coração enorme! Muito obrigada por tudo, especialmente pela pronta-ajuda e ensinamentos compartilhados! Agradeço também à Rafa, Helena e Ediane que me apoiaram durante minha estadia em São Paulo! Bianca, obrigada por nossa grande amizade construída em tão pouco tempo! Obrigada por me mostrar que todas nós temos um pouco de “mulher maravilha”!

Aos colegas Mariana Hayashi, Roberth Andreata, Marco Arantes e Caroline Louise pela companhia agradável! E aos amigos Antônio e Thales, pelos muitos meses de convivência em Sampa! Foi muito bom dividir a vida, a casa e o cuscuz com vocês! Tio Nonô, obrigada pelos bons momentos em SP!

Aos amigos de todas as horas, turma Bio 05.2! Obrigada a todos que me ajudaram a combater o “exu tranca tese” que apareceu nos últimos minutos! Agradeço ao amigo Hudson, biológo-estatístico de “mão cheia”, que me deu muito suporte! Às “moréias” pelo apoio e amizade, mesmo à distância! Por fim, aos amigos do sertão: Talyta pelo apoio e companhia nos experimentos quase noturnos! Iana Lima (minha baianinha) pelo apoio e torcida! Tony, Rose, à D. Isabel pelo cuidado e carinho!

A uma turma muito especial, que não era a minha, mas que tive o prazer de conhecer: alunos do Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública. A Saúde Pública também me proporcionou conhecer pessoalmente o prof. Dr. Delsio Natal e a profa. Dra. Maria Anice Sallum: foi uma honra tê-los como mestres, mesmo que por pouco tempo! Obrigada também a Márcia Bicudo, pela simpatia e conhecimentos valiosos! E à turma da FIOCRUZ-PE, por onde me aventurei rapidamente! Obrigada! Especialmente à Dra. Maria Alice Varjal por sua forma meiga e eficiente de ensinar!

I would like to thanks the researchers Fabrizio Balestrino and Jeremie Gilles, for all contributions with the mass rearing cage! Thank you!

Agradeço à Secretaria do Programa Interunidades em Biotecnologia! Obrigada pela atenção de sempre, em especial à Fábia, pela disponibilidade e simpatia!

Ao Velho Chico, por me inspirar todos os dias!

À CAPES, pela concessão da bolsa (1425078).

À FINEP (Referência 0256/16) pelo apoio financeiro.

“Não se pode criar experiência. É preciso passar por ela.”
Albert Camus

“Se você quer praticar o mal, a ciência pode lhe prover as mais poderosas armas; mas igualmente, se você deseja fazer o bem, a ciência também lhe põe nas mãos as mais poderosas ferramentas.”

Richard Dawkins

RESUMO

AMARAL, M. C. P. C. **Criação em massa de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) para aplicação no controle vetorial autocida: validação de uma linhagem, otimização e planejamento.** 2018. 147 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Aedes aegypti é o principal vetor envolvido na cadeia de transmissão de arboviroses como dengue, chikungunya, zika e febre amarela. Diante dos desafios para diminuir o nível de infestação do vetor e do recente aumento do número de casos e agravos dessas doenças, torna-se indispensável aderir a novas estratégias para complementar o controle vetorial. O controle autocida é uma estratégia que induz um controle de natalidade sobre a população do inseto e que tem a criação em massa como etapa fundamental. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver o protocolo de criação em massa e transporte de adultos de *Ae. aegypti* e aprimorar o sistema produtivo para aplicação em biofábricas. Foram avaliados dados de 59 lotes de produção em massa da linhagem bissexual MBR-001 e alguns dos seus parâmetros produtivos. A análise da MBR-001, mostrou baixo rendimento na produtividade de machos e fêmeas, com reduzida produção de ovos, em comparação com outra linhagem da mesma espécie. Com relação aos seus parâmetros produtivos, a manutenção de adultos em diferentes proporções sexuais nas gaiolas não afetou a produção de ovos viáveis. A MBR-001 apresentou também um baixo rendimento, revelando que ajustes no protocolo de criação são necessários. Tais adaptações são cruciais para reduzir a demanda de espaço físico e o custo da produção. Atrelado a isso, foram desenvolvidas gaiolas de criação em massa, e determinadas densidades de adultos para otimizar a produção de ovos viáveis. No que diz respeito à criação larval, foi verificada que não há ocorrência de protrandria em fase larvária logo após eclosão, e ainda, foram desenvolvidas seis dietas com insumos nacionais de baixo custo (sendo que três delas apresentaram melhores resultados). Além disso, uma ampla faixa de densidades larvais foi testada para determinar as condições ótimas de criação. Esses resultados contribuem para o aprimoramento das condições ideais de produção de machos estéreis de qualidade, com uma melhor relação custo-benefício. Por fim, foram determinadas as condições iniciais para o transporte de adultos entre biofábrica e áreas-alvo de liberação de insetos estéreis. A imobilização de *Ae. aegypti* em baixas temperaturas (4 a 7°C) por até seis horas, não afetou a sobrevivência e habilidade de voo do mosquito. De forma geral, o presente trabalho forneceu informações, produtos e

condições que contribuíram para o desenvolvimento de um protocolo padronizado e para o aprimoramento da criação em massa de *Ae. aegypti*, visando a produção de insetos de qualidade e a redução dos custos operacionais em estratégias de controle autocida.

Palavras-chave: Produção de insetos. Biofábrica. Técnica do Inseto Estéril. Manejo integrado do vetor. Supressão populacional.

ABSTRACT

AMARAL, M. C. P. C. **Mass rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for application in autocidal vector control: strain validation, optimization and planning**. 2018. 147 f. Thesis (Ph. D. Thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Aedes aegypti is the main vector involved in the transmission chain of arboviruses such as dengue, chikungunya, zika and yellow fever. Faced with the challenges to reduce the level of vector infestation and the recent increase in the number of cases and diseases, it is essential to adhere to new strategies to complement vector control. Self-control is a strategy that induces a birth control over the insect population and that has mass creation as a fundamental step. Thus, the objective of this study was to develop the protocol of mass creation and transport of adults of *Ae. aegypti* and to improve the productive system for application in biofactories. Data from 59 mass production batches of the bisexual strain MBR-001 and some of its productive parameters were evaluated. The analysis of MBR-001, showed low yield in males and females, with reduced egg production, in comparison to another lineage of the same species. Regarding their productive parameters, the maintenance of adults in different sex ratios in the cages did not affect viable egg production. MBR-001 also showed low performance, revealing that settings in the breeding protocol are required. Such adaptations are crucial to reduce the demand for physical space and the cost of production. Linked to this, mass-rearing cages, and certain adult densities were developed to optimize viable egg production. Regarding larval breeding, it was verified that there is no occurrence of protrandria in the larval phase after hatching, and six diets with low cost and national inputs were developed (three of them presented better results). In addition, a wide range of larval densities was tested to determine optimal breeding conditions. These results contribute to the improvement of the ideal conditions of production of quality sterile males, with a better cost-benefit ratio. Finally, initial conditions were determined for the transport of adults between facility and target areas of sterile insect release. The immobilization of *Ae. aegypti* at low temperatures (4 to 7 °C) for until to six hours, did not affect the survival and flight ability of the mosquito. In general, the present study provided information, products and conditions that contributed to the development of a standardized protocol and to the improvement of *Ae. aegypti*, aiming the production of quality insects and the reduction of operational costs in self-control strategies.

Keywords: Insect production. Facility. Sterile Insect Technique. Integrated vector management. Population suppression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução dos casos de dengue no Brasil..... 23

Figura 2 - Regiões onde o vírus Zika é enzoótico/endêmico e causou epidemias..... 26

Figura 3 - Estágios de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*..... 28

Figura 4 - A técnica do inseto estéril (SIT), a técnica do inseto incompatível (IIT) ou a combinação de ambas..... 33

Figura 5 - Fluxograma do sistema de produção em massa de *Ae. aegypti*..... 37

Figura 6 - Processo de criação em massa de *Ae. aegypti*: principais etapas..... 44

Figura 7 - Oviposição individual de fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001..... 46

Figura 8 - Etapas para avaliação do rendimento de pupas machos da linhagem de *Ae. aegypti*, MBR-001..... 47

Figura 9 - *Aedes* Mass Production Cage- MPC..... 48

Figura 10 - Procedimentos uti lizados para alimentação sanguínea e oferta dos substratos para oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti* na GCM-II.... 51

Figura 11 - Procedimentos utilizados para avaliação da taxa de eclosão de larvas de *Ae. aegypti*..... 52

Figura 12 - Etapas do processo de eclosão e coleta de larvas a cada intervalo..... 53

Figura 13 - Procedimentos realizados durante a execução do experimento de avaliação de dieta larval para o desenvolvimento de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001..... 55

Figura 14 - Criação de larvas em diferentes densidades e procedimentos utilizados para avaliação do peso corporal e taxa de emergência de indivíduos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001..... 56

Figura 15 - Procedimentos para avaliação da sobrevivência de machos estéreis imobilizados em baixas temperatura..... 58

Figura 16 - Procedimentos para avaliação da habilidade de voo de machos estéreis imobilizados em diferentes temperaturas..... 59

Figura 17 - Produção de pupas machos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, para lotes de colônia sob condições de criação em massa..... 62

Figura 18 - Produção de pupas fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, para lotes de colônia sob condições de criação em massa..... 63

Figura 19 - Produção de pupas machos e fêmeas de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001, durante 2016-2018 sob condições de criação em massa..... 65

Figura 20 - Produção de ovos por gaiola da colônia de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001..... 66

Figura 21 - Fecundidade de fêmeas de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001 expostas a diferentes proporções de macho..... 67

Figura 22 - Fertilidade média de fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.... 68

Figura 23 - Rendimento acumulado de pupas machos de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001, criadas em condições de grande escala..... 69

Figura 24 - Planilha básica de planejamento do sistema produtivo (PSP) para a produção em grande escala de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001... 72

Figura 25 - Planilha básica de planejamento do sistema produtivo (PSP) para a produção em grande escala de *Ae. aegypti*, linhagem OX513 A..... 73

Figura 26 - Fórmulas utilizadas na planilha básica de planejamento do sistema produtivo (PSP) para a produção de um milhões de machos de *Ae. aegypti*..... 74

Figura 27 - Protótipo da Gaiola de Criação em Massa (GCM-II) 77

Figura 28 - Mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* em gaiolas de criação em massa sob diferentes densidades ao final de dois ciclos reprodutivos..... 81

Figura 29 - Taxa de eclosão (± erro padrão) das larvas provenientes dos ovos produzidos sob diferentes DRS..... 84

Figura 30 - Padrão de eclosão de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, sob condições artificiais, em relação ao tempo..... 86

Figura 31 - Padrão de eclosão de machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, sob condições artificiais, em relação ao tempo..... 87

Figura 32 - Taxa de produção de machos de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001 desenvolvidas em diferentes dietas de criação larval..... 92

Figura 33 - Rendimento acumulado de machos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidos em diferentes dietas larvais..... 93

Figura 34 - Taxa de produção de machos (média ± erro padrão) de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidas em diferentes densidades de criação larval..... 100

Figura 35 - Rendimento acumulado de pupas machos (média ± erro padrão) de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidas em diferentes densidades de criação larval..... 100

Figura 36 - Fluxograma de desenvolvimento do experimento para determinação de condições para o transporte de machos estéreis..... 104

Figura 37 - Machos estéreis imobilizados logo após o resfriamento..... 105

Figura 38 - Sobrevivência sob stress de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, imobilizados..... 105

Figura 39 - Habilidade de voo de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001 imobilizados..... 106

Figura 40 - Sobrevivência sob stress de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, imobilizados e incubados..... 107

Figura 41 - Habilidade de voo sob stress de machos estéreis de *Ae. aegypti* (linhagem MBR-001) imobilizados e incubados..... 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Regime de alimentação larval utilizado na criação em massa de *Ae. aegypti*..... 42

Tabela 2 - Parâmetros avaliados na produção de pupas machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, para lotes de Colônia..... 64

Tabela 3 - Parâmetros de produção (média ± EP) de pupas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, criadas em condições de grande escala..... 70

Tabela 4 - Porcentagem de aumento dos principais parâmetros para a produção de 1 milhão de machos da linhagem MBR-001 em comparação com a linhagem OX513 A..... 75

Tabela 5 - Mortalidade, fecundidade das fêmeas e taxa de eclosão em diferentes gaiolas de criação em massa..... 78

Tabela 6 - Dimensões das gaiolas GCM-II-II e PVC, DRS avaliados e número equivalente de adultos utilizados para criação em massa de *Ae. aegypti*, linhagem Rockefeller..... 79

Tabela 7 - Número de fêmeas vivas, redução da sobrevivência (%), produção de ovos por gaiola e fecundidade das fêmeas ao longo dos ciclos reprodutivos em gaiolas de criação em massa com diferentes DRS.. 83

Tabela 8 - Efeito das interações de segundo nível avaliadas..... 85

Tabela 9 - Efeito das interações de segundo nível avaliadas..... 85

Tabela 10 - Composição das dietas alternativas avaliadas para o desenvolvimento larval de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001..... 88

Tabela 11 - Duração larval (dias) e sobrevivência dos estágios imaturos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidos em diferentes dietas larvais..... 89

Tabela 12 - Parâmetros biológicos e de produção (média ± EP) de pupas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, criadas em diferentes dietas larvais... 91

Tabela 13 - Relação custo-benefício para produção de um milhão de pupas machos de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001, considerando os rendimentos de pupas obtidos para cada dieta larval avaliada..... 94

Tabela 14 - Rendimento acumulado (média ± erro padrão) e razão sexual de progênies de pupas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidas sob diferentes densidades larvais..... 97

Tabela 15 - Parâmetros de produção (média ± erro padrão) e biológicos de pupas machos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, criadas em diferentes densidades..... 99

Tabela 16 - Parâmetros de produção e biológicos de pupas fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, criadas sob diferentes densidades larvais ao longo de quatro coletas..... 102

Tabela 17 - Estimativa de utilização de material biológico, consumo e custo de dieta para a produção de um milhão de machos/semana, considerando a utilização de cada densidade larval avaliada e seu respectivo rendimento de pupas machos nas primeiras 48h de coleta..... 103

Tabela 18 - Tempo de recuperação de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, após imobilização e incubação durante 2, 4 ou 6 horas... 108

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 FEBRE AMARELA 21
1.2 DENGUE 22
1.3 CHIKUNGUNYA 24
1.4 ZIKA VÍRUS 25
1.5 O VETOR *Aedes aegypti* 27
1.6 CONTROLE VETORIAL 29
1.6.1 **Controle autocida ou genético** 31
1.6.1.1 *Sterile Insect Technique – SIT* 31
1.6.1.2 *Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene- RIDL* 32
1.6.1.3 *Incompatible Insect Technique – IIT/SIT* 32
1.6.1.4 *Considerações sobre a aplicação do controle autocida/genético no controle de mosquitos vetores* 34
1.6.1.5 *Criação em massa* 36
2 OBJETIVOS 39
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39
3 MATERIAL E MÉTODOS 40
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO 40
3.2. META I: PLANO DE APLICAÇÃO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA LINHAGEM MBR-001 40
3.2.1 Estabelecimento da colônia da linhagem MBR-001 em condições de criação em massa 40
3.2.1.1 *Manutenção da Colônia Matriz* 40
3.2.1.2 *Criação larval* 41
3.2.1.3 *Separação e coleta de pupas* 42
3.2.2 Avaliação dos parâmetros de produção e qualidade da linhagem MBR-001 45
3.2.3 Determinação de parâmetros para criação em massa 45
3.2.3.1 *Proporção fêmea: macho para produção de ovos nas gaiolas de criação em massa* 45
3.2.3.2 *Quantificação do número de ovos por grama* 46
3.2.3.3 *Rendimento L1-pupa macho* 46
3.3.3 Planejamento da produção em massa da linhagem MBR-001 47
3.4 META II: PADRONIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO EM MASSA 47
3.4.1 Aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de *Ae. aegypti* e efeito da densidade de insetos na produção de ovos 47
3.4.1.1 *Desenvolvimento de protótipo de gaiolas de adultos para a produção em massa de Ae. aegypti* 47

3.4.1.2 *Efeito da densidade de adultos e do tipo de gaiola de adultos para a produção em massa de ovos*..... 48

3.4.2 Avaliação do padrão de eclosão de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001 52

3.4.3 Desenvolvimento de dietas alternativas para a criação larval 53

3.4.4 Determinação da densidade ótima para a criação larval..... 55

3.5 META III: PROCESSOS PÓS-PRODUÇÃO: CONDIÇÕES PARA O TRANSPORTE DE ADULTOS 57

3.5.1 Determinação de condições para o transporte de adultos machos estéreis imobilizados.....57

3.6 ANÁLISE DOS DADOS **..... 60**

4. RESULTADOS..... 61

4.1 META I: PLANO DE APLICAÇÃO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA LINHAGEM MBR-001..... 61

4.1.1 Avaliação dos parâmetros de produção e qualidade da linhagem MBR-001 61

4.1.2 Determinação de parâmetros para criação em massa 66

4.1.2.1 *Proporção sexual para produção de ovos em gaiolas* 66

4.1.2.2 *Quantificação do número de ovos por grama*.....68

4.1.2.3 *Rendimento L_1-pupa macho*.....68

4.1.2.4 *Planejamento da produção em massa da linhagem MBR-001* 70

4.2 META II: PADRONIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO EM MASSA 75

4.2.1 Aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de *Ae. aegypti* e efeito da densidade de insetos na produção de ovos 75

4.2.1.1 *Desenvolvimento e aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de Ae. aegypti* 75

4.2.1.2 *Efeito da densidade de adultos para a produção em massa de ovos*.....79

4.2.2 Avaliação da sincronização da eclosão de larvas machos e fêmeas 86

4.2.3 Desenvolvimento de dietas larvais alternativas para criação larval..... 87

4.2.3.1 *Eeito das dietas no tempo de duração larval e sobrevivência das fases imaturas*.....88

4.2.3.2 *Rendimento diário, peso, razão sexual e emergência*..... 89

4.2.3.3 *Taxa de produção e rendimento acumulado de pupas machos*..... 92

4.2.3.4 *Relação custo-benefício para a produção em massa com a utilização das dietas alternativas desenvolvidas* 93

4.2.4 Determinação da densidade ótima para a criação larval..... 95

4.2.4.1 *Efeito da densidade no desenvolvimento larval e sobrevivência de pupas* 95

4.2.4.2 *Rendimento diário, peso corporal, razão sexual e emergência* 95

4.2.4.3 *Relação custo-benefício na produção em massa com a utilização das diferentes densidades de criação larval*..... 103

4.3 META III: PROCESSOS PÓS-PRODUÇÃO: CONDIÇÕES PARA O TRANSPORTE DE ADULTOS 103

5 DISCUSSÃO 109

5.1 META I: PLANO DE APLICAÇÃO EM MASSA DA LINHAGEM MBR-001 109

5.2 META II: PADRONIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO EM MASSA.....113

5.2.1 Aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de *Ae. aegypti* 113

5.2.1.1 *Efeito da densidade de adultos e do tipo de gaiola de adultos para a produção em massa de ovos*..... 115

5.2.2 Avaliação do padrão de eclosão de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001 118

5.2.3 Desenvolvimento de dietas alternativas para a criação larval 119

5.2.4 Determinação da densidade ótima para a criação larval..... 125

5.3 META III: PROCESSOS PÓS-PRODUÇÃO: CONDIÇÕES PARA TRANSPORTE DE ADULTOS 128

6 CONCLUSÃO 132

REFERÊNCIAS 134

1 INTRODUÇÃO

Arbovirus é um termo derivado da expressão inglesa "*Arthropod-borne viruses*", que descreve um grupo de vírus que se multiplicam em artrópodes e são transmitidos por estes ao hospedeiro vertebrado, em um modo de transmissão denominado: transmissão biológica (OMS 1985; KUNO, 2005). Esses vírus multiplicam-se nos artrópodes e após um período de incubação extrínseco, podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada dos vetores e posteriormente, multiplicam-se e produzem viremia neste hospedeiro. Os arbovírus se mantêm no meio ambiente também através da transmissão transovariana e ainda, pela transmissão venérea entre os artrópodes (OMS 1985).

Os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus com 537 membros registrados no Catálogo Internacional dos Arbovírus (KARABATSOS, 2001), sendo que destes, 135 podem causar infecções em humanos (GULBER & VASILASKIS, 2017). Estes vírus pertencem às famílias Reoviridae, Rhabdoviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Togaviridae, mas apenas as três últimas possuem espécies que podem causar doenças no homem (HENRIQUES, 2008). A maioria dos arbovírus causa uma doença branda, com evolução benigna, sem ser fatal ou acarretar em incapacidade do indivíduo (TRAVASSOS DA ROSA ET AL., 1998). Contudo, a frequência e a magnitude dos problemas ocasionados pelas arboviroses tem aumentado (GUBLER, 2002, KUNIHOLM et al., 2008): tem sido registrado um maior impacto na morbidade e mortalidade durante a manifestação dessas enfermidades nos últimos anos (DONALÍSIO et al., 2017; MS, 2017c).

Em anos recentes, a distribuição geográfica da ocorrência de algumas arboviroses, bem como o número e a grandeza dos eventos epidêmicos aumentou significativamente (VASILAKIS & GUBLER, 2016). As arboviroses dengue, chikungunya e zika, causadas pelos vírus DENV, CHIKV e ZIKV, respectivamente, são as arboviroses mais comuns no atual cenário epidemiológico brasileiro (DONALÍSIO et al., 2017). Questões globais relacionadas aos fatores demográficos, ecológicos, sociais e ambientais são responsáveis pela emergência destas enfermidades nos últimos 40 anos (LIMA-CAMARA, 2016; VASILAKIS & GUBLER, 2016). Outra arbovirose também inserida na atual conjunta epidemiológica brasileira é a febre amarela (VASCONCELOS 2003; CAVALCANTE & TAUIL, 2016; DONALÍSIO et al., 2017).

1.1 FEBRE AMARELA

A febre amarela, cujo agente etiológico é o vírus YFV, é a primeira febre hemorrágica de origem viral descrita no mundo (MONATH, 2001). A enfermidade apresenta elevada letalidade (VASCONCELOS, 2003), sendo potencialmente epidêmica, porém, é também prevenível através de vacina (M.S., 2005). Apresenta-se na forma silvestre e urbana, a depender dos vetores e hospedeiros vertebrados envolvidos (MONATH, 2001; VASCONCELOS, 2003; CAVALCANTE & TAUIL, 2017). O YFV é transmitido ao ser humano através da picada de mosquitos da família Culicidae dos gêneros *Sabethes*, *Aedes* e *Haemagogus* (MONATH, 2001; VASCONCELOS, 2003). Na América do Sul, *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é o principal vetor da febre amarela urbana (CAVALCANTE & TAUIL, 2017; TAUIL, 2010).

A forma urbana da doença foi erradicada da América em 1954, mas há décadas se mantém endêmica nas florestas tropicais do continente africano e na América do Sul, levando à surtos isolados ou epidemias recorrentes de relevância variável em saúde pública (VASILAKIS & GUBLER, 2016; DONALÍSIO et al., 2017, VASCONCELOS, 2003).

No Brasil, a circulação da febre amarela ocorre em surtos silváticos, sem características periódicas e associadas a epizootias (DONALÍSIO ET AL., 2017). Desde 1942, nenhum ciclo urbano da doença é registrado no país (CAVALCANTE & TAUIL, 2017). Contudo, houve uma expansão da circulação do vírus da febre amarela entre os anos de 2000 a 2009 e seu ressurgimento no Centro-Oeste e no Sudeste desde 2014 (DONALÍSIO ET AL., 2017), caracterizando a doença como reemergente. A expansão das áreas de circulação viral para áreas com maior número de casos recentes (regiões Sudeste e Sul) é preocupante, uma vez que estes locais estão próximos a grandes centros urbanos e com uma baixa cobertura vacinal da população. Soma-se a isso, o fato de que em muitos destes locais, há alta infestação por *Ae. aegypti* (ROMANO et al., 2010; CAVALCANTE & TAUIL, 2017). Tal conjuntura, propicia o risco da reurbanização da doença no país (CAVALCANTE & TAUIL, 2017).

Desde 2016, o Brasil tem enfrentado um dos maiores surtos de febre amarela de transmissão silvestre já registrados no país, envolvendo principalmente os estados da região sudeste, sobretudo Minas Gerais e Espírito Santo (CAVALCANTE & TAUIL, 2017; M.S., 2017). Entre os meses de dezembro de 2016 e julho de 2017 foram confirmados 779 casos humanos e 262 óbitos, além da morte de 2.504 primatas não-

humanos (PNH) (M.S. 2017a). Neste mesmo período, foi observado o aumento da gravidade da doença (taxa de letalidade de 33,6%) (M.S., 2017 a). Entre julho e dezembro de 2017, mais quatro casos foram confirmados (incluindo um óbito), e 52 notificações ainda estão sob investigação. No mesmo período, foram notificadas 2.069 epizootias em PNH, com 320 casos confirmados (M.S., 2017b).

1.2 DENGUE

A dengue é uma doença febril aguda, com largo espectro clínico que varia de formas assintomáticas até formas graves e fatais. Esta arbovirose possui como agente etiológico um vírus do gênero *Flavivírus*, sendo descritos quatro sorotipos causadores da doença: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (WHO, 2012). O sorotipo 5 do vírus foi detectado na Malásia (VASILAKIS, 2013), mas sua caracterização ainda está sendo realizada e ainda não há evidências de sua ocorrência em outros locais.

As primeiras notificações de epidemias de dengue em nível mundial ocorreram nos anos de 1779 e 1780 nos continentes asiático, africano e norte-americano (CDC, 2000; MAHMOOD, 2006). Mas foi após a Segunda Guerra Mundial que a doença se expandiu para o restante do planeta, incluindo o continente americano (Pinheiro & Nelson, 1997; Maciel et al., 2008).

A OMS (2015a) estima que ocorram de 300 a 400 milhões de infecções de dengue anualmente, e que quase metade da população mundial resida em países em que a doença é endêmica. Assim, esta é a arbovirose com maior importância no planeta, com mais de 100 países sob risco de infecção (GÓMEZ-DANTÉS & WILLOQUET, 2009; OMS, 2009; TAUIL, 2002).

Na América, desde o início da década de 1980, o número de casos de dengue começou a aumentar consideravelmente (DICK ET AL., 2012). Deste então, a incidência da doença no continente americano tem mostrado uma tendência de crescimento, com picos epidêmicos cada vez mais altos, que se repetem a cada 3–5 anos (SAN MARTÍN & BRATHWAITE-DICK, 2007; DICK ET AL., 2012).

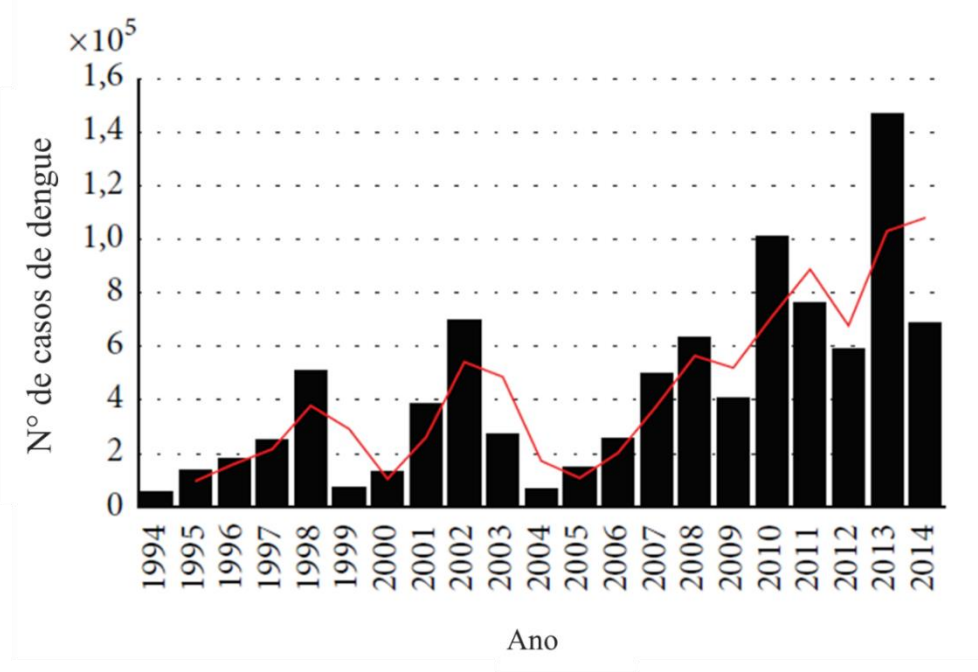
A primeira epidemia de dengue no Brasil foi registrada em 1845, sendo que outras epidemias foram reportadas no mesmo século e também no século XX (entre 1916 e 1923). Após aproximadamente 60 anos, o país não registrou ocorrência de dengue, devido à erradicação do seu vetor no país, *Ae. aegypti*, através de um programa

coordenado pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) em conjunto com a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e a "International Health Division"/ "Rockefeller Foundation" para controle da febre amarela urbana 1923 (THE ROCKEFELLER FUNDATION, 1947; FUNASA, 2002; TAUIL ET AL., 2001; SIQUEIRA ET AL., 2005, DICK ET AL., 2012).

O Brasil só registrou novos casos da doença em 1981, quando houve a reintrodução do mosquito através do estado de Roraima em meados da década de 70 (OSANAI ET AL., 1983; TAUIL ET AL., 2001). Ainda nos anos 80, a doença recebeu maior atenção, quando o DENV-1 foi introduzido no Rio de Janeiro, acarretando na infecção de milhares de pessoas (TAUIL ET AL., 2001; DICK ET AL., 2012).

A incidência da doença no Brasil tem apresentado padrão sazonal, com maior número de casos nos meses mais quentes e úmidos (janeiro a maio) que correspondem, em grande parte, à estação chuvosa (M.S., 2006). Desde os anos 2000, diversas epidemias têm sido registradas no país (ROMANO ET AL., 2010; FARES ET AL., 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Evolução dos casos de dengue no Brasil.



Fonte: Figura modificada e traduzida de Fares et al., 2015.

O aumento da incidência da doença pode estar relacionado a diversos fatores, dentre eles pode ser citado a deterioração do programa de erradicação do *Ae. aegypti* implementado pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) na década de 40, que

resultou no aumento da densidade do vetor desde a década de 70. Outros fatores como crescimento populacional e a urbanização desordenada, seleção de populações resistentes ao DDT (inseticida utilizado no programa de erradicação), a decadência da infraestrutura de saúde pública, redução do acesso aos cuidados de saúde (OPAS, 2010; Dick et al, 2012) também contribuíram para reinfestação do país.

Recentemente, uma vacina tetravalente para dengue foi licenciada (Dengvaxia®-Sanofi Pasteur, 2015; WHO 2017). A vacina é administrada em três doses ao longo de um ano (DURBIN, 2016) e sua eficiência média foi de 59,2%. (OMS,2016). A eficácia da vacina apresentou diferenças quanto aos sorotipos virais (eficiência aproximada de 54%, 43, 72% e 77% para os sorotipos 1, 2, 3 e 4, respectivamente), quanto a idade na vacinação e estado serológico do paciente (exposição prévia à doença) (O.M.S., 2016). Com relação a este último, diante dos novos dados preliminares apresentados pela Sanofi após cinco anos de estudo em indivíduos imunizados, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) brasileira recomendou em 2017 que a vacina não seja administrada em indivíduos que não tenham sido previamente expostos ao vírus da dengue (ANVISA, 2017a). Além disso, no Brasil, a Dengvaxia® ainda não é fornecida pelo Programa Nacional de Imunizações do poder público (ANVISA, 2017b). Apesar de existirem outros cinco candidatos vacinais adicionais que estão sob avaliação em ensaios clínicos (OMS, 2016), o controle do vetor *Ae. aegypti* ainda é a principal estratégia para prevenir a doença (WHO, 2009; FARES ET AL., 2015; GUBLER, 2015).

Nos últimos anos, o país tem vivenciado as maiores epidemias já registradas, tendo reportado 1.688.688 e 1.483.623 casos prováveis em 2015 e 2016, respectivamente. Todavia, em 2017 ocorreu uma redução no número de casos, sendo registrados 251.711 casos prováveis de dengue (M.S., 2018).

1.3 CHIKUNGUNYA

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi identificado na Tanzânia na década de 50 (ROSS, 1956). Apesar de ter ocasionado surtos no continente africano e asiático (WEAVER & LECUIT 2015), foi a partir de 2004 que sua expansão passou a ser acompanhada, e em 2013, CHIKV foi introduzido nas ilhas Saint Martin no mar do Caribe e posteriormente, se espalhou rapidamente para diversos países das Américas (LEPARC-

GOFFART ET AL., 2014; WEAVER & LECUIT, 2015). Desde 2004, mais de quatro milhões de casos suspeitos já foram registrados em todo o mundo (O.M.S, 2015b).

No Brasil, a transmissão autóctone foi detectada em setembro de 2014 no Amapá, sendo identificado o genótipo asiático do vírus. No mesmo ano, o genótipo africano do CHIKV foi identificado na Bahia (TEIXEIRA ET AL., 2014; HONÓRIO ET AL., 2015).

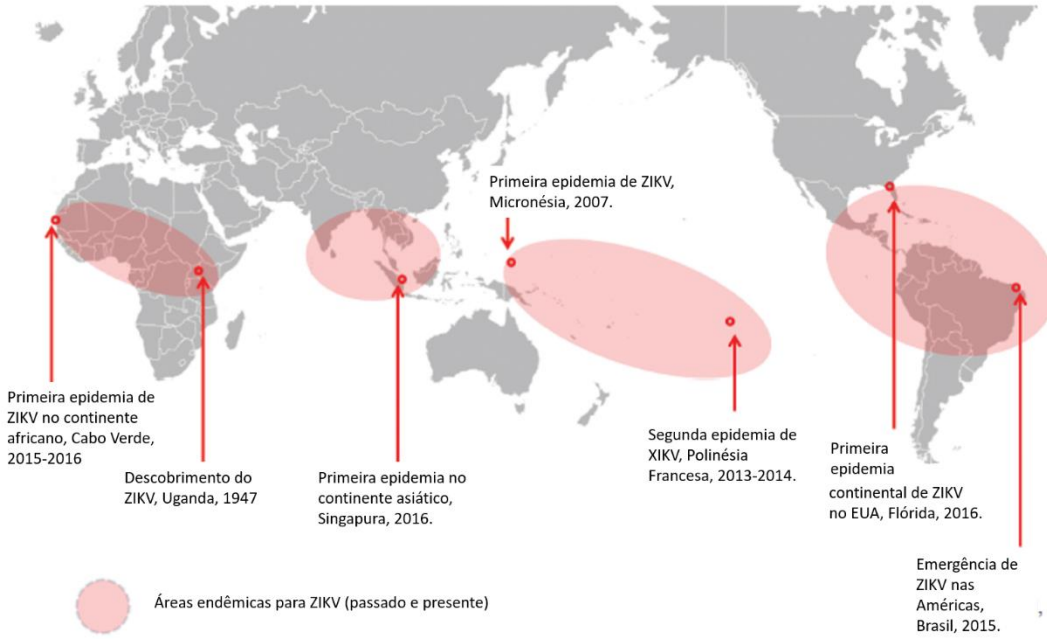
Em 2015 foram registrados no país, 38.332 casos prováveis de febre chikungunya (M.S. 2016). Nos últimos anos, muitos estudos têm desafiado a visão consagrada de que a febre Chikungunya teria natureza não-letal (DE LA HOZ ET AL., 2015; CAVALCANTI ET AL., 2017). Somente no Brasil em 2016, 196 óbitos foram notificados (M.S. 2017), além dos 271.824 casos prováveis da doença. De acordo com Cavalcanti et al. (2017), o número de mortes no país pode estar subestimado e permanecem algumas incertezas sobre o protagonismo ou subjacência de CHIKV em relação aos diversos óbitos registrados. Apesar disso, em 2017 o número de casos notificados caiu para 185.854 e houve apenas um óbito confirmado (dois ainda estão sob investigação) (M.S. 2018).

Em 2017, houve a primeira detecção de *Ae. aegypti* naturalmente infectado com CHIV no Brasil, sugerindo o envolvimento dessa espécie em surtos da doença ocorridos no nordeste do país nos últimos anos (Costa-da-Silva et al., 2017).

1.4 ZIKA VÍRUS

O Zika vírus foi isolado pela primeira vez em Uganda, no continente africano na década de 40 (DICK ET AL., 1952; GUBLER ET AL, 2017). Estudos recentes sugerem que o primeiro caso em humanos só foi registrado na década de 60, no mesmo local (WIKAN & SMITH, 2017). O primeiro grande surto da doença ocorreu em 2007 nos Estados Federados da Micronésia. Somente após cerca de sete anos é que o segundo surto ocorreu, dessa vez, na Polinésia Francesa, sendo registradas algumas complicações neurológicas nos humanos infectados (O.M.S, 2015c). A partir de então, o ZIKV se dispersou pelo Pacífico (O.M.S, 2015c) e em 2013 ou 2014, foi introduzido no Brasil (FARIA ET AL., 2017) (Figura 2). Desde então, mais de 45 países do continente americano relataram transmissão local do vírus (OMS, 2017).

Figura 2 - Regiões onde o vírus Zika é enzoótico/endêmico e causou epidemias



Fonte: Figura modificada e traduzida de Gubler et al., 2017.

A enfermidade foi considerada uma doença branda até outubro de 2015, quando um acentuado aumento no número de recém-nascidos com microcefalia foi observado no nordeste do Brasil (TEIXEIRA ET AL., 2016; OLIVEIRA ET AL., 2016; LOWE ET AL., 2018), quando se suspeitou da associação entre a infecção pelo vírus e distúrbios neurológicos em neonatos. Devido a tal conjuntura, a OMS declarou a situação como "E*mergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) em fevereiro de* 2016 (OPAS, 2015). Ainda em 2016, o Brasil notificou associação entre a infecção pelo vírus Zika e a síndrome de Guillain-Barré, e entre a infecção pelo ZIKV e microcefalia (O.M.S, 2015c).

Em novembro de 2016, a OMS anunciou que ZIKV não representa mais uma ESPII. Todavia, a mesma organização alertou que a avaliação de risco global não mudou e que o vírus continua a se dispersar para locais onde vetores competentes são frequentemente encontrados (OPAS, 2016). E mesmo com um declínio no número de casos em alguns países, a vigilância epidemiológica deve ser constante e plena (O.M.S, 2015c, atualizado em 2016). No Brasil, em 2016 foram registrados 216.207 casos prováveis de febre pelo vírus Zika. Em 2017, o número de casos registrados caiu para 17.452 (M.S. 2017 e 2018).

Nesse contexto, a conjuntura brasileira atual recente mostra o enfrentamento de uma epidemia tríplice desses arbovírus, uma vez que paralelamente às epidemias

recorrentes de dengue, ocorreram ainda as de febre chikungunya e zika. Devido à ausência de vacinas eficientes disponíveis em massa e de terapias específicas para estas arboviroses, o controle do vetor de forma integrada ainda, com uso sinérgico de diversas ferramentas é a medida mais eficaz para conter a propagação destas doenças (Tauil, 2002; FARES et. al., 2015, GUBLER et al., 2015; ZARA et al., 2016).

No Brasil, o mosquito *Ae. aegypti* é considerado o principal vetor destes arbovírus (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2004; HONÓRIO et al., 2015; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016).

1.5 O VETOR *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é uma espécie exótica, originária da África subsaariana (FORATTINI, 2002), cujo controle tem sido um desafio desde sua reintrodução no país na década de 70 (TAUIL 2002; ZARA et al., 2016).

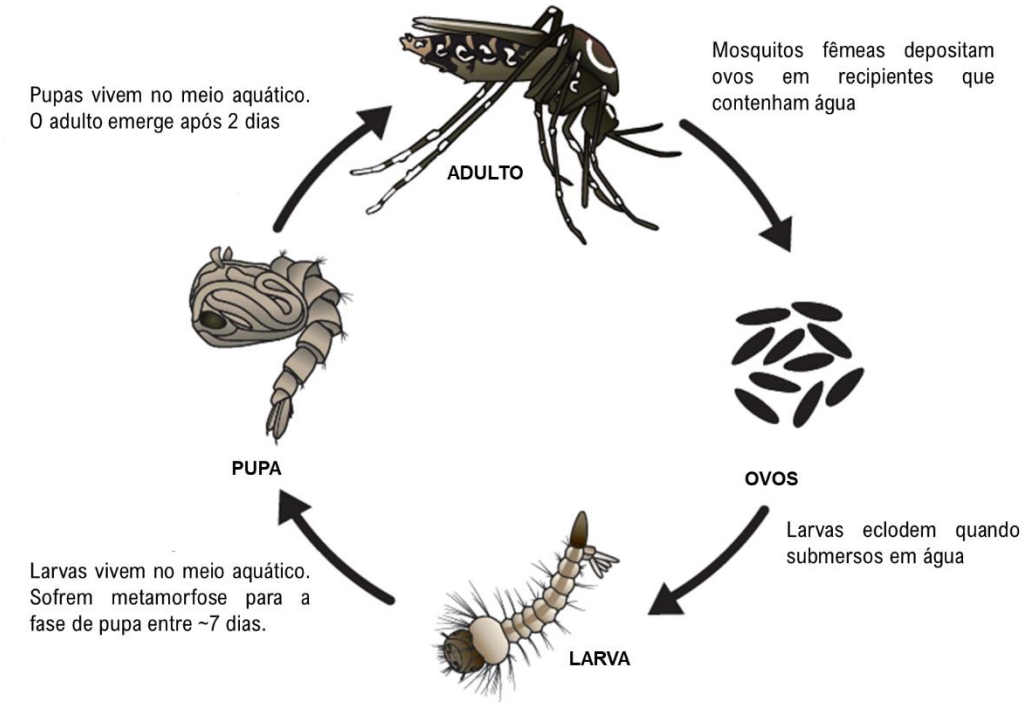
Em sua fase adulta, a imago alada vive no meio terrestre, enquanto suas formas imaturas (larva e pupa) se desenvolvem no meio aquático entre de 8 a 10 dias, dependendo da temperatura da água e disponibilidade de alimentos (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; FORATINI, 2002). Os ovos são depositados pelas fêmeas nas paredes internas de recipientes, preferencialmente contendo água com pouca matéria orgânica, próximos à superfície da água, embora a oviposição possa também ocorrer diretamente na água (MADEIRA et al., 2002; GOMES et al., 2006). Em seguida, há um período de incubação de aproximadamente trinta e seis horas para que ocorra o desenvolvimento embrionário (CLEMENTS, 1992). Os ovos podem permanecer por mais de um ano em locais secos apresentando um estado de quiescência (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), sendo a sua submersão em água essencial para a eclosão das larvas (CLEMENTS, 1992).

As larvas apresentam quatro estádios larvais (L_1-L_4) e se alimentam através da filtração de partículas minúsculas (detritos animal, vegetal e microorganismos) obtidas quando os imaturos revolvem o fundo do fundo do criadouro com o próprio corpo e ainda, pela mastigação e deglutição de partículas sólidas de alimentos usando as mandíbulas (CHRISTOPHERS, 1960). Em seguida ao desenvolvimento larval, inicia-se a fase de pupa onde ocorre metamorfose completa do inseto. A pupa apresenta motilidade, e como não se alimenta, utiliza as reservas energéticas obtidas enquanto larvas. Nesse estágio, pode-se observar diferenças entre fêmeas e machos, devido tanto ao maior tamanho

corporal da primeira, quanto aos caracteres sexuais. A imago emerge em aproximadamente quarenta e oito horas após o início da fase de pupa, mas a emergência pode ser acelerada ou retardada pela temperatura (alta e baixa, respectivamente). O adulto de ambos os sexos se alimenta de fluidos açucarados de diversas fontes. Contudo, as fêmeas de *Ae. aegypti* são fortemente hematófagas e realizam repasto sanguíneo preferencialmente nos horários diurnos (FORATTINI., 1992; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998).

A espécie apresenta características antropofílicas, tendo a habitação humana como local preferencial para realização de hematofagia, bem como para repousarem e encontrarem criadouros (FORATTINI, 2002). Seus criadouros preferenciais são artefatos produzidos pelo homem, como vasos de planta, caixas d'água e pneus, ou seja, essencialmente locais que possam acumular água limpa e parada (FORATTINI, 2002). Estas características favoreceram a adaptação do mosquito às áreas urbanas e a rápida proliferação da espécie nesses locais (NATAL, 2002; ZARA et al., 2016).

Figura 3 - Estágios de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*.



Fonte: Adaptado de Centers For Disease Control and Prevention-CDC (2009)

Desde o início do século XX o combate intensivo ao mosquito foi iniciado para controlar a Febre Amarela, havendo sucesso na erradicação da espécie entre 1958 e 1973 (FUNASA, 2002; BRAGA & VALLE, 2007). Entretanto, após sua reintrodução em 1976,

o mosquito se dispersou e atualmente, está presente em todos os estados brasileiros em mais de 80% dos municípios do país (CATÃO, 2009; ZARA et al., 2016).

1.6 CONTROLE VETORIAL

O controle populacional de *Ae. aegypti* tem se mostrado como um intenso desafio, sobretudo nos países em desenvolvimento (TAUIL, 2006; ZARA et al., 2016). As medidas de controle aplicadas objetivam eliminar o mosquito em diferentes fases do seu ciclo de vida, utilizando o controle integrado de medidas que pode ser agrupado em controle físico/mecânico, químico e biológico. O controle físico refere-se principalmente a remoção ou eliminação dos diversos tipos de criadouros, impedindo o acesso de fêmeas grávidas a esses locais. O controle químico corresponde a aplicação de inseticidas (larvicidas e adulticidas) de forma pontual durante surtos e epidemias ou de forma preventiva. O controle biológico, por sua vez, emprega o uso de organismos que predem as formas adultas ou imaturas (peixes larvófagos e outros predadores). Todavia a aplicação do controle físico e químico são os mais empregados no Brasil (DONALÍSIO & GLASSER, 2002 INCLUIR O PNCD 2002).

Em 2002, com a criação do Plano Nacional de Controle à Dengue (PNCD), o poder público disponibilizou maiores recursos financeiros para o controle vetorial e descentralizou suas ações para os municípios (BRAGA & VALLE, 2007). Desde então, as estratégias de controle aplicadas no país têm implementação descentralizada, envolvem o poder público e a sociedade e interagem de forma integrada (DONALÍSIO & GLASSER, 2002), sendo reconhecidas como Manejo Integrado do Vetor (MIV).

O PNCD também enfatizou a estratégia que estabelece como meta a redução dos Índices de Infestação Predial (IIP) e de Breteau (IIB) do mosquito para níveis inferiores a 1%, sendo estes índices obtidos através da metodologia LIRAa (Levantamento Rápido de Índice de *Aedes aegypti*) (FUNASA, 2002). Mas manter os índices supracitados abaixo do limiar proposto (<1%) é uma tarefa extremamente difícil e complexa. Houve um aumento de 27,3% no número de municípios participantes do LIRAa em 2016 (88,6 %) quando comparado a 2015 (61.6%). No entanto, dentre os participantes, um total de 28.8% dos municípios se encontrava em estado de alerta (definido pelo índice IIP entre 1 e 3,9) e 8.6% em situação de risco (IIP > 4,0) (S.V.S, 2016). Os resultados do LIRAa em 2017 foram semelhantes ao de 2016, onde 98,4% dos municípios brasileiros realizaram o levantamento, sendo que destes, 26,4% apresentaram estado de alerta (índice de

infestação entre 1% a 3,9%) e 8,4% dos municípios apresentaram risco de epidemia (índice superior à 4%) (M.S.2018)

Mesmo com o repasse adequado de recursos para os programas de controle vetorial executado pelos municípios, por diversas vezes, não foram obtidos os resultados esperados (ZARA et al., 2016). A manutenção dos índices abaixo do limiar proposto é complexa devido a (1) necessidade de uma vigilância entomológica constante, (2) com intensiva mão-de-obra capacitada. Além de que, com a redução da incidência da doença, (3) o apelo político para seu controle diminui e, portanto, (4) os recursos financeiros para tal, são reduzidos (TAUIL, 2006). Ademais é necessário considerar que a pressão antrópica sobre estes vetores é cada vez maior (LEES ET AL., 2015), propiciando a seleção de populações de mosquitos que apresentem resistência aos larvicidas e adulticidas empregados nas principais atividades de controle (DONALÍSIO & GLASSER, 2002; BRAGA & VALLE, 2007; BRAGA et al, 2004; LUNA et al, 2004; TAUIL, 2006; RANSON ET AL., 2010).

As ações preconizadas pelo PNCD não têm sido eficazes na diminuição da infestação por *Ae. aegypti* na maior parte do país, favorecendo o aumento no número de casos das supra referidas arboviroses (M.S. 2016; ZARA et al., 2016). Portanto, diante dos desafios em controlar a população do vetor e da complexa condição em relação às arboviroses, torna-se indispensável aderir a novas estratégias de controle. A incorporação de novas estratégias no manejo integrado, contribuiriam para a sustentabilidade das ações estabelecidas pelas redes de vigilância e facilitariam as adaptações aos drásticos cenários epidêmicos vivenciados no país (ARAÚJO et al.,2015; ZARA et al., 2016).

Nesse contexto, o Brasil tem dado os primeiros passos para agregar novas tecnologias de controle vetorial (ARAÚJO et al., 2015). Como resultado da tríplice epidemia e a declaração de ESPII pela OMS, ocorreu em 2016 a "Reunião Internacional para Implementação de Novas Alternativas para o Controle de *Aedes aegypti* no Brasil", sob a coordenação do PNCD do Ministério da Saúde (VALE, 2016). Nesta reunião, foram avaliadas tecnologias alternativas de controle vetorial, com potencialidade de aplicação no país. Estas metodologias foram distribuídas em três categorias: (a) "Abordagens recomendadas para inclusão imediata no PNCD", (b) "Abordagens para inclusão imediata no PNCD em situações especiais" e (c) "Tecnologias potencialmente promissoras". Nesta última, estão inseridas ferramentas cuja incorporação imediata ao PNCD ainda não é viável, seja devido ao seu custo-benefício incompatível com os recursos públicos atuais, ou pela inviabilidade do escalonamento em curto prazo para aplicação em nível nacional,

ou ainda, por necessitarem de ajustes significativos na operacionalidade do programa. Nesta categoria foram ainda incluídas tecnologias pertencentes ao controle autocida ou genético (VALE, 2016).

1.6.1 **Controle autocida ou genético**

O controle autocida é uma técnica espécie-específica, que não acomete o meio ambiente, e que utiliza a espécie vetora para promover um controle de natalidade sobre sua própria população (KNIPLING, 1959; BENEDICT & ROBINSON, 2003; WILKE et al., 2009). A técnica deve ser associada a outros métodos de controle, atuando como parte de uma abordagem integrada do Manejo Integrado de Pragas e/ou vetores em área ampla (do conceito em inglês, *Area wide- Integrated Pest Manegement* AW-IPM), que reduziria a população de vetores abaixo do limite de transmissão de doenças (LEES et al., 2015).

De forma geral, para aplicação do controle genético, há necessidade de uma criação em massa da espécie-alvo, e a liberação dos machos produzidos na área de interesse. Para a maioria das pragas, apenas machos são liberados[1] e em maior número em relação a população de machos selvagens, para aumentar a probabilidade de cópula desses machos com fêmeas coespecíficas selvagens. Após o cruzamento com o macho, haverá uma indução de esterilidade na fêmea (a depender da tecnologia utilizada), acarretando na inibição de uma prole viável. Assim, conforme ocorram liberações sistemáticas, a população existente na área-alvo será suprimida, podendo em alguns casos, ser eliminada (KNIPLING, 1955; ROBINSON, 2002; WILKE et al. 2009).

1.6.1.1 Sterile Insect Technique – SIT

A primeira estratégia de controle autocida foi desenvolvida na década de 1950, sendo denominada de *Sterile Insect Technique* – SIT (KNIPLING,1955; DICK, 2005), ou Técnica do Inseto Estéril. A SIT foi desenvolvida por Edward F. Knipling com o intuito de controlar populações de pragas na pecuária e agricultura, como *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) (mosca-varejeira) e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (mosca-das-frutas). Desde então, a SIT tem sido utilizada para supressão

[1]Para espécies que não possuem sexagem genética (linhagem GSS -*Genetic Sexing Strain)*, uma baixa porcentagem de fêmeas (<1%) podem ser liberadas, devido à contaminação durante a realização do processo de separação dos sexos.

populacional, contenção ou erradicação de diversas espécies de insetos-pragas em várias partes do mundo com numerosos casos de sucesso (DYCK et al., 2005). NA SIT, os machos produzidos são esterilizados. A indução da esterilidade ocorre através da exposição dos indivíduos à agentes quimioesterilizantes, ou principalmente, à exposição à radiação ionizante (raios gama ou X) (HELINSKI, 2009).

1.6.1.2 Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene- RIDL

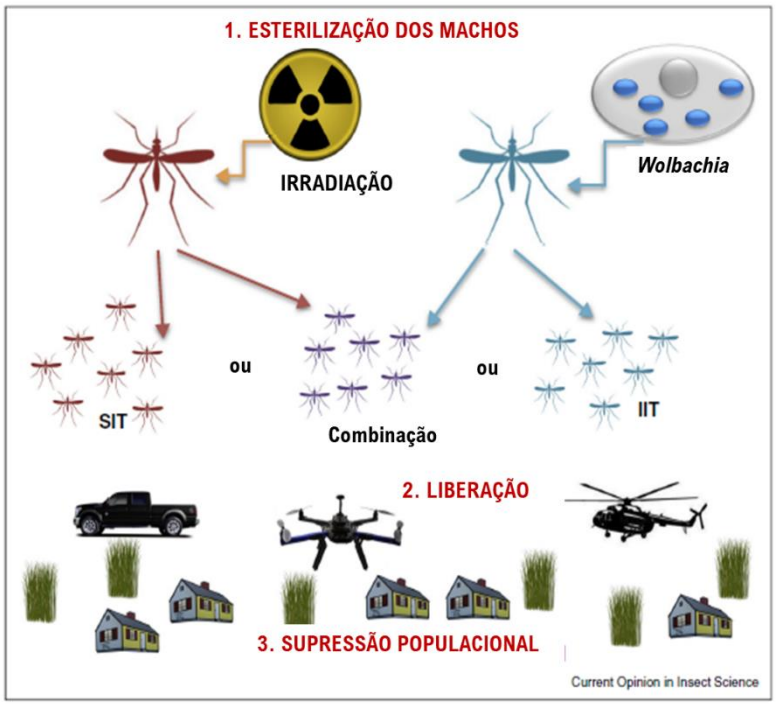
Outras tecnologias baseadas em SIT têm sido desenvolvidas nas últimas décadas, como a tecnologia *Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene*- RIDL, proposta por Thomas et al. (2000). Através da tecnologia RIDL, foi estabelecida a linhagem transgênica de *Ae. aegypti* OX513A (Oxitec ltd., Inglaterra) (PHUC et al., 2007). A OX513A é portadora de um gene letal dominante que acarreta na mortalidade dos indivíduos antes de atingirem a fase adulta. Contudo, o sistema de letalidade é condicional, podendo ser desativado na presença do "antídoto" (antibiótico tetraciclina). Assim, para a criação em massa, o antídoto é adicionado à água de criação larval para a produção de machos transgênicos (CARVALHO et al.,2014). Mas quando os machos são liberados nas áreas-alvo, os mesmos acasalam com fêmeas selvagens e na ausência do antídoto nos criadouros, a prole resultante desse cruzamento não alcança a fase adulta. A linhagem foi estabelecida em 2002 (ALPHEY E ANDREASEN, 2002; ALPHEY, 2002), sendo primeiramente testada em campo nas Ilhas Cayman em 2010 (HARRIS et al., 2012). Entre os anos de 2010 e 2015, foram conduzidos estudos em laboratório e testes pilotos em dois municípios do estado da Bahia, para avaliar a eficiência da aplicação da tecnologia RIDL na supressão populacional do vetor *Ae*. aegypti (CAPURRO et al., 2016; CARVALHO et al., 2015 e GARZIERA et al., 2017). Para tanto, foi instalada a primeira biofábrica de mosquitos do mundo em Juazeiro, Bahia (Organização Social Biofábrica Moscamed Brasil -BMB), sendo produzidos até 1,5 milhões de machos/semana (arquivos, BMB) para execução desses projetos. Uma supressão de cerca de 70 % no número de ovos foi alcançada em ambos pilotos.

1.6.1.3 Incompatible Insect Technique – IIT/SIT

A IIT é uma técnica que pode ser combinada com SIT (IIT/SIT) (ZHANG et al., 2015). A estratégia é baseada na utilização de um endosimbionte naturalmente encontrado

em populações de diversas espécies de artrópodes. A bactéria intracelular obrigatória do gênero *Wolbachia* é o principal simbionte utilizado. A *Wolbachia* é capaz de manipular a reprodução do seu hospedeiro através de um mecanismo conhecido como incompatibilidade citoplasmática (IC). Machos infectados com essa bactéria, quando copulam com fêmeas não infectadas, têm sua prole afetada devido à IC que acontece no momento da fecundação dos embriões (CALVITTI et al., 2015). Estudos em condições de semicampo (gaiolas de contenção) com machos infectados com *Wolbachia* e fêmeas selvagens, demonstram a supressão populacional (ZHANG et al., 2015) ao se utilizar essa técnica. Na China, a associação entre IIT/SIT está sendo utilizada atualmente para espécie *Aedes albopictus*, sendo os resultados preliminares de supressão também positivos (THE GUARDIAN, 2015; ZHANG et al., 2016).

Figura 4 - A técnica do inseto estéril (SIT), a técnica do inseto incompatível (IIT) ou a combinação de ambas.



Técnicas de controle autocida para suprimir populações de mosquitos. Os mosquitos machos estéreis ou infectados com *Wolbachia* são liberados na população-alvo para induzir a esterilidade nas fêmeas selvagens. Fonte: Traduzida de Lees et al., 2015.

1.6.1.4 Considerações sobre a aplicação do controle autocida/genético no controle de mosquitos vetores

Entre as décadas de 60 e 70, acreditou-se no uso da SIT como ferramenta alternativa no controle de mosquitos vetores de doenças (WILKE et al. 2009). A estratégia foi utilizada para múltiplas espécies de culicídeos, entre elas *Culex quiquefasciatus* (CURTIS, et al., 1982), *Anopheles gambiae*, (DAVIDSON, 1970) *Anopheles albimanus* (WEIDHAS, 1974), *Ae. aegypti* (PETERSEN et al., 1977), *Aedes albopictus* (HANSON et al., 1993), dentre muitas outras (BENEDICT & ROBINSON, 2003; DICK 2005). Desde então, liberações de mosquitos com diversos fins relacionados à SIT (supressão populacional; persistência de translocação na população selvagem; competitividade do macho no acasalamento, erradicação, entre outros) foram realizados. Contudo, até o início dos anos 2000, a maioria destas liberações eram realizadas com o objetivo científico de responder a uma pergunta específica, não sendo a supressão populacional o alvo principal ou imediato (BENEDICT & ROBINSON, 2003).

Na década de 70, foi iniciado um grande projeto via SIT para controle de mosquitos vetores via na Índia. Mas devido a um engajamento comunitário malsucedido, os resultados do programa foram desastrosos, acarretando em sua interrupção a partir da intervenção por líderes políticos. As consequências negativas se propagaram para outros locais, acarretando no abandono da técnica para mosquitos em todo o mundo (SEHGAL, 1974; BENEDICT & ROBINSON, 2003; CARVALHO & CAPURRO et al., 2016). Entretanto, várias falhas técnicas também contribuíram para as falhas nos primeiros projetos de controle genético e que, portanto, não devem ser repetidas na aplicação desse tipo de estratégia, dentre elas (BENEDICT & ROBINSON, 2003):

a) produção de machos abaixo da quantidade desejada devido a ineficiência dos métodos eficientes de sexagem ou atrasos na produção;
b) diminuição da aptidão *(fitness)* do macho produzido, uma vez que o processo de produção e principalmente, a irradiação pode causar perda na competitividade por acasalamento em comparação aos machos selvagens e diminuir a longevidade (ALPHEY, 2002; WILKE et al., 2009);

Após anos de abandono (desde a década de 80) dos estudos referentes ao controle autocida para mosquitos, as crescentes epidemias, dispersão de arbovírus e disponibilidade de ferramentas biotecnológicas para esterilizar/transformar os mosquitos, reavivaram o interesse pela técnica nos últimos anos (LEES et al., 2015). Logo, o controle

autocida de mosquitos tem ganhado força e vem sendo avaliado em testes piloto ao redor do mundo para avaliar sua eficiência. Pode-se citar como exemplo as pesquisas realizadas com a tecnologia RIDL no Brasil e Panamá (CARVALHO et al., 2015 e GARZIERA et al., 2017; GORMAN e tal., 2015), com IIT/SIT na China (ZHIONG XI, informação verbal[1]) e com SIT na Itália e Sudão (BELLINI et al. 2013; AGEEP et al, 2015). Ainda para esta última, a Indonésia (SASMITA et al., informação verbal[2]) e também a FIOCRUZ-Pernambuco deram início à projetos em pequena escala, utilizando tal técnica para o controle de *Ae. aegypti*. A colonização, criação em massa, manipulação, esterilização, imobilização por resfriamento/hipóxia, transporte e liberação de machos são elementos fundamentais de uma estratégia SIT (PAGABELEGUEM et al., 2015; CULBERT et al., 2017) e consequentemente, muitas destas etapas são comuns às tecnologias RIDL e IIT/SIT. Contudo, a execução com qualidade de cada uma dessas etapas está diretamente relacionada com a sobrevivência e qualidade do macho produzido (PAGABELEGUEM et al., 2015; CULBERT et al., 2017).

De acordo com ZAVALA-LÓPEZ & ENKERLIN (2017)**,** um programa operacional de SIT, por exemplo, pode ser dividido em duas áreas principais:

a) Produção em grande escala e esterilização através de irradiação
b) Processos pós-produção que abrangem diversas etapas: acondicionamento, nocaute/transporte, manipulação, emergência, alimentação, acondicionamento e liberação dos insetos.

Produção de insetos competitivos está diretamente ligada à eficiência da técnica (BENEDICT et al., 2009), uma vez que qualquer falha neste processo poderá desencadear problemas e resultados insatisfatórios em todas as etapas subsequentes. Tal questão poderia também ser extrapolada para técnicas relacionadas (RIDL e IIT/SIT), uma vez que a estrutura operacional seria semelhante. Além disso, durante a competição pela cópula com fêmeas selvagens entre "machos produzidos" e machos coespecíficos selvagens, os "machos produzidos" devem ser igualmente competitivos. Assim, são necessárias metodologias de criação que levem à produção de "insetos de alta qualidade", visando um nível de desempenho idêntico ao do mosquito selvagem (BENEDICT et al., 2009).

[2] Informação fornecida por Dr. Hadian Iman Sasmita no "1st RCM on Mosquito Handling, Transport, Release and Male Trapping Methods, Viena, Áustria, 2015.

1.6.1.5 Criação em massa

A criação de um inseto em quantidade suficientemente grande e de qualidade adequada, é um requisito essencial para o sucesso da SIT e tecnologias relacionadas (BENEDICT et al., 2009), e depende da disponibilidade de métodos eficientes de colonização e produção que devem ser desenvolvidos ou aprimorados, deixando uma escala laboratorial para produção de milhares de insetos semanalmente (BENEDICT & ROBINSON, 2003). As tecnologias utilizadas para criar, esterilizar e liberar os machos devem ser de altíssima qualidade, caso contrário, acarretarão em um impacto negativo nas liberações em campo, tornando necessária uma compensação, ou seja, liberando um número muito maior de insetos durante o período de liberação do que o previsto (BENEDICT & ROBINSON, 2003).

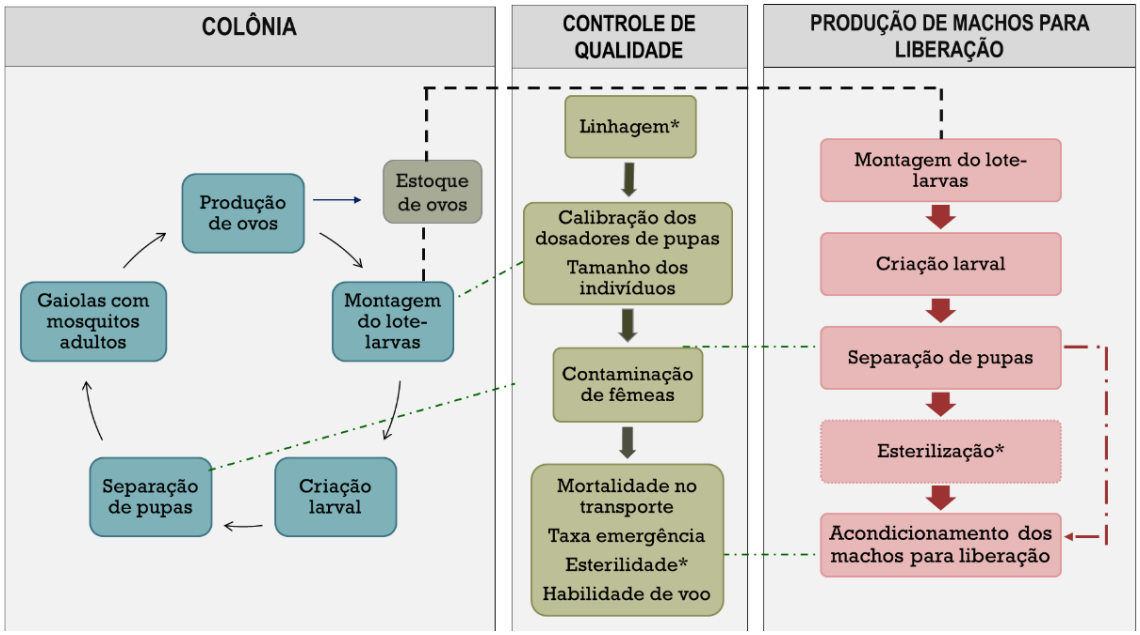
As experiências anteriores de criação em massa são frutos da expansão de processos e métodos laboratoriais. Portanto, é esperado que com o aumento da demanda pela SIT, a utilização desses métodos se torne inviável diante do custo de produção e manutenção da criação. Consequentemente, há uma necessidade de aperfeiçoamento desses métodos, no intuito de reduzir os custos do processo de criação em massa, (BENEDICT et al., 2009).

Nessa perspectiva, recentemente têm-se estimulado o desenvolvimento de equipamentos e a validação contínua de dietas e protocolos para criação em massa de diferentes espécies de culicídeos (LESS et al., 2015). Como principais avanços obtidos para diferentes espécies de mosquitos, pode-se citar a avaliação e/ou desenvolvimento de dietas para larvas de *Ae. aegypti, Ae. albopictus e Anopheles sp* (Damiens et al., 2012; KHAN et al 2013; PUGGLIOLI et al. 2013; YAHOUEDO et al., 2014; PUGGLIOLI et al., 2016; BOND et al., 2017), gaiolas de criação em massa (BALESTRINO et al, 2014a, ZHANG et al., 2018), métodos de contabilização de ovos (ZHENG et al., 2015), unidades de criação larval (BALESTRINO et al, 2014b), separadores de larva/pupa (BALESTRINO et al., 2011) e dispositivos para realização do controle de qualidade dos insetos produzidos (BALESTRINO et al., 2017). Com relação à *Ae. aegypti*, o Brasil foi pioneiro ao desenvolver e disponibilizar um protocolo de criação em massa para uma linhagem transgênica OX513A (CARVALHO et al. 2014).

No sistema de criação em massa de *Ae. aegypti* descrito por Carvalho et al. (2014), a produção inicia-se pela previsão de demanda de machos para liberação. A demanda de mosquitos machos determinará o tamanho necessário da matriz (colônia). Desta maneira,

a criação em massa é realizada através da produção de lotes para a manutenção da colônia matriz e de lotes para a produção de machos para liberação (Figura 5). A colônia matriz gera ovos tanto para a sua própria manutenção, quanto para prover a produção de machos para liberação. O protocolo de criação é diferenciado em alguns parâmetros, de acordo com a finalidade do processo (produção de ovos ou de machos).

Figura 5 - Fluxograma do sistema de produção em massa de *Ae. aegypti*.



*Depende da linhagem a ser utilizada.
Fonte: Baseado em Carvalho et al. (2014).

Apesar do atual protocolo de criação ser viável, haja visto os resultados positivos obtidos em testes pilotos em que ele foi utilizado (CARVALHO et al., 2015 e GARZIERA et al., 2017), antes que programas em grande escala sejam viáveis, métodos eficientes e menos trabalhosos são necessários (LEES Et al.,2015), incluindo para a criação em massa.

Nesse contexto, ao se considerar: a) a demanda crescente por estratégias alternativas de controle que sejam também mais eficazes, sustentáveis e ambientalmente amigáveis (LEES et al., 2015); b) a perspectiva de incorporação do controle autocida no manejo integrado do vetor; c) a projeção de projetos pilotos utilizando o controle genético em diversos países (BELLINI et al. 2013, AGEEP et al, 2015; GORMAN et al, 2015), denota-se a necessidade de padronização e aperfeiçoamento do sistema de criação em massa de *Ae. aegypti*. Tais avanços são necessários para contribuir com a viabilidade

econômica e produtiva desta metodologia de controle, e consequentemente, para que sua inserção no manejo integrado do vetor seja factível.

2 OBJETIVOS

Desenvolver o protocolo de criação em massa e transporte de adultos de *Aedes aegypti* e aprimorar o sistema produtivo para aplicação em biofábricas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

META I– PLANO DE APLICAÇÃO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA LINHAGEM MBR-001

- Avaliar parâmetros produtivos e de qualidade da linhagem de *Ae. aegypti* (MBR-001) sob condições de criação em larga escala;
- Elaborar subsídios que contribuam para o planejamento do sistema produtivo dessa linhagem.

META II – PADRONIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO EM MASSA

- Desenvolver e avaliar um protótipo de gaiola de adultos para a criação em massa;
- Avaliar o efeito da densidade de adultos em gaiolas de criação na produção de ovos, fecundidade e fertilidade de fêmeas sob condições de produção em massa.
- Avaliar o padrão de eclosão de larvas de *Ae. aegypti* com relação ao tempo sob condições de criação em massa;
- Desenvolver e avaliar, em escala laboratorial, dietas artificiais alternativas com relação custo-benefício favorável para a criação de larvas;
- Avaliar em escala laboratorial, o efeito da densidade larval para produção em massa, determinando a densidade ótima de criação.

META III - PROCESSOS PÓS-PRODUÇÃO: CONDIÇÕES PARA O TRANSPORTE DE ADULTOS

- Determinar a temperatura e tempo ideal para o transporte (*knockdown*) de machos estéreis de *Ae. aegypti*;
- Avaliar os efeitos do transporte a frio de machos estéreis de *Ae. aegypti* durante diferentes períodos, na sobrevivência e habilidade de voo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estabelecimento das colônias matrizes de *Ae. aegypti* e os experimentos foram realizados no biotério de artrópodes (Nível 2 de Biossegurança: NB-2) e na Unidade de Produção de *Aedes* (NB-2), ambos localizados na Biofábrica Moscamed Brasil (BMB), Juazeiro, Bahia.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os mosquitos *Ae.aegypti* (linhagens MBR-001 e Rockefeller) foram mantidos sob condições controladas de Temperatura (T) 27±1ºC, umidade relativa (UR)= 70±10% e fotoperíodo 11 h claro: 13 h escuro. A linhagem MBR-001 foi estabelecida a partir de ovos coletados no distrito de Carnaíba do Sertão, Juazeiro, BA, em 2013. A linhagem Rockefeller é de origem caribenha, sendo mantida em condições de laboratório desde a década de 1930 (KUNO, 2010).

3.2. META I: PLANO DE APLICAÇÃO PARA EM MASSA DA LINHAGEM MBR-001

3.2.1 Estabelecimento da colônia da linhagem MBR-001 de *Ae. aegypti* em condições de criação em massa

A multiplicação em grande escala foi realizada como descrito a seguir, baseada no protocolo de Carvalho et al. (2014).

3.2.1.1 Manutenção da Colônia Matriz

Pupas fêmeas (N=1500) e machos (N=500) na proporção de 3:1, foram alocadas separadamente em recipientes plásticos de 90 mL e inseridas em gaiolas cilíndricas de PVC (30 cm de altura x 30 cm de diâmetro) (modelo Moscamed Brasil (Figura 6 A). Após a emergência dos adultos, os insetos foram alimentados com solução de sacarose a 10% p/v (*ad libitum*) através de chumaços de algodão. Depois da maturação sexual do macho (24 horas), um período mínimo de 48 horas para realização da cópula foi aguardado e em seguida, foi oferecida alimentação sanguínea às fêmeas. O sangue proveniente de ovinos

e/ou caprinos foi previamente coletado em abatedouro registrado. Para estimular um maior número de fêmeas a realizarem o repasto sanguíneo, a alimentação com sacarose foi suspensa nas 24 horas anteriores. O sistema de repasto sanguíneo artificial foi utilizado como descrito por Carvalho et al. (2014) (Figura 6 B-C).

Três dias após a alimentação sanguínea, ofereceu-se um pote plástico (8 cm de altura x 9,5 cm de diâmetro) para oviposição dentro da gaiola de criação. Para tanto, o interior foi revestido por uma tira de papel de filtro (41 cm de altura x 8 cm de largura) e o mesmo foi preenchido com aproximadamente 200 mL de água da criação larval (reaproveitamento de água das bandejas)[3]. Após 72 horas, retirou-se os recipientes (Figura 6 D) de postura e as tiras de papel com ovos foram estendidas sobre uma bandeja coberta com papel absorvente (Figura 6 E). Foram aguardados três dias para o desenvolvimento embrionário e então, os ovos foram removidos do papel com utilização de pincel tipo trincha (Figura 6 F). Por fim, estes foram peneirados (para remover resquícios de adultos mortos), pesados em balança semianalítica de precisão (Toledo Ohaus, precisão de 0,001 grama) em alíquotas de um ou meio grama e estocados em copos plásticos descartáveis (50 ml) (Figura 6 G). Os ovos foram mantidos em sala sob condições controladas (Temperatura (T) 27±1ºC, Umidade Relativa (UR)= 70±10% e fotoperíodo 11 h claro: 13 h escuro).

3.2.1.2 Criação larval

A criação larval iniciou-se com o processo de eclosão (Figura 6 H), em que ovos de *Ae. Aegypti* foram imersos em recipientes de vidro, contendo água autoclavada (baixo teor de oxigênio dissolvido), a fim de sincronizar o processo de eclosão das larvas. Em seguida, as larvas de primeiro estádio foram transferidas com auxílio de peneira (0,075 mm de abertura) para um béquer contendo quantidade fixa de água. O conteúdo do béquer foi homogeneizado em um agitador magnético (velocidade média) e com auxílio de pipeta graduada, foram retiradas três alíquotas de 1 mL cada, para contabilização e determinação do número de larvas por mL. A partir da quantidade de larvas contabilizadas, foi definido o volume das alíquotas contendo 3.000 larvas (densidade 1 larva/mL) para lotes de colônia matriz e 6.750 (densidade 2,25 larvas/mL) para lotes de machos para liberação.

[3]Alteração do protocolo de Carvalho et al. (2014) definida após a realização de testes pela BMB.

Cada alíquota foi retirada seguindo o mesmo método supracitado (Figura 6 I) e em seguida, foram transferidas para uma bandeja plástica (9,7 cm de altura x 30,3 cm de largura x 51,0 cm de comprimento) juntamente, com três litros de água filtrada. Todas as bandejas foram alocadas em carrinhos de criação (Figura 6 J).

Ao longo do processo de criação larval, os lotes foram mantidos em ambiente com temperatura 28 ± 1 °C durante sete a 10 dias, sendo alimentados com ração para peixe triturada Sera Vipan Premium® (SeraGmbH, Heinsberg, Alemanha) de acordo com o regime de alimentação pré-definido (Tabela 1).

Tabela 1 – Regime de alimentação larval utilizado na criação em massa de *Ae. aegypti*

Dia de criação larval	**Quantidade de dieta por larva (mg)**		
	Colônia*	**Produção de machos ***	**Produção de machos **[4]**
1	0,04	0,06	0,06
2	0,11	0,08	0,08
3	0,11	0,16	0,16
4	0,27	0,31	0,31
5	1,00	0,64	0,64
6	0,29	0,32	0,2
7	0,29	0,32	0,11
8	0,29	0,32	0,07
9	0,29	0,16	0,03
10	0,11	0,08	0,02
Total	2,8	2,45	1,68

*Regime de alimentação larval descrito por Carvalho et al. (2014).
** Regime de alimentação BMB

3.2.1.3 Separação e coleta de pupas

Após a formação das pupas, a separação por sexo ocorreu com o auxílio de um separador de placas de vidro (FAY & MORLAN 1959; FAY et al. 1963; FOCKS 1980-modelo Moscamed Brasil), a partir do dimorfismo sexual (pupa fêmea > macho > larvas) (Figura 6 K-L). Durante todo o processo, houve troca de bandejas para coleta de cada forma de vida (pupa macho, pupa fêmea e larva). As larvas foram devolvidas para

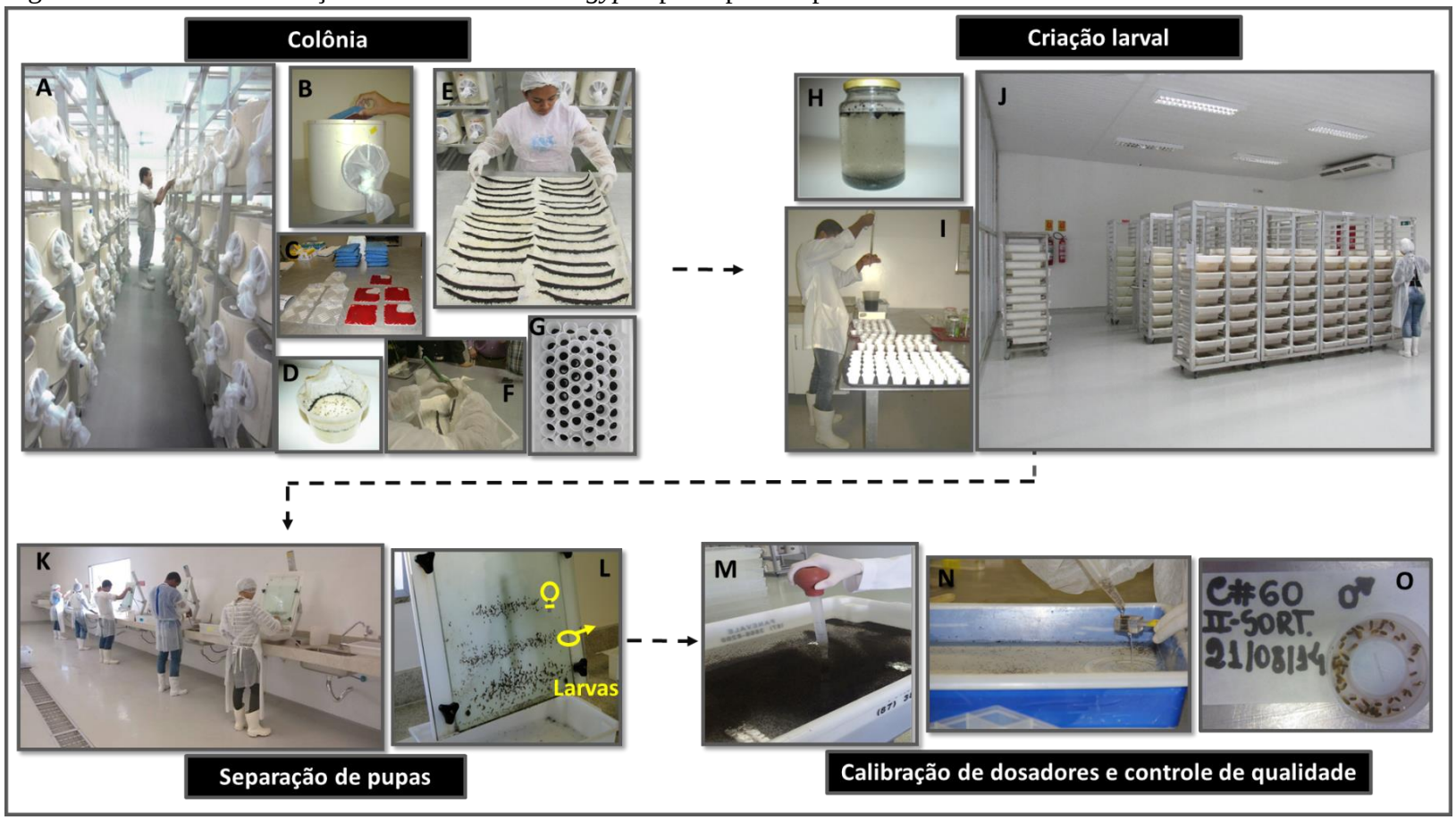
[4] Alteração do protocolo de Carvalho et al. (2014) definida após a realização de testes pela BMB.

bandejas de criação contendo água e ração para que completassem sua metamorfose até pupa. No dia seguinte, todo o processo foi realizado novamente para coleta de pupas (segunda coleta).

Para lotes para produção de machos para a liberação, foram realizadas duas coletas durante dois dias consecutivos (coletas de 24 e 48 horas após início da formação de pupas). Enquanto para lotes de colônia foram realizadas até quatro dias seguidos, uma vez que pretendeu-se recuperar pupas machos e fêmeas.

Ao longo da separação, foram utilizados dosadores de pupas machos e de pupas fêmeas. Os dosadores foram calibrados para acondicionar 500 pupas cada. Com o dosador, foi contabilizada a quantidade de pupas produzidas a cada dia de coleta (Figura 6 M-N). Além disso, foi mensurada a largura do cefalotórax de pupas machos e fêmeas para os lotes da colônia matriz. Para tanto, uma amostra (N=30) de pupas de cada sexo foi retirada a cada dia de coleta. As pupas foram fotografadas em alta resolução, dentro de um recipiente (50 mL) contendo aproximadamente 1,5 mL de água, com escala milimétrica posicionada na parte central. Posteriormente, o cefalotórax de 15 dessas pupas foi mensurado a partir da análise da imagem no software Image J.

Figura 6 – Processo de criação em massa de *Ae. aegypti*: principais etapas.



Colônia: A: criação de adultos em gaiolas; B-C: alimentação sanguínea com método de placas; D: coleta e E-G: processamento dos ovos. **Criação larval:** H: eclosão das larvas; I: preparo dos lotes e J: criação larval em bandejas. **Separação de pupas:** **K**: separação de pupas em andamento e L: separador de pupas e gradiente trifásico de pupas formado durante o processo (a partir das diferenças no tamanho corporal entre machos, fêmeas e larvas. **Calibração dos dosadores e controle de qualidade:** M: Retirada de amostras dos machos recuperados; N: calibração do dosador de pupas; O: amostragem para mensuração do cefalotórax. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.2 Avaliação dos parâmetros de produção e qualidade da linhagem MBR-001

Os seguintes parâmetros dos lotes de colônia da MBR-001 foram avaliados rotineiramente:

- $Taxa\ de\ eclosão = \frac{N°delarvaseclodidas}{N°totaldeovosutilizados}$

- *Largura do cefalotórax de pupas machos e fêmeas (item 3.2.1.3)*

- $Rendimento\ de\ machos\ e/ou\ fêmeas\ (diário) = \frac{N°\ de\ pupas\ machos/fêmeas\ recuperadas}{N°\ inicial\ de\ larvas\ na\ bandeja}$

- $Razão\ sexual(diária) = \frac{N°depupasfêmeas}{N°total\ de\ pupas\ (machos+fêmeas)}$

- $Produção\ de\ ovos/gaiola\ por\ ciclo\ gonotrófico\ ou\ total\ (1+2+3°ciclos)$

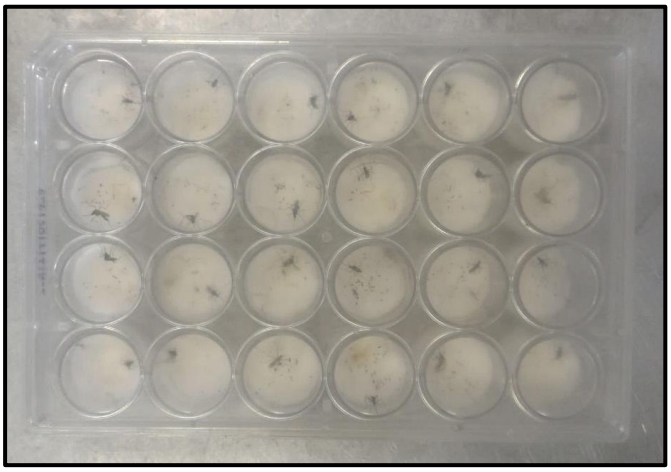
3.2.3 Determinação de parâmetros para criação em massa

3.2.3.1 Proporção fêmea: macho para produção de ovos nas gaiolas de criação em massa

Foram avaliadas diferentes proporções fêmeas:macho (♀:♂) para criação de adultos em gaiolas. Para tanto, foram utilizadas pupas criadas de acordo com o protocolo de colônia descrito no item 3.2.1.2. Os procedimentos após emergência do adulto e o repasto sanguíneo, foram realizados seguindo o item 3.2.1.1.

Os ovos depositados por cada fêmea foram contabilizados para determinação da fecundidade (número de ovos/fêmea). Por fim, os ovos foram submetidos ao processo de eclosão (item 3.2.1.2) e duas horas após, determinou-se com auxílio de um microscópio estereoscópio Leica®, a taxa de eclosão (n° de ovos abertos/ total de ovos amostra).

Figura 7 – Oviposição individual de fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.



A: Fêmeas confinadas na placa de oviposição "oviplate". B: Posturas individuais de fêmeas de *Ae. aegypti.*

3.2.3.2 Quantificação do número de ovos por grama

Os ovos foram produzidos em grande escala de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1.1. Os ovos foram pesados com a mesma idade (três dias após remoção da postura da gaiola) em balança semianalítica de precisão em alíquotas de 0,5 grama e estocados para posterior quantificação.

3.2.3.3 Rendimento L1-pupa macho

Foram montadas três bandejas para produção de machos para liberação (item 3.2.1.2) em 2016 e cinco bandejas em 2018. As bandejas foram alocadas em carrinhos de criação durante todo o experimento (Figura 8 A). A cada separação de pupas, a quantidade de machos e fêmeas foi contabilizada com auxílio de dosadores de pupas item 3.2.1.3 (Figura 8 B-C), sendo determinados diariamente os parâmetros descritos abaixo:

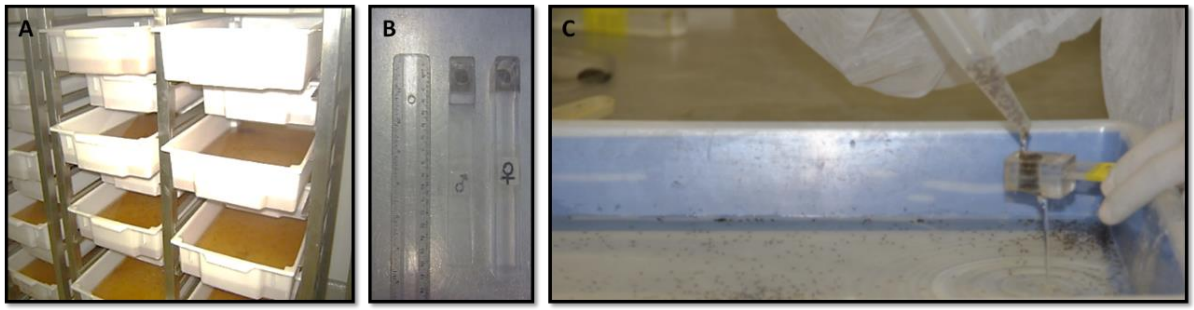
- Rendimento diário de machos (item 3.3.2)

- Razão sexual (diária) $= \frac{\text{N° de pupas machos}}{\text{N° total de pupas (machos+fêmeas)}}$

- Rendimento de machos(acumulado) $= \frac{\text{N° de pupas machos recuperadas(1°+2°coleta)}}{\text{N° inicial de larvas na bandeja}}$

- Taxa de produção demachos(24h) $= \frac{\text{N° de pupas machos recuperadas na 1° coleta}}{\text{N° total de pupas machos (1°+2°+3°coleta)}}$

Figura 8 - Etapas para avaliação do rendimento de pupas machos da linhagem de *Ae. aegypti*, MBR-001



A: Bandejas de criação contendo larvas de *Ae. aegypti*, acondicionadas em carrinho de criação. B. Dosadores utilizados para avaliação do número de machos e fêmeas, C. Pupas de *Ae. aegypti* sendo acondicionadas em dosador para determinação do rendimento.

3.3.3 Planejamento da produção em massa da linhagem MBR-001

Os dados da produção em massa das linhagens MBR-001 e OX513A (obtidos em CARVALHO et al., 2014) foram utilizados para desenvolver uma planilha básica para o planejamento do sistema produtivo (PSP). Para isso, os parâmetros: produção média de ovos/gaiola, número de ovos por grama, taxa média de eclosão, densidade larval (lotes de colônia e lotes de machos para liberação) e rendimento L_1-pupa, foram utilizados.

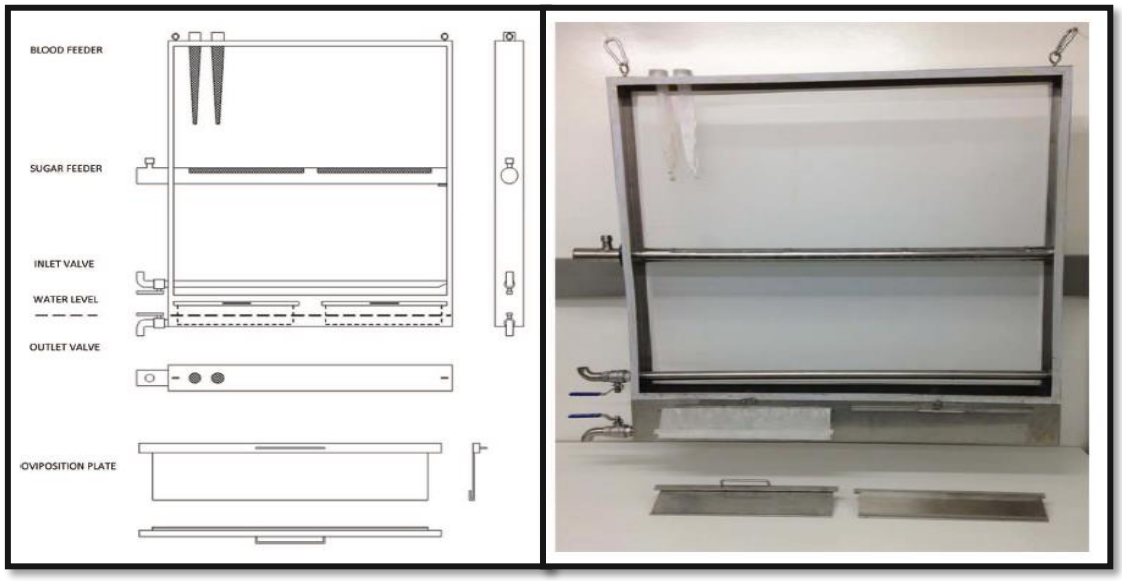
3.4 META II – PADRONIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO EM MASSA

3.4.1 Aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de *Ae. aegypti* e efeito da densidade de insetos na produção de ovos

3.4.1.1 Desenvolvimento de protótipo de gaiolas de adultos para a produção em massa de Ae. aegypti

A partir da gaiola "*Aedes* MPC" (Figura 9) (*Mass Production Cage*) desenvolvida por Balestrino et al. (2014), foi desenvolvido um protótipo de gaiola de criação em massa para *Ae. aegypti*, denominado GCM-II (Gaiola de Criação em Massa-protótipo II) A GCM-II (98 x 70 x 24 cm). O protótipo foi construído em alumínio, tubo de PVC e malha fina (30 furos/mm^2).

Figura 9 - *Aedes Mass Production Cage*- MPC.



Fonte: Balestrino et al 2014.

3.4.1.2 Efeito da densidade de adultos e do tipo de gaiola de adultos para a produção em massa de ovos

Os testes foram conduzidos com pupas e adultos provenientes da colônia da linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti.* Pupas machos e fêmeas criadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1.2 (densidade de colônia: 1 larva/cm^2) foram acondicionadas em gaiolas de PVC e nas GCM-II (item 3.4.12). Foram utilizadas pupas machos de primeira e segunda coleta, e pupas fêmeas recuperadas entre a primeira e quarta coletas.

A inoculação diária de pupas foi proporcional entre as gaiolas. Na GCM-II, as pupas foram introduzidas em canaletas contendo um litro de água filtrada e nas gaiolas de PVC, em recipientes (90 mL) como descrito no item 3.2.1.1. Durante toda a realização do experimento, foi oferecida solução de sacarose 10% *ad libitum* na gaiola

PVC (3.2.1.1). Na GCM-II, a solução foi ofertada no tubo de alimentação (290 mL). O tubo foi removido, higienizado e a solução substituída a cada três dias.

No quinto dia após a emergência dos adultos, a alimentação sanguínea foi oferecida para fêmeas mantidas em ambos tipos de gaiola durante três horas, como descrito no item 3.2.1.1. Contudo, o volume de sangue oferecido foi proporcional à quantidade de fêmeas da gaiola (6 µL por fêmea). Para a GCM-II, o sistema de placas para alimentação sanguínea foi oferecido na parte superior da gaiola (Figura 10 A-C).

Dois dias após o repasto sanguíneo (dia anterior ao início da oviposição), a mortalidade foi avaliada no intuito de estimar o número de fêmeas que ovipositaram a cada ciclo gonotrófico. Nas gaiolas PVC os indivíduos mortos foram removidos da gaiola, separados por sexo e contabilizados. Na GCM-II, não foi possível a remoção dos cadáveres de insetos, portanto, foi realizada uma avaliação da densidade média de adultos por área (cm^2). Para tanto, foram desenhados três quadrantes (10 cm x 10 cm) em cada lado da gaiola, em três alturas diferentes (superior, central e inferior), seguindo uma direção diagonal. Em seguida, foi quantificado o número de adultos machos e fêmeas pousados em cada quadrante, com auxílio de contador manual. Durante a avaliação de cada quadrante, a respiração do avaliador foi pausada para evitar a atração das fêmeas para o local, devido a liberação de gás carbônico.

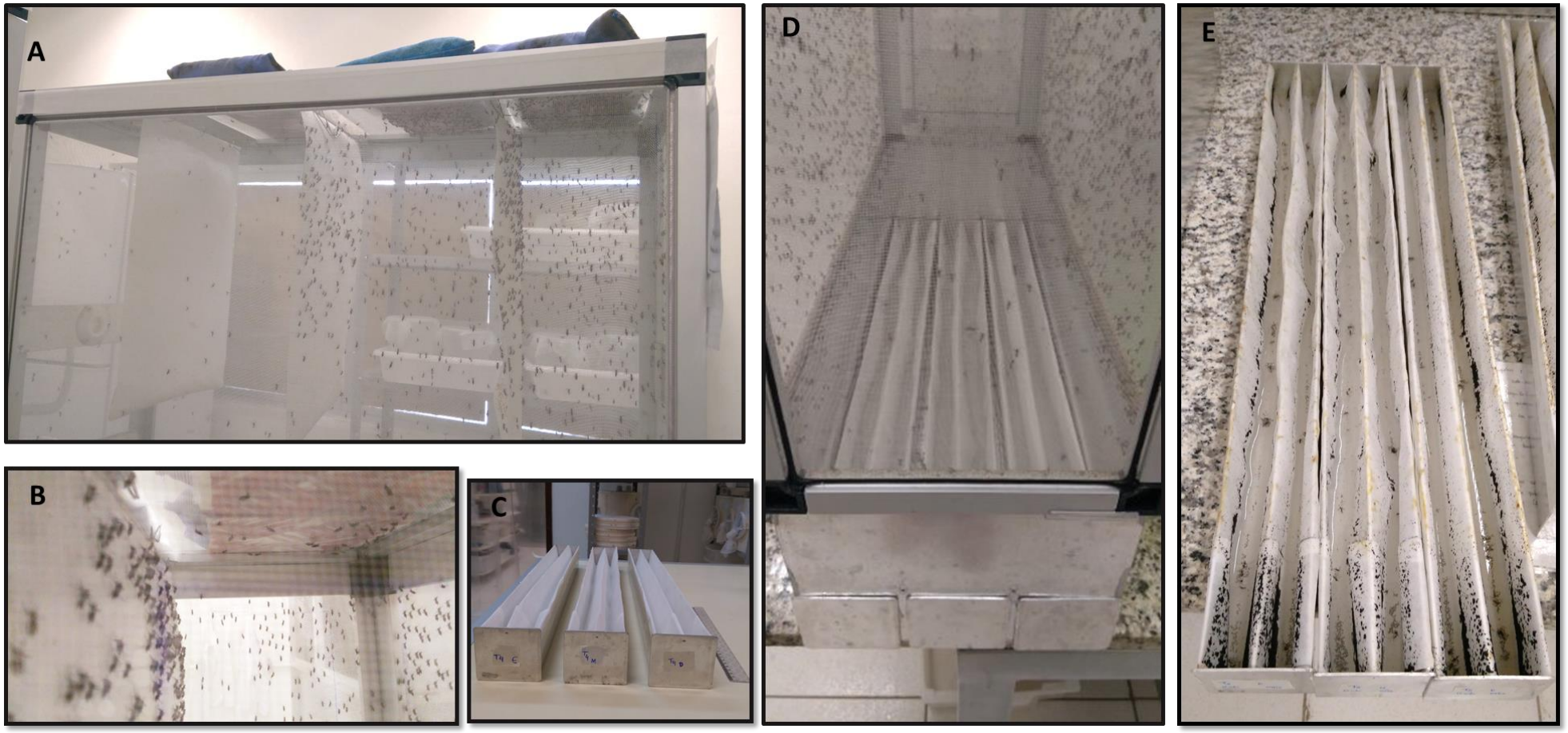
Após 72 h do repasto sanguíneo, foi ofertado o substrato de oviposição para as gaiolas PVC, de acordo com o item 3.2.1.1 para as gaiolas PVC. Para a GCM-II, foram oferecidas as canaletas com os substratos de oviposição de papel filtro (25 cm largura x 68 cm comprimento). Para tanto, os papéis foram dobrados em formato sanfonado e suas laterais externas foram fixadas com fita adesiva na canaleta (Figura 10 D-F). O centro do papel sanfonado foi sustentado por um bastonete de alumínio (25 cm de comprimento 0.32 cm de diâmetro), instalado na parte central da canaleta. Para cada gaiola, foram oferecidas três canaletas como substrato de oviposição, contendo um litro de água cada.

Após 72 h do repasto sanguíneo, foi ofertado o substrato de oviposição para as gaiolas PVC, de acordo com o item 3.2.1.1 para as gaiolas PVC. Para a GCM-II, foram oferecidas as canaletas com os substratos de oviposição de papel filtro (25 cm largura x 68 cm comprimento). Para ambos modelos de gaiolas, foram aguardadas 72 horas como período para a oviposição das fêmeas. Em seguida, as posturas foram retiradas, a água

dos recipientes foi drenada e os ovos nela depositados foram descartados, sendo desconsiderados das análises. O processamento dos ovos ocorreu como descrito no item 3.2.1.1. O segundo repasto sanguíneo foi realizado um dia após a retirada das posturas do primeiro ciclo gonotrófico, o que correspondeu ao início do segundo ciclo gonotrófico. Todos os procedimentos para coleta e manipulação dos ovos do segundo ciclo foram realizados como descrito anteriormente.

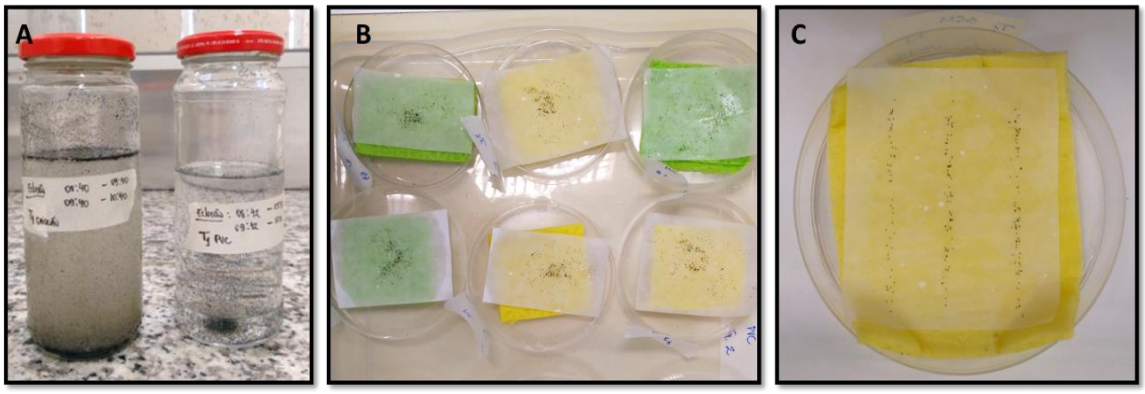
Para avaliar a taxa de eclosão, os ovos foram submetidos ao processo de eclosão (Figura 11 A), sendo retiradas quinze amostras (1 mL cada) de cada tratamento (item 3.2.1.2). As amostras foram transferidas para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo esponja vegetal e tira de papel filtro sobreposto (Figura 11 B). Em seguida, os ovos foram distribuídos em fileiras com auxílio de pincel macio (modelo condor 0.002) (Figura 11 C) e o número de ovos abertos e fechados foi contabilizado sob microscópio estereoscópio Leica® (aumento de 40x), a fim de determinar a taxa de eclosão de larvas mediante a fórmula: n° de ovos eclodidos amostra/ total de ovos amostra.

Figura 10 – Procedimentos uti lizados para alimentação sanguínea e oferta dos substratos para oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti* na GCM-II.



Manipulação e funcionamento da GCM-II-II durante o repasto sanguíneo e oviposição. A: Alimentação sanguínea sendo ofertada em placas. B: Fêmeas confinadas na gaiola, se alimentando ou já ingurgitadas. C: Recipientes (canaletas) de oviposição montados. D: Substratos de oviposição inseridos na gaiola. E: Posturas logo após a retirada da GCM-II. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Procedimentos utilizados para avaliação da taxa de eclosão de larvas de *Ae. aegypti.*

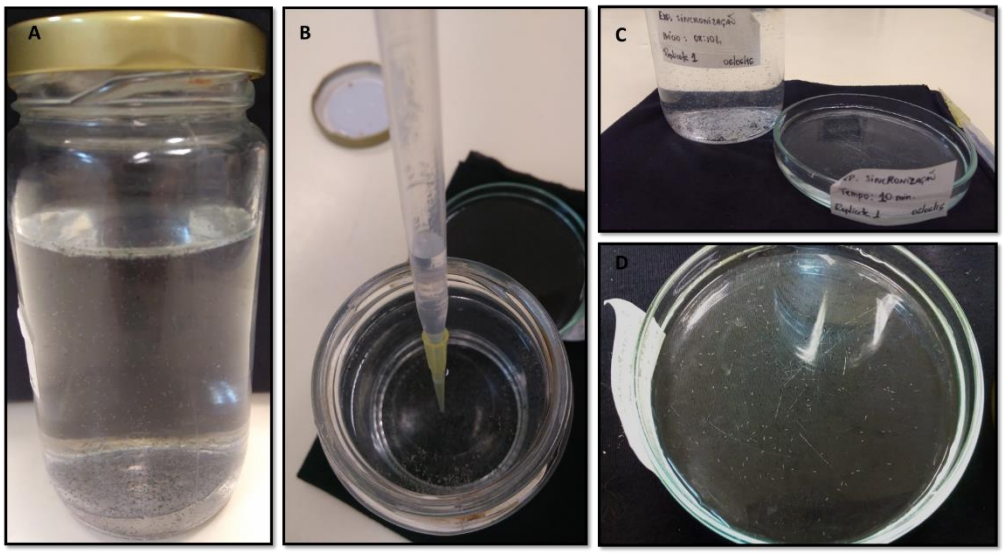


Eclosão de larvas provenientes de ovos produzidos nas gaiolas GCM-II e PVC. A: Processo de eclosão. B: Alíquotas de 1 mL despejadas em placas de Petri (com esponja vegetal e papel filtro) logo após o processo de eclosão. C: Alíquota distribuída em fileiras para facilitar o processo de contabilização de ovos abertos e fechados. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.2 Avaliação do padrão de eclosão de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001

Ovos de *Ae. aegypti* do mesmo lote de produção foram subdivididos em alíquotas de 0,1g. Cada alíquota foi colocada em potes (300ml) contendo água com baixo teor de oxigênio dissolvido (Figura 12 A). A cada intervalo de tempo preestabelecido (10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos), as larvas foram retiradas com auxílio de pipeta de Pasteur e transferidas para placas de Petri (Figura 12 B-D). Em seguida, larvas de cada tratamento (intervalo de eclosão) foram transferidas para recipientes plásticos de criação (500 mL) e criadas sob condições controladas (T:28 ±1 °C, UR: 80 ±5%, fotoperíodo de 13:11 h) com ração Sera Vipan® (item 3.2.1.2). Ao atingirem a fase de pupa, as pupas provenientes de cada tratamento foram coletadas, separadas por sexo, contabilizadas e acondicionadas em potes plásticos (1,8 L). Após a emergência do adulto (48 hs) o sexo foi confirmado. As coletas de pupas foram realizadas até que todas as pupas fossem formadas, não restando larvas nos recipientes de criação.

Figura 12 – Etapas do processo de eclosão e coleta de larvas a cada intervalo**.**



A: Processo de eclosão com água com baixo teor de oxigênio dissolvido. B: Larvas sendo coletadas. C-D: Larvas coletadas a cada tempo. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.3 Desenvolvimento de dietas alternativas para a criação larval

Ovos de *Ae. aegypti* com a mesma idade biológica (coletados na mesma data) foram submetidos ao processo de eclosão como descrito no item 3.2.1.2 durante duas horas. Uma hora após o fim do processo, as larvas de primeiro estádio (L_1) foram contabilizadas e transferidas para bandejas de plástico transparente (14 x 9 x 5 cm), contento 225 mL de água filtrada (2,0 cm de profundidade). A densidade de larvas por volume utilizada neste experimento foi de 2,25 larvas por mL, equivalente a 506 larvas/bandeja. O bioensaio foi conduzido no biotério de artrópodes da BMB sob as seguintes condições: T:29 ±1 °C, UR: 80 ±5% e fotoperíodo 12h claro:12h escuro. As larvas receberam diariamente e no mesmo horário, as dietas desenvolvidas nas quantidades pré-estabelecidas pelo regime de alimentação definido no protocolo da BMB (item 3.2.1.2). Para tanto, a quantidade diária de cada dieta foi pesada em microtubos.

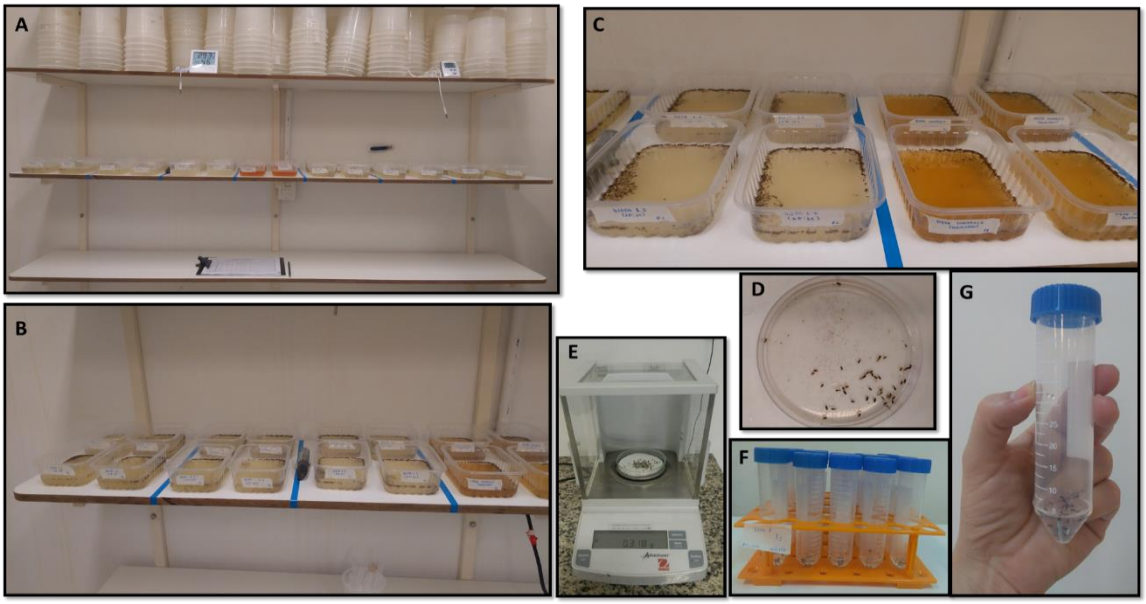
Todos os recipientes foram verificados diariamente para avaliação da estabilidade da temperatura, e nível da água na bandeja e mortalidade larval e o estádio de desenvolvimento larval. Houve reposição de água, caso estivesse abaixo do nível padronizado (marcado em cada bandeja). A partir do 5° dia de criação, as bandejas foram examinadas nos períodos matutino e vespertino para verificação do início da formação dos pupários. A primeira coleta de pupas realizou-se 24 h após o registro da formação das primeiras pupas (Figura A-C). As pupas foram coletadas diariamente durante três dias

consecutivos (72 hs), sempre no mesmo horário, separadas por sexo e contabilizadas. A água de criação foi totalmente substituída somente nos dias em que ocorreu coleta de pupas.

Pupas coletadas nas primeiras 24 e 48 horas de coleta foram pesadas em balança de precisão. Para tanto, os indivíduos foram acondicionados nos dosadores de pupa e em seguida, dispostos em disco de papel filtro para retirada do excesso de água e então, transferidos para placa de Petri (60 x 15 mm) (Figura 13 D-E). Além disso, pupas machos foram acondicionadas em tubos cônicos de centrifugação (50 mL) (duas pupas/tubo), contendo 10 mL de água filtrada, para avaliação da emergência do adulto (Figura 13 F-G). Para calcular a emergência, utilizou-se a razão do nº de adultos emergidos sobre o nº de pupas avaliadas.

O tempo até a formação de pupas (duração L_1-pupa) foi calculado de acordo com a duração do período de desenvolvimento da larva de primeiro estádio (L_1) até a formação da pupa. A sobrevivência L_1-pupa foi obtida a partir da proporção de pupas vivas em relação ao número total de larvas inoculadas em cada bandeja. A sobrevivência de pupas foi determinada a partir da proporção de pupas vivas em relação ao total de pupas formadas. O rendimento total e diário de pupas machos e fêmeas, rendimento acumulado de machos (duas coletas), a razão sexual (♂/♂+♀), emergência de adultos (%) e ainda, a taxa de produção de machos com 24 h (PUGGLIOLI et al., 2013) foram determinadas seguindo as fórmulas descritas no item 3.3.2. O experimento foi realizado três vezes, e para cada uma delas, quatro replicatas de cada tratamento foram utilizadas.

Figura 13 - Procedimentos realizados durante a execução do experimento de avaliação de dieta larval para o desenvolvimento de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.



A-B: Bandejas de criação contendo larvas sendo alimentadas com diferentes dietas. C: Formação de pupas. D: Processo de pesagem das pupas. E: Avaliação da emergência de adultos. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.4 Determinação da densidade ótima para a criação larval

Para o bioensaio, ovos da linhagem MBR-001 foram submetidos ao processo de eclosão de acordo com o item 3.2.1.2 durante duas horas. Uma hora após o fim desse processo, as larvas de primeiro estádio (L_1) foram transferidas para recipientes de plástico (9 x 9 cm) contendo 102 mL de água em uma profundidade de 2 cm. Após inoculação das larvas, os recipientes foram mantidos em sala sob condições controladas (T: 28 ±2°C, UR: 80 ±5%, fotoperíodo de 12:12 (claro:escuro) (Figura 14 A-C). As larvas foram alimentadas diariamente, sempre nos mesmos horários, com ração de peixe Sera Vipan® de acordo com a tabela 1.

Todos os recipientes foram verificados diariamente para avaliação da estabilidade da temperatura e nível da água na bandeja. Quando detectado um nível inferior ao estabelecido, houve reposição de água. Além disso, foram registrados os parâmetros biológicos: mortalidade larval e o estádio de desenvolvimento larval/dia.

A partir do 5° dia de criação, foram realizadas observações diárias (turno matutino e vespertino) para registrar o início da formação das pupas. Com base nesse registro, 24 horas após ocorreu a primeira coleta de pupas, sendo as três próximas coletas realizadas sucessivamente (48,72 e 96 hs após).

As pupas foram coletadas, separadas por sexo (manualmente) e contabilizadas (Figura 14 D). A cada dia de coleta, 30 pupas machos e 30 pupas fêmeas foram alocadas nos dosadores de pupa (pra drenagem do excesso de água). Em seguida, as pupas foram dispostas em disco de papel filtro para retirar o excesso de água e então, transferidas para placa de Petri (60 x 15 mm) para serem pesadas com o auxílio de uma balança semianalítica (Toledo Ohaus, precisão de 0,0001 grama (Figura 14 E-F). Então, os indivíduos de cada grupo experimental foram acondicionados em potes plásticos (1800 mL) contendo aproximadamente 150 mL de água, para posterior avaliação da emergência do adulto (Figura 14 G-I).

Figura 14 - Criação de larvas em diferentes densidades e procedimentos utilizados para avaliação do peso corporal e taxa de emergência de indivíduos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.

A-C: Recipientes contendo larvas de *Ae. aegypti* sob diferentes densidades de larvas/volume. D: Coleta e separação de pupas. E-F: Pesagem de pupas. G-I: Acondicionamento de pupas para emergência dos adultos. Crédito das fotos: Luiza Garziera A; B-I: Elaborado pelo autor

Para cada dia de coleta de pupas, os seguintes parâmetros biológicos foram avaliados de acordo com o descrito no item 3.3.2: duração do desenvolvimento larval (L_1

- pupa); rendimento diário de pupas machos/fêmeas e total, massa corporal das pupas machos/fêmeas, emergência de adultos (%) e razão sexual (♂/♂+♀). E ainda, a taxa de produção (PUGGLIOLI et al.,2013) o rendimento acumulado de machos. O experimento foi repetido quatro vezes.

3.5 META III- PROCESSOS PÓS-PRODUÇÃO: CONDIÇÕES PARA O TRANSPORTE DE ADULTOS

3.5.1 Determinação de condições para o transporte de adultos machos estéreis imobilizados

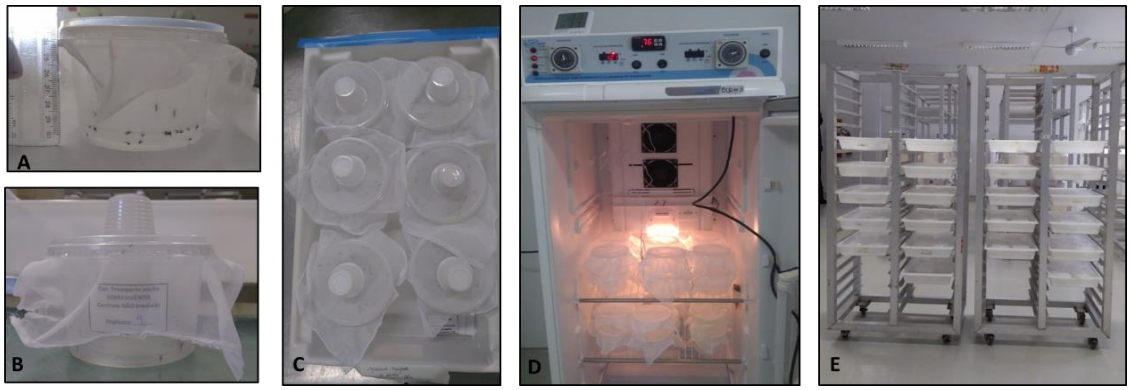
Como parte de um projeto FINEP[5] para aprimoramento da criação em massa, foi determinada uma dose de raios X esterilizante para machos (35 Grays) (manuscrito em preparação). Os machos estéreis provenientes desse projeto foram utilizados nesse experimento. Os adultos se alimentaram de solução de sacarose 10% *ad libitum.* Os mosquitos foram mantidos em sala com temperatura controlada (27 ± 1 °C) durante 72-96 horas (idade de liberação do macho, CARVALHO et al., 2015; GARZIERA e al., 2017) (Figura 15 B-C).

Em um primeiro experimento para simular o processo de imobilização a frio etapa 1), os machos foram mantidos em incubadora com temperatura regulável em intervalos de temperatura entre 10 e 60 minutos. Após cada período de incubação, foram avaliados os parâmetros sobrevivência sob condições de estresse e habilidade de voo.

Para avaliação da sobrevivência, os potes com adultos resfriados (nocauteados) foram removidos da incubadora e mantidos em temperatura constante de 26 ± 1 °C (Figura 15 E) sendo os insetos alimentados somente com água. A mortalidade foi avaliada diariamente, durante três dias consecutivos.

[5] "Pesquisa e inovação para aplicação da Técnica do Inseto Estéril no controle do vetor *Aedes aegypti;* Convenente: Biofábrica Moscamed Brasil; Referência 0256/16. Chamada pública (01/2016); MCTI/FINEP/FNDCT.
http://www.finep.gov.br/images/chamadas-publicas/2016/MCTI-Finep-FNDCT_01-2016-ZIKA.pdf

Figura 15 – Procedimentos para avaliação da sobrevivência de machos estéreis imobilizados em baixas temperaturas.



A-C: Pupas/adultos machos estéreis acondicionadas em recipientes. D: Alocação dos recipientes com adultos em incubadora para imobilização dos machos estéreis. E: Alocação dos potes em bandejas para avaliação da sobrevivência em condições de stress. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar a habilidade de voo, após a incubação os adultos resfriados (nocauteados) foram imediatamente transferidos para o dispositivo de avaliação. O dispositivo consistiu em um pote plástico (9,5 cm altura), com paredes lisas, que teve o fundo removido), emborcado e encaixado em uma placa de Petri. A parte interna superior do pote foi revestida com amido de milho (~1,5cm) para impedir que mosquitos escapassem caminhando do tubo (Figura 16 A), sendo possível sair apenas se voassem. Cada dispositivo foi inserido no centro de uma gaiola modelo PVC (Figura 16 B). Com a gaiola aberta (sem tampa), os adultos imobilizados foram cuidadosamente despejados no dispositivo, com auxílio de funil (Figura 16 C-E). Em seguida, a gaiola foi fechada e o funil removido através da manga (abertura na parte frontal da gaiola coberta de tecido voal para manipulação dos insetos). Uma hora após o fim da incubação, o dispositivo foi fechado e removido da gaiola para contabilização de: adultos não voadores (indivíduos que permaneceram dentro do dispositivo) e adultos mortos (Figura 16 F). O percentual de voadores da amostra foi obtido pelo cálculo do n ° de voadores/n° total de mosquitos na amostra.

Foram realizadas cinco repetições do experimento para cada período (cinco tratamentos) e intervalo de temperatura avaliados (três tratamentos).

Figura 16 - Procedimentos para avaliação da habilidade de voo de machos estéreis imobilizados em diferentes temperaturas.

A-C: Dispositivo de liberação. B: Dispositivo de liberação inserido na gaiola com funil instalado. C: Gaiolas preparadas para serem alocados rapidamente os mosquitos imobilizados logo após a retirada da incubadora. D: Mosquitos imóveis sendo despejados no dispositivo. E: Mosquitos ainda imobilizados no fundo do dispositivo. F: Gaiolas mantidas com mosquitos durante uma hora para avaliação do número de voadores. Fonte: Aline Taiane Macedo (B-D), Michelle Pedrosa (A, E- J).

Em um segundo bioensaio (etapa 2) para simular o transporte, potes contendo 25 machos estéreis cada, foram preparados de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Os insetos foram imobilizados em incubadora nas condições supracitadas e em seguida, foram imediatamente transferidos para outra incubadora estabilizada na faixa de temperatura de 4 a 7°C, durante 2 a 6 horas, simulando o transporte. Então, os adultos foram prontamente direcionados para as avaliações de sobrevivência e habilidade de voo, como descrito acima. Machos estéreis imobilizados e não incubados constituíram o grupo controle.

Nesse experimento, o tempo necessário para a recuperação dos machos (despertar e voar) após imobilização e incubação foi avaliado. Para tanto, machos estéreis foram imobilizados e incubados de acordo com a metodologia supracitada. Entretanto, logo após o fim do período de incubação, os potes foram mantidos em temperatura ambiente (26 ± 1°C), sendo observados ininterruptamente, até que todos os adultos se recuperassem. O tempo em que o primeiro e o último mosquito do pote demoraram para se recuperar, foi registrado, com auxílio de cronômetro.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os experimentos foram realizados seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado. Previamente a cada análise realizada, os pressupostos de homoscedasticidade e normalidade foram avaliados mediante os testes de e Levene's e Kolmogorov-Smirnov, respectivamente, com nível de significância de 0,05. Dados que escapavam desses pressupostos foram transformados em $\sqrt{x}$.

Os dados referentes aos parâmetros da linhagem MBR-001: proporção sexual para produção de ovos e rendimento de machos em dois períodos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA com um fator) e teste t de Student, respectivamente.

As gaiolas GCM-II e PVC foram comparadas através do teste t de Student. O efeito da densidade de adultos na mortalidade de fêmeas foi avaliado com um modelo linear generalizado (GLM) de efeitos mistos e devido à natureza dos dados, foi empregada distribuição binomial de variância com regressão logística, sendo as médias comparadas via teste de Van der Waerden. Dados de fecundidade e fertilidade foram submetidos a análise de GLM de efeitos mistos e as médias foram comparadas através do teste de Tukey (HSD. Em todas as análises, as variáveis *rodada* e *gaiola* foram consideradas como interações de segundo nível. As análises foram realizadas em linguagem R (versão 3.4.4), com simplificação do modelo como o descrito por Crawley (2015).

Foi utilizado o teste de correlação de Pearson e ANOVA com dois fatores para analisar a porcentagem de larvas eclodidas e a possível relação entre o sexo dos indivíduos nos diferentes intervalos de tempo de eclosão, respectivamente.

Os dados de desempenho das dietas e os efeitos da densidade na criação larval, foram submetidos à ANOVA com um fator. Os testes de Tukey e/ou Fisher foram utilizados para identificar quais grupos diferiram. Dados cuja distribuição de frequência distava à distribuição normal foram analisados mediante teste de Kruskal-Wallis e as médias foram comparadas par a par pelo teste de Mann-Whitney.

Os parâmetros comportamentais de machos estéreis expostos às condições de transporte foram comparados com o uso do teste de Kruskal-Wallis, enquanto o tempo de recuperação dos machos foi avaliado através de ANOVA com um fator e teste de Tukey.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico Statistica (versão 10.0).

4. RESULTADOS

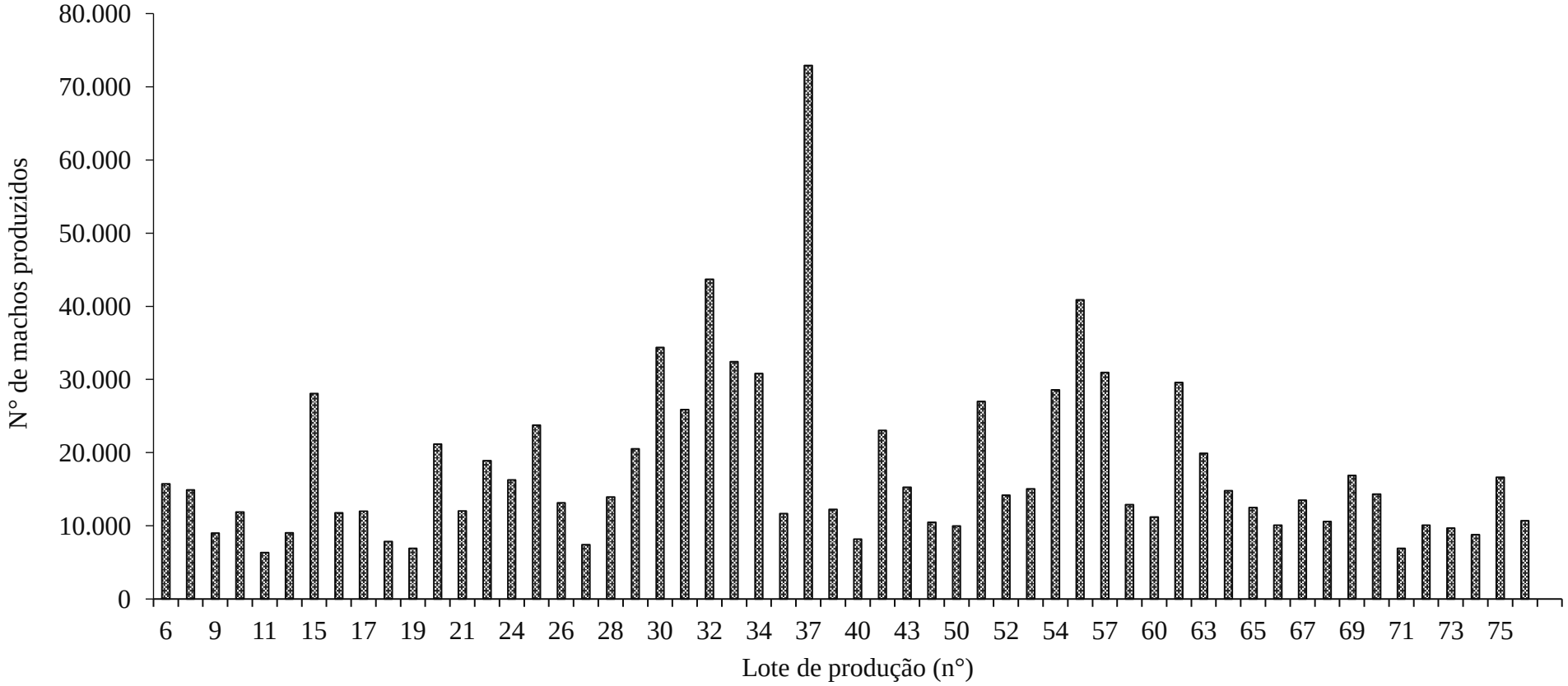
4.1 META I - PLANO DE APLICAÇÃO PARA PRODUÇÃO EM MASSA DA LINHAGEM MBR-001

4.1.1 Avaliação dos parâmetros de produção e qualidade da linhagem MBR-001

Na criação larval, os lotes destinados à colônia matriz e os lotes para produção de machos para liberação são criados de forma independente, contudo, seguindo protocolos semelhantes. A colônia MBR-001 tem sido criada em massa, porém em quantidades reduzidas desde 2016 na Unidade de Produção do Aedes Estéril (UPAE). Nesse estudo, foram analisados 59 lotes de colônia criados entre abril de 2016 e janeiro de 2018.

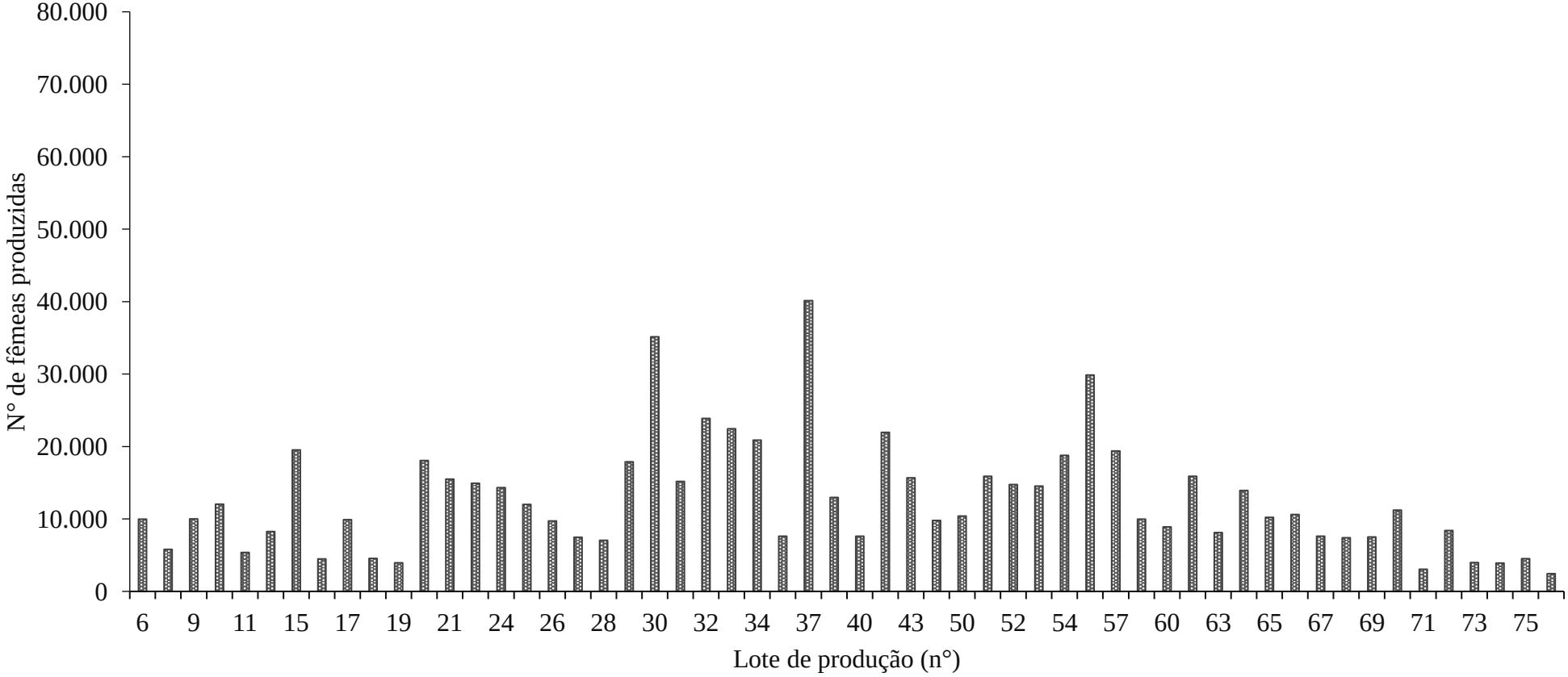
A taxa média de eclosão de larvas no período supracitado foi de 62%, oscilando entre 12% e 100% entre os lotes de produção avaliados. O total de pupas produzidas a cada lote de colônia oscilou entre 6.352-72.907 (machos) (Figura 17) e 2.432 - 40.115 (fêmeas) (Figura 18), e a amplitude deste parâmetro é relacionada com a demanda de produção de ovos no período supracitado. Nos 56 lotes avaliados foram produzidas 997.188 pupas machos (média de 17.807/lote) e 705.102 fêmeas (média de 12.591/lote).

Figura 17 - Produção de pupas machos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, para lotes de colônia sob condições de criação em massa.



Colunas representam produção total de cada um dos 56 lotes avaliados entre os anos de 2016 e 2018. T: 26 ±1 °C. 70 ± 10 UR. 14:10 (claro:escuro).

Figura 18 - Produção de pupas fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, para lotes de colônia sob condições de criação em massa.



Colunas representam produção total de cada um dos 56 lotes avaliados entre os anos de 2016 e 2018. T: 26 ±1 °C. 70 ± 10 UR. 14:10 (claro:escuro).

O rendimento acumulado de pupas machos foi de 28%, considerando ambas as coletas (Tabela 2). Quanto a recuperação de fêmeas este parâmetro biológico atingiu um valor médio de 31% levando em consideração as três primeiras coletas (Tabela 2). Contudo, os dados registrados ao longo do período avaliado revelaram uma grande amplitude deste parâmetro, tanto para machos quanto para fêmeas entre os lotes de produção (Figura 19).

Nas duas primeiras coletas, a recuperação de pupas machos foi maior que a de fêmeas. Entretanto, na terceira coleta, a proporção de fêmeas foi maior que a de machos apenas no terceiro dia de coleta (0,54). Dessa maneira, a razão sexual se mostrou estável na maioria dos lotes avaliados, revelando uma maior proporção de machos nos dois primeiros dias de coleta (Tabela 2 e Figura 19 A-B) e de fêmeas na terceira coleta (Tabela 2 e Figura 19 C).

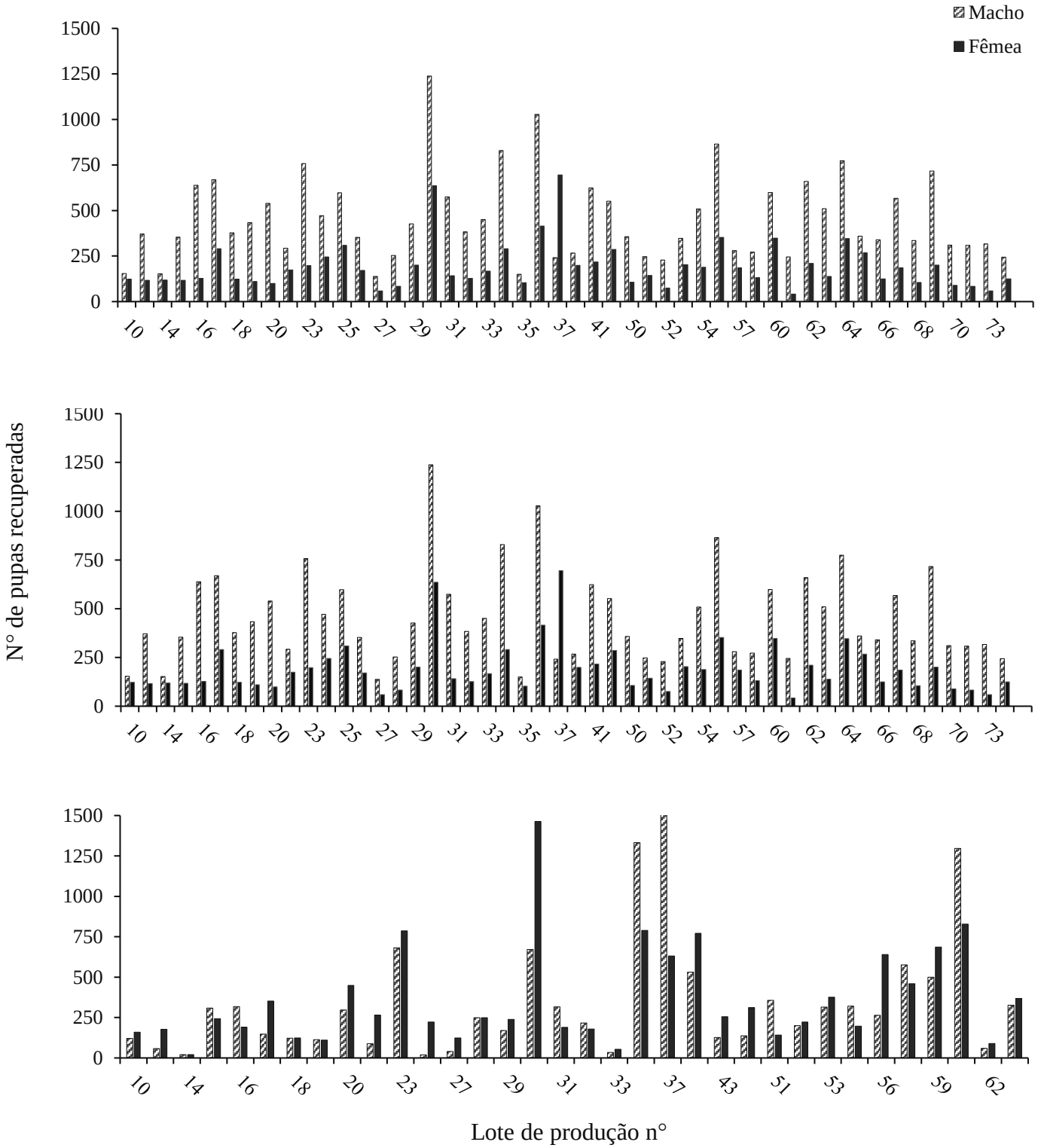
Os resultados evidenciaram uma diferença de aproximadamente 0,2 mm entre a largura média do cefalotórax de machos e fêmeas desta linhagem de *Ae. aegypti* (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros avaliados na produção de pupas machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, para lotes de Colônia.

Coleta	**Rendimento pupas machos**	**Rendimento pupas fêmeas**	**Razão sexual (♀/♂+♀)**	**Cefalotórax ♂(mm)**	**Cefalotórax ♀(mm)**
1°	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,29 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,25 ± 0,01
	(0,05 - 0,41)	(0,01 - 0,23)	(0,15- 0,74)	(0,97 - 1,18)	(1,13 - 1,42)
	58*	56*	55*	67*	67*
2°	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,47 ± 0,02	1,06 ± 0,00	1,27 ± 0,01
	(0,02 - 0,41)	(0,03 - 0,34)	(0,11 - 0,75)	(1,00 - 1,18)	(1,12 - 1,36)
	57*	56*	55*	66*	66*
3°	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,54 ± 0,02		1,28 ± 0,01
	(0,01- 0,71)	(0,01 - 0,49)	(0,23 -0,75)	_	(1,18 - 1,33)
	32*	32*	32*		41*

As colunas representam a média ± erro padrão de cada parâmetro. Valores entre parênteses apontam o intervalo de variação do parâmetro. Cefalotórax de machos de terceira separação não foram avaliados.
*Número de lotes avaliados a cada coleta de pupas.

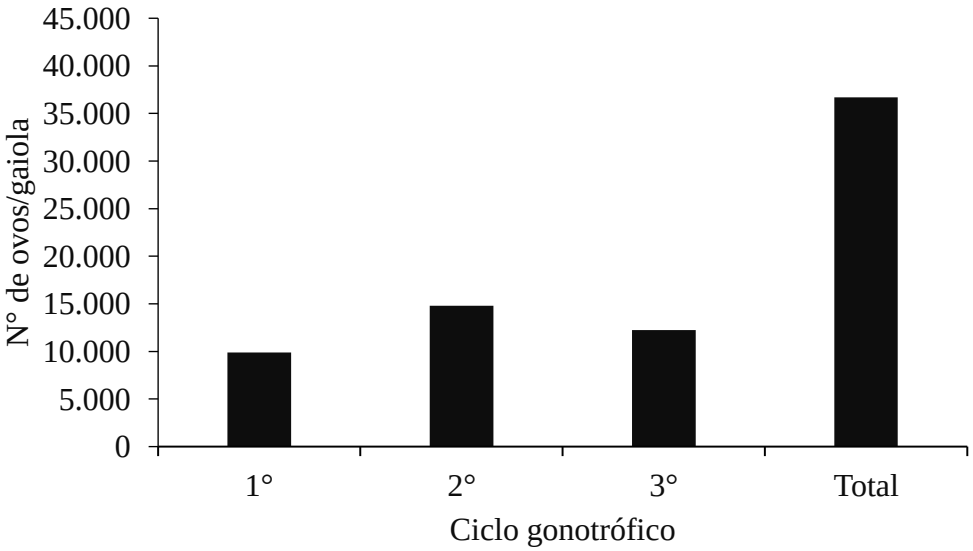
Figura 19 – Produção de pupas machos e fêmeas de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001, durante 2016-2018 sob condições de criação em massa.



As colunas representam a média de pupas de cada sexo produzidas por bandeja ± erro padrão, a cada dia de coleta. A: Primeiro dia de coleta de pupas (24 hs), 51 lotes avaliados. B: Segundo dia de coleta de pupas (48 hs), 51 lotes avaliados. C: Terceiro dia de coleta de pupas (72 hs), 33 lotes avaliados. T: 26 ±1 °C. 70 ± 10 UR. 14:10 (claro:escuro).

A figura 20 apresenta a produção de ovos de fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001 durante três ciclos gonótroficos sob condições de criação em massa. A produção total de ovos ao longo dos três ciclos foi de 36.696 (± 4.473). Assim, desconsiderando-se a mortalidade de fêmeas e a taxa de inseminação, a fecundidade média total foi de (24,5 ovos/fêmea).

Figura 20 – Produção de ovos por gaiola da colônia de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.



As colunas representam a média ± erro padrão do total de ovos produzidos por gaiola a cada ciclo reprodutivo e a produtividade total de ovos ao longo da vida útil da gaiola. T: 26 ±1 °C. 70 ± 10 UR. 14:10 (claro:escuro). Foram avaliados 61, 61 e 60 lotes para o 1°, 2° e 3° ciclo gonotrófico, respectivamente.

4.1.2 Determinação de parâmetros para criação em massa

4.1.2.1 Proporção sexual para produção de ovos em gaiolas

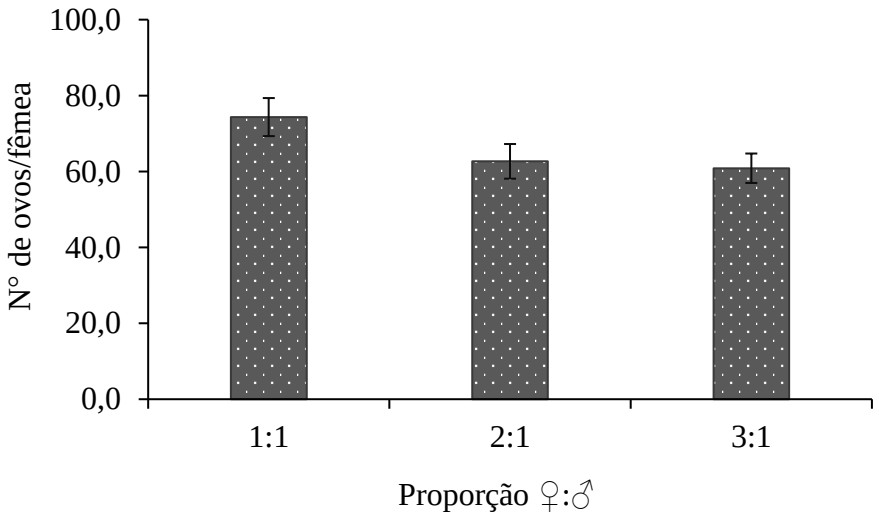
Foram avaliadas as proporções 1:1; 2:1 e 3:1 fêmeas:macho (♀:♂) para criação de adultos em gaiolas. Para tanto, 100 adultos foram mantidos em minigaiola (18 cm x 18 cm), sendo montadas três minigaiolas para cada proporção (♀:♂) avaliada. Foram realizadas três replicatas biológicas e cada fêmea foi considerada como uma unidade experimental. Setenta e duas horas depois do repasto sanguíneo, as fêmeas de cada gaiola foram imobilizadas (*knockdown)* em freezer a -10 °C durante 60 segundos e em

seguida, confinadas individualmente, em poços de placa de cultura de células (85,4 x 127,6 mm) (IOSHIRO et al. 2018, sob revisão) (Figura 7). As posturas foram retiradas das placas e em seguida, os ovos foram processados seguindo metodologia descrita no item 3.2.1.1. Setenta e duas horas depois, determinou-se a fecundidade e taxa de eclosão (fertilidade) das fêmeas.

A criação de adultos sob diferentes proporções sexuais não afetou a fecundidade individual das fêmeas (ANOVA: $F_{(2,146)} = 2,77$; $p=0,07$) (Figura 21). O mesmo padrão foi observado para a taxa de eclosão das larvas, uma vez que este parâmetro não diferiu entre os diferentes tratamentos (ANOVA: $F_{(2,146)} = 2,34$; $p= 0,10$). A taxa de eclosão de larvas atingiu valores médios inferiores a 60% para as três proporções ♀:♂ testadas (Figura 22).

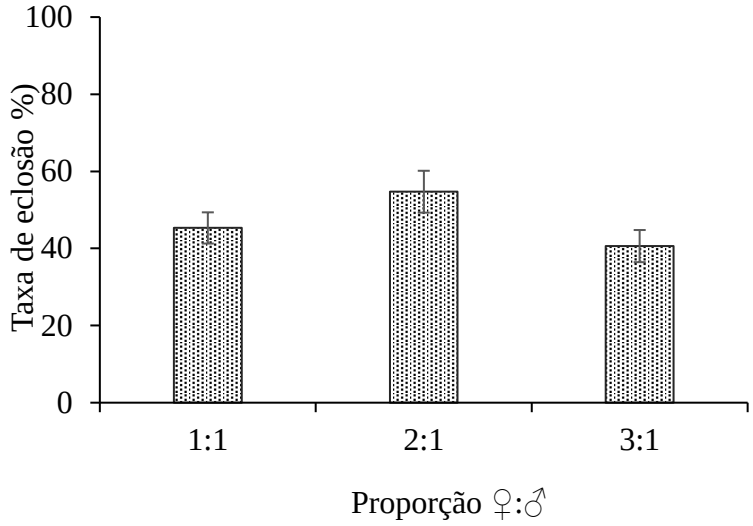
A porcentagem de fêmeas que não depositaram ovos nos três tratamentos foi superior a 75% (1:1=78,2%; 2:1= 84,5% e 3:1 77,8%), não sendo constadas diferenças significativas entres as proporções ♀:♂ avaliadas (ANOVA: $F_{(2,9)} = 0,58$; $p=0,06$).

Figura 21 - Fecundidade de fêmeas de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001 expostas a diferentes proporções de macho.



As colunas representam a fecundidade média por fêmea ± erro padrão T: 27±1ºC; UR: 70±10%; fotoperíodo 14:10 (claro:escuro).

Figura 22 – Fertilidade média de fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.



As colunas representam a fertilidade média de fêmeas ± erro padrão T: 27±1ºC; UR: 70±10%; fotoperíodo 14:10(claro:escuro).

4.1.2.2 Quantificação do número de ovos por grama

Foram contabilizados ovos de seis alíquotas provenientes de seis lotes biológicos diferentes. Os ovos foram quantificados em um círculo de papel filtro quadriculado (1 cm x 1 cm) inserido numa placa de Petri (8 cm x 15 cm). O papel filtro foi moderadamente umedecido para evitar a dispersão dos ovos. Cada amostra foi distribuída gradualmente pelos quadrículos ao longo do papel. A contabilização foi conduzida com auxílio de contador manual sob microscópio estereoscópio binocular (Leica, Modelo 165®, aumento 40X).

O número de ovos nas seis amostras avaliadas oscilou entre 59.739 a 62.759 ovos. A partir da média obtida (60.673± 467,6), estimou-se que em cada grama de ovos da linhagem MBR-001 produzido sob condições de criação em massa há aproximadamente 121.000 ovos.

4.1.2.3 Rendimento L_1-pupa macho

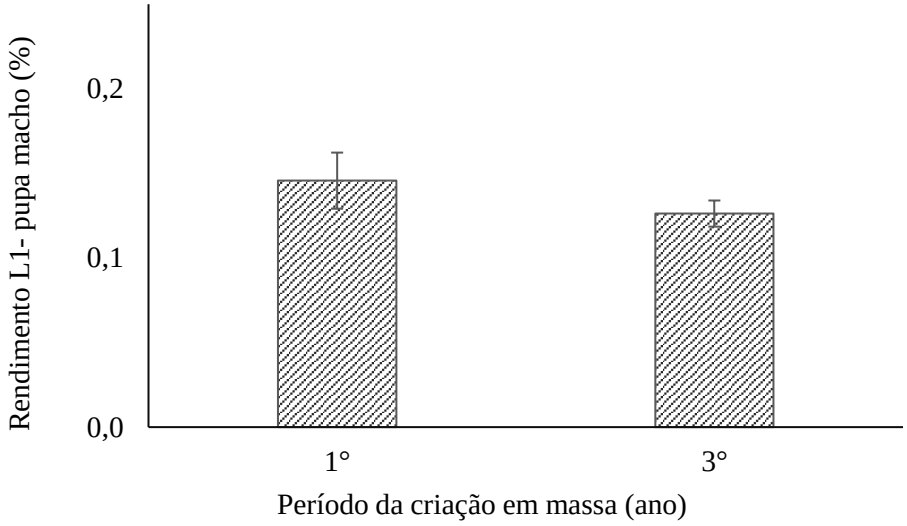
O rendimento de pupas machos da linhagem MBR-001 em relação ao número total inoculado de larvas de primeiro estádio (L_1) foi avaliado no início do

estabelecimento da criação em massa da linhagem (ano de 2016) e dois anos após (ano de 2018). O experimento foi realizado com três e cinco replicatas biológicas em 2016 e 2018, respectivamente.

A partir do quinto dia de criação larval, o início da formação de pupas foi monitorado diariamente (turno matutino e vespertino). As coletas de pupas (item 3.2.1) ocorreram 24, 48 e 72 horas após o início da formação do pupário. Para cada dia de coleta, determinou-se a quantidade de machos e fêmeas recuperados.

Os resultados de recuperação de pupas revelaram um baixo rendimento de machos da linhagem MBR-001 em condições de criação em massa. O rendimento acumulado de machos, ou seja, considerando as pupas machos coletadas no primeiro e segundo dia de separação foi inferior à 20% (Figura 23). Este parâmetro não foi influenciado pelo tempo de manutenção da linhagem em condições de criação em massa. (Teste T, gl=35; p=0,09).

Figura 23 - Rendimento acumulado de pupas machos de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001, criadas em condições de grande escala.



As colunas representam o rendimento médio acumulado (dois dias de coleta) de pupas machos ± erro padrão para cada ano de criação (1°=2016) e (2°=2018). T: 28±1ºC; UR: 80 ±05%; fotoperíodo 14:10 (claro:escuro).

O rendimento médio diário de machos na primeira e segunda separação de pupas foi de 11 e 7% no primeiro ano de criação e de 5 e 9% em 2018 (Tabela 5). Em 2016, a maior produtividade de machos foi obtida na primeira coleta (73%) em comparação com a segunda, diferentemente do observado para o ano de 2018 (38 %). Independentemente do ano de avaliação, a recuperação de machos na primeira coleta foi superior à de fêmeas, como mostrado pelos valores da razão sexual obtidos (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros de produção (média ± EP) de pupas de *Aedes aegypti*, linhagem MBR-001, criadas em condições de grande escala.

Período de criação em massa*	**Coleta**	**Rendimento L_1-pupas (♂)**	**Razão sexual ♂/(♂+♀)**	**Taxa de produção (♂)**
2016	1° (24 hs)	0,11 ± 0,01	0,72 ± 0,04	0,73 ± 0,08
	2° (48 hs)	0,07 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,27 ± 0,08
2018	1° (24 hs)	0,05 ± 0,00	0,85 ± 0,02	0,38 ± 0,04
	2° (48 hs)	0,09 ± 0,01	0,71 ± 0,02	0,47 ± 0,04

Avaliação dos parâmetros de produtividade de machos criados em condições de grande escala, na primeira e segunda coleta. Os parâmetros foram avaliados no ano de 2016 (início do estabelecimento) e dois anos após, em 2018. As colunas representam a média ± erro padrão de cada parâmetro.

4.1.2.4 Planejamento da produção em massa da linhagem MBR-001

O usos dos parâmetros para a criação em massa da linhagem MBR-001 possibilitou gerar a planilha básica de planejamento (PSP), que consiste na apresentação dos principais atributos necessários para a produção em grande escala dessa linhagem, por exemplo, quantidade semanal de gaiolas (lote) para manutenção da colônia matriz e quantidade semanal de bandejas/criação larval (lote) para uma produção semanal de um milhão de machos.

A Figura 24 apresenta a planilha PSP com dados da linhagem MBR-001 e a Figura 25, com dados da linhagem transgênica a fim de propiciar uma análise comparativa entre ambas, uma vez que a OX513 A foi a única linhagem de *Ae. aegypti* criada em grande escala até o momento no mundo. Na Figura 26, por sua vez, pode-se visualizar as fórmulas utilizadas para automatizar os resultados da PSP. Dados

sinalizados em vermelho representam parâmetros mutáveis, cujos valores podem ser alterados de acordo com a linhagem utilizada na criação em massa.

Por fim, a Tabela 4 apresenta a porcentagem de aumento dos principais parâmetros com a criação da linhagem MBR-001 em comparação com a linhagem OX513 A. É possível observar que o maior aumento ocorre no número de gaiolas PVC utilizadas, com 139 % mais de gaiolas que a criação com a linhagem transgênica. No geral, a porcentagem média de aumento é 109 %.

Figura 24 – Planilha básica de planejamento do sistema produtivo (PSP) para a produção em grande escala de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.

Planejamento do Sistema Produtivo (PSP)					
Linhagem: MBR-001					**Atualização:** __/__/__
ITEM	**PARÂMETROS**	**UNIDADE**	**QUANTIDADES**		
1.1	**PRODUÇÃO GERAL**				
1.1.1	Produção de machos/semana	milhões de machos/semana	1	4	10
1.1.2	Rendimento L_1-pupa	Porcentagem	0,16	0,16	0,16
1.1.3	Qtde de larvas/necessárias para recuperar produção de machos (+10%)	larvas	6.875.000	27.500.000	68.750.000
1.1.4	N° de ovos/grama	ovos	121.000	121.000	121.000
1.1.5	Taxa de eclosão média (%)	Porcentagem	0,62	0,62	0,62
1.1.6	Qtde de ovos/necessária para sustentar a produção de machos	ovos	11.088.710	44.354.839	110.887.097
1.1.7	Qtde de ovos/necessária para sustentar a produção de machos	gramas	92	367	916
1.2	**MANUTENÇÃO COLÔNIA MATRIZ**				
1.2.1	Densidade larval	Larvas/mL	1,0	1,0	1,0
1.2.2	Quantidade de água por bandeja	mL	3000	3000	3000
1.2.3	Quantidade de larvas por bandeja	Larvas/bandeja	3000	3000	3000
1.2.4	Proporção sexual por gaiola- N° de ♀ para cada	relação/semana	3♀ : 1♂	3♀ : 1♂	3♀ : 1♂
1.2.5	Produção média de ovos gaiola/vida (1° -3° ciclos)	ovos/semana	36896	36896	36896
1.2.6	Fecundidade fêmea/vida útil (1° -3° ciclos)	ovos/semana	25	25	25
1.2.7	Rendimento L_1-pupa (fêmeas - 4 coletas/lote)	Porcentagem	0,4	0,4	0,4
1.2.8	Qtde de fêmeas/necessárias para produção de ovos	fêmeas/semana	450.809	1.803.238	4.508.094
1.2.9	Qtde de gaiolas/semana (PVC)	gaiolas/semana	150	601	1.503
1.2.10	Qtde de gaiolas/semana (PVC)-rotatividade	gaiolas/semana	361	1.443	3.606
1.2.13	Produção larval para sustentar colônia/semana (4 separações/semana)	larvas/semana	1.127.024	4.508.094	11.270.236
1.2.14	Qtde de ovos necessária para sustentar a colônia/semana	ovos/semana	1.817.780	7.271.120	18.177.799
1.2.15	Qtde de ovos necessária para sustentar a colônia/semana	gramas/semana	15	60	150
1.2.16	Qtde de bandejas/semana necessária para produzir lote de colônia	bandejas/semana	376	1.503	3.757
1.2.17	Qtde de bandejas/semana necessária para produzir lote de colônia -rotatividade	bandejas/semana	864	3.456	8.641
1.2.18	Qtde de carrinho larval/semana necessária para produzir lote de colônia	carrinhos/semana	14	58	144
1.2.19	Qtde de carrinho larval/semana necessária para produzir lote de colônia-rotatividade	carrinhos/semana	32	127	318
1.2.20	Qtde de carrinho adulto/semana necessária por lote (PVC)	carrinho adulto/semana	4	15	38
1.2.21	Qtde de carrinho adulto/semana necessária por lote (PVC)-rotatividade	carrinho adulto/semana	8	33	83
1.2.24	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos	ovos/semana	1.817.872	51.625.958	129.064.896
1.2.25	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos+ estoque (5%)	gramas/semana	112	448	1.120
1.3	**PRODUÇÃO DE MACHOS PARA LIBERAÇÃO**				
1.3.1	Densidade larval	Larvas/mL	2,25	2,25	2,25
1.3.2	Quantidade de água por bandeja	mL	3000	3000	3000
1.3.3	Quantidade de larvas por bandeja	Larvas/bandeja	6750	6750	6750
1.3.4	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos	bandejas/semana	1.019	4.074	10.185
1.3.5	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos - rotatividade	bandejas/semana	2.343	9.370	23.426
1.3.6	Qtde de carrinhos/semana necessária para produção de machos	carrinhos/semana	39	157	392
1.3.10	Qtde de potes/semana necessária para acondicionamento de machos (+ 10%)	Potes/semana	1.100	4.400	11.000
1.3.11	Qtde de potes /semana necessária para acondicionamento de machos (+10%)-rotatividade	Potes/semana	4.400	17.600	44.000
1.4	**CONSUMO-DIETAS**				
1.4.1	Consumo de dieta/larva por lote/colônia	g	0,003	0,003	0,003
1.4.2	Consumo de dieta/lbandeja por lote/colônia	g	9,4	9,4	9,4
1.4.3	Consumo total de dieta/lote/colônia	kg	4,1	15,5	38,8
1.4.4	Consumo de dieta/larva por lote/supressão - Tabela "BMB"	g	0,002	0,002	0,002
1.4.5	Consumo de dieta/bandeja por lote/produção de machos	g	11,5	11,5	11,5
1.4.6	Consumo total de dieta/lote/produção de machos (+15%)	kg	13,4	46,8	116,9
1.4.7	Consumo total de dieta (colônia+produção de machos)	kg	17,5	62,3	155,7
1.4.8	Água (criação larval)+ reposição (pós 1° separação) (+3%)	lts	8.574	34.297	85.743
1.4.9	Consumo de dieta de adulto: algodão	kg	1,8	7,0	17,5
1.4.10	Consumo de dieta de adulto: açúcar	kg	4,0	12,0	30,0
1,5	**RESUMO**				
1.5.1	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos+ estoque (5%)	gramas/semana	112	448	1.120
1.5.3	Qtde de gaiolas/semana (PVC)	gaiolas/semana	150	601	1.503
1.5.4	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos	bandejas/semana	1.019	4.074	10.185
1.5.5	Consumo total de dieta (colônia+produção de machos)	kg	17,5	62,3	155,7
1.5.6	Água (criação larval)+ reposição (pós 1° separação) (+3%)	lts	8.574	34.297	85.743

Figura 25 – Planilha básica de planejamento do sistema produtivo (PSP) para a produção em grande escala de *Ae. aegypti*, linhagem OX513 A.

Planejamento do Sistema Produtivo (PSP)					
Linhagem: OX513 A					**Atualização:** __/__/__
ITEM	**PARÂMETROS**	**UNIDADE**	**QUANTIDADES**		
1.1	**PRODUÇÃO GERAL**				
1.1.1	Produção de machos/semana	milhões de machos/semana	1	4	10
1.1.2	Rendimento L_1-pupa	Porcentagem	0,30	0,30	0,30
1.1.3	Qtde de larvas/necessárias para recuperar produção de machos (+10%)	larvas	3.666.667	14.666.667	36.666.667
1.1.4	N° de ovos/grama	ovos	80.000	80.000	80.000
1.1.5	Taxa de eclosão média (%)	Porcentagem	0,81	0,81	0,81
1.1.6	Qtde de ovos/necessária para sustentar a produção de machos	ovos	4.526.749	18.106.996	45.267.490
1.1.7	Qtde de ovos/necessária para sustentar a produção de machos	gramas	57	226	566
1.2	**MANUTENÇÃO COLÔNIA MATRIZ**				
1.2.1	Densidade larval	Larvas/mL	1,0	1,0	1,0
1.2.2	Quantidade de água por bandeja	mL	3000	3000	3000
1.2.3	Quantidade de larvas por bandeja	Larvas/bandeja	3000	3000	3000
1.2.4	Proporção sexual por gaiola- N° de ♀ para cada	relação/semana	3♀ : 1♂	3♀ : 1♂	3♀ : 1♂
1.2.5	Produção média de ovos gaiola/vida (1° -2° ciclos)	ovos/semana	143000	143000	143000
1.2.6	Fecundidade fêmea/vida útil (1° -2° ciclos)	ovos/semana	48	48	48
1.2.7	Rendimento L_1-pupa (fêmeas - 4 coletas/lote)	Porcentagem	0,4	0,4	0,4
1.2.8	Qtde de fêmeas/necessárias para produção de ovos	fêmeas/semana	94.307	377.229	943.073
1.2.9	Qtde de gaiolas/semana (PVC)	gaiolas/semana	63	251	629
1.2.10	Qtde de gaiolas/semana (PVC)-rotatividade	gaiolas/semana	151	604	1.509
1.2.12	Produção larval para sustentar colônia/semana (4 separações/semana)	larvas/semana	235.768	943.073	2.357.682
1.2.13	Qtde de ovos necessária para sustentar a colônia/semana	ovos/semana	291.072	1.164.287	2.910.718
1.2.14	Qtde de ovos necessária para sustentar a colônia/semana	gramas/semana	4	15	36
1.2.15	Qtde de bandejas/semana necessária para produzir lote de colônia	bandejas/semana	79	314	786
1.2.16	Qtde de bandejas/semana necessária para produzir lote de colônia -rotatividade	bandejas/semana	181	723	1.808
1.2.17	Qtde de carrinho larval/semana necessária para produzir lote de colônia	carrinhos/semana	3	12	30
1.2.18	Qtde de carrinho larval/semana necessária para produzir lote de colônia-rotatividade	carrinhos/semana	7	27	66
1.2.19	Qtde de carrinho adulto/semana necessária por lote (PVC)	carrinho adulto/semana	2	6	16
1.2.20	Qtde de carrinho adulto/semana necessária por lote (PVC)-rotatividade	carrinho adulto/semana	3	14	35
1.2.23	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos	ovos/semana	291.128	19.271.283	48.178.208
1.2.24	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos+ estoque (5%)	gramas/semana	63	253	632
1.3	**PRODUÇÃO DE MACHOS PARA LIBERAÇÃO**				
1.3.1	Densidade larval	Larvas/mL	2,25	2,25	2,25
1.3.2	Quantidade de água por bandeja	mL	3000	3000	3000
1.3.3	Quantidade de larvas por bandeja	Larvas/bandeja	6750	6750	6750
1.3.4	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos	bandejas/semana	543	2.173	5.432
1.3.5	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos - rotatividade	bandejas/semana	1.249	4.998	12.494
1.3.6	Qtde de carrinhos/semana necessária para produção de machos	carrinhos/semana	21	84	209
1.3.10	Qtde de potes/semana necessária para acondicionamento de machos (+ 10%)	Potes/semana	1.100	4.400	11.000
1.3.11	Qtde de potes /semana necessária para acondicionamento de machos (+10%)-rotatividade	Potes/semana	4.400	17.600	44.000
1.4	**CONSUMO-DIETAS**				
1.4.1	Consumo de dieta/larva por lote/colônia	g	0,003	0,003	0,003
1.4.2	Consumo de dieta/lbandeja por lote/colônia	g	9,4	9,4	9,4
1.4.3	Consumo total de dieta/lote/colônia	kg	0,8	3,4	8,5
1.4.4	Consumo de dieta/larva por lote/supressão - Tabela "BMB"	g	0,002	0,002	0,002
1.4.5	Consumo de dieta/bandeja por lote/produção de machos	g	11,5	11,5	11,5
1.4.6	Consumo total de dieta/lote/produção de machos (+15%)	kg	7,2	24,9	62,3
1.4.7	Consumo total de dieta (colônia+produção de machos)	kg	8,0	28,3	70,8
1.4.8	Água (criação larval)+ reposição (pós 1° separação) (+3%)	lts	3.824	15.296	38.241
1.4.9	Consumo de dieta de adulto: algodão	kg	1,8	7,0	17,5
1.4.10	Consumo de dieta de adulto: açúcar	kg	4,0	12,0	30,0
1,5	**RESUMO**				
1.5.1	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos+ estoque (5%)	gramas/semana	63	253	632
1.5.3	Qtde de gaiolas/semana (PVC)	gaiolas/semana	63	251	629
1.5.4	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos	bandejas/semana	543	2.173	5.432
1.5.5	Consumo total de dieta (colônia+produção de machos)	kg	8,0	28,3	70,8
1.5.6	Água (criação larval)+ reposição (pós 1° separação) (+3%)	lts	3.824	15.296	38.241

Figura 26 – Fórmulas utilizadas na planilha básica de planejamento do sistema produtivo (PSP) para a produção de um milhões de machos de *Ae. aegypti*.

ITEM	PARÂMETROS	UNIDADE	QUANTIDADES
1.1	**PRODUÇÃO GERAL**		
1.1.1	Produção de machos/semana	milhões de machos/semana	1
1.1.2	Rendimento L_1-pupa	Porcentagem	0,16
1.1.3	Qtde de larvas/necessárias para recuperar produção de machos (+10%)	larvas	=((1000000)/D5)+(0,1*(1000000)/D5)
1.1.4	N° de ovos/grama	ovos	121000
1.1.5	Taxa de eclosão média (%)	Porcentagem	0,62
1.1.6	Qtde de ovos/necessária para sustentar a produção de machos	ovos	=((D6)/D8)
1.1.7	Qtde de ovos/necessária para sustentar a produção de machos	gramas	=D9/D7
1.2	**MANUTENÇÃO COLÔNIA MATRIZ**		
1.2.1	Densidade larval	Larvas/mL	1
1.2.2	Quantidade de água por bandeja	mL	3000
1.2.3	Quantidade de larvas por bandeja	Larvas/bandeja	=D14*D13
1.2.4	Proporção sexual por gaiola- N° de ♀ para cada	relação/semana	3♀ : 1♂
1.2.5	Produção média de ovos gaiola/vida (1° -3° ciclos)	ovos/semana	36896
1.2.6	Fecundidade fêmea/vida útil (1° -3° ciclos)	ovos/semana	=D17/1500
1.2.7	Rendimento L_1-pupa (fêmeas - 4 coletas/lote)	Porcentagem	0,4
1.2.8	Qtde de fêmeas/necessárias para produção de ovos	fêmeas/semana	=D9/D18
1.2.9	Qtde de gaiolas/semana (PVC)	gaiolas/semana	=D20/3000
1.2.10	Qtde de gaiolas/semana (PVC)-rotatividade	gaiolas/semana	=2*(D20/3000)+ (0,4*D20/3000)
1.2.13	Produção larval para sustentar colônia/semana (4 separações/semana)	larvas/semana	=((D20)/D19)
1.2.14	Qtde de ovos necessária para sustentar a colônia/semana	ovos/semana	=((D23)/D8)
1.2.15	Qtde de ovos necessária para sustentar a colônia/semana	gramas/semana	=D24/D7
1.2.16	Qtde de bandejas/semana necessária para produzir lote de colônia	bandejas/semana	=D23/3000
1.2.17	Qtde de bandejas/semana necessária para produzir lote de colônia -rotatividade	bandejas/semana	=(D26*2)+0,15*((D26*2))
1.2.18	Qtde de carrinho larval/semana necessária para produzir lote de colônia	carrinhos/semana	=D26/26
1.2.19	Qtde de carrinho larval/semana necessária para produzir lote de colônia-rotatividade	carrinhos/semana	=(D28*2)+0,1*((D28*2))
1.2.20	Qtde de carrinho adulto/semana necessária por lote (PVC)	carrinho adulto/semana	=D21/40
1.2.21	Qtde de carrinho adulto/semana necessária por lote (PVC)-rotatividade	carrinho adulto/semana	=(D30*2)+(0,1*(D30*2))
1.2.24	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos	ovos/semana	=D10+D24
1.2.25	Produção total de ovos para sustentar colônia+ produção de machos+ estoque (5%)	gramas/semana	=(D10+D25)+(0,05*(D10+D25))
1.3	**PRODUÇÃO DE MACHOS PARA LIBERAÇÃO**		
1.3.1	Densidade larval	Larvas/mL	2,25
1.3.2	Quantidade de água por bandeja	mL	3000
1.3.3	Quantidade de larvas por bandeja	Larvas/bandeja	=D37*D36
1.3.4	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos	bandejas/semana	=D6/D38
1.3.5	Qtde de bandejas/semana necessária para produção de machos - rotatividade	bandejas/semana	=(2*D39)+(0,15*(2*D39))
1.3.6	Qtde de carrinhos/semana necessária para produção de machos	carrinhos/semana	=D39/26
1.3.10	Qtde de potes/semana necessária para acondicionamento de machos (+ 10%)	Potes/semana	=((D4*1000000)/1000)+0,1*(D4*1000000)/1000
1.3.11	Qtde de potes /semana necessária para acondicionamento de machos (+10%)-rotatividade	Potes/semana	=4*D42
1.4	**CONSUMO-DIETAS**		
1.4.1	Consumo de dieta/larva por lote/colônia	g	0,00313333333333333
1.4.2	Consumo de dieta/lbandeja por lote/colônia	g	=(D46*D15)
1.4.3	Consumo total de dieta/lote/colônia	kg	=((D47*D26)/1000)+0,15*((D47*D26)/1000)
1.4.4	Consumo de dieta/larva por lote/supressão - Tabela "BMB"	g	0,0017
1.4.5	Consumo de dieta/bandeja por lote/produção de machos	g	=(D49*D38)
1.4.6	Consumo total de dieta/lote/produção de machos (+15%)	kg	=((D39*D50)/1000)+0,15*((D39*D50)/1000)
1.4.7	Consumo total de dieta (colônia+produção de machos)	kg	=D48+D51
1.4.8	Água (criação larval)+ reposição (pós 1° separação) (+3%)	lts	=(2*(D26+D39)*(D37/1000))+0,05*((D26+D39)*(D37/1000))
1.4.9	Consumo de dieta de adulto: algodão	kg	=1,75*D4
1.4.10	Consumo de dieta de adulto: açúcar	kg	=4*D4

Tabela 4 – Porcentagem de aumento dos principais parâmetros para a produção de 1 milhão de machos da linhagem MBR-001 em comparação com a linhagem OX513 A.

Parâmetro	Unidade	OX513 A	MBR-001	Aumento (%)
Produção total de ovos	ovos/semana	5.058.712	13.551.814	77
Qtde de gaiolas/semana (PVC)	gaiolas/semana	63	150	139
Qtde de bandejas/semana para produção de ♂	bandejas/semana	543	1.019	88
Consumo total de dieta	kg	8	18	118
Consumo total de água	lts	3.824	8.574	124
Média geral				109

4.2 META II – PADRONIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO EM MASSA

4.2.1 Aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de *Ae. aegypti* e efeito da densidade de insetos na produção de ovos

4.2.1.1 Desenvolvimento e aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de Ae. aegypti

A partir dos aspectos negativos observados na gaiola "*Aedes* MPC" (Figura 9) (*Mass Production Cage*) desenvolvida por Balestrino et al. (2014), como a baixa taxa de alimentação sanguínea das fêmeas, a baixa produtividade de ovos e ainda, a grande deposição de ovos fora dos substratos de oviposição (nas paredes internas da gaiola) (observação pessoal; ZHANG et al., 2018), foi desenvolvida a GCM-II.

A GCM-II foi construída para aperfeiçoar ampliar a área de repouso e aprimorar o sistema de alimentação sanguínea e de coleta. O protótipo é composto por três canaletas (68 cm comprimento x 6,4 cm largura) que podem ser utilizadas tanto para o acondicionamento de pupas, quanto como local para oviposição (Figura 27 A-C). As canaletas foram instaladas para inviabilizar a oviposição nas paredes internas da gaiola. Além disso, a GCM-II pode ser operada com duas diferentes metodologias de alimentação sanguínea, sendo possível a utilização de duas metodologias de forma assíncrona ou ainda, simultânea (Figura 27 B). Para a primeira metodologia, é utilizado um dispositivo (inédito) formado por um par de tubos: 1) tubo interno de alumínio (1.7 cm de diâmetro) para alocação de glicerol aquecido (manutenção da temperatura do sangue em cerca de 37°C- adaptado de Costa-da-Silva et al. (2013) e 2) tubo externo em

PVC (2 cm de diâmetro), para distribuição do sangue. O tubo de PVC possui furos (2,5 cm x 0,5 cm) revestidos com pano tipo voal, para viabilizar o acesso das fêmeas ao sangue oferecido. Já a segunda metodologia de alimentação sanguínea utiliza o sistema de placas de alumínio, de acordo com a metodologia proposta por Carvalho et al. (2014) (item 3.2.1.1)[6]. O teto da GCM -II foi projetado para acomodar até oito placas simultaneamente.

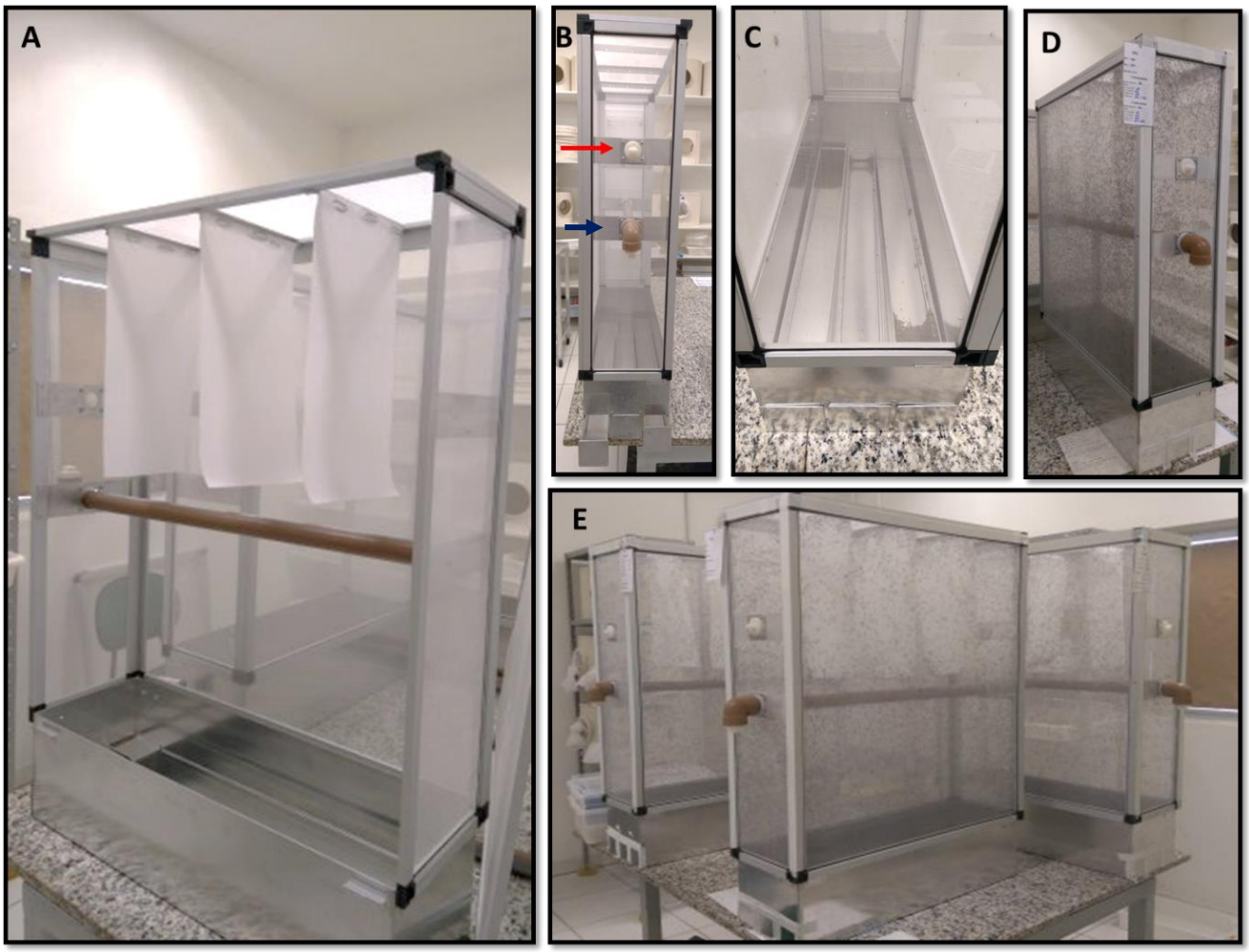
Para ampliar a área da superfície vertical de repouso (RS - *Resting Surface*; Gerberg, 1970) da gaiola, foi instalado no teto do protótipo, três suportes para alocar três tiras de papel filtro (37 cm x 20 cm) (Figura 27 A). Desse modo, a área original de superfície de repouso vertical (18.424 cm^2) foi ampliada em 4.440 cm^2.

Todos os processos de manipulação (inoculação de pupas, oferecimento do substrato para oviposição e alimentação (sacarose ou sanguínea com sistema de tubos), podem ser realizados pela parte frontal da gaiola (Figura 27 B).

A análise comparativa entre as gaiolas com diferentes dimensões (GCM-II e PVC), mas com igual densidade de adultos (0,7 adultos/cm^2 ou DRS: 1.4 cm^2/adulto), não evidenciou diferença significativa tanto na mortalidade, quanto na fecundidade de fêmeas ao longo dos ciclos reprodutivos (Tabela 5). A taxa de mortalidade de fêmeas e a fecundidade total (primeiro e segundo ciclos) também não diferiram entre as gaiolas. Contudo, foi observado que a taxa de eclosão (fertilidade), foi maior na gaiola GCM-II em comparação com a PVC (Tabela 5).

[6] Apesar dos pré-testes indicarem o êxito do sistema de tubos, no experimento para avaliação da GCM-II e do efeito da densidade de adultos (item 3.2.1.2) ele não foi utilizado, buscando padronizar o método de alimentação sanguínea entre as gaiolas, uma vez que na gaiola PVC apenas o sistema de placas pode ser utilizado.

Figura 27 - Protótipo da Gaiola de Criação em Massa (GCM-II).



Estrutura e funcionamento geral da GCM-II-II. A: Visão lateral- com a tela direita removida para manipulação e papéis para superfície de repouso instalados. B: Visão frontal – central de manipulação: entradas para tubo de alimentação sanguínea pode ser visualizada (seta vermelha) e para solução de sacarose (seta azul). C:Visão frontal- com canaletas preenchidas com água e pupas. D: Visão lateral-frontal da gaiola com mosquitos adultos. E: Experimento em andamento com diferentes DRS. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Mortalidade, fecundidade das fêmeas e taxa de eclosão em diferentes gaiolas de criação em massa.

Gaiola	Mortalidade (♀)			Fecundidade (ovos/♀)			Taxa de eclosão (%)
	1° ciclo	2° ciclo	Total	1° ciclo	2° ciclo	Total	1° ciclo
GCM-II	0,22 ± 0,04 [a]	0,39 ± 0,06 [a]	0,61 ± 0,09 [a]	33,28 ± 13,37 [a]	32,94 ± 15,97 [a]	66,21 ± 26,49 [a]	74,36 ± 1,46 [a]
PVC	0,11 ± 0,02 [a]	0,21 ± 0,02 [a]	0,33 ± 0,03 [a]	22,40 ± 0,71 [a]	18,78 ± 8,41 [a]	41,18 ± 8,93 [a]	64,56 ± 1,17 [a]
gl	4	4	4	4	4	4	28
p valor	0,13	0,11	0,10	0,23	0,25	0,20	p<0,01

As colunas representam a média de cada parâmetro ± erro padrão, em gaiolas de criação em massa mantidas com a mesma densidade de adultos. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (Teste T, p<0,05).

4.2.1.2 Efeito da densidade de adultos para a produção em massa de ovos

As densidades de adultos para gaiolas de criação em massa foram determinadas a partir do fator denominado "DRS" [7](do termo em inglês *Density Resting Surface*), que considera o número de adultos por superfície de repouso vertical (GERBERG 1970; BALESTRINO et al., 2014). Quatro DRS foram avaliadas: 2,0; 1,7; 1,4 e 1,0 (cm^2/adulto) (Tabela 6). A escolha da DRS 1.7 baseou-se nos resultados obtidos por Balestrino et al., (2014) para *Ae. albopictus*. Já a definição do DRS 1.4 foi fundamentada no atual protocolo de criação em massa da Moscamed Brasil para *Ae. aegypti*. O DRS 1.0, por sua vez, foi citado por Balestrino et al., (2014) como a densidade máxima para *Ae. albopictus*.

As gaiolas foram montadas de acordo com a Tabela 6, seguindo a proporção de 1♂:1♀. Após a emergência dos adultos foi avaliada a mortalidade de pupas nos dispositivos de inoculação usados na gaiola PVC. No quinto dia após a emergência dos adultos, a alimentação sanguínea foi oferecida para fêmeas mantidas em ambos tipos de gaiola.

Tabela 6 – Dimensões das gaiolas GCM-II-II e PVC, DRS avaliados e número equivalente de adultos utilizados para criação em massa de *Ae. aegypti*, linhagem Rockefeller.

Gaiola	**Medidas (cm)**	**Área de superfície de repouso (cm^2)**	**DRS**	**N° de mosquitos ♀**	**N° de mosquitos ♂**	**N° total de mosquitos**
PVC	15 x 30 (R x A)	2.826	2.0	700	700	1400
			1.7	850	850	1700
			1.4	1.000	1.000	2000
			1.0	1.400	1.400	2800
GCM-II	70 x 98 x 24 (C x A x L)	22.864	2.0	5.750	5.750	11500
			1.7	6.750	6.750	13.500
			1.4	8.000	8.000	16000
			1.0	11.000	11.000	22000

* R (Raio); C (Comprimento); A (Altura); L (Largura)

A densidade de fêmeas pré-oviposição foi estimada a partir da razão entre adensidade inicial de fêmeas na área lateral de cada tratamento (fêmeas/cm^2) e a

[7] A DRS é calculada a partir da fórmula DRS= RS/D, em que "RS" representa a área de superfície vertical de repouso, e "D", a densidade populacional de mosquitos na gaiola. A área de superfície de repouso é calculada em cm^2, a partir dos quatro lados da mesma, desconsiderando o topo e chão da gaiola (GERBERG 1970).

densidade avaliada pré-oviposição. Assim, uma razão estimada de 0,5 para a avaliação do primeiro ciclo gonotrófico, por exemplo, revelou uma redução de metade do número inicial de fêmeas na gaiola.

Após 72 h do repasto sanguíneo, foi ofertado o substrato de oviposição para as gaiolas PVC e GCM-II. Para ambos modelos de gaiolas, foram aguardadas 72 horas como período para a oviposição das fêmeas. Em seguida, as posturas foram retiradas, e os ovos, manipulados. A produção de ovos [8] em cada tratamento foi avaliada através da pesagem das amostras em balança de precisão (Toledo Ohaus, precisão de 0,001 g).

O segundo repasto sanguíneo foi realizado um dia após a retirada das posturas do primeiro ciclo gonotrófico, o que correspondeu ao início do segundo ciclo gonotrófico. Para avaliar a taxa de eclosão, quinze amostras (1 mL cada) de cada tratamento (item 3.2.1.2) foram utilizadas. A taxa de eclosão foi avaliada apenas para ovos recuperados durante o primeiro ciclo.

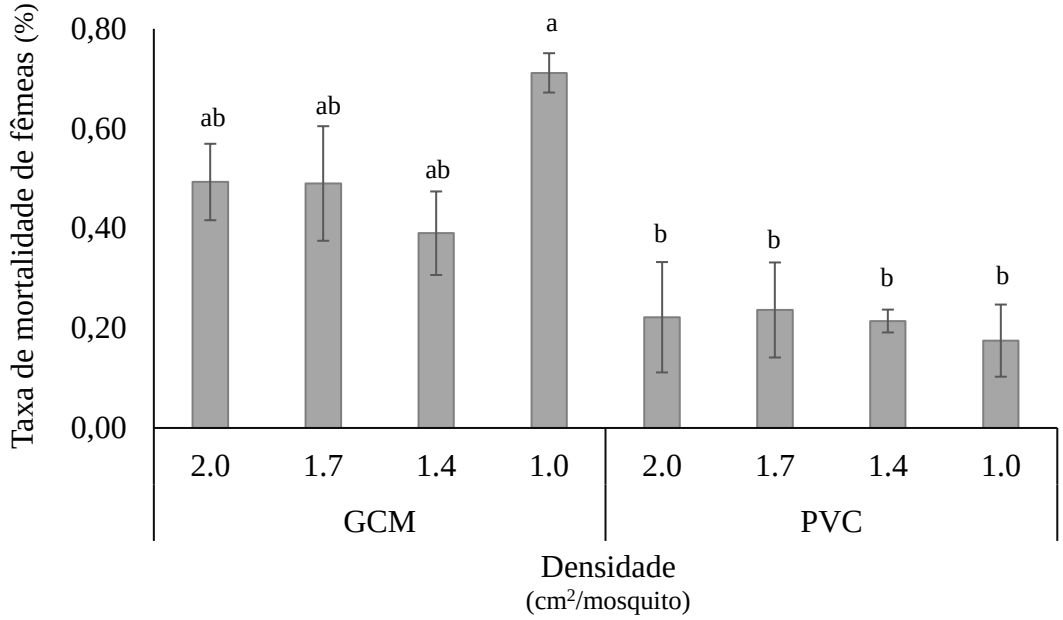
O experimento foi conduzido em triplicata biológica, sendo que para cada DRS avaliada, foram montadas três GCM-II e três gaiolas PVC como controle.

No que se refere ao comportamento da mortalidade de fêmeas ao final dos ciclos reprodutivos, observou-se uma amplitude entre 21 e 71%, sendo constatadas diferenças significativas foram entre as DRS avaliadas (X^2 =23,56, p<0,05), A maior mortalidade de adultos foi observada na GCM-II quando utilizada a DRS de 1.0 (71%). Grande parte dessa mortalidade ocorreu previamente à primeira oviposição (46%) dos adultos. No entanto, quando utilizada a mesma DSR na gaiola de PVC, a mortalidade atingiu um valor médio de 18 % (Figura 28).

Dentre as gaiolas GCM-II, verificou-se que não houve diferenças significativas entre as DRS avaliadas, apesar deste parâmetro variar entre 40 e 70% (Figura 28). Para as gaiolas de PVC, a DRS também não influenciou no comportamento da mortalidade de fêmeas. Diferentemente do resultado observado nas gaiolas GCM-II, este parâmetro oscilou em média entre 18 a 22%. De forma geral, a mortalidade média nestas gaiolas foi 50% menor em relação às gaiolas GCM-II.

[8]Para a linhagem Rockefeller, foi estimada uma média de 105.000 ovos por grama. Fonte: Arquivo, BMB.

Figura 28 – Mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* em gaiolas de criação em massa sob diferentes densidades ao final de dois ciclos reprodutivos.



As colunas representam a taxa de mortalidade acumulada de fêmeas ± erro padrão. Colunas com letras diferentes diferem entre si (Teste de Van der Waerden, $p<0,05$).

A produção de ovos durante o primeiro ciclo gonotrófico foi superior em relação ao segundo ciclo para todas a DRS testadas tanto nas gaiolas GCM-II quanto nas de PVC. Apenas para a DRS 2.0 (PVC) registrou-se um ligeiro aumento deste parâmetro biológico no segundo ciclo gonotrófico (Tabela 7). Nas gaiolas GCM-II, houve uma redução de 20-30% no número de ovos produzidos entre o primeiro e segundo ciclo reprodutivo. Por outro lado, nas gaiolas PVC, a redução foi diretamente proporcional à densidade de adultos. Sendo assim, as gaiolas PVC com densidades maiores de adultos (DRS 1.7, 1.4 e 1.0) apresentaram uma redução de 10, 20 e 40%, respectivamente (Tabela 7).

A maior produção total de ovos para as gaiolas GCM-II registrou-se quando utilizada a DRS 1.4 (~377.000), enquanto a menor foi constatada com a DRS 2.0 (~212.000). Tais resultados revelam uma redução de 40 % na produtividade como consequência da diminuição do número de mosquitos nas gaiolas. Por outro lado, na gaiola PVC, a DRS 1.0 acarretou em uma maior produção de ovos (~47.000), quando comparado as demais DRS avaliadas (Tabela 7).

Considerando que para um mesmo DRS, cada gaiola GCM-II é equivalente em número de mosquitos à oito gaiolas PVC[9], constatou-se que o uso da DRS 1.4 (cm^2/mosquito) na GCM-II acarretou numa produção de ovos equivalente à 11 gaiolas PVC, ou seja, superando a produção de ovos prevista. As DRS 2.0 e 1.0, por sua vez, evidenciaram uma produção inferior, análoga à seis gaiolas PVC (Tabela 7).

Com relação ao primeiro ciclo reprodutivo, houve diferença na fecundidade das fêmeas provenientes das diferentes gaiolas e densidades ($F_{(3,14)=}$ 8,19; $p<0,05$). A fecundidade das fêmeas mantidas nas GCM-II sob DRS 1.7 e 2.0 diferiram entre si, com esta última densidade registrando a menor fecundidade (Teste de Tukey, $p<0,05$). Não houve diferença entre as demais DRS no que se refere a este parâmetro biológico. Nas gaiolas PVC, a fecundidade foi semelhante entre todas as densidades avaliadas (Tabela 7). Quando analisado o segundo ciclo, observou-se que não houve influência da DRS e do tipo de gaiola de criação na fecundidade das fêmeas($F_{(3,14)=}$ 4,69; $p=0,051$),

A fecundidade total não variou entre as DRS avaliadas na GCM-II, contudo, as densidades de 1.7 e 1.4 cm^2/mosquito dessa gaiola, apresentaram maior fecundidade em comparação com as DRS 1.4 e 1.0 nas gaiolas PVC ($F_{(3,8)=}$ $_{7,84}$; $p<0,05$) (Teste de Tukey, $p<0,05$) (Tabela 7). Além disso, nas gaiolas PVC, a fecundidade foi inversamente proporcional à densidade de insetos utilizada.

[9]Ex.: N° total de indivíduos da GCM-II DRS 1.0/ N° total de indivíduos da PVC DRS 1.0 = 8

Tabela 7 – Número de fêmeas vivas, redução da sobrevivência (%), produção de ovos por gaiola e fecundidade das fêmeas ao longo dos ciclos reprodutivos em gaiolas de criação em massa com diferentes DRS.

Gaiola	DRS	Ciclo gonotrófico	N° ♀ (inoculado)	N° ♀ (vivas)	Redução sobrevivência ♀ (%) *	Produção ovos/gaiola (10^3)	Fecundidade (ovos/♀)
GCM-II	2.0	1°	5.750	4.535	21	117 ± 50	24 ± 14 bc
	1.7		6.750	5.068	25	169 ± 34	35 ± 15 a
	1.4		8.000	6.230	22	205 ± 46	33 ± 13 ab
	1.0		11.000	5.970	46	155 ± 8	26 ± 3 abc
PVC	2.0		700	613	12	18 ± 1	29 ± 2 abc
	1.7		850	731	14	19 ± 4	26 ± 6 abc
	1.4		1.000	888	11	20 ± 1	22 ± 1 c
	1.0		1.400	1.245	11	29 ± 5	24 ± 7 bc
GCM-II	2.0	2°	5.750	2.915	28	95 ± 33	32 ± 17 a
	1.7		6.750	3.442	24	121 ± 39	33 ± 10 a
	1.4		8.000	4.878	17	173 ± 66	33 ± 16 a
	1.0		11.000	3.171	25	113 ± 38	33 ± 15 a
PVC	2.0		700	545	10	18 ± 4	33 ± 8 a
	1.7		850	649	10	17 ± 3	26 ± 6 a
	1.4		1.000	786	10	15 ± 4	19 ± 8 a
	1.0		1.400	1.155	6	18 ± 2	15 ± 2 a
GCM-II	2.0	Ambos**	5.750	2.835	49	212 ± 67	56 ± 16 abc
	1.7		6.750	3.308	49	290 ± 57	68 ± 14 a
	1.4		8.000	3.122	39	377 ± 106	66 ± 26 a
	1.0		11.000	7.829	71	267 ± 36	59 ± 14 abc
PVC	2.0		700	155	22	36 ± 5	62 ± 6 ab
	1.7		850	201	24	36 ± 7	52 ± 12 abc
	1.4		1.000	214	21	35 ± 5	41 ± 9 bc
	1.0		1.400	245	18	47 ± 7	39 ± 9 c

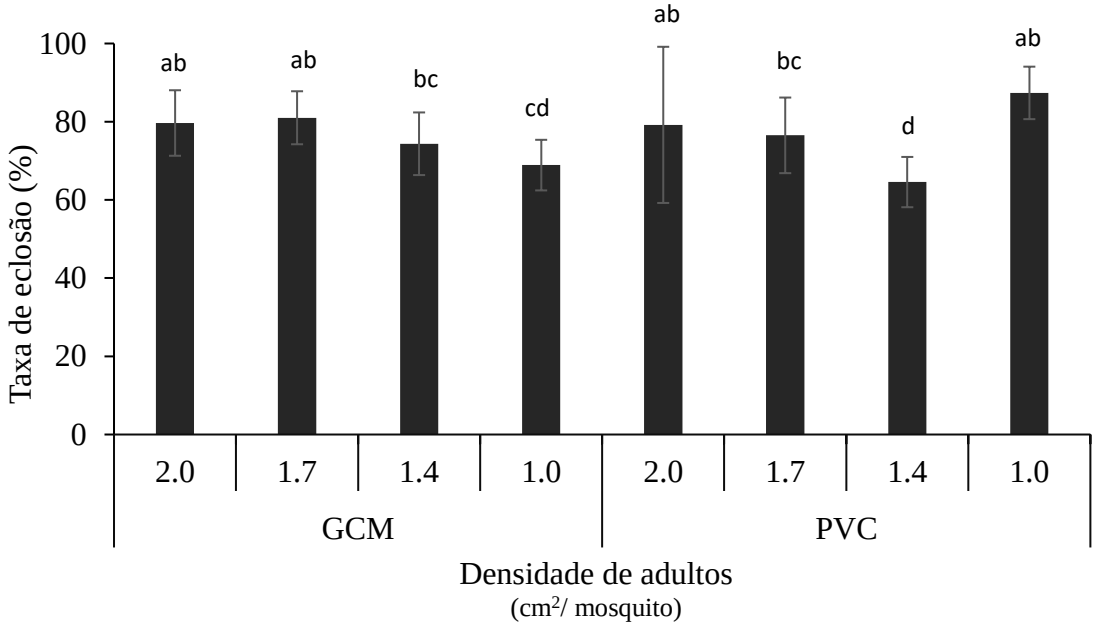
As colunas representam a média de cada parâmetro ± erro padrão, em gaiolas de criação em massa com diferentes densidades de criação de adultos. Para o parâmetro "fecundidade", médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (Teste de Tukey, $p<0,05$). Somente tratamentos do mesmo ciclo reprodutivo foram comparados entre si. Demais parâmetros não foram estatisticamente analisados.

*Redução entre o número inicial de fêmeas vivas e o ciclo reprodutivo correspondente.

** Somatório dos valores de cada parâmetro para ambos ciclos reprodutivos. Representa a totalidade por gaiola.

Foram observadas diferenças significativas na taxa de eclosão (fertilidade) entre as diferentes DRS avaliadas ($F_{(3,102)=}$ 18,54; $p<0,05$). Nas GCM-II, o aumento da densidade de adultos afetou a taxa de eclosão, uma vez que a taxa de eclosão foi superior nos tratamentos com menor densidade (DRS 2.0 e 1.7) (Teste de Tukey, $p<0,05$). No entanto, o mesmo padrão não foi observado nas gaiolas PVC, pois somente a DRS 1.4 apresentou taxa de eclosão inferior aos demais tratamentos (Teste de Tukey, $p<0,05$) (Figura 29).

Figura 29 - Taxa de eclosão (± erro padrão) das larvas provenientes de ovos produzidos sob diferentes DRS.



Taxa de eclosão dos ovos (± erro padrão) provenientes da criação em dois modelos de gaiolas de criação em massa, sob diferentes DRS. As colunas representam a taxa de eclosão média s ± erro padrão de ovos produzidos no primeiro ciclo gonotrófico, para cada DRS avaliado. Colunas com letras diferentes diferem entre si (Teste de Tukey, $p<0,05$).

Todas as análises referentes aos efeitos da densidade de adultos foram realizadas considerando o fator "repetição" como efeito fixo, uma vez que estas interações poderiam ser relevantes para a compreensão dos resultados obtidos. O efeito "repetição" apresentou interação significativa em todos os parâmetros, exceto para sua interação com o fator DRS na fecundidade do 2° ciclo (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Efeito das interações de segundo nível avaliadas.

Avaliação	Fatores	GL	X^2	p-valor
Mortalidade de fêmeas	DRS	3	8,01	0,05
	Gaiola	1	8,81	<0,01
	Rodada	1	59,62	<0,01
	Gaiola x Rodada	1	7,51	<0,01
	DRS x Rodada	3	3,41	0,34
	Total			

Interações testadas via ANOVA do Modelo Linear Generalizado (GLM) com interações de segundo nível considerando "Replicata" como efeito fixo.

Tabela 9 – Efeito das interações de segundo nível avaliadas.

Avaliação	Fatores	GL	F	p-valor
Fecundidade 1° ciclo	DRS	3	3,91	0,07
	Gaiola	1	12,54	0,02
	Rodada	2	23,34	<0,01
	Gaiola x Rodada	2	21,96	<0,01
	DRS x Rodada	6	9,92	0,01
	Total			
Fecundidade 2° ciclo	DRS	3	3,61	0,08
	Gaiola	1	24,35	<0,01
	Rodada	2	22,09	<0,01
	Gaiola x Rodada	2	12,07	<0,01
	DRS x Rodada	6	3,38	0,08
	Total	23		
Fecundidade Total	DRS	3	4,35	0,06
	Gaiola	2	33,14	<0,01
	Rodada	1	19,41	<0,01
	Gaiola x Rodada	2	10,10	0,01
	DRS x Rodada	6	5,28	0,03
	Total	23		
Taxa de eclosão	DRS	3	10,76	<0,01
	Gaiola	1	0,42	0,52
	Rodada	2	15,69	<0,01
	Gaiola x Rodada	2	10,95	<0,01
	DRS x Rodada	6	4,64	<0,01
	Total	119		

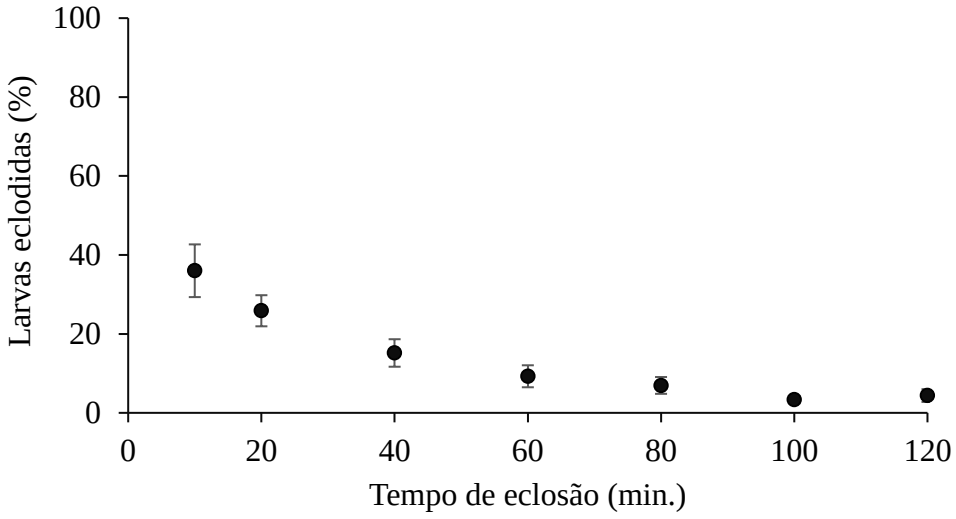
Interações testadas via ANOVA do Modelo Linear Generalizado (GLM) com interações de segundo nível considerando "Replicata" como efeito fixo.

4.2.2 Avaliação da sincronização da eclosão de larvas machos e fêmeas

O experimento foi conduzido para avaliar se devido à protandria, larvas machos eclodiriam antecipadamente em relação às fêmeas. Foi avaliado o número de larvas machos e fêmeas eclodidas a cada intervalo de tempo preestabelecido (10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos) durante o processo de eclosão. O experimento foi realizado em triplicata, com três vezes lotes biológicos diferentes.

Houve correlação entre a porcentagem de larvas eclodidas e os intervalos de tempo de eclosão avaliados ($r = -0,72$; $p < 0,01$) (Figura 30). A maioria das larvas (86%) eclodiu durante os primeiros 60 minutos.

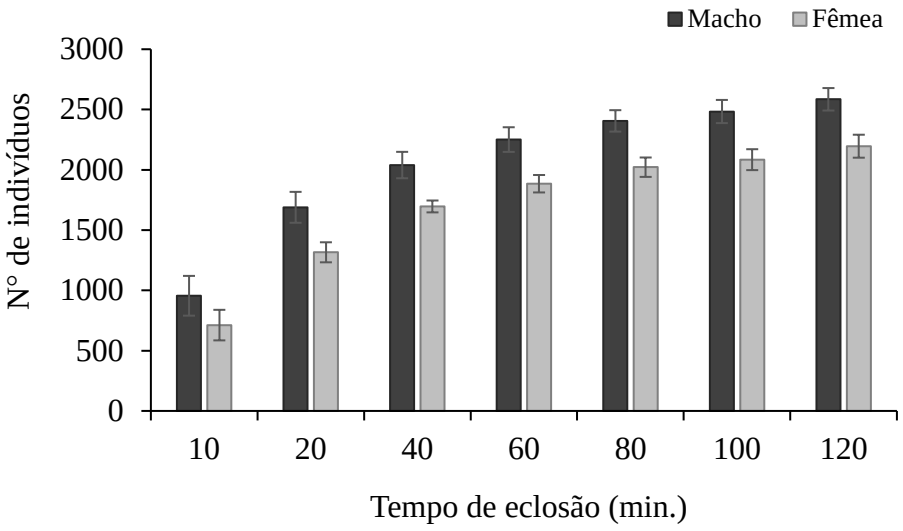
Figura 30 - Padrão de eclosão de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, sob condições artificiais, em relação ao tempo.



Larvas eclodidas (%) ± erro padrão em cada intervalo de eclosão avaliado. O número de indivíduos eclodidos se correlacionou com o tempo (r= -,072).

Não houve interação entre o número de indivíduos de cada sexo e os intervalos de eclosão avaliados (ANOVA: $F_{(6,112)}=0,14$; $p=0,99$), ou seja, o padrão de eclosão de machos e fêmeas foi semelhante ao longo dos intervalos de tempo avaliados (Figura 31).

Figura 31 – Padrão de eclosão de machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, sob condições artificiais, em relação ao tempo.



As colunas representam o total de indivíduos de cada sexo eclodidos até o intervalo de tempo avaliado ± erro padrão. O número de machos e fêmeas não diferiu com os intervalos de tempo (ANOVA, p>0,05).

4.2.3 Desenvolvimento de dietas larvais alternativas para criação larval

Foram formuladas seis dietas com produtos processados em território nacional. Para tanto, diferentes proporções de proteína (P) e carboidrato (C) foram utilizadas, considerando a composição nutricional de cada ingrediente descrita no rótulo dos ingredientes utilizados ou na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011). Para o preparo das dietas (Tabela 10), os ingredientes foram triturados, quando necessário (triturador para grãos de café) e peneirados para padronizar o tamanho das partículas. Em seguida, a quantidade de cada ingrediente foi pesada em balança de precisão e transferido para um recipiente para o preparo de 200 g de cada dieta. Então, cada recipiente foi agitado manualmente por 25 vezes, para homogeneizar os ingredientes da dieta.

A larvas foram alimentadas diariamente com as formulações desenvolvidas. Baseado em resultados de testes preliminares, determinou-se que para evitar a mortalidade larval por outros fatores que não a dieta, que a temperatura da água na bandeja de criação fosse estável, mantendo-se em 27 °C ± 1 °C. A partir do 5° dia de

criação, as bandejas foram examinadas em dois períodos diurnos para registro do início da formação das pupas. A partir do surgimento dos primeiros indivíduos nessa fase de vida, aguardou-se 24 hs para realização da primeira coleta. As pupas foram coletadas diariamente durante três dias consecutivos (72 hs). A cada dia de coleta, 30 pupas de cada sexo foram pesadas em balança de precisão e 30 pupas machos foram acondicionadas em tubos para avaliação da emergência do adulto.

Tabela 10 - Composição das dietas alternativas avaliadas para o desenvolvimento larval de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001.

Ingredientes	**Dietas**						
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**Controle**
Farinha de aveia	10	31	5	10	30	3	0
Clara de ovo em pó	0	0	0	10	4	34	0
Farinha de soja torrada	30	20	3	20	15	23	0
Farinha de trigo	0	0	0	10	9	5	0
Gema de ovo em pó	30	5	80	20	4	14	0
Farinha de grão-de-bico	5	24	5	10	23	5	0
Levedura de cerveja em pó	25	20	7	20	15	16	0
Sera Vipan®	0	0	0	0	0	0	100
Total (g)	**100**	**100**	**95**	**100**	**100**	**100**	**100**
Proporção P:C	1:1	1:2	2:1	1:1	1:2	2:1	46,2% P*

As colunas representam a porcentagem do componente para cada 100 gramas de dieta

*Ingredientes informados pelo fabricante da Sera Vipan®: farinha de peixe, farinha de trigo, levedura de cerveja, caseinato de Ca, gammarus, ovo inteiro em pó, mananoligossacarídeos (0,4%), óleo de fígado de bacalhau, spirulina, ervas, alfafa, urtiga, farinha de mexilhão, algas marinhas, salsa, páprica, espinafre, alho, cenoura. Principais constituintes: 46,2% de proteína bruta; 8,9% Gordura bruta.

4.2.3.1 Efeito das dietas no tempo de duração larval e sobrevivência das fases imaturas

O tempo de desenvolvimento larval e a sobrevivência L_1-pupa não diferiram entre as dietas avaliadas (Kruskal Wallis: $H_{(6)} = 3,06$; $p = 0,80$) e a sobrevivência L_1-pupa ($H_{(6)} = 10,12$; $p = 0,12$) (Tabela 11). Porém, houve diferenças significativas entre os tratamentos em relação à porcentagem de pupas que sobreviveram após a metamorfose (larva-pupa) ($H_{(6)} = 29,44$; $p < 0,01$). Apesar do balanço P:C ser similar entre as dietas III e VI, ambas foram diferentes no que se refere a este parâmetro biológico, uma vez que a dieta III apresentou menor taxa de sobrevivência de pupas (77%) (Teste de Mann-Whitney $p < 0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Duração larval (dias) e sobrevivência dos estágios imaturos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidos em diferentes dietas larvais.

Dieta *	Proporção P:C*	Tempo de desenvolvimento L_1-pupa (dias)	Sobrevivência L_1-pupa (%)	Sobrevivência de pupas (%)
I	1:1	6,2 ± 0,29	0,95 ± 0,04	0,92 ± 0,04 ab
II	1:2	6,5 ± 0,25	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,00 a
III	2:1	6,5 ± 0,16	0,94 ± 0,03	0,77 ± 0,08 b
IV	1:1	6,7 ± 0,14	1,00 ± 0,00	0,97 ± 0,02 ab
V	1:2	6,8 ± 0,22	0,97 ± 0,02	1,00 ± 0,00 a
VI	2:1	6,6 ± 0,25	0,89 ± 0,05	0,99 ± 0,01 ab
Controle	-	6,6 ± 0,20	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,00 a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (Teste de Mann-Whitney; $p<0,05$). Somente tratamentos da mesma coleta foram comparados entre si.T= 29 ± 1ºC, UR= 80 ± 5%, fotofase 12 h.
*Proporção Proteína:Carboidrato

4.2.3.2 Rendimento diário, peso, razão sexual e emergência

O rendimento total de pupas (machos e fêmeas) foi influenciado pelas dietas (ANOVA: $F_{6,69}=4,96$; $p<0,01$) no primeiro dia de coleta. A recuperação de pupas de ambos os gêneros na dieta VI foi menor em relação às dietas I e II. Além disso, as dietas I (47 %) e II (54 %) apresentaram rendimento total superior ao obtido com a dieta Controle (32 %) (Teste de Tukey, $p<0,05$) (Tabela 12).

O rendimento de pupas machos registrado na primeira coleta (24 hs) para as dietas I, II, IV e V foi significativamente maior que o constatado para a dieta controle (ANOVA: $F_{6,69}= 5,35$; $p<0,001$) (Tabela 13). Nesta mesma coleta, a dieta larval também afetou o rendimento de pupas fêmeas (ANOVA: $F_{6,69}=3,74$; $p<0,05$), com a dieta VI, que contém maior proporção de proteína, apresentando menor rendimento em comparação com as dietas I e II (Tabela 12).

Considerando o segundo dia de coleta (48 hs), não houve influência da dieta larval no rendimento total de pupas (ANOVA: $F_{6,69}=0,87$; $p=0,52$) (Tabela 12). Tanto para machos (ANOVA: $F_{6,75}=1,72$; $p=0,13$) quanto para fêmeas (ANOVA: $F_{6,69}=1,10$; $p=0,372$) também não foram constadas diferenças significativas dos gêneros com relação a este parâmetro biológico (Tabela 12).

O peso médio de pupas machos diferiu entre as dietas, tanto na primeira (ANOVA: $F_{6,66}= 4,93$; $p<0,05$) quanto na segunda coleta (ANOVA: $F_{6,66=} 3,88$; $p<0,001$) (Tabela

12). Na primeira coleta, pupas machos provenientes das dietas I e III apresentaram maior peso corporal em relação à dieta controle (Teste de Tukey, gl=66, $p<0,05$). Na segunda coleta (48 hs), o peso das pupas machos diferiu somente entre as dietas III (2,07 mg) e Controle (1,72 mg).

A composição das dietas também influenciou o peso corporal das pupas fêmeas, tanto na primeira (ANOVA: $F_{6,69=}$ 6,70; $p<0,05$), quanto na segunda coleta (ANOVA: $F_{6,66=}$ 6,51; $p<0,05$). Pupas fêmeas coletadas no primeiro dia e desenvolvidas na dieta III apresentaram peso corporal consideravelmente maior (3,24 mg) em relação aos insetos desenvolvidos nas dietas II (2,76 mg), V e Controle (2,60 mg). Na segunda coleta, observou-se o mesmo padrão de comportamento com relação aos pesos de pupas fêmeas (Teste de Tukey, $p<0,05$) (Tabela 12).

A razão sexual das progênies de pupas recuperadas na primeira coleta (24 hs) foi semelhante entre as dietas larvais testadas (ANOVA: $F_{6,69=}1,64$; $p=0,15$). Na segunda coleta, constatou-se que houve diferença entre as seis dietas alternativas testadas em relação a razão sexual. As dietas I (0,27) e II (0,23) diferiram da dieta Controle (0,44) no que se refere a este parâmetro biológico **(**ANOVA: $F_{6,68}=4,06$; $p<0,05$) (Tabela 12).

A emergência dos machos provenientes de pupas recuperadas no primeiro ($H_{(6)}=10,76$; $p=0,09$) e segundo dia ($H_{(6)}=8,56$; $p=0,20$) seguiu um padrão semelhante e não foi afetada pela composição da dieta larval.

Tabela 12 - Parâmetros biológicos e de produção (média ± EP) de pupas de *Aedes aegypti*, linhagem MBR-001, criadas em diferentes dietas larvais.

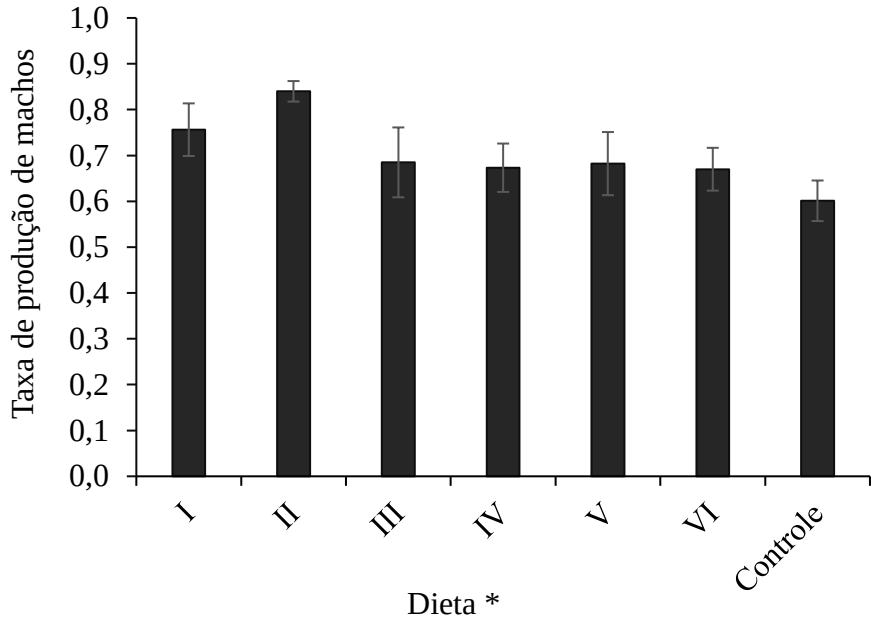
Dieta	Proporção P:C	Coleta	Rendimento pupa total (♂+♀)	Rendimento pupa (♂)	Rendimento pupa (♀)	Peso pupa (♂) (mg)	Peso pupa (♀) (mg)	Razão sexual (♂/♂+♀)	Taxa de emergência (♂)
I	1:1	1° (24 hs)	0,47 ± 0,07 ab	0,30 ± 0,04 ab	0,17 ± 0,04 a	2,04 ± 0,02 ab	3,16 ± 0,08 ab	0,63 ± 0,05 a	0,97 ± 0,02 a
II	1:2		0,54 ± 0,03 ab	0,40 ± 0,02 a	0,15 ± 0,01 ab	1,90 ± 0,02 abc	2,76 ± 0,04 bc	0,73 ± 0,02 a	0,99 ± 0,02 a
III	2:1		0,29 ± 0,05 bc	0,20 ± 0,03 b	0,09 ± 0,02 abc	2,11 ± 0,08 a	3,24 ± 0,09 a	0,70 ± 0,05 a	0,91 ± 0,03 a
IV	1:1		0,38 ± 0,04 abc	0,28 ± 0,03 ab	0,10 ± 0,02 abc	1,96 ± 0,03 abc	2,85 ± 0,05 abc	0,76 ± 0,03 a	0,99 ± 0,01 a
V	1:2		0,39 ± 0,04 abc	0,29 ± 0,03 ab	0,10 ± 0,02 abc	1,80 ± 0,04 c	2,60 ± 0,06 c	0,76 ± 0,03 a	0,99 ± 0,00 a
VI	2:1		0,24 ± 0,05 c	0,19 ± 0,04 b	0,05 ± 0,01 c	2,00 ± 0,10 abc	3,02 ± 0,24 abc	0,75 ± 0,04 a	0,99 ± 0,01 a
Controle	-		0,32 ± 0,03 bc	0,24 ± 0,02 b	0,08 ± 0,01 bc	1,84 ± 0,04 bc	2,69 ± 0,05 c	0,74 ± 0,02 a	0,96 ± 0,03 a
I	1:1	2° (48 hs)	0,27 ± 0,06 a	0,09 ± 0,03 a	0,18 ± 0,03 a	1,95 ± 0,13 ab	3,08 ± 0,04 a	0,27 ± 0,05 cb	0,96 ± 0,03 a
II	1:2		0,23 ± 0,02 a	0,06 ± 0,01 a	0,18 ± 0,02 a	1,83 ± 0,02 ab	2,62 ± 0,04 bc	0,23 ± 0,02 c	0,98 ± 0,01 a
III	2:1		0,22 ± 0,05 a	0,07 ± 0,03 a	0,15 ± 0,02 a	2,07 ± 0,03 a	3,07 ± 0,09 a	0,31 ± 0,05 abc	0,89 ± 0,05 a
IV	1:1		0,31 ± 0,03 a	0,12 ± 0,02 a	0,19 ± 0,02 a	1,86 ± 0,03 ab	2,85 ± 0,07 abc	0,38 ± 0,04 abc	0,96 ± 0,01 a
V	1:2		0,24 ± 0,02 a	0,10 ± 0,02 a	0,14 ± 0,01 a	1,79 ± 0,02 b	2,57 ± 0,07 c	0,40 ± 0,04 abc	0,99 ± 0,00 a
VI	2:1		0,24 ± 0,05 a	0,10 ± 0,02 a	0,14 ± 0,03 a	1,93 ± 0,08 ab	3,01 ± 0,22 ab	0,41 ± 0,04 abc	0,97 ± 0,01 a
Controle	-		0,28 ± 0,02 a	0,13 ± 0,01 a	0,15 ± 0,01 a	1,72 ± 0,05 b	2,58 ± 0,07 c	0,44 ± 0,03 a	0,99 ± 0,01 a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (Teste de Tukey p<0,05). Somente tratamentos da mesma coleta foram comparados entre si. T= 29 ± 1ºC, UR= 80 ± 5%, 12:12 (claro:escuro).
P:C- Proteína:Carboidrato

4.2.3.3 Taxa de produção e rendimento acumulado de pupas machos

A taxa de produção de pupas machos em 24 horas não diferiu entre as dietas avaliadas, seja na primeira coleta realizada após 24 horas do início da formação de pupas **(**$F_{6,69}$=1,84; p=0,103) (Figura 32). Os resultados indicaram que aproximadamente 70 % dos machos são produzidos nas primeiras 24 horas após o início da formação das pupas.

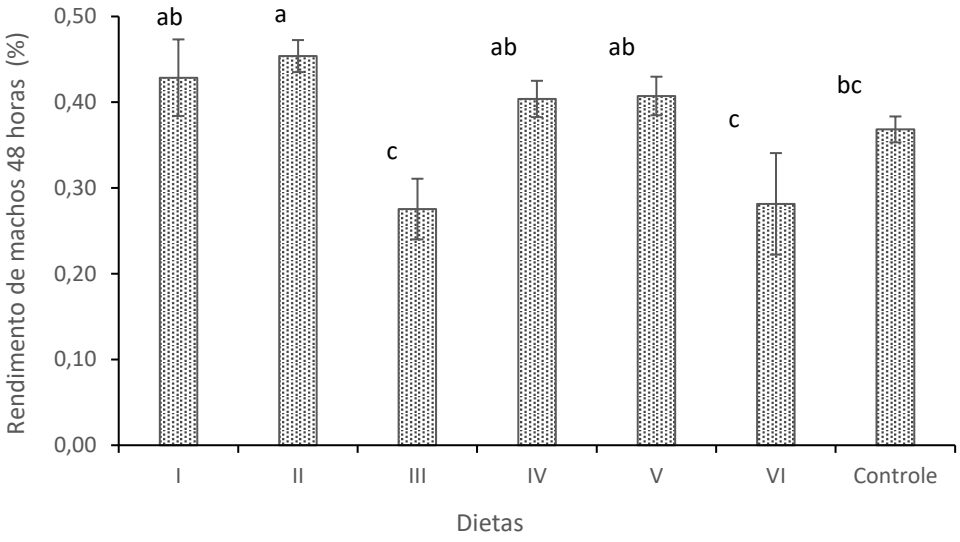
Figura 32 - Taxa de produção de machos de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001 desenvolvidas em diferentes dietas de criação larval.



As colunas representam a média ± erro padrão. A criação dos indivíduos foi realizada em sala com condições controladas (29±1ºC; RH=80 ±05%; fotoperíodo 12:12 claro:escuro).

Foram observadas diferenças entre as dietas testadas em relação ao rendimento acumulado de machos (primeira e segunda coletas) ($H_{(6)}$ =16,89 p<0,05). A criação larval com a dieta II (45%) acarretou em um maior rendimento acumulado de machos (45%) quando comparada à dieta controle (37%). A menor recuperação de machos foi evidenciada com a utilização das dietas III e VI (28%), que possuem maior proporção de proteína. Entretanto, essas dietas não diferiram da dieta controle, (Teste de Mann-Whitney, p<0,05) (Figura 33).

Figura 33 - Rendimento acumulado de machos de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidos em diferentes dietas larvais.



As colunas representam a média ± erro padrão. Colunas seguidas por letras diferentes diferem entre si (Teste de Mann-Whitney p<0,05). A criação dos indivíduos foi realizada em sala com condições controladas (29±1ºC; RH=80 ±05%; fotoperíodo 14:10 (claro:escuro). *Proporção Proteína:Carboidrato de cada dieta: I: (1:1); II (1:2); III (2:1); IV (1:1); V (1:2); VI (2:1)

4.2.3.4 Relação custo-benefício para a produção em massa com a utilização das dietas alternativas desenvolvidas

Com base nos resultados obtidos, estimou-se a relação custo-benefício para uma produção de um milhão de pupas machos, considerando o rendimento acumulado de machos (duas primeiras coletas) obtido para cada dieta avaliada. A tabela 13 apresenta tal relação em comparação com a dieta controle.

Todas as dietas tiveram desempenho similar ou superior à dieta Controle. Pode-se observar que os menores custos com dieta larval correspondem às dietas II, V e I, respectivamente. As dietas III e VI apresentaram relação custo-benefício inferior quando comparada às demais. Contudo, todas as dietas avaliadas apresentaram custo inferior quando comparado à dieta controle.

A dieta II apresentou a melhor relação custo-benefício e sua utilização na criação em massa com uma redução de até 17 vezes no custo relacionado com a alimentação larval. Além de demandar menor número inicial de larvas para a criação (~2,2 milhões larvas L_1) e consequentemente, menor quantidade de ovos (20 g).

Tabela 13 - Relação custo-benefício para produção de um milhão de pupas machos de *Ae. aegypti* linhagem MBR-001, considerando os rendimentos de pupas obtidos para cada dieta larval avaliada.

Dieta*	Proporção P:C	Rendimento L_1-pupa macho (24 + 48 hs)	Produção de 1 milhão de machos					Produção de 1 milhão de machos/semana	
			Quantidade de ovos (g)	Quantidade de larvas (10^3)**	Consumo total de dieta (kg)	Custo de 1kg de dieta*	Custo total	Custo mensal com dieta (R$ / US$)	Redução**
I	1:1	0,43	21	2,33	3,8	R$ 31,73	R$ 116,77	466,00 / 124	10
II	1:2	0,45	20	2,20	3,6	R$ 18,56	R$ 68,82	272,00 / 72	17
III	2:1	0,28	33	3,63	5,9	R$ 66,86	R$ 394,47	1.106 / 294	4
IV	1:1	0,40	23	2,48	4,0	R$ 35,47	R$ 141,89	555 / 148	8
V	1:2	0,41	22	2,46	4,0	R$ 21,84	R$ 87,36	368 / 98	12
VI	2:1	0,28	32	3,55	5,8	R$ 56,44	R$ 327,35	1.318 / 350	3
Controle	-	0,37	25	2,72	4,4	R$ 259,00	R$ 1.139,6	4.596 / 1.222	_

*Proporção Proteína/Carboidrato de cada dieta: I: (1:1); II (1:2); III (2:1); IV (1:1); V (1:2); VI (2:1)
**Número inicial de larvas necessárias calculado com base no rendimento L_1-pupa macho por dieta.
***Valores referentes ao ano de 2017.
****Redução em relação à dieta controle. Uma redução de valor 10,0, por exemplo, representa um custo mensal 10 vezes menor em comparação com a dieta controle.

4.2.4 Determinação da densidade ótima para a criação larval

Uma ampla faixa de densidade de larvas por volume (mL) foi avaliada, a fim de determinar as condições ótimas de criação em massa de *Ae. aegypti*. As densidades larvais testadas foram:1.0; 1.5; 2.0; 2.25; 2.5; 3.0; 3.5 e 4.0 larvas/mL, que no recipiente utilizado corresponderam a 134; 201; 268; 302; 335; 402; 469 e 536 (larvas/recipiente), respectivamente.

A larvas foram alimentadas diariamente com a dieta Sera Vipan®. A partir do 5° dia de criação, foram realizadas observações diárias em dois turnos para registrar o início da formação das pupas. Com base nesse registro, 24 horas após ocorreu a primeira coleta de pupas, sendo realizadas outras três coletas sucessivas (48,72 e 96 hs após).

A cada dia de coleta, 30 pupas machos e 30 pupas fêmeas foram pesadas em balança de precisão e em seguida, foram acondicionadas em potes plásticos (1,8 L) para avaliação da emergência do adulto.

4.2.4.1 Efeito da densidade no desenvolvimento larval e sobrevivência de pupas

O tempo de desenvolvimento de L_1-pupa foi similar (6 dias) para todas as densidades avaliadas. A densidade larval não influenciou na sobrevivência L_1- pupa ($H_{(7)}$ =6,83; p=0,45), uma vez que não houve mortalidade larval em nenhum dos grupos experimentais.

4.2.4.2 Rendimento diário, peso corporal, razão sexual e emergência

A recuperação total de pupas (machos e fêmeas) na primeira coleta oscilou de 0.21 a 0.49, sendo afetada pela densidade larval (ANOVA: $F_{(7,24)}$=5,70; p<0,01) (Tabela 14). Os resultados evidenciaram uma relação inversamente proporcional entre a densidade larval e o rendimento total. Assim, densidades acima de 2.25 larvas/mL apresentaram diferença significativa com a menor densidade de larvas por volume testada (1.0 larva/mL) (Teste de Tukey; p <0,05) (Tabela 14).

Na segunda coleta de pupas também se constatou influência da densidade no rendimento total de pupas (ANOVA: $F_{(7,24)}$= 2,62; p<0,05). As densidades de 1.0 e 2.25 larvas/mL produziram menor quantidade de pupas em relação às demais densidades (exceto 2.5 larvas/mL) (Teste de LSD, p <0,05) (Tabela 14).

Quanto ao terceiro dia de coleta, também foram verificadas diferenças significativas entre as densidades de larvas estudadas com relação ao rendimento total (ANOVA: $F_{(7,24)}$=7,52; p<0,01). O menor rendimento de pupas (6%) observou-se quando utilizada a menor densidade, ou seja,1.0 larva/mL (Teste de Tukey, p <0,05) (Tabela 14).

A razão sexual da progênie de pupas recuperadas na primeira coleta diferiu significativamente entre os tratamentos (ANOVA: $F_{(7,24)}$=4,25; p<0,05), oscilando entre 0.69 e 0.88. A razão sexual das menores densidades (1.0 a 2,25 larvas/mL) atingiu valores inferiores (0,69 - 0,74) quando comparada com as maiores densidades (2.5 a 4.0 larvas/mL) (Teste de Tukey, p <0,05). Contudo, os valores obtidos para a razão sexual evidenciaram que na primeira coleta, a proporção de machos foi superior à de fêmeas em todas as densidades avaliadas. Este parâmetro também diferiu entre as densidades avaliadas no segundo dia de coleta de pupas (ANOVA: $F_{(7,24)}$=6,78; p<0,05). Porém, diferentemente da primeira coleta, a razão sexual dos grupos experimentais com maior densidade larval (2,25 a 4.0 larvas/mL) manteve uma proporção próxima de 1:1 (fêmea:macho) (Tabela 15). Na terceira coleta, a proporção de pupas machos recuperadas foi inferior à de pupas fêmeas em todas as densidades estudadas, não sendo observadas diferenças significativas entre as densidades larvais avaliadas (ANOVA: $F_{(7,24)}$=0,53; p=0,80).

Tabela 14 – Rendimento acumulado (média ± erro padrão) e razão sexual de progênies de pupas de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidas sob diferentes densidades larvais.

Densidade (larvas/mL)	Coleta	Rendimento pupa total (♂+♀)	Razão sexual pupa (♂/♂+♀)
1,0	1° (24 hs)	0,49 ± 0,02 a	0,69 ± 0,05 b
1,5		0,37 ± 0,03 ab	0,83 ± 0,05 ab
2,0		0,34 ± 0,05 ab	0,80 ± 0,03 ab
2,25		0,39 ± 0,06 ab	0,74 ± 0,03 ab
2,5		0,30 ± 0,04 b	0,88 ± 0,01 a
3,0		0,24 ± 0,03 b	0,87 ± 0,02 a
3,5		0,25 ± 0,01 b	0,86 ± 0,01 a
4,0		0,21 ± 0,04 b	0,87 ± 0,04 a
1,0	2° (48 hs)	0,34 ± 0,06 b	0,26 ± 0,04 b
1,5		0,47 ± 0,03 a	0,40 ± 0,01 ab
2,0		0,46 ± 0,03 a	0,46 ± 0,03 a
2,25		0,32 ± 0,08 b	0,41 ± 0,02 ab
2,5		0,44 ± 0,03 ab	0,49 ± 0,04 a
3,0		0,49 ± 0,02 a	0,54 ± 0,04 a
3,5		0,47 ± 0,00 a	0,50 ± 0,01 a
4,0		0,47 ± 0,02 a	0,56 ± 0,07 a
1,0	3° (72 hs)	0,06 ± 0,01 b	0,20 ± 0,11 a
1,5		0,12 ± 0,01 ab	0,09 ± 0,03 a
2,0		0,12 ± 0,01 ab	0,18 ± 0,04 a
2,25		0,12 ± 0,02 ab	0,14 ± 0,04 a
2,5		0,17 ± 0,02 a	0,17 ± 0,03 a
3,0		0,17 ± 0,02 a	0,16 ± 0,02 a
3,5		0,16 ± 0,00 a	0,14 ± 0,02 a
4,0		0,19 ± 0,02 a	0,19 ± 0,03 a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (Teste de Tukey, $p<0,05$). Somente tratamentos da mesma coleta foram comparados entre si.

Com relação à produção de pupas machos, as densidades de criação larval afetaram o rendimento diário na primeira (ANOVA: $F_{(7,24)}=3,50$; $p<0,01$), segunda (ANOVA: $F_{(7,24)}= 6,06$; $p<0,01$) e terceira coleta de pupas (ANOVA: $F_{(7,24)}=2,49$; $p<0,05$) (Tabela 15).

Na primeira coleta, observou-se que a menor densidade larval (1.0 larvas/mL) produziu um rendimento de machos significativamente superior (34%) ao constatado para a densidade mais alta (4.0 larvas/mL) (18%) (Teste de Tukey, $p <0,05$). As mesmas densidades também

diferiram entre si com relação à recuperação de machos na segunda coleta, contudo, diferentemente do comportamento observado na primeira coleta, a densidade de 4.0 larvas/mL apresentou maior rendimento de pupas machos (Teste de Tukey, p <0,05). O rendimento de machos variou entre 1 – 4% na terceira coleta de pupas, (Tabela 15).

O peso das pupas machos coletadas no primeiro dia (24 hs) foi influenciado pela densidade de criação larval (ANOVA: $F_{(7,20)}$=3,07; p<0,05). Entretanto, observou-se que o incremento da densidade não interferiu no peso dos machos recuperados na segunda (ANOVA: $F_{(7,23)}$= 0,90; p=0,52) e terceira coleta (ANOVA: $F_{(7,23)}$=0,45; p=0,86) (Tabela 16).

A emergência de adultos machos atingiu valores superiores à 92%, não sendo este parâmetro influenciado pela densidade larval nas três coletas avaliadas 1ª: $H_{(7)}$=8,11 p=0,92; 2ª: $H_{(7)}$= 8,79 p=0,27; 3ª: $H_{(7)}$=,3,44 p=0,84 (Tabela 15).

Ainda com relação a produção de pupas machos, a criação larval de *Ae. aegypti* sob diferentes densidades influenciou a taxa de produção de machos em 24 hs (ANOVA: $F_{(7,24)}$= 6,88; p<0,01). Porém, o aumento da densidade larval não incrementou a produtividade de machos, sendo constatada uma relação inversa entre esses dois parâmetros sob densidades de criação larval mais extremas (1.0 e 4.0 larvas/mL) (Teste de Tukey, p<0,05) (Figura 34).

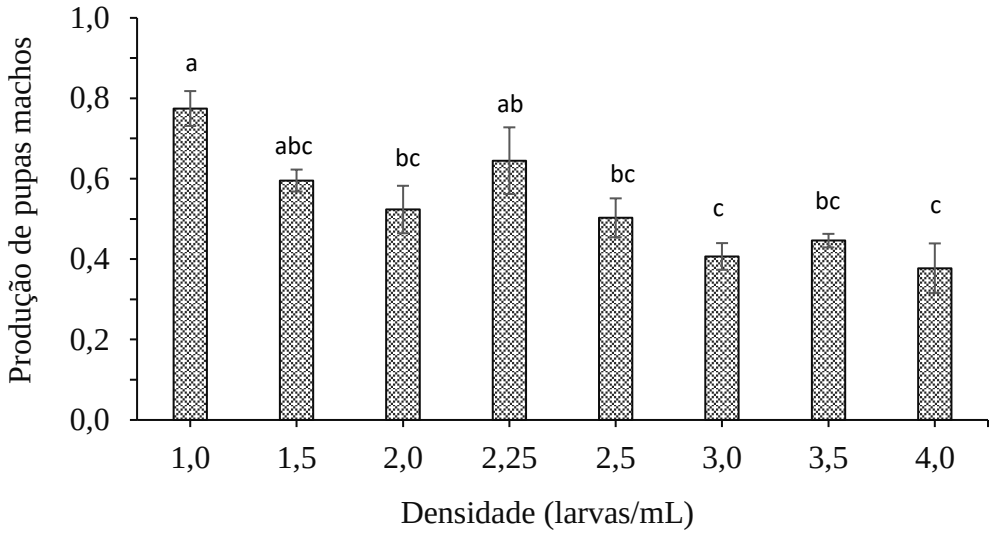
O rendimento acumulado de machos não foi afetado pela densidade larval (ANOVA: $F_{(7,24)}$= 1,35; p=0,27). Em ambas as coletas, recuperou-se em média, 46% de pupas machos em relação ao total de larvas inoculadas (Figura 35).

Tabela 15 - Parâmetros de produção (média ± erro padrão) e biológicos de pupas machos de *Ae. aegypti,* linhagem MBR-001, criadas em diferentes densidades.

Densidade (Larvas/mL)	Coleta	Rendimento pupa macho	Peso pupa macho (mg)*	Emergência macho
1,0	1° (24 hs)	0,34 ± 0,02 [a]	1,97 ± 0,02 [a]	0,94 ± 0,01 [a]
1,5		0,30 ± 0,02 [ab]	1,95 ± 0,03 [a]	0,96 ± 0,03 [a]
2,0		0,27 ± 0,03 [ab]	1,88 ± 0,03 [ab]	0,98 ± 0,01 [a]
2,25		0,28 ± 0,04 [ab]	1,94 ± 0,08 [a]	0,94 ± 0,05 [a]
2,5		0,26 ± 0,04 [ab]	1,80 ± 0,03 [b]	0,97 ± 0,01 [a]
3,0		0,21 ± 0,03 [ab]	1,80 ± 0,02 [b]	0,99 ± 0,01 [a]
3,5		0,21 ± 0,01 [ab]	1,80 ± 0,01 [b]	0,98 ± 0,01 [a]
4,0		0,18 ± 0,02 [b]	1,89 ± 0,04 [ab]	0,98 ± 0,01 [a]
1,0	2° (48 hs)	0,09 ± 0,02 [c]	1,86 ± 0,04 [a]	0,98 ± 0,02 [a]
1,5		0,19 ± 0,01 [abc]	1,85 ± 0,03 [a]	0,99 ± 0,01 [a]
2,0		0,21 ± 0,02 [ab]	1,84 ± 0,02 [a]	0,97 ± 0,01 [a]
2,25		0,13 ± 0,04 [bc]	1,84 ± 0,09 [a]	0,99 ± 0,01 [a]
2,5		0,21 ± 0,02 [ab]	1,79 ± 0,02 [a]	0,96 ± 0,01 [a]
3,0		0,27 ± 0,02 [a]	1,76 ± 0,02 [a]	0,99 ± 0,01 [a]
3,5		0,23 ± 0,01 [ab]	1,77 ± 0,02 [a]	0,98 ± 0,01 [a]
4,0		0,26 ± 0,04 [a]	1,80 ± 0,02 [a]	0,96 ± 0,02 [a]
1,0	3° (72 hs)	0,01 ± 0,00 [c]	1,00 ± 0,01 [a]	1,00 ± 0,00 [a]
1,5		0,01 ± 0,00 [c]	1,89 ± 0,22 [a]	0,92 ± 0,08 [a]
2,0		0,02 ± 0,00 [abc]	1,90 ± 0,05 [a]	0,96 ± 0,04 [a]
2,25		0,02 ± 0,00 [bc]	2,06 ± 0,33 [a]	0,92 ± 0,08 [a]
2,5		0,03 ± 0,00 [ab]	1,79 ± 0,04 [a]	0,98 ± 0,02 [a]
3,0		0,03 ± 0,01 [ab]	1,85 ± 0,07 [a]	0,99 ± 0,01 [a]
3,5		0,02 ± 0,00 [abc]	1,88 ± 0,03 [a]	1,00 ± 0,00 [a]
4,0		0,04 ± 0,01 [a]	2,10 ± 0,18 [a]	0,96 ± 0,02 [a]

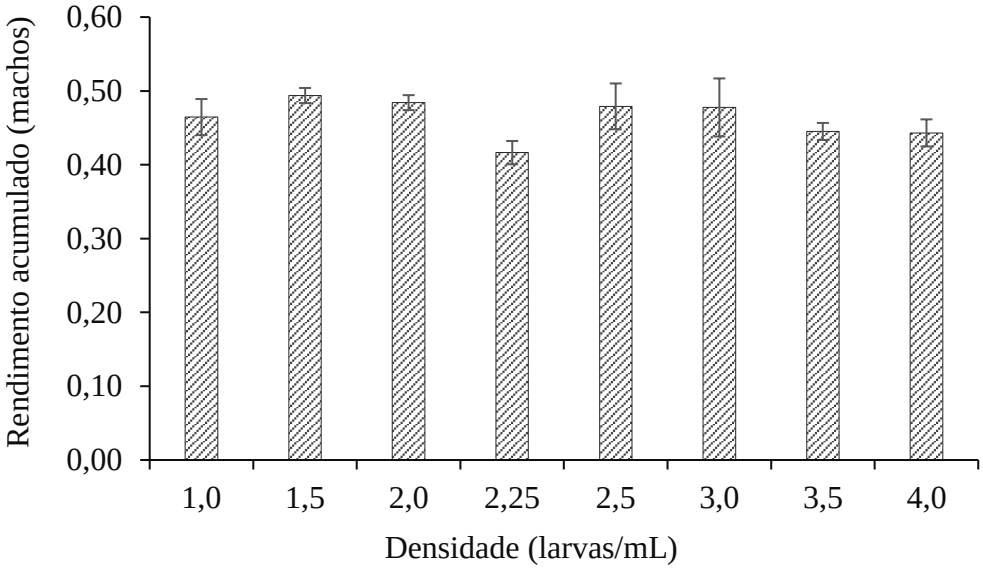
Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (Teste de Tukey $p<0,05$).
*Para a terceira coleta, representa o valor original do rendimento. Para análise, os dados foram transformados ($\sqrt{x}$). Somente tratamentos da mesma coleta foram comparados entre si.

Figura 34 - Taxa de produção de machos (média ± erro padrão) de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidas em diferentes densidades de criação larval.



As colunas representam a taxa média de produção de pupas machos ± erro padrão recuperadas na primeira (24 hs) e segunda (48 hs) coleta. A criação dos indivíduos foi realizada em sala com condições controladas (28±1ºC; RH=80 ±05%; fotoperíodo 14:10 claro:escuro). Colunas da mesma cor seguidas de letras diferentes diferem entre si (Teste de Tukey, $p<0,05$).

Figura 35 - Rendimento acumulado de pupas machos (média ± erro padrão) de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, desenvolvidas em diferentes densidades de criação larval.



As colunas representam o rendimento médio acumulado (dois dias de coleta) de pupas machos ± erro padrão em relação ao total de larvas utilizadas. A criação dos indivíduos foi realizada em sala com condições controladas (29±1ºC; RH=80 ±05%; fotoperíodo 14:10 claro:escuro).

Com relação à produção de pupas fêmeas, a recuperação média desse sexo diferiu significativamente entre as densidades avaliadas, tanto na primeira (ANOVA: $F_{(7,24)}$=5,67, p< 0,01), quanto na terceira (ANOVA: $F_{(7,24)}$=6,7149; p<0,01) e quarta coleta (ANOVA: $F_{(7,24)}$=4,35, p<0,01). Na primeira coleta (24 hs), o rendimento de fêmeas foi inversamente proporcional à densidade larval, uma vez que a menor densidade (1,0 larvas/mL) apresentou o maior rendimento (15 %), enquanto a densidade mais alta (4,0 larvas/mL) exibiu a menor recuperação de pupas fêmeas (3%) (Teste de Tukey, p <0,05) (Tabela 16).

O maior rendimento de fêmeas ocorreu no segundo dia de coleta. Este parâmetro oscilou de 19 a 28% e não diferiu entre os tratamentos (ANOVA: $F_{(7,24)}$=1,09; p=0,40) Já na terceira coleta, este parâmetro biológico se mostrou semelhante entre todas as densidades larvais estudadas, com exceção da menor densidade avaliada (0,04%) (Teste de Tukey, p <0,05). Na quarta coleta, a densidade de larvas utilizada também influenciou a recuperação de fêmeas, com as maiores recuperações sendo obtidas nas densidades entre 2.0 e 3.5 larvas/mL (oscilação de 3 a 5 %) (Teste de Tukey, p <0,05) (Tabela 16).

O peso corporal das pupas fêmeas não foi afetado pela densidade na primeira (ANOVA: $F_{(7,21)}$= 0,73; p=0,65), segunda (ANOVA: $F_{(7,22)}$= 1,40; p=0,26) ou quarta coleta (ANOVA: $F_{(7,24)=}$1,29; p=0,30). Contudo, o peso das pupas coletadas no terceiro dia diferiu entre os tratamentos (ANOVA: $F_{(7,24)}$=7,33; p<0,01), revelando que pupas provenientes da densidade 1.0 larva/mL alcançaram maior peso (3,39 mg) que indivíduos desenvolvidos sob densidades superiores a 2.0 larvas/mL (Teste de Tukey, p <0,05) (Tabela 16).

A densidade larval não influenciou a emergência das fêmeas coletadas no primeiro ($H_{(7)}$= 2,54 p=0,92), segundo ($H_{(7, 32)}$=10,83 p=0,15), terceiro ($H_{(7,32)}$= 8,43; p=0,29) ou quarto dia de coleta de pupas ($H_{(7)}$= 5,23; p=0,63). Todos os grupos experimentais apresentaram valores de taxa emergência superiores a 94% (Tabela 16).

Tabela 16 - Parâmetros de produção e biológicos de pupas fêmeas de *Aedes aegypti*, linhagem MBR-001, criadas sob diferentes densidades larvais ao longo de quatro coletas.

Densidade (Larvas/mL)	Coleta	Rendimento pupa ♀ *	Peso pupa ♀ (mg)	Emergência ♀ (%)
1,0	1° (24 hs)	0,15 ± 0,02 [a]	2,88 ± 0,02 [a]	0,99 ± 0,99 [a]
1,5		0,06 ± 0,02 [abc]	2,89 ± 0,17 [a]	0,96 ± 0,96 [a]
2,0		0,07 ± 0,02 [abc]	2,79 ± 0,05 [a]	0,97 ± 0,97 [a]
2,25		0,05 ± 0,01 [ab]	2,71 ± 0,06 [a]	0,98 ± 0,98 [a]
2,5		0,04 ± 0,01 [bc]	2,79 ± 0,10 [a]	0,99 ± 0,99 [a]
3,0		0,03 ± 0,01 [bc]	2,74 ± 0,05 [a]	0,94 ± 0,94 [a]
3,5		0,04 ± 0,00 [bc]	2,75 ± 0,05 [a]	0,99 ± 0,99 [a]
4,0		0,03 ± 0,01 [c]	2,76 ± 0,03 [a]	0,96 ± 0,96 [a]
1,0	2° (48 hs)	0,25 ± 0,04 [a]	2,89 ± 0,06 [a]	0,94 ± 0,03 [a]
1,5		0,28 ± 0,01 [a]	2,84 ± 0,05 [a]	1,00 ± 0,00 [a]
2,0		0,25 ± 0,02 [a]	2,89 ± 0,03 [a]	0,96 ± 0,01 [a]
2,25		0,19 ± 0,04 [a]	2,73 ± 0,05 [a]	0,99 ± 0,00 [a]
2,5		0,22 ± 0,02 [a]	2,71 ± 0,01 [a]	0,98 ± 0,01 [a]
3,0		0,22 ± 0,02 [a]	2,70 ± 0,05 [a]	0,99 ± 0,02 [a]
3,5		0,24 ± 0,01 [a]	2,96 ± 0,22 [a]	0,97 ± 0,02 [a]
4,0		0,21 ± 0,03 [a]	2,81 ± 0,08 [a/]	0,98 ± 0,02 [a]
1,0	3° (72 hs)	0,04 ± 0,01 [b]	3,39 ± 0,05 [a]	0,96 ± 0,04 [a]
1,5		0,11 ± 0,01 [a]	3,09 ± 0,06 [abc]	1,00 ± 0,00 [a]
2,0		0,10 ± 0,02 [a]	3,16 ± 0,07 [abc]	0,97 ± 0,01 [a]
2,25		0,11 ± 0,02 [a]	2,93 ± 0,09 [bc]	0,98 ± 0,02 [a]
2,5		0,14 ± 0,02 [a]	2,86 ± 0,07 [bc]	1,00 ± 0,00 [a]
3,0		0,14 ± 0,01 [a]	2,79 ± 0,08 [c]	0,99 ± 0,01 [a]
3,5		0,14 ± 0,01 [a]	2,86 ± 0,05 [bc]	0,97 ± 0,01 [a]
4,0		0,15 ± 0,01 [a]	2,93 ± 0,11 [bc]	0,98 ± 0,02 [a]
1,0	4° (96 hs)	0,01 ± 0,00 [c]	3,73 ± 0,29 [a]	1,00 ± 0,00 [a]
1,5		0,02 ± 0,01 [bc]	3,48 ± 0,03 [a]	1,00 ± 0,00 [a]
2,0		0,03 ± 0,01 [abc]	3,71 ± 0,21 [a]	0,95 ± 0,05 [a]
2,25		0,04 ± 0,01 [abc]	3,54 ± 0,09 [a]	0,96 ± 0,03 [a]
2,5		0,04 ± 0,01 [abc]	3,53 ± 0,09 [a]	0,99 ± 0,01 [a]
3,0		0,03 ± 0,00 [ab]	3,48 ± 0,12 [a]	0,95 ± 0,03 [a]
3,5		0,05 ± 0,01 [a]	3,46 ± 0,06 [a]	0,97 ± 0,02 [a]
4,0		0,02 ± 0,00 [c]	3,22 ± 0,14 [a]	0,98 ± 0,02 [a]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (ANOVA, Teste de Tukey $p<0,05$). Somente tratamentos da mesma coleta foram comparados entre si.

*Representa o valor original do rendimento. Para análise, os dados foram transformados em $\sqrt{x}$.

4.2.4.3 Relação custo-benefício na produção em massa com a utilização das diferentes densidades de criação larval

Com base nos resultados obtidos, foi calculada a relação custo-benefício para a produção de um milhão de pupas machos da linhagem MBR-001 de *Ae. aegypti* utilizando as densidades de criação larval avaliadas (Tabela 17). Quando se considera o rendimento acumulado de machos (1° e 2° coleta de pupas), pode-se observar que os menores custos mensais (R$ 5.244 e R$5.827) com a dieta larval correspondem às densidades de 1.0 e 1.5 larvas/mL, respectivamente.

Tabela 17 - Estimativa de utilização de material biológico, consumo e custo de dieta para a produção de um milhão de machos/semana, considerando a utilização de cada densidade larval avaliada e seu respectivo rendimento de pupas machos nas primeiras 48h de coleta.

Densidade (larvas/ mL)	**Rendimento L_1-pupa macho (24 + 48 hs)**	**Produção de 1 milhão de machos**				**Produção de 1 milhão de machos/semana**
		Quantidade de ovos (g)	**Quantidade de larvas (10^3)***	**Consumo dieta/ lote (kg) ****	**Custo dieta (R$)**	**Custo mensal com dieta (R$ / US$***)**
1,0	0,46	18	2,15	3,7	1.311	5.244 / 1.394
1,5	0,49	17	2,03	3,4	1.457	5.827 / 1.549
2,0	0,48	17	2,07	3,5	1.628	6.510 / 1.731
2,25	0,42	20	2,40	4,1	1.555	6.221 / 1.654
2,5	0,48	17	2,09	3,5	1.667	6.667 / 1.773
3,0	0,48	17	2,09	3,6	2.089	8.354 / 2.222
3,5	0,45	19	2,25	3,8	2.075	8.302 / 2.208
4,0	0,44	19	2,26	3,8	2.458	9.833 / 2.615

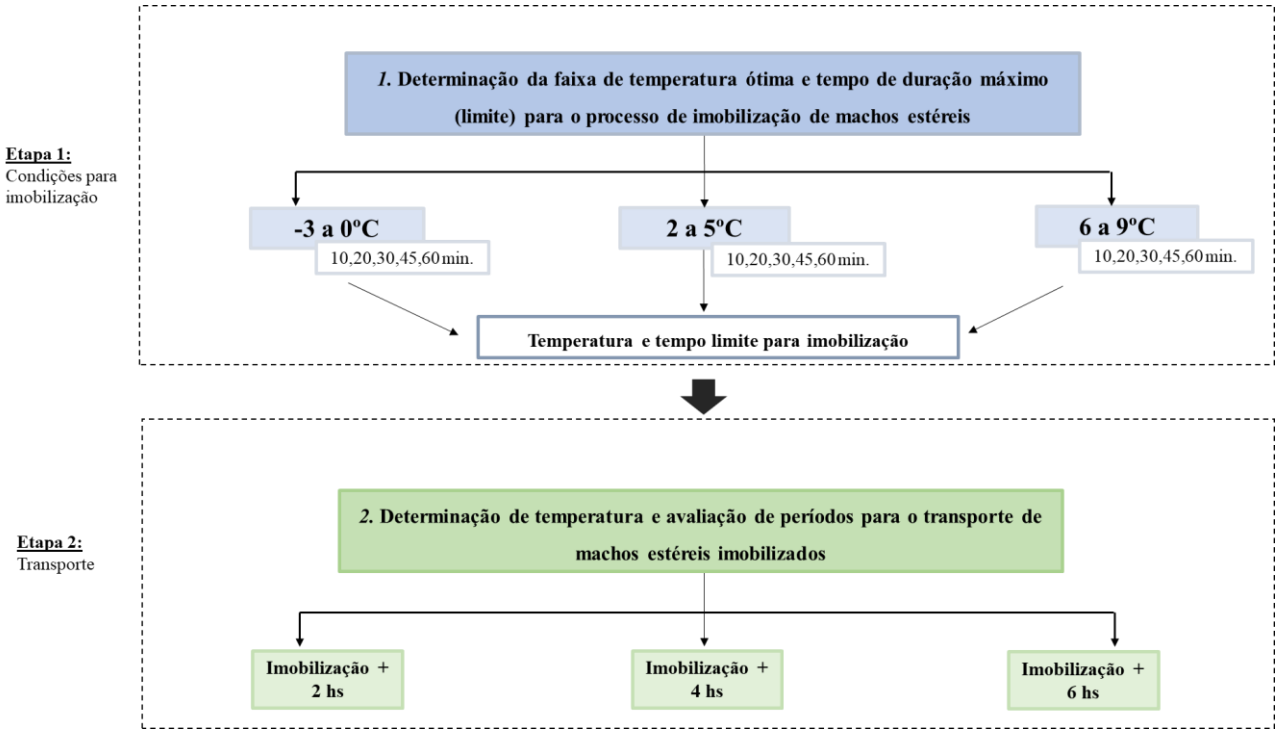
*Número inicial de larvas necessárias calculado com base no rendimento L_1-pupa macho por densidade.
** Valor referente ao ano de 2017 (259,00//kg).
***Cotação do dólar em 02/08/2018.

4.3 META III – PROCESSOS PÓS-PRODUÇÃO: CONDIÇÕES PARA O TRANSPORTE DE ADULTOS

O produto final de uma criação em massa é o mosquito macho para liberação. Para o transporte de adultos, os machos devem ser expedidos da biofábrica já estéreis. Entretanto, apesar de ser um processo pós-produção, as condições iniciais para manipulação e transporte desses machos podem ser realizadas na biofábrica.

O estudo para determinar as condições para o transporte de adultos machos estéreis imobilizados foi conduzido em duas etapas (Figura 36). Na etapa 1, as condições de imobilização de machos estéreis adultos, foram determinadas a partir da avaliação dos intervalos de temperatura (3 a 0 °C; 2 a 5 °C e 6 a 9°C) e de duração máxima (limite) para o processo de imobilização ou *knockdown* (10, 20, 30, 45 e 60 minutos). Para tanto, um grupo controle machos estéreis não expostos ao resfriamento foi utilizado. Foram realizadas cinco repetições para cada período-limite de cada temperatura.

Figura 36 - Fluxograma de desenvolvimento do experimento para determinação de condições para o transporte de machos estéreis.



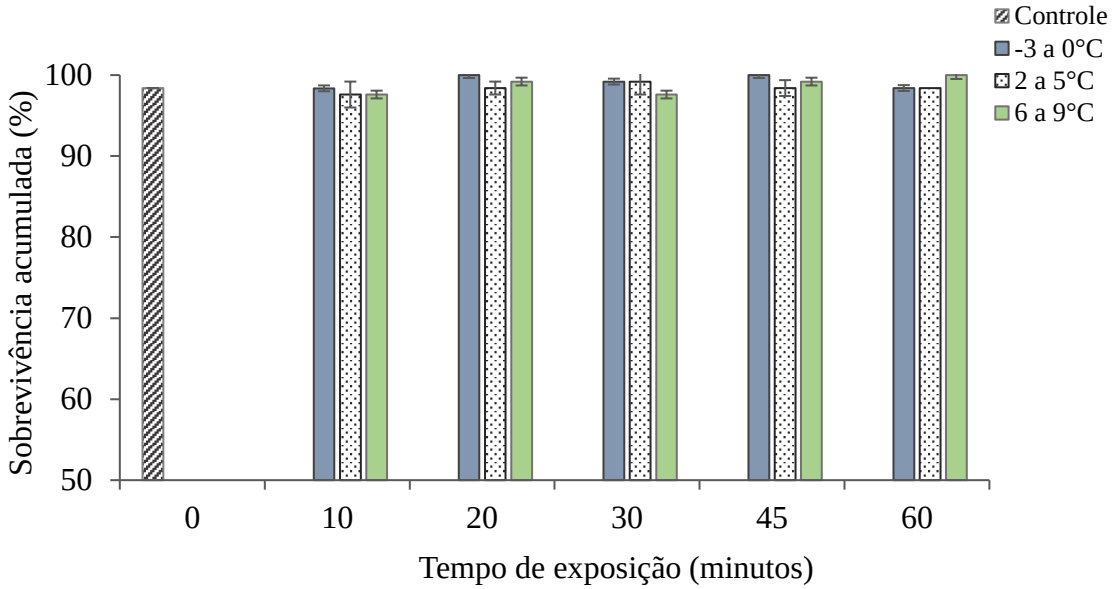
As três faixas de temperatura avaliadas imobilizaram os machos estéreis. Contudo, o grau de imobilização de adultos incubados na faixa de 6 a 9 °C foi menor (imobilização parcial). Após 60 minutos de exposição, machos expostos à faixa de temperatura supracitada permaneceram imóveis nas paredes do recipiente, diferentemente do observado para machos expostos a temperaturas inferiores à 5°C (Figura 37).

A sobrevivência dos machos estéreis sob condições de estresse oscilou em média de 98 a 100 % (Figura 38) e não foi influenciada pelas temperaturas e tempos de exposição avaliados (-3 a 0 °C: $H_{(4)}$ =4,88; p=0,30; 2 a 5 °C: $H_{(4)}$ =0,86; p=0,93; 6 a 9°C: $H_{(4)}$ =2,42; p=0,66). A sobrevivência média observada para machos estéreis não resfriados foi de 98,4%.

Figura 37- Machos estéreis imobilizados logo após o resfriamento.

Comparação do grau de imobilização de machos estéreis logo após a exposição (60 minutos) à diferentes faixas de temperatura: 6 a 9 °C (esquerda) e 2 a 5 °C (direita). Créditos das fotos: Maylen Gómez

Figura 38 - Sobrevivência sob *stress* de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, imobilizados.

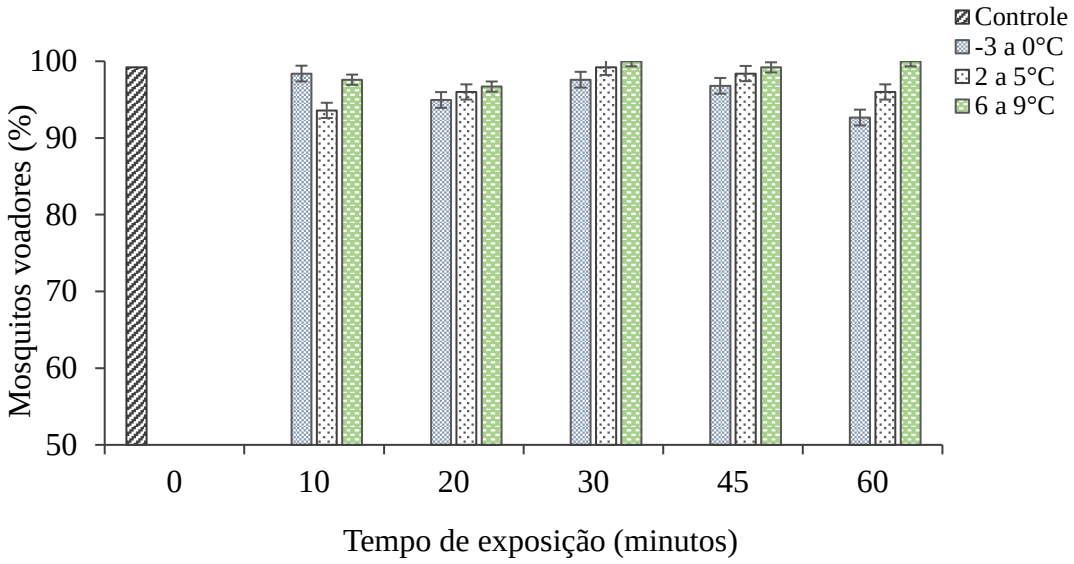


As colunas representam a sobrevivência média ± erro padrão dos diferentes tratamentos 72h após a imobilização durante diferentes períodos. A sobrevivência foi avaliada em sala com condições controladas (27±1ºC; RH= 60 ±10%; fotoperíodo 14:10 claro:escuro).

Quanto a habilidade de voo dos machos resfriados, verificou-se que não houve influência das temperaturas para imobilização e períodos de exposição neste parâmetro (-3 a 0 °C: $H_{(4)}$ =5,44; p=0,25; 2 a 5 °C: $H_{(4)}$ =2,74; p=0,60; 6 a 9°C : $H_{(4)}$ =7,29; p=0,12). De acordo

com os resultados obtidos, mesmo na condição mais extrema (3 a 0 °C, 60 minutos de exposição), a taxa de voadores foi superior a 92% (Figura 39).

Figura 39 - Habilidade de voo de machos estéreis de *Ae. aegypti* (linhagem MBR-001) imobilizados.



As colunas representam o número médio de voadores ± erro padrão dos diferentes tratamentos, uma hora após a imobilização durante diferentes períodos. Os adultos foram mantidos em sala com condições controladas (27±1ºC; RH= 60 ±10%; fotoperíodo 14:10 claro:escuro).

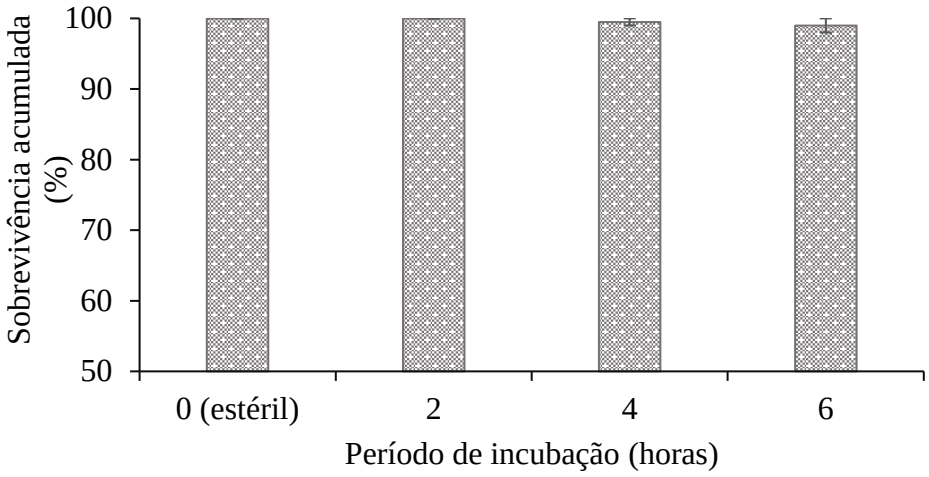
Os resultados obtidos na primeira etapa, a faixa de temperatura (2 a 5 °C) e o tempo limite de 45 ± 15 minutos foram definidos para imobilização dos machos estéreis prévio ao transporte a baixas temperaturas.

No segundo bioensaio, foi simulada a condição de transporte entre biofábrica e aérea de liberação, sob condições controladas de temperatura. Para isso, tendo como referências os resultados da primeira etapa e o estudo realizado por Culbert et al. (2017), a temperatura de 4 a 7°C foi determinada para o transporte.

Diante do exposto, machos estéreis foram imobilizados através da exposição à temperatura de 2 a 5°C durante 45 minutos, com subsequente incubação à 4-7°C durante 2, 4 ou 6 horas. Foram realizadas oito repetições do experimento para cada período de transporte (três tratamentos) avaliado. Tal condição não afetou a sobrevivência dos machos estéreis, mesmo sob estresse (Kruskal Wallis: $H_{(3)}$ =2,06; p=0,56) (Figura 40). Além disso, a

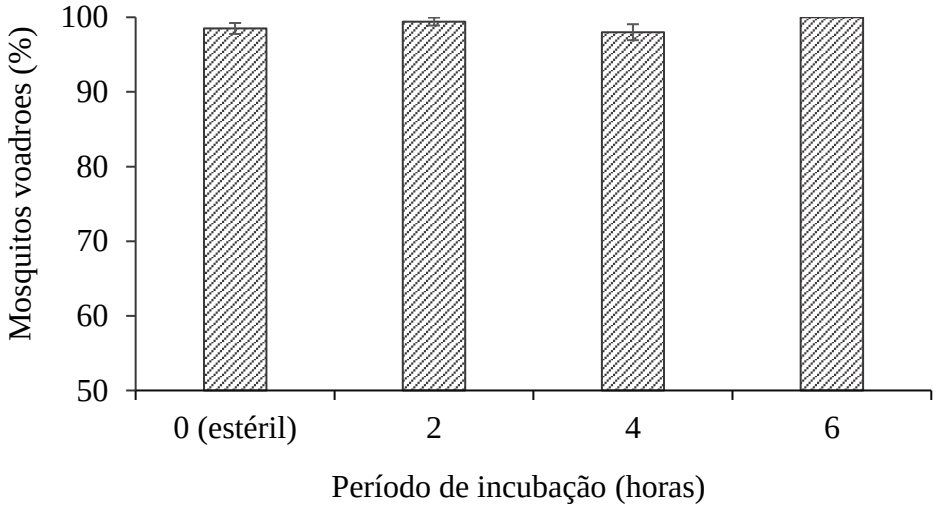
porcentagem média de machos estéreis voadores foi similar entre os períodos de transporte simulados (Kruskal Wallis: $H_{(3)}$ =3,66; p=030), oscilando entre 98 -100% (Figura 41).

Figura 40 - Sobrevivência sob *stress* de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, imobilizados e incubados.
As colunas representam a sobrevivência média ± erro padrão dos diferentes



tratamentos 72h após a simulação do transporte. A sobrevivência foi avaliada em sala com condições controladas (27±1ºC; RH= 60 ±10%; fotoperíodo 14:10 claro:escuro).

Figura 41. Habilidade de voo sob *stress* de machos estéreis de *Ae. aegypti* (linhagem MBR-001) imobilizados e incubados.



As colunas representam o número médio de voadores ± erro padrão dos diferentes tratamentos uma hora após a após a simulação do transporte. Os adultos foram mantidos em sala com condições controladas (27±1ºC; RH= 60 ±10%; fotoperíodo 14:10 claro:escuro).

.

Ainda sobre a simulação do transporte, a avaliação do tempo de recuperação, foi realizada realizadas cinco vezes para cada período de transporte. A tabela 18 apresenta os resultados do tempo de recuperação dos machos estéreis após simulação de transporte a baixas temperaturas. Este parâmetro foi influenciado pelo tempo de exposição (1° mosquito: $F_{(3,14)}=14,20$; e 100% dos mosquitos: $F_{(3,14)}=1092,1$; $p<0,01$). A taxa de recuperação dos 100% dos insetos oscilou entre 1,9 e 7,1 minutos. Com o aumento do tempo de exposição, a taxa de recuperação foi menor. O grupo controle, ou seja, machos que foram imobilizados (2 a 5°C; 45 min.) mas não foram incubados durante longos períodos, retardou o despertar em relação a todos os outros grupos avaliados (Tabela 18).

Tabela 18 - Tempo de recuperação de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001, após imobilização e incubação durante 2, 4 ou 6 horas.

Período de incubação (horas)	**Tempo de recuperação (voo)**	
	1° mosquito (s)	**100% dos mosquitos (min.)**
0 (Controle)*	44,3 ± 1,1 ^{b}	7,1 ± 0,11 ^{a}
2	65,2 ± 6,4 ^{a}	3,5 ± 0,08 ^{b}
4	22,2 ± 5,1 ^{c}	1,9 ± 0,03 ^{c}
6	41,0 ± 3,7 ^{bc}	2,2 ± 0,01 ^{c}

Tempo médio ± erro padrão de machos estéreis submetidos ao resfriamento. Médias seguidas de letras diferentes (a,b,c) na mesma coluna indicam diferenças significativas para as comparações entre tratamentos (Teste de Tukey, $p<0,05$).

5 DISCUSSÃO

A produção e liberação de insetos em número suficiente e com a qualidade apropriada para induzir uma alta proporção de acasalamentos estéreis numa população selvagem, é um dos principais requisitos para o sucesso da SIT e tecnologias relacionadas (PARKER, 2005). O requerimento de um alto número de insetos pode demandar a otimização do sistema produtivo e como consequência, esse aumento na escala de produção resultaria em uma queda no custo médio de produção (economia de escala). Contudo, durante a otimização da criação, a qualidade do inseto produzido deve ser considerada (CALKINS & PARKER, 2005). Melhorias na tecnologia de criação e mudanças nos procedimentos realizados tem contribuído grandemente para a redução no custo médio de produção de insetos (Parker, 2005). Nesse sentido, o presente estudo realizou diversos experimentos no intuito de aprimorar alguns fatores da criação em massa de *Ae. aegypti*, sem reduzir a qualidade dos produtos (ovos e machos). Os resultados obtidos em cada experimento e suas implicações para o planejamento e aplicação da criação em massa são discutidos a seguir.

5.1 META I– PLANO DE APLICAÇÃO EM MASSA DA LINHAGEM MBR-001

A avaliação dos dados produtivos da linhagem MBR-001 para uso em SIT, revelou taxa média de eclosão (62%), inferior aos dados obtidos por Carvalho et al. (2014) para a linhagem OX513 A de *Ae. aegypti* (81,3 %). A eclosão de larvas pode estar relacionada com fatores como a temperatura de imersão e a condição fisiológica dos ovos (período de quiescência/idade) (CHRISTOPHERS 1960, ALMEIDA, 2005; DIENG et al., 2006). Nesse sentido, os lotes avaliados neste estudo foram produzidos para a manutenção da Colônia matriz, assim, ovos de diferentes idades foram utilizados.

Com relação ao rendimento de pupas dessa linhagem, ainda que a criação larval tenha sido realizada em menor densidade (1 larva/mL), o rendimento diário foi inferior ao esperado, uma vez que para a produção de machos para liberação (densidade 2,25 larvas/mL) CARVALHO et al. (2014) obteve somente no primeiro dia de coleta rendimentos superiores para machos (30 %) e fêmeas (15%) em comparação com o presente estudo. Uma explicação plausível para o baixo rendimento da linhagem MBR-001 em condições criação em massa relaciona-se com a origem da linhagem: ovos

coletados na cidade de Juazeiro, sertão da Bahia, nordeste do país. No nordeste, os reservatórios para armazenamento de água são os criadouros predominantes de *Ae. aegypti*. Em 2014, estes depósitos representaram 78,8 % dos criadouros e em 2015, este número subiu para 82,2% (M.S.,2015). Nesse contexto, é provável que a densidade de larvas seja baixa nestes reservatórios, devido ao grande volume de água que armazenam. Assim, o baixo rendimento de pupas em alta densidade larval poderia estar relacionado às características genéticas da população que originou a linhagem. Contudo, outros fatores como adaptação a temperaturas mais elevadas também precisam ser avaliados.

O tamanho das pupas pode ser correlacionado com o tamanho do imago (KOENRAADT, 2008; CARVALHO et al., 2014). Na criação dos lotes de colônia, este parâmetro foi avaliado a partir da mensuração da largura do cefalotórax das pupas. Assim, o tamanho médio do cefalotórax de machos (1,06 mm e 1,04 mm) e fêmeas (1,27 mm e 1,29 mm) foi similar entre as linhagens MBR-001 e OX513A, respectivamente (CARVALHO et al., 2014).

Apesar do tamanho semelhante entre as fêmeas das linhagens MBR-001 e OX513 A, a fecundidade total das fêmeas da MBR-001 foi aproximadamente 50 % menor que a das fêmeas da linhagem OX513A (48 ovos/fêmea) em dois ciclos. A massa da pupa está significativamente correlacionada com a fecundidade de fêmeas. Pupas maiores geram fêmeas maiores, que por sua vez, produzem mais ovos por ciclo reprodutivo em comparação com as fêmeas menores (BAR-ZEEV, 1957; STEINWASCHER, 1982), provavelmente por conseguirem ingerir maior quantidade de sangue (BAR-ZEEV, 1957). Nesse sentido, a baixa fecundidade da MBR-001 em relação à OX513 A pode estar relacionada a outros fatores e não ao tamanho das fêmeas, pois como descrito anteriormente as pupas apresentaram tamanho similar, foram desenvolvidas com a mesma dieta larval se alimentaram do mesmo tipo de fonte sanguínea.

Com relação aos experimentos desenvolvidos para a determinação de parâmetros-chave para criação em massa, a proporção sexual não afetou a fecundidade das fêmeas ou taxa de eclosão (fertilidade) das larvas. Considerando que em densidades adequadas de adultos, uma maior produção de ovos por gaiola pode ser alcançada com o incremento da quantidade de fêmeas na gaiola (ZHANG et al., 2018), a proporção de 3: 1 (♀:♂) é a mais indicada para a manutenção da colônia matriz. A mesma proporção também foi considerada adequada por Carvalho et al. (2014) para *Ae. aegypti* e Zhang et al. (2018)

para *Ae. albopictus.* De acordo com este último autor, o risco de redução da diversidade genética da linhagem pode ser minimizado através da realização de cruzamentos periódicos com material biológico selvagem.

Neste experimento, diferentemente da avaliação da colônia matriz, as fêmeas apresentaram alta fecundidade (~66 ovos/fêmea) quando realizaram deposição de ovos de forma individual. Entretanto, também foi observado que 75 % das fêmeas do estudo não ovipositaram ao longo de sua vida. De acordo com Hartberg (1971), fêmeas muito jovens desta espécie são refratárias a inseminação: após emergirem podem copular, porém não ocorre inseminação quando estão na idade entre 24 e 72 horas. Fêmeas utilizadas neste estudo tinham entre 48 e 72 h de idade quando a cópula foi induzida, a mesma idade relatada por Carvalho et al. (2014) para a colônia matriz. Assim, os resultados sugerem que as fêmeas da linhagem MBR-001 atingem a maturidade sexual mais tardiamente em comparação com a linhagem transgênica. Mais estudos são necessários para verificar tal suspeita, porém, caso seja confirmada, o protocolo para manutenção da colônia matriz deverá ser adaptado para delongar a inoculação de machos nas gaiolas ou o primeiro repasto sanguíneo. No entanto, vale ressaltar que a metodologia utilizada pode ter interferido negativamente na fecundidade, pois neste estudo as fêmeas foram adormecidas (*knockdown*) em freezer – 20°C, diferentemente do que foi descrito por Ioshino (2018, manuscrito em avaliação) que utilizou uma atmosfera de CO_2.

Foi observado que os ovos da MBR-001 são mais leves em comparação com outras linhagens de *Ae aegypti*. Um grama de ovos da linhagem estudada corresponde a 121.000 ovos, enquanto a mesma massa representa ~80.000 ovos da linhagem transgênica OX513 A (CARVALHO, 2013) e ainda, ~105.000 ovos da linhagem Rockefeller (dados Moscamed Brasil, manuscrito em preparação. Os dados foram semelhantes ao obtido por Zheng et al. (2015) ~115.000 que também analisou ovos cuja população de origem é da cidade de Juazeiro (mas com locais de coleta distintos dos utilizados para MBR-001). Ainda que as fêmeas das linhagens MBR-001 e OX513A tenham tamanhos semelhantes, como descrito anteriormente, os ovos da primeira linhagem possuem menor peso em comparação com a segunda. Assim, pode-se inferir que há uma variabilidade genética entre as linhagens quanto ao tamanho e/ou peso dos ovos.

O córium do ovo diminui a perda de água para o ambiente (CLEMENTS, 1992). Numa avaliação interespecífica entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, Sota & Mogi (1992)

detectaram que quanto maior o volume do ovo, maior tolerância a dessecação. Por outro lado, o grau de resistência à dessecação dos ovos pode variar de forma interespecífica (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) e até mesmo entre populações de uma mesma espécie (SOTA; MOGI, 1992; JULIANO et al. 2002), muitas vezes relacionada a variações climáticas (ALMEIDA, 2005). Nesse contexto, as plantas de ambientes áridos e semiáridos como a Caatinga, possuem algumas características morfológicas de cunho adaptativo ao estresse hídrico. Dentre elas, pode-se citar a redução da relação entre superfície e volume das folhas para reduzir a perda de água (BARROS; SOARES, 2013). Fazendo uma analogia com esses vegetais, é provável que o menor volume dos ovos da MBR-001 seja também uma adaptação às condições climáticas do local de origem da linhagem, no intuito de minimizar a perda de água.

A MBR-001 apresentou rendimento de machos inferior à linhagem transgênica, uma vez que foram recuperadas 15% de pupas machos (em dois dias de coleta), enquanto para a OX513 A o rendimento de machos foi de 30 % de machos (um dia de coleta). Além disso, o rendimento para obtenção de machos para a liberação (densidade de criação: 2.25 larvas/mL) foi menor em comparação com o rendimento de machos para manutenção da colônia (densidade de criação: 1.0 larvas/mL). Novamente, a criação em densidades mais elevada pode ter influenciado negativamente este parâmetro biológico.

Diante da baixa produtividade da linhagem MBR-001 em comparação com a transgênica, foi possível pressupor as principais implicações, para a sua produção em massa. De forma geral, aproximadamente 10 % do total de ovos produzidos em uma criação em massa são usados para a manutenção da própria colônia matriz e o restante, para a produção de lotes dos machos para liberação (CARVALHO et al., 2014; ZHANG et al., 2018) e estoque emergencial. Contudo, devido à reduzida fecundidade das fêmeas e o baixo rendimento de machos (produção para liberação) da linhagem MBR-001, uma porcentagem superior seria exigida (17%) e consequentemente, seriam necessárias mais que o dobro de gaiolas/semana do tipo PVC (150 gaiolas) em comparação com a linhagem transgênica (63 gaiolas). Além disso, a produção de um milhão de machos/semana para liberação da linhagem MBR-001 demandaria um tamanho exorbitante de cada lote semanal de criação larval (1.019 bandejas), enquanto para a linhagem OX513 A, 543 bandejas seriam necessárias. Tal fato resultaria em um consumo semanal de 4.750 litros de água e 9,5 quilos de dieta a mais em comparação com a linhagem transgênica.

Assim, a MBR-001 exige um aumento médio de 109 % no sistema de produção em comparação com a linhagem transgênica. Soma-se a este aumento, importantes itens não mensurados nesse estudo, como a área construída e capacidade instalada da biofábrica e ainda, o número de colaboradores. Dessa maneira, todos esses acréscimos acarretariam em um custo dispendioso com a criação em massa da espécie. Considerando que é necessário um equilíbrio entre aprimorar a criação em massa, reduzir custos e produzir machos de qualidade (CARVALHO et al., 2014), algumas adaptações no protocolo de criação são necessárias para essa cepa, bem como são imprescindíveis experimentos que conduzam a uma melhor relação custo-benefício para a produção em grande escala dessa linhagem.

5.2 META II – PADRONIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO EM MASSA

5.2.1 Aprimoramento de gaiolas de adultos para a produção em massa de *Ae. aegypti*

A produção de ovos sustenta uma criação em massa. Neste estudo, foi desenvolvida uma grande gaiola de criação em massa (GCM-II). A análise comparativa entre a operação da gaiola grande e pequena (PVC) revelou que a mortalidade e a fecundidade das fêmeas não foram afetadas na GCM-II. Balestrino et al. (2014) também não encontraram diferenças entre a fecundidade das fêmeas mantidas em gaiolas pequenas ou grandes. Contudo, a taxa de eclosão (fertilidade) foi superior na GCM-II em relação à gaiola PVC. Nesse sentido, a união sexual ocorre durante o voo para *Ae. aegypti*, sendo a frequência do batimento alar um dos atrativos para a cópula (FORATTINI, 2002). Considerando que as paredes da GCM-II são de tela, as fêmeas podem receber mais estímulos externos e, portanto, voarem mais vezes em comparação com fêmeas mantidas nas gaiolas PVC. Somado a isso, tem-se o fato do maior volume da GCM-II, que contribui para voos mais longos. Tais fatores possivelmente, aumentam a probabilidade de encontro entre machos e fêmeas e consequentemente, a taxa de inseminação de fêmeas, o resultando em uma taxa de eclosão (fertilidade) mais elevada.

Com relação à operacionalidade e funcionamento da gaiola, foi observado que nem todas as fêmeas subiram (~1/5 da gaiola) para se alimentar na fonte sanguínea. Balestrino et al. (2014) não relataram esse comportamento em seu estudo com *Ae.*

albopicus na MPC. Por outro lado, Zhang et al. (2018) ao testarem uma grande gaiola em posição vertical (altura 50 cm) e horizontal (altura 30 cm), sugeriram que a altura da gaiola tenha influenciado a taxa de alimentação das fêmeas, uma vez que a maior fecundidade foi apresentada por fêmeas criadas na gaiola na horizontal. Portanto, os mesmos autores recomendaram que é necessário um equilíbrio entre a altura e largura para o desenvolvimento de uma estrutura ideal. Todavia, vale ressaltar que na GCM-II, esse comportamento provavelmente, será minimizado com a utilização do sistema de tubos para alimentação sanguínea, uma vez que o sistema está situado à 71 cm de altura, 26 cm mais baixo que o sistema de placas.

Foi observado ainda que na GCM-II, houve um padrão de movimentação das fêmeas na gaiola de acordo com a fase do ciclo reprodutivo em que se encontravam: no período pré-alimentação sanguínea (dois dias antes do repasto), as fêmeas se concentravam na parte frontal superior da gaiola (central de manipulação), que também é o local mais próximo da área de movimentação do operador ou de outras pessoas que circulam no laboratório; no período pós-prandial as fêmeas se distribuíram uniformemente sobre toda a área de repouso da gaiola; no dia pré-oviposição, as fêmeas passaram a ocupar a área inferior da gaiola, mais próxima a área de oviposição, ainda que essa não estivesse preparada com água e sítios de postura; em seguida, as fêmeas retornavam para a parte frontal da gaiola, como descrito acima. Tal padrão de movimentação pode ter contribuído para a maior mortalidade de fêmeas, pois ao se concentraram em determinados pontos da gaiola, a densidade de adultos e a competição por espaço aumentaram. Como citado anteriormente, na GCM-II as fêmeas estão mais expostas à estímulos externos. Portanto, é possível presumir que em melhores condições de isolamento (ex.: gaiolas em racks com capas de tecido), a mortalidade de fêmeas poderia ser menor e consequentemente, a produção de ovos aumentaria.

Por fim, com relação à estrutura da gaiola, a *Aedes* MPC foi fabricada em aço inoxidável, mas de acordo com o Balestrino et al. (2014), modelos em plástico ou alumínio estavam sendo avaliados por serem mais leves e terem menor custo. Nesse sentido, a GCM-II foi desenvolvida em alumínio, sendo mais leve e com um custo ligeiramente inferior à MPC. Entretanto ainda é uma gaiola com valor elevado e por essa razão, sua fabricação em plástico ou acrílico precisa ser avaliada. Além disso, nos pré-testes realizados com a GCM-I, as fêmeas ovipositaram não somente no papel destinado à postura, como também nas paredes internas da gaiola. Devido a tal fato, foi necessário

adaptar um sistema de canaletas na gaiola, o que levou ao desenvolvimento do protótipo II da GCM (GCM-II). As canaletas solucionaram o problema da oviposição, porém, aumentaram a possibilidade de escape dos indivíduos (observação pessoal). Dessa maneira, os fatos relatados reforçam a necessidade de avaliação da GCM-II fabricada com outros materiais.

Grandes gaiolas de criação em massa além de proporcionarem uma maior produção de ovos devido ao maior número de mosquitos, também reduzem o espaço necessário para a criação, minimizam o escape de adultos durante a manipulação e ainda, diminuem o trabalho manual durante sua operação (ZHANG et al., 2018). Entretanto, devem ser tão ou mais eficientes que as gaiolas pequenas (PVC), sem reduzir a fecundidade e a taxa de eclosão dos ovos (BALESTRINO et al., 2014a; MAMAI et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Portanto, quando eficientes, são estratégicas para o aprimoramento de uma criação em massa e contribuem para a redução dos custos operacionais. Nesse contexto, a GCM-II foi a primeira grande gaiola testada para *Ae. aegypti* e os resultados obtidos neste estudo revelam sua eficiência na produção em massa de ovos dessa espécie.

5.2.1.1 Efeito da densidade de adultos e do tipo de gaiola de adultos para a produção em massa de ovos

O número de adultos por superfície de repouso vertical em uma gaiola (DRS) é um parâmetro importante para uma adequada criação de mosquitos (GERBERG, 1970; BALESTRINO et al., 2014). O presente estudo avaliou quatro diferentes DRS para a manutenção de adultos em gaiolas de criação. Os resultados obtidos indicam que as densidades mais adequadas para a criação de adultos são as intermediárias, entre 1.4 e 1.7 cm^2 para cada mosquito.

Na presente pesquisa, a linhagem Rockefeller foi selecionada devido a estabilidade de sua criação sob condições artificiais, reduzindo-se ou eliminando-se, efeitos de outros fatores além do modelo de gaiola e densidade de adultos, na produção de ovos e sobrevivência dos insetos. Um efeito da gaiola combinado com a densidade de adulto foi observado apenas na utilização da DRS 1.0 que resultou em uma alta mortalidade de fêmeas e menor produção de ovos somente na GCM-II. Zhang et al. (2018) também detectaram menor fecundidade em gaiolas de criação em massa com

densidades mais altas (DRS=0.5), mas os autores desconsideraram a mortalidade em suas análises. É possível que o padrão de movimentação das fêmeas mantidas na GCM-II descrito no item 5.1.1.1, somado à maior abundância de adultos nessa GCM tenham contribuído para a mortalidade mais acentuada em relação à PVC.

A densidade de criação de adultos pode afetar a fecundidade das fêmeas e consequentemente, a produção total de ovos (ZHANG et al., 2018). No presente estudo, a fecundidade total (1° e 2° ciclos) não variou entre as DRS avaliadas em grandes gaiolas de criação. Entretanto, a densidade de adultos influenciou a fecundidade das fêmeas mantidas em gaiolas PVC, sendo detectado que fêmeas mantidas em densidades de criação mais altas (DRS 1.0) depositaram menos ovos quando comparadas com fêmeas criadas em densidades mais baixas (DRS 2.0).

É provável que exista um limiar entre a densidade de adultos e os parâmetros biológicos afetados pela mesma (LINTS & LINTS, 1969; PETERS & BARBOSA, 1977). Assim, deve haver um equilíbrio entre a densidade de criação e a produção de ovos/fecundidade feminina para a criação de adultos em gaiolas (ZHANG et al.; 2018). Em um estudo conduzido por Mamai et al. (2017), foi observada a diminuição da fecundidade das fêmeas de *Anopheles arabiensis* com o aumento da densidade de adultos. A fecundidade das fêmeas na GCM-II em qualquer densidade avaliada (29 ovos/fêmea/1° ciclo) foi superior à obtida por Balestrino et al. (2014) com a criação de *Ae. albopictus* na MPC na DRS 1.7 (16 ovos/fêmea/1° ciclo), gaiola. Entretanto, já foi relatado que fêmeas de *Ae. aegypti* se alimentam melhor que fêmeas de *Ae. albopictus* em condições de laboratório (SOEKIMANI et al. 1984[10] apud BALESTRINO et al., 2014). Apesar disso, os dados de fecundidade total (dois ciclos reprodutivos) do presente estudo (62 ovos/fêmea) foram similares aos alcançados por Zhang et al. (2018) com a criação de *Ae. albopictus* em grandes gaiolas nas DRS 0.9 e 0.6 (64 ovos/fêmea). Vale ressaltar que o mesmo autor acrescentou ATP (Adenosina Trifosfato) no sangue oferecido para as fêmeas e comprovou o aumento da fecundidade com esse suplemento. Com relação às gaiolas PVC, os resultados de fecundidade foram superiores aos obtidos por Carvalho et al. (2014), que obteve uma média de 48 ovos/fêmea (dois ciclos reprodutivos) na criação com gaiola PVC mantida sob uma alta densidade (DRS 0,9).

[10]SOEKIMANI, S.; MACHFUDZ; SUBAGYO, S. ADIPOETRO, YAMANISHI H., AND MATSUMURA, T. Comparative studies on the biology of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) in a room condition. ICMR Ann. 4: 143Ð151, 1984.

De acordo com Zhang et al. (2018), a fecundidade das fêmeas pode ser afetada pela qualidade do sangue, volume de sangue ingurgitado, estado de inseminação, dentre outros fatores. Portanto, esses aspectos podem estar relacionados com as diferenças encontradas entre as repetições do experimento e representam um cenário real da criação em grande escala.

A taxa de eclosão diminuiu com o aumento da densidade de adultos nas GCM-II. Diferentemente do observado na gaiola PVC em que essa redução foi observada somente para a DRS 1.4. Portanto, considerado as variações significativas entre rodadas desse experimento (Item 4.2.2.2), mais avaliações referentes a esse parâmetro seriam relevantes para a confirmação deste resultado. Além disso, no estudo de Zhang et al. (2018) não houve diferença na taxa de eclosão de larvas de *Ae. albopictus* provenientes de fêmeas mantidas em grandes gaiolas sob diferentes DRS.

No estudo de Zhang et al. (2018) ao avaliar diferentes DRS (0,9; 0,68 e 0,54) para a criação de *Ae. albopictus* em grandes gaiolas, a utilização da densidade intermediária (DRS= 0,68) também foi recomendada para a produção em grande escala de ovos. Nesse contexto, na medida em que a taxa de eclosão indica a fertilidade, a DRS mais adequada para a criação de adultos será aquela que propiciar a melhor relação entre fecundidade e fertilidade. Assim, as GCM-II mantidas nas DRS 1.7 e 1.4 produziram a maior quantidade de ovos (290.000 e 377.000, respectivamente) e apresentaram taxas de eclosão similares entre si (81 % e 74 %, respectivamente). Com base nesses dados, a quantidade de ovos viáveis produzidos em cada gaiola foi de aproximadamente 235.000 (DRS 1.7) e 279.000 (DRS 1.4). Portanto, em condições de grande escala, é viável manter gaiolas sob DRS 1.4, que garantiriam cerca de 45.000 mais ovos com um uso de apenas 1250 fêmeas a mais que a DRS 1.7.

Finalmente, a proporção 3♀:1♂ apresentou resultados semelhantes de fecundidade e fertilidade em comparação com as demais proporções avaliadas para a linhagem MBR-001. Além do mais, essa proporção foi indicada para a criação em massa de *Ae. albopictus* (ZHANG et al. ,2018). Nesse sentido, a utilização dessa proporção sexual em uma GCM-II sob DRS 1.4 certamente levaria a uma produção de 550.000 ovos em sua vida útil. Na criação em massa de *Ae. albopictus*, foi observado que com uma maior proporção de machos em uma gaiola (1:1) o assédio às fêmeas para realização da cópula foi intenso (ZHANG et al. 2018). Assim, o mesmo autor presume que a utilização

de uma maior proporção de fêmeas na gaiola diminuiria a perseguição pelos machos, contribuindo para uma melhor sobrevivência e fecundidade das fêmeas. Portanto, a criação de adultos na GCM-II com uma na proporção de 3♀: 1♂ sob uma DRS de 1.4, presumivelmente, levaria a um aumento da produção de ovos viáveis de *Ae. aegypti*. Os resultados deste estudo podem contribuir para o aprimoramento da produção em massa de ovos dessa espécie.

5.2.2 Avaliação do padrão de eclosão de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001

A protandria é definida como o fenômeno em que machos se desenvolvem mais cedo que fêmeas dentro de uma mesma geração (ALTO et al. 2005), uma característica apresentada por *Ae. aegypti* que favorece a criação de lotes de machos para liberação na ausência de uma linhagem *GSS*, na medida em que provê maior recuperação inicial de machos (PUGGLIOLI et al., 2013). Nesse estudo avaliou se a protandria expressa-se ainda na fase de eclosão. A avaliação da eclosão revelou que o número de larvas eclodidas se correlaciona com o tempo do processo, sendo maior nos minutos iniciais. Além disso, larvas machos e fêmeas eclodiram de forma uniforme ao longo do processo de eclosão, não havendo predominância de algum dos sexos nos períodos avaliados.

A eclosão de larvas de *Ae. aegypti* está relacionada com fatores como a temperatura de imersão e a condição fisiológica dos ovos (tempo de armazenamento) (CHRISTOPHERS, 1960; DIENG et al., 2006), e é estimulada pela baixa concentração de oxigênio dissolvida na água (CLEMENTS, 1992). Entretanto, apesar do estímulo a que os ovos foram submetidos neste estudo, os resultados indicaram que a eclosão variou em função do tempo de exposição. Foram observadas diferenças entre os indivíduos quanto a resposta ao início da eclosão, uma vez que apesar da maioria das larvas terem eclodido rapidamente (até 60 minutos), 14% delas eclodiram até o fim do processo de eclosão (120 minutos).

Com relação à uniformidade dos sexos na eclosão de larvas machos e fêmeas, ainda que a espécie apresente protandria, não houve influência do sexo no comportamento deste parâmetro. Assim, esta característica biológica pode estar relacionada a outros processos nos estádios tardios do desenvolvimento larval, como a nutrição. As larvas de *Ae. aegpti* devem atingir um determinado peso crítico e reserva de glicogênio para

atingirem um estado competente e consequentemente, sofrerem metamorfose para o estágio de pupa. Esse peso crítico é maior para larvas fêmeas do que para larvas machos (CHAMBERS; KLOWDEN, 1990).

Apesar de não ser o objetivo do experimento, quando se considera cada tempo de avaliação, foi observado que a proporção de machos foi ligeiramente maior que a de fêmeas. Tal fato indica que machos são predominantes na progênie da linhagem MBR-001, com uma frequência média de 55%. De acordo com Dieng et al. (2006) na reprodução de mosquitos, o pai (mosquito macho) é quem determina a proporção da progênie e, dada a segregação normal, igual número de machos e fêmeas é esperado. Contudo, os dados do presente estudo corroboram com vários estudos que registraram a predominância do gênero masculino, com fêmeas presentes numa frequência de 35 a 45% em *Ae. aegypti* (CHRISTOPHERS, 1960; DIENG et al., 2006).

5.2.3 Desenvolvimento de dietas alternativas para a criação larval

A qualidade da dieta larval e as condições de criação influenciam fortemente as características morfológicas e comportamentais dos mosquitos em sua fase adulta (BRIEGEL; KNÜSEL; TIMMERMANN, 2001; COHEN, 2001; BENEDICT et al., 2009; GUNATHILAKA et al., 2017). Assim, em programas de controle de mosquitos, que envolvem o uso da TIE, a produção em massa de machos estéreis competitivos requer uma dieta que forneça os nutrientes necessários para o adequado desenvolvimento larval e que seja de baixo custo (PARKER, 2005; BOND, 2017). Neste estudo, seis formulações de dietas foram desenvolvidas e avaliadas para a criação larval de *Ae. aegypti*. As formulações estudadas atenderam aos requisitos supracitados e apresentaram resultados em seus parâmetros biológicos e produtivos semelhantes ou superiores em comparação com a dieta controle (ração Sera Vipan®).

Larvas de *Ae. aegypti* precisam atingir um peso crítico para que ocorra a metamorfoses larva-pupa (CHAMBERS & KLOWDEN, 1990). Neste estudo, o tempo de desenvolvimento L_1-pupa foi semelhante entre as dietas avaliadas, indicando que todas elas forneceram os nutrientes necessários para que as larvas alcançassem o peso crítico. Nesse contexto, a duração da fase imatura é um aspecto importante para a criação em massa, uma vez que influencia os custos de produção (GUNATHILAKA et al., 2017).

A duração da fase imatura é um aspecto importante para a criação em massa, uma vez que influencia os custos de produção (GUNATHILAKA et al., 2017). Neste estudo, o tempo de desenvolvimento larval (L_1-pupa) foi semelhante entre as dietas avaliadas, indicando que todas elas forneceram os nutrientes necessários para que as larvas alcançassem o peso crítico e consequentemente, acontecesse a metamorfoses larva-pupa.

No presente estudo, a taxa de sobrevivência L_1-pupa atingiu, valores superiores a 89%, não sendo afetada pela dieta utilizada durante a criação larval. Valores semelhantes de sobrevivência (90%) foram registrados para larvas de *Ae. albopictus* desenvolvidas na dieta IAEA [11] (p/v 4%) usando uma densidade de 2 larvas/mL (PUGGLIOLI et al., 2016). BOND et al. (2017) também constataram taxas de sobrevivência entre 94 e 98% para *Ae. aegypti*, não sendo observadas diferenças entre as dietas testadas pelos autores (IAEA e dieta de rato de laboratório- LabDiet 5001, respectivamente). A levedura de cerveja é um ingrediente comum entre as dietas supracitadas e as dietas avaliadas no presente estudo. Além disso, a farinha de soja também está presente na LabDiet.

Quanto a sobrevivência do estágio de pupa, os resultados revelaram um comportamento semelhante deste parâmetro entre as formulações de dietas avaliadas e a dieta controle. Apenas a dieta III (77%) registrou sobrevivência inferior à dieta controle. Normalmente, pupas mortas seriam consideradas na avaliação da taxa de emergência. Entretanto, optou-se por avaliar essa mortalidade de forma separada, devido a algumas observações durante a realização do experimento: 1) grande parte das pupas mortas recuperadas da dieta III eram brancas (recém formadas); 2) as pupas sobreviventes, apresentavam dificuldade para se locomoverem na água, nadando de forma mais lenta e com impulsos mais fortes em relação às pupas desenvolvidas nas demais dietas, mas quando retiradas da água de criação larval, continuavam a nadar com certa dificuldade, mas mortalidade diminuía consideravelmente. Tal comportamento pode estar relacionado com a elevada proporção de gema de ovo em pó (80%) presente na composição da dieta III, cuja concentração de colesterol é alta (225mg/ unidade de gema) (NOVELLO et al., 2006; TACO, 2011). Vale ressaltar que o colesterol não pode ser disperso em água sem a ajuda de um agente emulsificante e, portanto, o efeito de seu excesso pode ser de característica físico-química. Durante a realização do experimento não ter foi observada

[11] Dieta IAEA: Elaborada pela Organização para a Alimentação e a Agricultura (FAO)/Laboratório de Controle de Pragas e Insetos- Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) para produção em massa de mosquitos, composta por farinha de atum, fígado bovino em pó, levedura de cerveja e mix de vitaminas (DAMIENS et al., 2012; PUGGLIOLI et al., 2013).

formação de barreira física (tipo biofilme) na água, mas a insolubilidade do colesterol pode ter dificultado a manutenção da pupa na superfície. Essa forma de vida quando submersa por maior tempo tende a perder a flutuabilidade devido ao uso de oxigênio pelos tecidos e ainda, se tornam muito pesadas para subir à superfície (CLEMENTES, 1960), o que consequentemente, contribuirá para sua mortalidade devido à baixa captação de oxigênio do meio externo. Além disso, pupas machos e fêmeas desenvolvidas na dieta III foram mais pesadas que as pupas produzidas nas dietas V e Controle. Considerando a composição da dieta III, o maior peso corpóreo pode estar relacionado com a maior quantidade de lipídeos.

Os requisitos nutricionais de um inseto, estão relacionadas com o seu conteúdo corpóreo e não com a composição de seu alimento natural (AKOV, 1962). Em *Ae. aegypti*, as reservas de carboidratos e lipídios correspondem a maior proporção do peso vivo total de larvas machos em comparação com fêmeas (CHAMBERS & KLOWDEN, 1990). Considerando que as dietas foram testadas exclusivamente para a produção de machos para liberação, as formulações I, II, IV e V revelaram um maior rendimento de machos em comparação com as demais dietas avaliadas. As dietas I, II, IV e V contém proporção igual ou maior de carboidrato em relação às demais dietas. Bond et al. (2017) obtiveram alta produtividade de machos de *Ae. aegypti*, com a utilização de uma dieta de rato com alta concentração de carboidratos (~65%). O desenvolvimento do mosquito pode estar diretamente relacionado com a absorção de carboidratos, uma vez que a queda do hormônio juvenil (JH) pode ser regulada pela obtenção de reservas calóricas e pelo aumento de alguns componentes dos carboidratos (JONES et al. 1981; CHAMBERS & KLOWDEN, 1990). Ocorre que ambos fatores, possivelmente, iniciam a cascata endocrinológica que culmina na redução do JH e consequentemente, as larvas param de se alimentar e iniciam o processo de metamorfose larva-pupa (TELANG; FRAME; BROWN, 2007). Outro fator é que o consumo de carboidrato provavelmente, leva mais rapidamente a um ganho de peso, e consequentemente, o peso crítico é atingido mais rapidamente em comparação com dietas com menor quantidade desse nutriente (CHAMBERS & KLOWDEN, 1990).

A razão sexual das de pupas recuperadas foi semelhante entre as dietas na primeira coleta de pupas, atingindo um valor médio de 0,72 de machos em relação ao total de pupas formadas. O surgimento de machos previamente às fêmeas é esperado devido à protandria, uma característica comum em espécies monogâmicas ou sem sobreposição de

gerações (ALTO et al., 2005; MERCERCER et al., 2008). Num contexto evolutivo, a protandria aumenta a oportunidade de acasalamento dos machos com fêmeas virgens (MERCER et l., 2008; YEE et al., 2012), uma vez que fêmeas necessitam de uma condição muito específica em relação à cópula/inseminação para serem poliândricas (CARVALHO et al., 2018). Assim, a utilização de dietas que sejam capazes de induzir a expressão dessa característica é primordial (PUGGLIOLI et al., 2013; BOND et al., 2017), tanto para obter um alto rendimento de machos, quanto para reduzir o risco de contaminação de fêmeas durante a liberação de linhagens que não são *GSS*.

A taxa de produção de pupas machos nas primeiras 24 horas seguiu um padrão semelhante entre as dietas avaliadas e atingiu valores médios superiores a 70%. Taxas de produção superiores à 85% foram relatadas por Puggioli et al. (2013, 2016) para *Ae. albopictus* e por Bond et al. (2017) para a *Ae. aegypti* quando utilizadas as dietas IAEA e LabDiet 5001, respectivamente. Na produção em massa, é importante recuperar uma maior quantidade de pupas machos dentro de um curto espaço de tempo, para potencializar a eficiência dos métodos de separação sexual (PUGGIOLI et al. 2013; BOND et al., 2017). Assim, com maiores taxas de produção de pupas machos num intervalo de 24 hs, evitaria realizar uma segunda coleta de pupas que consequentemente reduziria os custos relacionados com o consumo de água (para criação e separação), dieta e número de colaboradores necessários para realizar todos os demais procedimentos envolvidos no processo de criação. Além disso, altas taxa de produção de pupas machos em 24 hs sugerem uma maior sincronização do período de formação dos pupários. Tal fato contribuiria para uma determinação mais exata da idade da pupa (PUGGLIOLI et al., 2013), parâmetro “crucial” para o processo de esterilização, considerando que há uma idade adequada para realização do processo de esterilização , quanto para reduzir os possíveis danos decorrentes do processo de ;irradiação realizado durante esse estágio biológico (BALESTRINO et al., 2010; PUGGLIOLI et al., 2013, VIANEZ, 2018).

Considerando que em projetos pilotos da TIE com *Ae. aegypti* são utilizados machos estéreis provenientes das duas primeiras coletas de pupas (CARVALHO et al., 2015; GARZIERA et al., 2017), foi avaliado o rendimento acumulado de machos para cada dieta testada. Neste sentido, as dietas I, II, IV e V apresentaram altos rendimentos de pupas machos considerando ambas coletas. Mas apenas a dieta II apresentou o maior rendimento (45%) em relação às dietas com maior proporção de proteína (III e VI) e em comparação com a dieta controle (37%).

A nutrição larval adequada par mosquitos requer aproximadamente quatorze aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos polinsaturados, esteróis e nucleotídeos e cerca de oito vitaminas (KLEINIAN et al.,1977; DADD et al., 1988; KHAN; FARID; ZEB, 2013). Akov (1962) demonstrou que dietas contendo as vitaminas tiamina, piridoxina, riboflavina, niacinamida ou pantotenato de cálcio comprometeram a sobrevivência dos primeiros instares larvais de *Ae. aegypti*. No presente estudo, esses nutrientes foram fornecidos principalmente através das farinhas de aveia e de soja e levedura. Nesse sentido, com relação ao desempenho da dieta II, sua formulação contém a maior proporção dos ingredientes levedura: 20 % e farinha de aveia: 31%, dentre as dietas avaliadas, além de grande quantidade de soja (20%). Além disso, essa dieta contém a maior proporção de farinha de grão-de-bico em comparação às demais dietas. Essa leguminosa possui grande quantidade de triptofano e metionina, aminoácidos presentes em pequenas proporções nos cereais (SHAN, et al., 1987; (KHAN; VREYSEN, 2011) e tem sido eficiente nas dietas desenvolvidas para *Anopheles sp*. ((KHAN; VREYSEN, 2011); KHAN & AZEB, 2013).

No estudo conduzido por Akov (1962), observou-se que ao adicionar levedura a uma dieta a base de caseína (proteína), o desenvolvimento larval foi mais satisfatório o que, provavelmente, é resultado de uma dieta mais palatável. O mesmo autor sugere que o efeito positivo de uma fonte proteica esteja relacionado não somente ao seu valor nutritivo, mas também pelo fato de que as larvas não se alimentam o suficiente quando criadas em dietas com sabor menos agradável. O balanço nutricional e a palatabilidade das formulações desenvolvidas conduziram a um desempenho favorável na criação larval, eliminando a necessidade da adição de ingredientes onerosos como vitaminas sintetizadas ou fígado bovino em pó, utilizados em outras dietas para criação em massa de mosquitos.

Inesperadamente, as dietas que apresentaram resultados biológicos e produtivos mais favoráveis (I, II, IV e V), foram também as que revelaram menor custo total por quilograma de dieta (~ R$31; R$19; R$ 35 e R$ 22, respectivamente). Nesse contexto, a utilização dessas dietas na criação em massa de *Ae. aegypti* poderia reduzir os custos com alimentação larval entre oito e dezessete vezes, a depender da dieta utilizada. Vale ressaltar que o custo de cada dieta pode se tornar ainda menor quando os ingredientes forem adquiridos em grandes quantidades, o que seria o cenário real de uma biofabrica de produção de insetos. Além disso, considerando o rendimento acumulado obtido no presente estudo, a produção larval utilizando as dietas supracitadas acarretaria em um

menor requerimento de gramas de ovos de *Ae. aegypti* para a criação dos lotes, menor quantidade de bandejas de criação larval e consequentemente, menor consumo de água. Portanto, a redução dos custos extrapolaria os valores apresentados na Tabela 13.

Outro ponto favorável a ser considerado no que refere ao custo-benefício é que os ingredientes utilizados nesse estudo podem ser facilmente obtidos a preços acessíveis no mercado nacional. A dieta controle (Sera Vipan®- ração para peixes ornamentais), sugerida no protocolo de Carvalho et al. (2014) além de dispendiosa é importada, o que limita sua compra à poucos fornecedores e aumenta as chances de indisponibilidade no mercado nacional por haver apenas um único revendedor no país. A dieta IAEA por sua vez, tem um custo aproximado[12] de R$ 70,00/kg, enquanto a dieta de rato avaliada por Bond et al. (2017) é de baixo custo (R$8,00/kg) [2]. Apesar do valor da dieta de rato ser inferior ao valor das dietas desenvolvidas nesse estudo, a LabDiet 5001 também apresenta alguns pontos desfavoráveis para sua utilização no Brasil: 1) Valor condicionado ao valor do dólar; 2) é uma dieta importada, e portanto, os gastos referentes à importação devem ser agregados ao valor final do produto; 3) compras em grandes quantidades diminuiriam o custo, mas isso dependeria do tempo de validade da dieta; 4) oscilações de disponibilidade do produto pelo distribuidor brasileiro.

Considerando que o sucesso do controle autocida requer a produção de machos estéreis de qualidade, estudos complementares que avaliem a longevidade do adulto e sua competitividade sexual devem ser conduzidos para definir a dieta mais eficiente (PARKER, 2005; BENEDICT et al., 2009; PUGGLIOLI et al., 2016; SOMDA et al., 2017) para a criação em massa desta linhagem de *Ae. aegypti*. Neste contexto, embora estes parâmetros biológicos ainda precisem ser avaliados, o presente estudo revelou quatro dietas potenciais (I, II, IV e V), com destaque para a dieta II, cuja utilização na criação larval conduziu a melhores resultados quando comparada com a dieta controle. Os resultados deste estudo sugerem que a dieta II constitui uma opção favorável para a criação em massa de machos estéreis de *Ae. aegypti*, linhagem MBR-001 visando sua utilização em projetos de SIT.

[12] US$18.00 e US$2,00, respectivamente. Conversão de moedas realizada em 15/07/2018.

5.2.4 Determinação da densidade ótima para a criação larval

O desenvolvimento e sobrevivência em *Ae. aegypti* estão relacionados com a densidade intraespecífica de criação de seus estágios imaturos (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014). Na produção em massa de mosquitos é desejável um desenvolvimento larval rápido e com alta sobrevivência, um tamanho padronizado dos indivíduos e sincronismo na formação de pupas (MEDICI et al., 2011). A fim de determinar a densidade ótima para a criação larval de *Ae. aegypti*, foram avaliadas densidades larvais entre 1 e 4 larvas/mL. Os resultados obtidos mostraram que a densidade de criação larval afetou a porcentagem de recuperação de pupas e principalmente, o peso corporal de machos nessa fase de vida.

A duração do tempo de criação larval é um parâmetro relevante para a criação em massa na medida em que influencia diretamente os custos de produção (PUGGLIOLI et al., 2016). No presente estudo, o tempo de desenvolvimento (L_1-pupa) não foi afetado pela densidade de larvas, corroborando com os estudos de Beserra; Fernandes, Ribeiro (2009) para *Ae aegypti* e Medici et al. (2011) para *Ae. albopictus.* Nos trabalhos conduzidos por Gilles et al. (2011) para *Anopheles arabiensis*, e Pugglioli et al. (2016) para *Ae. albopictus,* foram detectadas diferenças no tempo de desenvolvimento larval quando este parâmetro esteve associado à diferentes proporções de dietas. Assim, observou-se que o aumento da densidade larval relacionado a menores níveis de dieta prolongou o tempo de desenvolvimento ou quando em níveis de dieta mais altos, reduziu o tempo de desenvolvimento larval. Portanto, provavelmente, esse padrão é resultante da competição intraespecífica pelo recurso alimentar.

A densidade de criação também não acometeu a sobrevivência (L_1-pupa), assim como no estudo de Beserra; Fernandes, Ribeiro (2009). Pugglioli et al. (2016), por sua vez, revelou menor sobrevida em densidades baixas combinadas com maior tratamento alimentar. A autora considera que a menor sobrevivência se deve ao excesso de dieta residual na bandeja de criação, uma vez que as larvas foram incapazes de consumir toda o alimento oferecido. Assim, os resultados obtidos na pesquisa atual demonstram um equilíbrio entre a quantidade de dieta oferecida por larva (regime de alimentação BMB) e as densidades de criação de larvas avaliadas.

A criação larval em densidade baixa (1.0 larvas/mL) acelerou a produção global de pupas em relação às densidades mais altas no primeiro dia de coleta.

Aproximadamente metade dos indivíduos criados sob tal densidade se tornaram pupas nas primeiras 24 horas. Entretanto, a razão sexual (♂) nesta densidade foi inferior à razão sexual das densidades mais altas que 2.25 larvas/mL, como resultado do maior rendimento de pupas fêmeas também formadas.

Grandes diferenças entre o rendimento de machos na primeira coleta foram detectadas somente quando densidades larvais extremas foram utilizadas (1 e 4 larvas/mL). A criação na densidade mais baixa rendeu aproximadamente o dobro de machos em comparação com a densidade mais alta. Como esperado, as densidades larvais que propiciaram a maior recuperação de pupas machos na primeira coleta tiveram menores rendimentos na segunda e terceira coletas. Contudo, o rendimento de machos desenvolvidos nas densidades acima de 2.25 larvas/mL foi equivalente entre a primeira e segunda coletas.

A densidade larval mais extrema (4 larvas/mL) apresentou maior recuperação de machos na segunda coleta em comparação com a primeira. Os dados corroboram com Medici et al. (2011) que também relatou menor recuperação de machos em 24 hs nas densidades mais elevadas de criação larval. A recuperação de fêmeas nesse período também se mostrou inversamente proporcional à densidade de criação. Maior quantidade de pupas fêmeas no primeiro dia de coleta tornam a separação de pupas mais laboriosa.

O tamanho de *Ae. aegypti* é altamente sensível à densidade larval (JIRAKANJANAKIT et al., 2007). O presente estudo revelou que a criação em menores densidades produziu pupas machos com maior peso corporal, exceto para as densidades 2.0 e 4.0 que não apresentaram padrão diferente. Os resultados foram similares aos obtidos por Timmermann& Briegel (1993) e Beserra; Fernandes, Ribeiro (2009) que detectaram uma relação inversamente proporcional entre densidade larval e tamanho dos machos da mesma espécie (aumento da densidade, diminuição do tamanho). Medici et al. (2011) também obteve pupas de *Ae. albopictus* com cefalotórax mais largos quando desenvolvidas em densidades mais baixas de criação larval. Considerando que a competição pode afetar diretamente a protandria (KLECKNER et al. 1995), mesmo que o recurso alimentar esteja em quantidade adequada, o desenvolvimento sob alta densidade larval pode dificultar o forrageamento das larvas. Nessas condições, os machos minimizam o tempo de desenvolvimento e se tornam pupas com menor massa corporal (KLECKNER et al. 1995). Todavia, como relatado anteriormente, a formação de pupas

na densidade de 4 larvas/mL se deu de forma proporcional entre as duas primeiras coletas. Tal fato pode ter contribuído para que essas larvas consumissem maior quantidade de comida em relação às densidades de 2,5 a 3,5 larvas/mL e portanto, obtivessem peso corporal também similar às pupas criadas sob densidades baixas. Vale ressaltar que nos estudos de Timmermann & Briegel (1993), Jirakanyanaki et al. (2007), Beserra; Fernandes, Ribeiro (2009) e Medici et al. (2011), as densidades avaliadas foram baixas em relação ao presente estudo, variando entre 0,04 e 1,5 larvas/mL.

Diferentemente dos machos, a massa corporal das fêmeas não foi afetada pela densidade de criação nos dois primeiros dias de coleta. Contudo, na terceira coleta a relação inversa entre densidade larval e peso também foi observada. Nesse dia de coleta, as fêmeas apresentaram maior massa corporal em relação às fêmeas produzidas nos dois primeiros dias. Do mesmo modo, Medici et al. (2011) detectou variação entre os tamanhos de fêmeas de *Ae. albopictus* com a criação em diferentes densidades larvais. No entanto, o mesmo autor sugere que a diferença de tamanho entre os sexos (essencial para o processo de separação de pupas) é geneticamente impulsionada, sendo pouco influenciada pelas condições de criação.

Dentre cada densidade avaliada, os machos da primeira coleta apresentaram maior peso corporal em relação aos machos da segunda coleta. Embora não avaliadas estatisticamente, essas diferenças são cruciais para a definição de quais machos devem ser liberados (somente primeira coleta ou ambas). Além disso, no presente estudo os indivíduos foram alimentados de acordo com o regime para a criação de machos para liberação. Portanto, apesar de estudos com o regime alimentar para a colônia ainda precisarem ser realizados, os resultados referentes ao peso das fêmeas são importantes para a definição da melhor densidade larval para criação de lotes de colônia, pois fêmeas maiores produzem mais ovos por ciclo reprodutivo (BAR-ZEEV, 1957; STEINWASCHER, 1982).

A emergência de adultos foi satisfatória em todas as densidades avaliadas. Assim, de forma geral, a densidade de criação larval influenciou apenas no rendimento e peso corporal dos indivíduos. De forma geral, a densidade larval é um dos fatores que acarreta na competição larval, que incorre em um custo específico para cada sexo. Para minimizar os efeitos da competição em sua aptidão, machos e fêmeas parecem manter a característica mais importante de sua história de vida (para machos, o tempo de

desenvolvimento e para fêmeas, o peso corporal) (BEDHOMME et al., 2003). Tal fato é de extrema importância para a criação em massa, considerando que dependendo dos fins para os quais a criação é realizada (manutenção da colônia ou produção de machos para liberação), diferentes densidades larvais são utilizadas.

A taxa de produção de pupas machos em 24 hs é um parâmetro de extrema relevância para a criação em massa, uma vez que determina a quantidade de machos que podem ser recuperados para liberação (PUGGLIOLI et al., 2016). Nesse estudo, uma alta produtividade masculina (~78 %) foi obtida na densidade larval mais baixa (1 larva/mL) em comparação com densidades mais altas. Uma inversão desse padrão foi observada na taxa de produção em 48 hs. Assim, a alta produtividade obtida na segunda coleta compensa a baixa produtividade da primeira ou vice e versa. Isso reflete no rendimento acumulado de machos que se mostrou similar entre as densidades avaliadas. Nesse sentido, em cenários de produção em que somente um dia de coleta de pupas será utilizado, a criação larval em densidades mais baixas será a mais propícia.

A criação larval em densidades altas não se mostrou favorável, uma vez que o rendimento acumulado de machos foi semelhante entre as densidades avaliadas. Todos esses fatores incorrem diretamente nos custos de produção em massa do mosquito. Considerando a planilha PSP (4.3.3), pode-se observar que quanto maior a densidade larval utilizada, menor quantidade de bandejas, carrinhos e espaço físico serão necessários e ainda, e o consumo de água e dieta serão inferiores. Assim, de forma geral, o presente estudo evidenciou que a criação sob densidades de até 2.25 larvas/mL tem resultados produtivos similares entre si e que essas densidades são ótimas para a criação em massa de *Ae. aegypti*. Além disso, a densidade larval pode ser um fator manipulável dentro do sistema produtivo útil para a adequar o tamanho dos machos produzidos ao tamanho dos machos selvagens provenientes da área-alvo onde o controle vetorial autocida deverá ser realizado.

5.3 META III- PROCESSOS PÓS-PRODUÇÃO: CONDIÇÕES PARA TRANSPORTE DE ADULTOS

O transporte de mosquitos adultos estéreis é o método mais viável (CULBERT et al., 2017). Contudo, não existem referências que sustentem a praticabilidade desse

método para *Ae. aegypti*, o que seria de extrema relevância para aplicação do controle autocida. Neste sentido, o presente estudo determinou condições iniciais para viabilização do transporte de machos estéreis de *Ae. aegypti* resfriados (imobilizados). Foi determinada o intervalo de temperatura ideal, o período-limite para imobilização e manipulação dos mosquitos e a partir desses parâmetros, definiu-se a faixa de temperatura adequada para o transporte avaliados em três diferentes durações.

Na aplicação da TIE, o tamanho da área a ser tratada e consequentemente o número de insetos requeridos, pode determinar se é mais vantajoso construir uma instalação de criação em massa para produzir os insetos estéreis no local ou transportá-los de uma biofábrica instalada em outra região (PAGABELEGUEM et al., 2015), uma vez que o custo de instalação de uma fábrica pode ser maior que os custos referentes ao transporte dos machos. Nos casos em que o transporte é opção mais viável, a imobilização dos insetos através do resfriamento pode ser utilizada. Nessa pesquisa, todas as faixas de temperatura e períodos avaliados para imobilização dos machos estéreis não comprometeram a habilidade de voo testada em condições laboratoriais e a sobrevivência dos mosquitos sob condições em condição de estresse. O resfriamento de insetos adultos para o transporte impede que o choque mecânico danifique os machos durante todo o trajeto impede e ainda, reduz o metabolismo dos mesmos (CULBERT et al., 2017).

Entretanto, foi contatado que a faixa de temperatura elevada avaliada (6 a 9 °C) os mosquitos foram “parcialmente imobilizados”, uma vez que permaneceram imóveis nas paredes dos recipientes utilizados, não se despregando das paredes diferentemente do comportamento observado para as demais faixas avaliadas. Em uma situação de imobilização por resfriamento, os indivíduos perdem a força ou a coordenação para ficar em pé (DAVID et al., 1998; MACMILLAN; SINCLAIR, 2011). O resfriamento de insetos ocasiona em um “coma frio”, onde a transmissão e o movimento neuromuscular são interrompidos, porém esse é um estado é reversível (MACMILLAN & SINCLAIR, 2011). Nesse sentido, machos “parcialmente imobilizados” poderiam sofrer maiores danos físicos devido a incompleta paralização do seu sistema neuromuscular. Dessa maneira, acondicionar mosquitos para o transporte sem sua completa imobilização seria laborioso e consequentemente, exigiria maior espaço para transportá-los. Por outro lado, os efeitos dessa faixa de temperatura elevada na imobilização dos adultos podem ser interessantes para fins de liberação terrestre, ou aérea, já que provavelmente os adultos despertariam, mais rapidamente quando liberados.

Baseados nos resultados da primeira etapa do experimento, e nas diretrizes dos programas de SIT para o controle da mosca-do-mediterrâneo, *C. capitata* (ZAVALA-LÓPEZ & ENKERLIN, 2017), definiu-se para a imobilização dos insetos a faixa de temperatura de 2 a 5°C durante um período de 45 minutos (±15 min) como limite para exposição dos machos ao resfriamento. Em um cenário de produção em massa, este período seria suficiente para imobilizar os mosquitos em câmaras frias e acondicioná-los, ainda "nocauteados" nos dispositivos de transporte. Além disso, foi determinada uma faixa de temperatura moderadamente mais alta para o transporte dos machos estéreis (4 a 7°C), em que eles estivessem totalmente imobilizados.

Os dados obtidos neste experimento foram similares aos encontrados por Culbert et al. (2017). Esses autores definiram a temperatura de 6°C como ideal para o transporte de machos estéreis de *Anopheles arabiensis*. Contudo, os mesmos autores recomendaram uma temperatura entre 4 e 10 °C durante o transporte, prevendo oscilações de ± 3°C em torno da temperatura ótima definida. O transporte de adultos imobilizados tem sido utilizado para algumas espécies-alvo de SIT, tais como moscas-das-frutas dos gêneros: *Ceratitis* e *Anastrepha*, *Bactrocera* e *Dacus*). Na Guatemala e México, rotineiramente é realizada a imobilização de adultos machos estéreis da mosca-do-mediterrâneo entre 2 e 5 °C durante 45 ± 15 minutos, com subsequente transporte para o aeroporto em um veículo refrigerado (10 e 14 °C) (SAGARPA-SENASICA, 2013; ZAVALA-LÓPEZ & ENKERLIN 2017).

No caso da mosca-do-mediterrâneo, o nível de dano ao inseto exposto às baixas temperaturas é diretamente proporcional à duração da exposição (ZAVALA-LÓPEZ & ENKERLIN. 2017). No presente estudo, a incubação por até seis horas na temperatura para transporte (4 a 7°C) não afetou a habilidade de voo e a sobrevivência dos indivíduos sob condições de estresse. Culbert et al. (2017) avaliaram diferentes períodos de transporte (1, 4, 8 e 24 horas) e não obtiveram efeito da temperatura na sobrevivência de mosquitos machos imobilizados por até 24 horas.

Outro importante parâmetro avaliado foi o tempo de recuperação dos mosquitos após o resfriamento (despertar até voar). Este parâmetro biológico parece estar diretamente relacionado com o tempo de exposição à baixas temperaturas (MACDONALD et al., 2004; MACMILLAN & SINCLAIR, 2011). Neste estudo, ao contrário do esperado, machos imobilizados e incubados durante duas horas demoraram mais tempo para se recuperarem em relação aos machos incubados por períodos mais

longos. Portanto, estudos complementares são necessários para avaliar se existe um limiar de tempo de exposição à baixas temperaturas que influencie no período de recuperação dos mosquitos. Além disso, no estudo de Culbert et al. (2017), o tempo de recuperação de todos os adultos de *A. arabiensis* expostos durante 20 minutos, foi inferior (~ 110 segundos) ao obtido neste trabalho, considerando temperaturas entre 4 a 7°C. Contudo, é sabido que o tempo de recuperação provavelmente, varia de acordo com as condições ambientais da sala, incubadoras (maior ou menor oscilação da temperatura), materiais utilizados para acondicionamento dos indivíduos e principalmente, diverge consideravelmente entre espécies e populações de insetos (MACMILLAN & SINCLAIR, 2011).

Diferentemente do trabalho realizado por Culbert et al. (2017), a atual pesquisa foi conduzida com machos estéreis, representando o cenário real do transporte de adultos, o que aumenta a precisão das condições para transporte de mosquitos aqui definidos. Além disso, a sobrevivência foi avaliada sob condição de estresse (sem alimento), simulando o pior cenário de liberação em campo aberto, em que os machos poderiam não encontrar nenhuma fonte alimentar. Parâmetros como compactação de adultos para o transporte e longevidade dos adultos resfriados (FAO/IAEA/USDA, 2014) ainda necessitam ser avaliados. Além disso, como esses machos precisam sobreviver ao transporte e uma vez liberados competir com os machos selvagens pela cópula com a fêmea, a competitividade entre machos por cópula após as condições de transporte também precisa ser avaliada (CULBERT et al., 2017). Contudo, os resultados obtidos são inéditos para *Ae. aegypti* e contribuem para a definição das condições para o transporte de machos estéreis desta espécie. Tais condições são fundamentais no desenvolvimento de diretrizes para distribuição de mosquitos estéreis entre biofábricas e centros de liberação.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos na Meta “Plano de aplicação para a produção em massa da linhagem MBR-001”, permitem concluir que podem existir diferenças nos parâmetros produtivos entre linhagens de uma mesma espécie. Assim, a criação em massa de cada linhagem deve considerar aspectos da história de vida e características adaptativas da população fundadora da colônia. Para tanto, ajustes no protocolo de criação podem ser necessários, para maximizar a produtividade sem detrimento da qualidade. Esses ajustes podem ser cruciais na medida em que estão diretamente ligados à demanda de espaço físico da biofábrica, custo e mão-de-obra.

Com relação à Meta de “ Padronização e aprimoramento do sistema de produção em massa”, foi desenvolvido um novo modelo de gaiola de criação em massa (GCM-II), que apesar de necessitar de melhorias, encontra-se pronta para utilização. Além disso, foi observado que diferentes densidades de criação de adultos podem aumentar ou diminuir a produção total de ovos viáveis e que possivelmente, o modelo/estrutura da gaiola pode afetar a produtividade em densidades muito altas. Ainda sobre tal meta, referente à padronização e aprimoramento da criação larval, detectou-se que a protandria não se manifesta desde o momento da eclosão das larvas e que possivelmente, está relacionada com aspectos fisiológicos/genéticos exibidos em fases mais tardias do desenvolvimento larval. Três dietas larvais formuladas com insumos nacionais de baixo custo, apresentaram resultados superiores à dieta atualmente indicada para a criação em massa da espécie. Ademais, uma ampla faixa de densidades ótimas de criação larval (1 a 2,25 larvas/mL) foi determinada como eficiente. Tais definição contribuirão para a padronização e otimização das condições ideais de produção de machos de qualidade, com a melhor relação custo benefício possível.

Sobre a Meta “Processos pós-produção: condições para o transporte de adultos”, a imobilização de *Ae. aegypti* em baixas temperaturas se mostrou viável, pois não afetou a sobrevivência ou habilidade de voo. Ainda que testes complementares para avaliar a competitividade desses machos devam ser realizados, recomenda-se para a imobilização de *Ae. aegypti* o período de 45 minutos (2 a 5°C) e o transporte por até seis horas numa temperatura entre 4 e 7°C. Tais resultados podem contribuir para ampliar a área de ação de uma biofábrica de mosquitos.

Considerando todas as metas delineadas, o presente trabalho forneceu informações, produtos e/ou condições que contribuíram para o desenvolvimento de um protocolo padronizado e para o aprimoramento da criação em massa de *Ae. aegypti*, visando a produção de alta qualidade e a redução dos custos operacionais em estratégias de controle que demandem a produção em massa desse vetor.

REFERÊNCIAS

AGEEP, T. B.; DAMIENS, D.; ALSHARIF, B.; AHMED, A.; SALIH, E. H. O.; AHMED, F. T. A.; DIABATÉ, A.; LEES, R. S.; GILLES, J. R. L.; SAYED, B. B. El. Participation of irradiated *Anopheles arabiensis* males in swarms following field release in Sudan. **Malaria Journal,** v. 13, n. 484, p. 1–11, 2014.

AKOV, S. A qualitative and quantitative study of the nutritional requirements of *Aedes aegypti* L. larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 8, n. 3, p. 319–335, 1962.

ALMEIDA, E. A. P. Fecundidade, fertilidade e quiescência dos ovos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em resposta a variações de temperatura e umidade. **Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia**, v. 1762, p. 50, 2005.

ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1243–1247, out. 2002.

ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 173–178, maio 2002.

ALTO, B. W., M. W. GRISWOLD, AND L. P. LOUNIBOS. Habitat complexity and sex-dependent predation of mosquito larvae in containers. **Oecologia,n** 146, p 300-310, 2005.

ARAÚJO, H.; CARVALHO, D.; IOSHINO, R.; COSTA-DA-SILVA, A.; CAPURRO, M. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2075-4450/6/2/576/>.

ARMBRUSTER, P.; HUTCHINSON, R. A. Pupal Mass and Wing Length as Indicators of Fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 699–704, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/0022-2585-39.4.699>.

BALESTRINO, A. F.; PUGGIOLI, a; BELLINI, R.; PETRIC, D.; GILLES, J. R. L.; BALESTRINO, F. Mass Production Cage for *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) Mass Production Cage for *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae). v. 51, n. 1, p. 155–163, 2014a.

BALESTRINO, F.; MEDICI, a; CANDINI, G.; CARRIERI, M.; MACCAGNANI, B.; CALVITTI, M.; MAINI, S.; BELLINI, R. Gamma ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus males*. **Journal of medical entomology**, v. 47, p. 581–591, 2010.

BALESTRINO, F.; GILLES, J. R. L.; SOLIBAN, S. M.; NIRSCHL, A.; BENEDICT, Q. E.; BENEDICT, M. Q. Mosquito Mass Rearing Technology: A Cold-Water Vortex Device for Continuous Unattended Separation of *Anopheles arabiensis* Pupae from Larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 27, n. 3, p. 227–235, 2011.

BALESTRINO, F.; PUGGIOLI, A.; BELLINI, R.; PETRIC, D.; GILLES, J. R. L. Mass Production Cage for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 155–163, 2014b.

BALESTRINO, F.; PUGGIOLI, A.; GILLES, J. R. L.; BELLINI, R. Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mass rearing. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91914, 2014c.

BALESTRINO, F.; PUGGIOLI, A.; CARRIERI, M.; BELLINI, R. Quality control methods for *Aedes albopictus* sterile male production. p. 1–18, 2017.

BARROS, I. O.; SOARES, A. A. Adaptações anatômicas em folhas de marmeleiro e velame da caatinga brasileira. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 1, p. 192–198, 2013.

BEDHOMME, S.; AGNEW, P.; SIDOBRE, C.; MICHALAKIS, Y. Sex-specific reaction norms to intraspecific larval competition in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 4, p. 721–730, 2003.

BELLINI, R.; MEDICI, A.; PUGGIOLI, A.; BALESTRINO, F.; CARRIERI, M. Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 317–325, 2013. Disponível em: <http://jme.oxfordjournals.org/content/50/2/317.abstract>.

BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. **The first releases of transgenic mosquitoes: An argument for the sterile insect techniqueTrends in Parasitology**, 2003.

BESERRA, E.B., FERNADES, C.R.M., RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 847–852, 2009.

BOND, J. G.; RAMÍREZ-OSORIO, A.; MARINA, C. F.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; DOR, A.; WILLIAMS, T. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito Aedes aegypti. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–13, 2017.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. da S.; VALLE, D. Aedes aegypti resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199–203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, dez. 2007. Disponível em: <scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

BRATHWAITE DICK, O.; SAN MARTÍN, J. L.; MONTOYA, R. H.; DEL DIEGO, J.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–93, 2012.

BRIEGEL, H.; KNÜSEL, I.; TIMMERMANN, S. E. Aedes aegypti: size, reserves, survival, and flight potential. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, v. 26, n. Foster 1995, p. 21–31, 2001.

CALKINS & PARKER, 2005. Sterile Insect Quality In: DYCK, V; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Techinique: principles and practice in area-wide integrated pest management.** Vienna:Springer iaea, 2005. P. 269-296.

CALVITTI, M.; MARINI, F.; DESIDERIO, A.; PUGGIOLI, A.; MORETTI, R. Wolbachia density and cytoplasmic incompatibility in Aedes albopictus: Concerns with using artificial Wolbachia infection as a vector suppression tool. **PLoS ONE**, 2015.

CARVALHO, D. O. Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti*. São Paulo. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia, 2012. 122pp.

CARVALHO, D. O.; NIMMO, D.; NAISH, N.; MCKEMEY, A. R.; GRAY, P.; WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T.; VIRGINIO, J. F.; ALPHEY, L.; CAPURRO, M. L. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments,** n. 83, p. 1–10, 2014.

CARVALHO, D. O.; MCKEMEY, A. R.; GARZIERA, L.; LACROIX, R.; DONNELLY, C. a.; ALPHEY, L.; MALAVASI, A.; CAPURRO, M. L. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003864, 2015. Disponível em:http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003864%5Cnhttp://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003864>.

CARVALHO D. O; CAPURRO M. L. C. Community Engagement. In: ZACH N. ADELMAN. **Genetic Control of Malaria and Dengue**, Oxford: Academic Press, 2016. 409-422pp. ISBN: 978-0-12-800246-9

CARVALHO, D. C. Obtenção e caracterização de linhagem transgênica de *Aedes aegypti* de machos geneticamente estéreis. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia, 2016. 101pp.

CARVALHO, D. O.; CHUFFI, S.; IOSHINO, R. S.; MARQUES, I. C. S.; FINI, R.; COSTA, M. K.; ARAÚJO, H. R. C.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; KOJIN, B. B.; CAPURRO, M. L. Mosquito pornoscopy: Observation and interruption of *Aedes aegypti* copulation to determine female polyandric event and mixed progeny. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–14, 2018.

CATÃO, R.; GUIMARÃES, R. Mapeamento da reemergência do dengue no Brasil–1981/82-2008. **Hygeia**, v. 7, n. 13, p. 173–185, 2011.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L.; CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 3, p. 617–620, 2017.

CENTRAL DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/arbdet.htm> Acesso em 05 de maio de 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/mosquitolifecycle.pdf>
Acesso em: Julho 2018.

CHAMBERS, G. M.; KLOWDEN, M. J. Correlation of nutritional reserves with a critical weight for pupation in larval Aedes aegypti mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 6, n. 3, p. 394–399, 1990.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes.** Development, nutrition and reproduction. 1º. Ed. London: Chapman and Hall, 1992. 509 pp. ISBN 0-412-40180-0.

COHEN, A.C. Formalizing insect rearing and artificial diet technology. **American Entomologist,** 47(4), 198–206, 2001.

CONSOLI, R. A. G. B; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1º. Ed. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz, 1994. 228pp. ISBN 85- 85676-03-5.

COURET, J.; DOTSON, E.; BENEDICT, M. Q. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

CHRISTOPHERS, S. *et al*. ***Aedes aegypti*** **(L.) the yellow fever mosquito**: its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press, 1960. 739pp.

CULBERT, N. J.; LEES, R. S.; VREYSEN, M. J. B.; DARBY, A. C.; GILLES, J. R. L. Optimised conditions for handling and transport of male *Anopheles arabiensis*: effects of low temperature, compaction, and ventilation on male quality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 164, n. 3, p. 276–283, 2017.

CURTIS, C.F. et al. (1982) A field trial on control of *Culex quinquefasciatus* by release of males of a strain integrating cytoplasmic incompatibility and a translocation. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** 31, 181–190.

DA COSTA VASCONCELOS, P. F. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2003.

DADD RH; KLEINJAN JE; ASMAN SM. Eicosapentaenoic acid in mosquito tissues: differences between wild and laboratory-reared adults. **Environmental Entomology,** 17:172–180, 1988.

DAMIENS, D.; BENEDICT, M. Q.; WILLE, M.; GILLES, J. R. L. An Inexpensive and Effective Larval Diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): Eat Like a Horse, a Bird, or a Fish? **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 5, p. 1001–1011, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/ME11289>.

DAVID, R.J., GIBERT, P., PLA, E., PETAVY, G., KARAN, D., MORETEAU, B., 1998. Cold stress tolerance in Drosophila: analysis of chill coma recovery in D. melanogaster. **Journal of Thermal Biology** 23, 291–299.

DAVIDSON, G.; ODETOYINBO JA, COLUSSA B, COZ J. A field attempt to assess the mating competitiveness of sterile males produced by crossing 2 members species of the Anopheles gambiae complex. Bull. **World Health Organ** 42, 55–67, 1970.

DICK GW, KITCHEN SF, HADDOW AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; 46:509–20,1952.

DIENG, H.; BOOTS, M.; TAMORI, N.; HIGASHIHARA, J.; OKADA, T.; KATO, K.; ESHITA, Y. Some technical and ecological determinants of hatchability in Aedes albopictus, a potential candidate for transposon-mediated transgenesis. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 382–389, 2006.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, p. 10–15, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102017000100606&lng=en&tlng=en>.

DUQUE LUNA, J. E.; FERRER MARTINS, M.; DOS ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibilidade de Aedes aegypti aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saude Publica**, v. 38, n. 6, p. 842–843, 2004.

DYCK, V.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S.; KLASSEN, W.; CURTIS, C. History of the Sterile Insect Technique. In: **Sterile Insect Technique**. Vienna:**Springer Netherlands**,. p. 3–36, 2005.

FARES, R. C. G.; SOUZA, K. P. R.; AÑEZ, G.; RIOS, M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, n. spe2, p. 1–13, 2015.

FARIA, N. R.; QUICK, J.; CLARO, I. M.; THÉZÉ, J.; DE JESUS, J. G.; GIOVANETTI, M.; KRAEMER, M. U. G.; HILL, S. C.; BLACK, A.; DA COSTA, A. C.; FRANCO, L. C.; SILVA, S. P.; WU, C. H.; RAGHWANI, J.; CAUCHEMEZ, S.; DU PLESSIS, L.; VEROTTI, M. P.; DE OLIVEIRA, W. K.; CARMO, E. H.; COELHO, G. E.; SANTELLI, A. C. F. S.; VINHAL, L. C.; HENRIQUES, C. M.; SIMPSON, J. T.; LOOSE, M.; ANDERSEN, K. G.; GRUBAUGH, N. D.; SOMASEKAR, S.; CHIU, C. Y.; MUÑOZ-MEDINA, J. E.; GONZALEZ-BONILLA, C. R.; ARIAS, C. F.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; BAYLIS, S. A.; CHIEPPE, A. O.; AGUIAR, S. F.; FERNANDES, C. A.; LEMOS, P. S.; NASCIMENTO, B. L. S.; MONTEIRO, H. A. O.; SIQUEIRA, I. C.; DE QUEIROZ, M. G.; DE SOUZA, T. R.; BEZERRA, J. F.; LEMOS, M. R.; PEREIRA, G. F.; LOUDAL, D.; MOURA, L. C.; DHALIA, R.; FRANÇA, R. F.; MAGALHÃES, T.; MARQUES, E. T.; JAENISCH, T.; WALLAU, G. L.; DE LIMA, M. C.; NASCIMENTO, V.; DE CERQUEIRA, E. M.; DE LIMA, M. M.; MASCARENHAS, D. L.; NETO, J. P. M.; LEVIN, A. S.; TOZETTO-MENDOZA, T. R.; FONSECA, S. N.; MENDES-CORREA, M. C.; MILAGRES, F. P.; SEGURADO, A.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A.; BEDFORD, T.; NUNES, M. R. T.; SABINO, E. C.; ALCANTARA, L. C. J.; LOMAN, N. J.; PYBUS, O. G. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 2017.

FAY, R. W.; MORLAN, H. B. A mechanical device for separating the developmental stages, sexes and species of mosquitoes. **Mosquito News**, 1959. Disponível em: <http://citebank.org/node/114760%5Cn%5Cthttp://www.archive.org/details/cbarchive_114760_amechanicaldeviceforseparating1959>.

FAY, R.W., MCCRAY, E.M. & KILPATRICK, J.W. Mass production of sterilized male *Aedes aegypti*. **Mosquito News.** 23, 210-214, 1963.

FOCKS, D.A. An improved separator for the developmental stages, sexes and species of mosquito (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol**. 17,567-568 (1980).

FUNASA. Histórico da Presença do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Brasil. p. 23–25, 2001.

FORATTINI O. P. **Culicidologia Médica. Identificação, Biologia e Epidemiologia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2002. 864pp.

GARZIERA, L.; PEDROSA, M. C.; DE SOUZA, F. A.; GÓMEZ, M.; MOREIRA, M. B.; VIRGINIO, J. F.; CAPURRO, M. L.; CARVALHO, D. O. Effect of interruption of over-flooding releases of transgenic mosquitoes over wild population of Aedes aegypti: two case studies in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 164, n. 3, p. 327–339, 2017.

GERBERG, E. J. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. **Bulletin of the American Mosquito Control Association**, v. 5, n. 5, p. 1–109, 1970.

GILLES, J. R. L.; LEES, R. S.; SOLIBAN, S. M.; BENEDICT, M. Q. Density-Dependent Effects in Experimental Larval Populations of Anopheles arabiensis (Diptera: Culicidae) Can Be Negative, Neutral, or Overcompensatory Depending on Density and Diet Levels. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 296–304, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/ME09209>.

GOLBERG, L.; DE MEILLON, B. The nutrition of the larva of Aëdes aegypti Linnaeus. 3. Lipid requirements. **Biochemical Journal**, v. 48, n. 3, p. 372–379, 1948.

GOMES A DOS S, SCIAVICO CJ DE S, EIRAS AE 2006. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** vol. 39 (4): 327-332.

GÓMEZ-DANTÉS H, WILLOQUET JR. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control**. Caderno Brasileiro de Saúde Pública,** Rio de Janeiro, 25 Sup 1:S19-S31,2009.

GORMAN, K.; YOUNG, J.; PINEDA, L.; MÁRQUEZ, R.; BERNAL, D.; TORRES, R.; SOTO, Y.; LACROIX, R.; NAISH, N.; KAISER, P.; TEPEDINO, K.; PHILIPS, G.; CÁCERES, L. Short-term suppression of *Aedes aegypti* using genetic control does not facilitate Aedes albopictus, **Pest Management Science** n. **72**: 618–628, 2015.

GUBLER, D. J. The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 330–342, 2002.

GUBLER, D. J. The partnership for dengue control - A new global alliance for the prevention and control of dengue. **Vaccine**, v. 33, n. 10, p. 1233, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.002>.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. History and Emergence of Zika Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. January, p. S860–S867, 2017.

GUNATHILAKA, P. A. D. H. N.; UDUWAWALA, U. M. H. U.; UDAYANGA, N. W. B. A. L.; RANATHUNGE, R. M. T. B.; AMARASINGHE, L. D.; ABEYEWICKREME, W. Determination of the efficiency of diets for larval development in mass rearing Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–10, 2017.

HARRIS, A. F.; MCKEMEY, A. R.; NIMMO, D.; CURTIS, Z.; BLACK, I.; MORGAN, S. a; OVIEDO, M. N.; LACROIX, R.; NAISH, N.; MORRISON, N. I.; COLLADO, A.; STEVENSON, J.; SCAIFE, S.; DAFA'ALLA, T.; FU, G.; PHILLIPS, C.; MILES, A.; RADUAN, N.; KELLY, N.; BEECH, C.; DONNELLY, C. a; PETRIE, W. D.; ALPHEY, L. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 828–830, 2012.

GWADZ, R. W. & Craig, G. B., Jr (1968) **Mosquito News,** 28, 586-593, 1968.

HELINSKI, M.; PARKER, A.; KNOLS, B. Radiation biology of mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 8, n. 2, 2009.

HENRIQUES, D. A. Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna Diptera Nematocera do estado de Rondônia (Amazônia Ocidental Brasileira). São Paulo. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia, 2008, 128pp.

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. *Chikungunya*: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, p. 906-908, 2015.

JONES, D., G. JONES AND G. BHASKARAN. Dietary Sugars, Hemolymph Trehalose Levels, and Supernumerary Molting of Manduca sexta Larvae. **Physiol. Zool.** 54:260-266,1981.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGKIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of Aedes (Stegomyia) aegypti. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, 2007.

JULIANO, S. A.; MEARA, G. F. O.; CUTWA, M. M. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. v. 130, n. 3, p. 458–469, 2002.

KARABATSOS, N. International Catalogue of Arboviruses, including certain other virues of vertebrates. **Am. Soc. Trop. Md. Hyg. San Antonio**, Tx, USA:1985. Atualização em 2001.

KHAN, I.; FARID, A.; ZEB, A. Development of inexpensive and globally available larval diet for rearing *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 2–8, 2013.

KHAN, I.; VREYSEN, M. Comparing efficacy of mixed larval diets on the developmental attributes of *Anopheles arabiensis* patton. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 43, n. 6, p. 1111–1115, 2011.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F. History of the Sterile Insect Technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. The Netherlands: Springer,2005, 3-36pp.

KLECKNER, C.A., HAWLEY, W.A., BRADSHAW, W.E., HOLZAPFEL, C.M. & FISHER, I.J.. Protandry in *Aedes sierrensis*: the significance of temporal variation in female fecundity. **Ecology** 76: 1242–1250,1995.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **Journal of Economic Entomology**, v. 48, n. 4, p. 459–62, 1955.

KOENRAADT, C. J. M. Pupal dimensions as predictors of adult size in fitness studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 2, p. 331–336, 2008.

KUNIHOLM, M. H.; WOLFE, N. D.; HUANG, C. Y. H.; MPOUDI-NGOLE, E.; TAMOUFE, U.; BURKE, D. S.; GUBLER, D. J. Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 1078–1083, 2006.

KUNO, G.; GWONG-JEN, J.P. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin. Microbiol. Rev**., v.18, n.4, p. 608-637, 2005a. 2005.

LEES, R. S.; GILLES, J. R.; HENDRICHS, J.; VREYSEN, M. J.; BOURTZIS, K. Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 156–162, 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214574515000905>.

LIMA-CAMARA, T. N.; LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A.; GÓMEZ-DANTÉS, H.; WILLOQUET, J. R.; VARMA, M. G. R.; WHITE, G. B.; PARA, S.; HUMANAS, A.; EM, D. E. I.; CAUSEY, O. R.; CAUSEY, C. E.; MAROJA, O. M.; MACEDO, D. G.; CASALS, J.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS, A. P. a; PINHEIRO, F. P.; VASCONCELOS, P. F. C.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, A. P. A. T. D. A.; PLNHEIRO, F. P.; SILOPE, R. E.; ROSA, J. F. S. T. D. A.; DKGALLIER, N.; TRAVASSOS, E. S.; ROSA, D. A.; ORGANIZATION, W. H.; TURELL, M. J.; O'GUINN, M. L.; JONES, J. W.; SARDELIS, M. R.; DOHM, D. J.; WATTS, D. M.; FERNANDEZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, a; GUZMAN, H.; TESH, R.; ROSSI, C. a; LUDWIG, V.; MANGIAFICO, J. a; KONDIG, J.; WASIELOSKI, L. P.; PECOR, J.; ZYZAK, M.; SCHOELER, G.; MORES, C. N.; CALAMPA, C.; LEE, J. S.; KLEIN, T. a. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. suppl 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2009001300003&lng=en&tlng=en>.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; CASTRO, M. G.; BRAKS, M. A. H.; LOUNIBOS, L. P. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. **Journal of Vector Ecology,** p. 94–100, 2004.

LOWE, R.; BARCELLOS, C.; BRASIL, P.; CRUZ, O. G.; HONÓRIO, N. A.; KUPER, H.; CARVALHO, M. S. The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, 2018.

LUIS, J.; MARTÍN, S.; BRATHWAITE-DICK, O. La Estrategia de Gestión Integrada para la Prevención y el Control del Dengue en la Región de las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública,** v. 21, n. 1, 2007.

MACIEL IJ, JÚNIOR JBS, MARTELLI CM. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical.** 37: 111-118, 2008.

MACDONALD, S.S., RAKO, L., BATTERHAM, P., HOFFMANN, A.A. Dissecting chill coma recovery as a measure of cold resistance: evidence for a biphasic response in Drosophila melanogaster. **Journal of Insect Physiology** 50, 695–700, 2004.

MACMILLAN, H. A.; SINCLAIR, B. J. Mechanisms underlying insect chill-coma. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 1, p. 12–20, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.10.004>.

MADEIRA, N. G.; MACHARELLI, C. a; CARVALHO, L. R. Variation of the oviposition preferences of Aedes aegypti in function of substratum and humidity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 415–20, abr. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12048575>.

MAHMOOD, S. A. I. Dengue: An Epidemic Is Largely a Failure in Public Health Administration! The Role of Dhaka City Corporation, DCC of Bangladesh. **World Health & Population**, n. June, 2006.

MERCER, D. R.; SCHOERGENDORFER, A.; VANDYKE, R. Sexual differences in larval molting rates in a protandrous mosquito (Diptera : Culicidae) species, Aedes sierrensis. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 5, p. 861–866, 2008. Disponível em: <//000259099000005>.

MAMAI, W.; BIMBILE-SOMDA, N. S.; MAIGA, H.; JUAREZ, J. G.; MUOSA, Z. A. I.; ALI, A. B.; LEES, R. S.; GILLES, J. R. L. Optimization of mosquito egg production under mass rearing setting: effects of cage volume, blood meal source and adult population density for the malaria vector, *Anopheles arabiensis.* **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017.

MARK Q BENEDICT; BART GJ KNOLS; HERVÉ C BOSSIN; PAUL I HOWELL; ERIC MIALHE; CARLOS CACERES; ALAN S ROBINSON. Colonisation and mass rearing: learning from others. **Malaria Journal**, v. 8, p. 1 a 11, 2009. Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/8/S2/S4>.

MEDICI, A.; CARRIERI, M.; SCHOLTE, E.-J.; MACCAGNANI, B.; DINDO, M. L.; BELLINI, R. Studies on Aedes albopictus Larval Mass-Rearing Optimization. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 1, p. 266–273, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article-lookup/doi/10.1603/EC10108>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 52 de 2015**. Brasília, 2016. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf. Acesso em 15 maio 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018. 11/04, p. 11, 2018a**. Brasília, 2018. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/12/Informe-FA-21-11abr18-c.pdf. Acesso em: 15 maio 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018. 11/04, n. Figura 1, p. 11, 2018b**. Brasília, 2018. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/12/Informe-FA-21-11abr18-c.pdf. Acesso em: 15 maio 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42656-ministerio-da-saude-mobiliza-populacao-para-o-combate-ao-aedes-aegypti>.
Acesso em: 09 de abril de 2018

MONATH, T. P. Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001.

NATAL, D.; PAULO, S. Bioecologia do. p. 205–207, 2002.

NOVELLO; FRANCESCHINI; QUINTILIANO; OST. Ovo : Conceitos , análises e controvérsias na saúde humana. **Archivos latinoamericanos de nutrición,** v. 56, p. 315–320, 2006.

OLIVEIRA, W. K. De; VINÍCIUS, G.; FRANÇA, A. De; CARMO, E. H.; DUNCAN, B. B.; KUCHENBECKER, R. D. S.; SCHMIDT, M. I. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil : a surveillance-based analysis. **The Lancet**, v. 23, 2016.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TANG, A. T.; DO AMARAL, R. S.; PASSOS, A. D.; TAUIL, P. L. Surto De Dengue Em Boa Vista, Roraima. Nota Previa. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53–54, 1983.

PAGABELEGUEM, S.; SECK, M. T.; SALL, B.; VREYSEN, M. J.; GIMONNEAU, G.; FALL, A. G.; BASSENE, M.; SIDIBÉ, I.; RAYAISSÉ, J. B.; BELEM, A. M.; BOUYER, J. Long distance transport of irradiated male Glossina palpalis gambiensis pupae and its impact on sterile male yield. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0869-3>.

PARKER, A. G. Mass-Rearing for Sterile Insect Release In: DYCK, V; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Techinique: principles and practice in area-wide integrated pest management.** Vienna:Springer iaea, 2005. P. 209-232.

PETERSEN, J.L. ET AL. Field trials of double translocation heterozygotemales for genetic control of Aedes aegypti (L.) (Diptera:Culicidae). **Bull. Entomol. Res.** 67, 313–324, 1977.

PHUC, H. K.; ANDREASEN, M. H.; BURTON, R. S.; VASS, C.; EPTON, M. J.; PAPE, G.; FU, G.; CONDON, K. C.; SCAIFE, S.; DONNELLY, C. A.; COLEMAN, P. G.; WHITE-COOPER, H.; ALPHEY, L. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC biology**, v. 5, p. 11, 2007.

PINHEIRO F.; NELSON M. Re-emergence of dengue and emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. **Dengue Bulletin,** 21: 16-24,1997.

PUGGIOLI, A.; BALESTRINO, F.; DAMIENS, D.; LEES, R. S.; SOLIBAN, S. M.; DINDO, M. L.; BELLINI, R.; GILLES, J. R. L. Efficiency of Three Diets for Larval Development in Mass Rearing Aedes albopictus (Diptera : Culicidae) Efficiency of Three Diets for Larval Development in Mass Rearing Aedes albopictus (Diptera : Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 819–825, 2013.

PUGGIOLI, A.; CARRIERI, M.; DINDO, M. L.; MEDICI, A.; LEES, R. S.; GILLES, J. R. L.; BELLINI, R. Development of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) larvae under different laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 1, p. 142–149, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4991:organizacao-mundial-da-saude-anuncia-emergencia-de-saude-publica-de-importancia-internacional&Itemid=812>. Acesso em 17 dezembro 2016.

RANSON, H.; BURHANI, J.; LUMJUAN, N.; IV, W. C. B. Review Insecticide resistance in dengue vectors. **Tropika.net**, p. 1–12, 2008.

RITCHIE, S. A.; JOHNSON, B. J. Advances in Vector Control Science: Rear-and-Release Strategies Show Promise… but Don't Forget the Basics. **The Journal of infectious diseases**, 2017.

ROBINSON, A. S.; CACERES, C.; WORNOAYPORN, V.; ISLAM, A. Exposure to ginger root oil enhances mating success of male mediterranean fruit flies (diptera: Tephritidae) from a genetic sexing Author (s): Todd E. Shelly, Alan S . Robinson, Carlos Caceres, Viwat Wornoayporn, 2002.

ROMANO, C. M.; DE MATOS, A. M.; ARAÚJO, E. S. A.; VILLAS-BOAS, L. S.; DA SILVA, W. C.; OLIVEIRA, O. M. N. P. F.; CARVALHO, K. I.; DE SOUZA, A. C. M.; RODRIGUES, C. L.; LEVI, J. E.; KALLAS, E. G.; PANNUTI, C. S. Characterization of dengue virus type 2: New insights on the 2010 brazilian epidemic. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 5–9, 2010a.

ROMANO, C. M.; MATOS, A. M.; ARAÚJO, E. S. A.; VILLAS-BOAS, L. S.; SILVA, W. C.; OLIVEIRA, O. M. N. P. F.; CARVALHO, K. I.; SOUZA, A. C. M.; RODRIGUES, C. L.; LEVI, J. E.; KALLAS, E. G.; PANNUTI, C. S. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11811, jan. 2010b.

ROSS, R. W. THE NEWALA EPIDEMIC III. THE VIRUS: ISOLATION, PATHOGENIC PROPERTIES AND RELATIONSHIP TO THE EPIDEMIC. **The Newala Epidemic**, p. 177–191, 1956. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2218030/pdf/jhyg00148-0027.pdf>. Acesso em: 9 maio de 2017.

SEHGAL, N.K. Doubts over US in India. **Nature** 251, 177–178, 1974.

SHAH, A.B., AHMED, M., AURANGZEB, BIBI, N., TILA, M. AND KHAN, I.. Relationships between physico-chemical characters and cooking time in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Pakistan J. scient. indust. Res**., n 30: 795-798, 1987.

SIQUEIRA, J. B.; MARIA, C.; MARTELLI, T.; COELHO, G. E.; CRISTINA, A.; HATCH, D. L. Dengue and Dengue Hemorrhagic. v. 11, n. 1, 2005.

STEINWASCHER, K. Relationship between pupal mass and adult survivorship and fecundity for Aedes aegypti. **Enviromental Entomology,** n11:150-153,1982.

SOTA, T.; MOGI, M. Interspecific variation in desiccation survival time of Aedes (Stegomyia) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. **Oecologia**, v. 90, n. 3, p. 353–358, 1992.

SOMDA, N. S. B.; DABIRÉ, K. R.; MAIGA, H.; YAMADA, H.; MAMAI, W.; GNANKINÉ, O.; DIABATÉ, A.; SANON, A.; BOUYER, J.; GILLES, J. L. Cost-effective larval diet mixtures for mass rearing of *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae). **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos.** 4.ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161p.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Ecology.** v. 17, p. 99–102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18 n. 3, p. 867-871, mai-jun. 2002.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. v. 39, n. 3, p. 275–277, 2006.

TEIXEIRA MG, ANDRADE AMS, COSTA MCN, CASTRO JSM, OLIVEIRA FLS, GOES CSB, et al. East/Central/South African genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerg Infect Dis**; 21:906-7,2015.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, C. N.; OLIVEIRA, W. K. De; NUNES, M. L.; RODRIGUES, L. C. The Epidemic of Zika Virus – Related Microcephaly in Brazil : Detection , Control , Etiology , and Future Scenarios. v. 106, n. 4, p. 601–605, 2016.

TELANG, A.; FRAME, L.; BROWN, M. R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 5, p. 854–864, 2007. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.02715>.

THE GUARDIAN. Disponível em: <https://www.theguardian.com/world/2015/may/24/sterile-mosquitoes-released-in-china-to-fight-dengue-fever>.
Acesso em: 31. Julho 2018.

“THE ROCKEFELLER FOUNDATION”. The Rockefeller Foundation Annual Report 1947. p. 360, 1947. Disponível em: <http://www.rockefellerfoundation.org/uploads/files/20bdae57-8ddd-49b0-9145-120b356dcb72-1947.pdf>.

TIMMERMANN, BRIEGEL. Water depth and larval density affect development and accumulation of reserves in laboratoy populations of mosquitoes, **Bulletin of the Society for Vector Ecology,** 18(2): 174-187,1993.

VASCONCELOS PFC, DA ROSA APA T, PINHEIRO FP, SHOPE RE, DEGALLIER N, DA ROSA ES T: Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries.** Edited by da Rosa APA T, Vasconcelos PFC, da Rosa JFS T. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998, 72–99pp.

VALLE, D. No magic bullet: citizenship and social participation in the control of Aedes aegypti Sem bala mágica: cidadania e participação social no controle de *Aedes aegypti*, **Epidemiol. Serv. Saude**, 25(3):629-632, 2016.

VASILAKIS, N.; GUBLER, D. J (Eds.). **Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control**. Caister Academic Press, 398 p. 2016.

VIANEZ, T. T. Viabilidade dos raios x no desenvolvimento da técnica do inseto estéril para esterilização do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Petrolina. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológicas) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina – PE, 2018. 68pp.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, n. May, p. 32–39, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>.

WEIDHAAS, D.E. Release of chemosterilized males for the control of Anopheles albimanus in El Salvador IV. Dynamics of the test population. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 23, 298–308, 1974.

WIKAN N, SMITH DR. First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. **Lancet Infect Disease**, 17:15–7, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. Geneva: **W.H.O. Tech. Rep**. n. 719; 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidedlines for diagnosis, treatment, prevention and control. S.l **World Health Organization-** WHO, 2009. 148.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chikungunya. Geneva: WHO. Disponível em: http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/. 2015a.
Acesso em: 21 novembro de 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chikungunya. Geneva: WHO. Disponível em: http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/. 2015b
Acesso em: 21 novembro de 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zika virus. Geneva: WHO. Disponível em: http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/. 2015c
Acesso em: 21 novembro de 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION.
http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/. 2016.

Acesso em: 21 novembro de 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention an control.** Geneva: WHO. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44188/1/9789241547871_eng.pdf. 2009. (acessado em 22 novembro de 2016).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly Epidemiological Report. **World Health Organiszation**, v. 30, n. 30, p. 349–364, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf?ua=1>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré Syndrome, 10 march 2017. **Situation Report**, n. March, p. 1–5, 2017.

WILKE, A. B. W.; NIMMO, D. D.; JOHN, O. S.; KOJIN, B. B.; CAPURRO, M. L.; MARRELLI, M. T. Mini-review: genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 65–74, 2009.

YAHOUÉDO, G. A.; DJOGBÉNOU, L.; SAÏZONOU, J.; ASSOGBA, B. S.; MAKOUTODÉ, M.; GILLES, J. R. L.; MAÏGA, H.; MOULINE, K.; SOUKOU, B. K.; SIMARD, F. Effect of three larval diets on larval development and male sexual performance of *Anopheles gambiae* s.s. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. S96–S101, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.014>.

ZARA, A. L. S. A; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G., COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391–404, 2016.

ZAVALA-LÓPEZ, J. L.; ENKERLIN, W. R. **Guideline for packing, shipping, holding and release of sterile flies in area-wide fruit fly control programmes Second edition Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture**. 150PP, 2017.

ZHANG D, LESS R.S.; XI Z.; BOURTZIS K.; GILLES J. R.L. Combinig the Sterile Insect Technique with the Incompatible Insect Technique: III- Robust Mating Competitiveness of Irradiated Triple Wolbachia- Infected *Aedes albopictus* Males under Semi-Fied Conditions. **Plos One,** v. 11 (3), e0151864, 2016.

ZHANG, D.; LI, Y.; SUN, Q.; ZHENG, X.; GILLES, J. R. L.; YAMADA, H.; WU, Z.; XI, Z.; WU, Y. Establishment of a medium-scale mosquito facility: Tests on mass production cages for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

ZHANG, D.; ZHENG, X.; XI, Z.; BOURTZIS, K.; GILLES, J. R. L. Combining the sterile insecttechnique with the incompatibleinsect technique: I-Impact of Wolbachia infection on the fitness of triple- and double-infected strains of *Aedes albopictus*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121126, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4388707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.