

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

GABRIEL BEZERRA FAIERSTEIN

AVALIAÇÃO DO EXTRATO LARVAL DE *Aedes aegyti* COMO ISCA DE
OVIPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE ARMADILHA
PARA COLETAR OVOS E ADULTOS DE MOSQUITOS

RECIFE

2021

GABRIEL BEZERRA FAIERSTEIN

AVALIAÇÃO DO EXTRATO LARVAL DE *Aedes aegyti* COMO ISCA DE OVIPOSIÇÃO
E DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE ARMADILHA PARA COLETAR
OVOS E ADULTOS DE MOSQUITOS

Tese apresentada ao doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de
doutor em ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de
patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa

Coorientador: Dr. Walter Soares Leal

RECIFE

2021

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- F159a Faierstein, Gabriel Bezerra.
Avaliação do extrato larval de *Aedes aegyti* como isca de oviposição e desenvolvimento de um protótipo de armadilha para coletar ovos e adultos de mosquitos / Gabriel Bezerra Faierstein. — Recife: [s.n.], 2021.
135 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.
Orientadora: Rosângela Maria Rodrigues Barbosa; coorientador: Walter Soares Leal.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. *Aedes* - fisiologia. 2. Oviposição - fisiologia. 3. Controle de Vetores - métodos. 4. Mosquitos vetores. 5. Avaliação de Eficácia-Efetividade de Intervenções. 6. Pesquisa Comparativa da Efetividade. 7. *Bacillus thuringiensis*. 8. Larva. 9. Comportamento Animal. I. Barbosa, Rosângela Maria Rodrigues. II. Leal, Walter Soares. III. Título.

GABRIEL BEZERRA FAIERSTEIN

AVALIAÇÃO DO EXTRATO LARVAL DE *Aedes aegyti* COMO ISCA DE OVIPOSIÇÃO
E DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE ARMADILHA PARA COLETAR
OVOS E ADULTOS DE MOSQUITOS

Tese apresentada ao doutorado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de
doutor em ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de
patógenos, vetores e hospedeiros.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Fábio Rocha Formiga
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Wendel José Teles Pontes
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À minha família, por me ensinarem a simplicidade, a resiliência e a força;

Ao apoio e ao conforto dos meus queridos amigos;

À Dra. Rosângela Barbosa e ao Dr. Walter Leal pela dedicada e valiosa orientação;

Aos colegas de laboratório, especialmente Andréa Sena, onde tive o prazer de ser co-orientador até conclusão da sua graduação, sendo hoje uma grande parceira nos experimentos;

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE;

Aos pesquisadores do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães, que são exemplos de inteligência, sabedoria e competência a serem seguidos;

Aos funcionários do insetário do Instituto Aggeu Magalhães, em especial Elisângela Dias e Duschinka Guedes, pela dedicação e disponibilização de materiais para realização desta pesquisa;

Aos amigos do IAM, LÍlian Amorim, Igor Rocha e Renata Pessôa, por dividirmos os momentos mais alegres e mais difíceis;

À Sophia e Zequinha, pela sorte que tive em ser tutor destes animais. Ainda que não estejam mais comigo, as lembranças que tenho deles ajudam a revigorar minhas energias.

Obrigado!

“[...] Quando a isso é adicionado o fato de que quanto mais intimamente um mosquito está associado ao homem, mais ele é sujeito a preconceitos e equívocos, segue-se que a concepção que prevalece sobre *Aedes aegypti* nas mentes dos entomologistas, é que podemos estar mais distantes da sua realidade do que na da maioria dos outros mosquitos.”

(MATTINGLY, 1957, tradução nossa).

FAIERSTEIN, Gabriel Bezerra. **Avaliação do extrato larval de *Aedes aegypti* como isca de oviposição e desenvolvimento de um protótipo de armadilha para coletar ovos e adultos de mosquitos.** 2021. 135 p. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

Uma das estratégias aplicadas ao manejo integrado de mosquitos é o uso de armadilhas de oviposição tratadas com larvicidas. O principal desafio dessa abordagem é desenvolver iscas capazes de atrair fêmeas, estimular a oviposição, e utilizar toxinas sem efeito dissuasor. *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (Bti) satisfaz o último critério, mas desenvolver estimulantes de oviposição é de grande necessidade. O presente estudo avaliou o extrato larval de *Ae. aegypti* como estimulante na oviposição intra e interespecífica, e propõe um novo modelo de armadilha (BR-Adult) para coletar ovos e adultos vivos. Os extratos larvais foram testados em concentrações entre 0,1 e 1,66 larva/ml. Em laboratório, extratos aquosos, hexânicos e com dimetilsulfóxido, foram avaliados em recipientes de oviposição (150 ml) em gaiolas com 30 fêmeas de *Ae. aegypti* ou *Cx. quinquefasciatus*. De forma similar, os extratos aquosos preparados a partir de larvas desidratadas por liofilização e por secagem em estufa à 65 °C, também foram avaliados. Foi avaliado em campo armadilhas com extratos aquosos (0,33 larva/ml). O potencial da BR-Adult foi observado em campo simulado e foi associada ao extrato larval aquoso e ao Bti. Os ensaios com extratos a 0,33 larva/ml coletaram significativamente mais ovos em relação ao controle e foi adotado como equivalência padrão. Extratos com dimetilsulfóxido coletaram significativamente mais ovos em relação ao controle, enquanto os extratos hexânicos foram significativamente indiferentes. Em campo, ovitrampas e BR-OVTs coletaram significativamente mais ovos quando tratadas com extratos aquosos (0,33 larva/ml) *in natura* ou liofilizado, tanto para coletar ovos de mosquitos *Aedes* quanto de *Culex*. Os resultados mostram que os extratos larvais podem servir como iscas nas armadilhas para monitoramento e controle integrado de mosquitos. Por outro lado, os resultados preliminares da BR-Adult coletaram aproximadamente 20% dos mosquitos em campo simulado, revelando baixa eficácia para a coleta de mosquitos adultos, indicando a necessidade de aperfeiçoamentos para torná-la eficaz. A identificação dos compostos presentes nas larvas responsáveis por estimular a oviposição podem nortear estudos sobre sua síntese e, desta forma, produzir uma isca eficiente para armadilhas coletoras de ovos em larga escala.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Controle de vetores. Oviposição.

FAIERSTEIN, Gabriel Bezerra. **Evaluation of *Aedes aegypti* larval extract as oviposition bait and development of a prototype trap to collect mosquito eggs and adults.** 2021. 135 p. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

ABSTRACT

One of the strategies applied to the integrated management of mosquitoes is the use of oviposition traps treated with larvicides. The main challenge of this approach is to develop baits capable of attracting females, stimulating oviposition, and using toxins without a deterrent effect. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) satisfies the latter criterion but developing oviposition stimulants is of great need. The present study evaluated the larval extract of *Ae. aegypti* as a stimulant in intra and interspecific oviposition and proposes a new trap model (BR-Adult) to collect eggs and live adults. Larval extracts were tested at concentrations between 0.1 and 1.66 larvae/ml. In the laboratory, aqueous, hexane and dimethylsulfoxide extracts were evaluated in oviposition recipients (150 ml) in cages with 30 females of *Ae. aegypti* or *Cx. quinquefasciatus*. Similarly, aqueous extracts prepared from larvae dehydrated by lyophilization and by drying in an oven at 65 °C were also evaluated. Traps with aqueous extracts (0.33 larvae/ml) were evaluated in the field. The potential of BR-Adult was observed in a simulated field and was associated with aqueous larval extract and Bti. The assays with extracts at 0.33 larvae/ml collected significantly more eggs in relation to the control and it was adopted as standard equivalence. Extracts with dimethylsulfoxide collected significantly more eggs compared to control, while hexane extracts were significantly indifferent. In the field, ovitraps and BR-OVTs collected significantly more eggs when treated with aqueous extracts (0.33 larvae/ml) in natura or lyophilized, both to collect eggs from *Aedes* and *Culex* mosquitoes. The results show that larval extracts can serve as bait in traps for integrated monitoring and control of mosquitoes. On the other hand, the preliminary results of BR-Adult collected approximately 20% of the mosquitoes in the simulated field, revealing low efficiency for the collection of adult mosquitoes, indicating the need for improvements to make it effective. The identification of the compounds presents in the larvae responsible for stimulating oviposition can guide studies on their synthesis and, in this way, produce an efficient bait for large-scale egg-collecting traps.

Keywords: *Aedes aegypti*. Vector control. Oviposition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .	15
Figura 2- Morfologia da larva do mosquito (subfamília Culicinae).	16
Figura 3- Morfologia do mosquito adulto.	17
Figura 4- Padrões de alimentação de sangue para Culicidae e linhagens relacionadas em relação às classes de hospedeiros vertebrados.	18
Figura 5- <i>Aedes aegypti</i> .	22
Figura 6- <i>Aedes albopictus</i> .	24
Figura 7- Distribuição global de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> e o risco de transmissão do vírus Dengue.	25
Figura 8- Distribuição global dos sorotipos virais de Dengue em 1970 (A) e 2011 (B)	25
Figura 9- <i>Culex quinquefasciatus</i>	26
Figura 10- Distribuição global hipotética de <i>Culex quinquefasciatus</i> com base nas condições climáticas.	27
Figura 11- Ovos de <i>Culex pipens</i> agrupados formando uma jangada	28
Figura 12- - Distribuição dos países com registro de filariose linfática em 2020	29
Figura 13- Comparação em porcentagem entre os principais focos de proliferação de <i>Aedes aegypti</i> por região no Brasil identificados pelo índice de pesquisa larvária em 2013	31
Figura 14- Registro fotográfico de um esgoto a céu aberto (Recife, PE), com destaque nos círculos vermelhos mosquitos (<i>Culex</i> sp.) pousados na superfície da água estagnada	32
Figura 15- População mundial que requer administração em massa de medicamentos para filariose linfática.	32
Figura 16- Micrografia eletrônica de varredura da cabeça e antena de uma fêmea <i>Aedes aegypti</i> .	35
Figura 17- Esquema gráfico sobre a integração entre o estímulo de CO ₂ e de luz no comportamento de voo de <i>Aedes aegypti</i> .	37
Figura 18- Esquematisação hierárquica dos semioquímicos.	38
Figura 19- Armadilhas do tipo Ovitrapa e BR-OVT.	40
Figura 20- Esquematisação da Double BR-OVT.	42
Figura 21- Imagem na íntegra e esquematização da armadilha Techno Bam.	42
Figura 22- Alimentação artificial oferecida para <i>Culex quinquefasciatus</i> .	48
Figura 23- Visão interna da gaiola avaliando extratos larvais de <i>Ae. aegypti in natura</i> com diferentes equivalências de larva/ml em relação à oviposição intraespecífica.	51

Figura 24- Esquematização dos processos para estocagem de larvas a -20 °C e para obtenção do extrato larval <i>in natura</i> (A), extrato liofilizado de larvas (B), extrato com larvas liofilizadas (C) e extrato de larvas dessecadas em estufa (D).	55
Figura 25- Ovitrapas e BR-OVTs instaladas em campo.	58
Figura 26- Extrato larval recolhido de uma ovitrapa com palheta de Eucatex (béquer esquerdo) e extrato larval recolhido de uma ovitrapa com tecido de algodão (béquer direito) após 60 dias de exposição no campo.	60
Figura 27- Ilustração dos componentes da armadilha BR-Adult e da sua visualização interna e externa após montagem.	61
Figura 28- BR-Adult sendo testada em ambiente peridomiciliar simulado.	62
Figura 29- Substratos de oviposição utilizados em laboratório (filtro de papel) e campo (palheta de Eucatex) com ovos após o término dos ensaios.	63
Figura 30- Avaliação de diferentes equivalências de extratos larvais <i>in natura</i> de <i>Aedes aegypti</i> na oviposição intraespecífica em 12 repetições.	65
Figura 30- Avaliação de diferentes equivalências de extratos larvais <i>in natura</i> de <i>Aedes aegypti</i> na oviposição intraespecífica em 12 repetições.	66
Figura 32- Avaliação de extratos larvais filtrados e extratos larvais não filtrados de <i>Aedes aegypti</i> na oviposição intraespecífica em 12 repetições.	67
Figura 33- Avaliações paralelas de extratos larvais de <i>Aedes aegypti</i> utilizando larvas congeladas em relação à oviposição intraespecífica em 12 repetições.	68
Figura 34- Avaliações paralelas sobre a influência do Bti nos recipientes tratados e não tratados com extratos larvais de <i>Aedes aegypti</i> na atividade de oviposição intraespecífica em 12 repetições.	69
Figura 35- Avaliação de extratos larvais liofilizados de <i>Aedes aegypti</i> em relação a oviposição intraespecífica em 12 repetições.	70
Figura 36- Avaliações paralelas de extratos larvais de <i>Aedes aegypti</i> a partir de amostras dessecadas em liofilizador e em estufa sobre a oviposição intraespecífica em 6 repetições.	72
Figura 37- Avaliações paralelas de extratos com larvas liofilizadas há 3 anos utilizando diferentes amostras.	73
Figura 38- Avaliações da ovitrapa e da BR-OVT associadas com Bti e com extrato larval <i>in natura</i> de <i>Aedes aegypti</i> em relação à oviposição dos mosquitos <i>Aedes</i> e <i>Culex</i> em campo.	74

- Figura 39-** Avaliações da ovitrampa da BR-OVT associadas com Bti e com fragmentos larvais de *Aedes aegypti* liofilizados sobre a oviposição dos mosquitos *Aedes* e *Culex* em campo. 75
- Figura 40-** Avaliações de extratos *in natura* de *Aedes aegypti* observando o efeito estimulativo à oviposição intraespecífica com observações quinzenais durante 2 meses entre 7 e 8 repetições. 76
- Figura 41-** Avaliação de extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* após exposição no campo em contato com palhetas de Eucatex e com tecido de algodão durante 60 dias. 77
- Figura 42-** Avaliações paralelas do hexano e do dimetilsulfóxido como solventes para realizar extratos larvais estimulantes de oviposição em 12 repetições. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliações sobre o comportamento de oviposição de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em relação aos extratos larvais <i>in natura</i> de <i>Aedes aegypti</i> sob diferentes processamentos.	50
Tabela 2- Avaliações sobre o comportamento de oviposição de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em relação aos extratos de larvas liofilizadas e aos extratos larvais <i>in natura</i> .	54
Tabela 3- Lista de objetos de suas características para montagem da nova armadilha.	60
Tabela 4- Avaliações paralelas sobre diferentes extratos de larvas <i>in natura</i> e de larvas liofilizadas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em relação à oviposição intra e interespecífica em 12 repetições/avaliação.	71
Tabela 5- Observações do novo modelo de armadilha para coletar ovos e fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em condições simuladas de campo.	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	15
2.1 Família Culicidae (Meigen, 1818)	15
2.2 O gênero Aedes	21
2.2.1 <i>Aedes (Stegomyia) aegypti, Linnaeus, 1762</i>	21
2.2.2 <i>Aedes (Stegomyia) albopictus, Suke, 1894</i>	23
2.2.3 <i>Importância epidemiológica</i>	24
2.3 O gênero Culex	26
2.3.1 <i>Culex (Culex) quinquefasciatus, Say, 1823</i>	26
2.3.2 <i>Importância epidemiológica</i>	28
2.4 O ambiente urbano sob a ótica do estabelecimento de populações de mosquitos	29
2.5 Sistema sensorial e comportamento dos mosquitos	32
2.5.1 <i>Fatores físicos</i>	33
2.5.1 <i>Fatores químicos</i>	34
2.6 Método mecânico-comportamental: monitoramento, vigilância e controle	38
2.6.1 <i>Armadilhas para coletar formas imaturas dos mosquitos</i>	39
2.6.2 <i>Armadilhas para formas adultas dos mosquitos</i>	40
2.6.3 <i>Iscas de oviposição</i>	42
3 HIPÓTESES	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 <i>Objetivo geral</i>	46
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	46
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	47
5.1 Obtenção de mosquitos e repasto sanguíneo para ensaios de oviposição	47
5.2 Criação das larvas para preparação dos extratos	48
5.3 Avaliação dos extratos larvais aquosos em laboratório	48
5.3.1 <i>Avaliações dos extratos larvais in natura</i>	49
5.3.2 <i>Avaliação do extrato liofilizado e do extrato de larvas dessecadas</i>	53
5.4 Avaliação dos extratos larvais com solventes	56
5.5 Avaliação dos extratos larvais como estratégia de attract-and-kill em campo	57
5.6 Desenvolvimento de um novo modelo de armadilha	60
5.7 Análise Estatística	62

5.8 Considerações éticas	64
6 RESULTADOS	65
6.1 Avaliações preliminares com extratos aquosos de larvas in natura	65
6.2 Avaliação dos extratos larvais liofilizados e extratos de larvas dessecadas	69
6.3 Avaliação de extratos larvais in natura como iscas de oviposição no campo.....	73
6.4 Avaliação de larvas liofilizadas como iscas de oviposição no campo	74
6.5 Avaliação de extratos de larvas in natura utilizando solventes.....	77
6.6 Observação da nova armadilha em campo simulado.....	78
7 DISCUSSÃO	80
8 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti, espécie comumente conhecida como mosquito, é um díptero da família Culicidae, cuja dispersão e estabelecimento estão em toda extensão tropical e subtropical do planeta, com predominância em áreas urbanizadas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O controle populacional de *Ae. aegypti* é uma necessidade imposta pelo seu envolvimento na transmissão de agentes patogênicos ao homem, como os arbovírus Dengue, Mayaro, Febre amarela, Chikungunya e Zika, colocando em risco mais de 3,9 bilhões de pessoas em mais de 129 países (WHO, 2020a). Os crescentes casos da dengue no mundo, principal arbovirose transmitida por vetores, com registros de meio milhão de casos em 2000, para 4,2 milhões em 2019, demonstram que as abordagens clássicas de vigilância e controle de mosquitos são ineficientes, inclusive às adotadas no Brasil (WHO, 2020b).

O Brasil vem investindo no controle populacional de mosquitos há décadas através do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), estabelecido em 1996, onde atualmente opera em mais de 5.000 municípios brasileiros (BRASIL, 2002). No entanto, o país continua com altos índices de infestação por *Ae. aegypti*, sendo 2015 o ano marcado tanto pela maior epidemia da dengue já registrada, com mais de 1,6 milhão de casos notificados (LUNA et al., 2020), quanto pelo primeiro relato de transmissão autóctone do vírus Zika (ZANLUCA et al., 2015). Algumas das grandes fragilidades do PNCD envolvem a limitação da inspeção visual para levantamento de índices na vigilância das espécies de *Aedes* (CODEÇO et al., 2015), e a aplicação de inseticidas como principal método de controle, que não diminuiu a densidade populacional, resultou na resistência em populações de todo país, e trouxe riscos à saúde dos que tiveram contato com o produto (ZARA et al., 2016). Essas medidas se contrapõem ao sugerido pelo Global Vector Control Response 2017–2030, que sugere utilização de estratégias integradas para suprimir a população de vetores, sem permitir a seleção de resistência e não colocar em risco a preservação do meio ambiente, a saúde dos seres humanos e a dos animais (WHO, 2017).

Uma das aplicações no controle integrado é a utilização de armadilhas com objetivo de coletar mosquitos em diferentes estágios de vida. No âmbito das armadilhas de oviposição, ganha destaque a ovitrampa, tanto para o monitoramento quanto para o controle da densidade populacional de mosquitos no campo (MELO-SANTOS et al., 2017; REGIS et al., 2013). Em comparação com a pesquisa larvária comumente observado no PNCD, o emprego das ovitampas mostrou ser mais sensível e operacionalmente mais simples de trabalhar para o levantamento de índices entomológicos (BRAGA et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2020).

As ovitrampas podem também ser eficientes em medidas de controle populacional, desde que sejam usadas em grande número e extensivamente distribuídas para garantir uma cobertura eficaz, e podem ser associadas à iscas e biolarvicidas, estabelecendo uma estratégia conhecida como *attract-and-kill* (ONG; JAAL, 2015; REGIS et al., 2013).

Por outro lado, a vigilância, que busca compreender a circulação de arbovírus nos mosquitos através do diagnóstico vetorial, é frequentemente realizada utilizando aspiradores elétricos ou o capturador de Castro para obter as amostras de fêmeas em campo (GUEDES et al., 2017a). Armadilhas eficientes para captura de mosquitos adultos vivos, como a CDC Gravid Trap e a BG-Sentinel, funcionam com aparelhagem movida à energia elétrica ou química que permite aspiração, mas são dispositivos de alto custo, tornando um investimento desafiador para os programas de vigilância e controle de mosquitos (CILEK; KNAPP; RICHARDSON, 2017). Adaptações de armadilhas com bordas adesivas, como a AedesTrap descrita por Santos et al. (2012) e a Sticky Trap descrita por Facchinelli et al. (2007), conseguem atender ao quesito baixo custo, mas inviabilizam as amostras para vigilância de arbovírus, tornando-as viáveis apenas nas estratégias de monitoramento e controle de adultos (CILEK; KNAPP; RICHARDSON, 2017; XAVIER et al., 2018). Nesse sentido, se faz necessário desenvolver armadilhas que consigam atender aos critérios de apresentar baixo custo e de coletar mosquitos para vigilância de arboviroses. Por esta razão, uma das propostas deste trabalho é desenvolver uma armadilha de baixo custo capaz de coletar ovos e aprisionar mosquitos vivos.

Frente a necessidade de potencializar as armadilhas, estudos sobre semioquímicos ganham destaque para formulação de iscas, pois agem como reguladoras dos principais tipos de comportamento em insetos, como busca por sítios de oviposição (LEAL et al., 2008). Foi relatado nas últimas décadas que a água onde larvas de mosquitos cresceram pode influenciar positivamente na atividade de oviposição, pois as fêmeas buscam pistas de criadouros adequados para o desenvolvimento das suas progênes, mas pouco foi relacionado se esses atrativos são derivados das larvas, das bactérias que nelas hospedam, ou mesmo das bactérias do meio de desenvolvimento (ALLAN; KLINE, 1998; SERPA; MONTEIRO; VOLTOLINI, 2008). Por uma perspectiva ecológica e evolutiva, são crescentes as discussões sobre os fatores que influenciam nas diferentes sinalizações em locais de desenvolvimento larvário, mas no ponto de vista epidemiológico e prático, este conhecimento tem um potencial ainda pouco explorado, cuja investigação pode gerar formulações de iscas que auxiliem no controle de mosquitos. Diante do exposto, este trabalho também se propõe a avaliar a eficiência de extratos larvais de *Aedes aegypti* como iscas de oviposição.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

Entre os insetos, a ordem Diptera compreende duas subordens, *Nematocera* e *Brachycera*, sendo a primeira composta principalmente por mosquitos e a segunda pelas diversas famílias de moscas, e que juntas são compostas por cerca de 153 mil espécies em todo planeta (CARVALHO et al., 2012). Os dípteros são insetos caracterizados por apresentarem um par de asas anteriores membranosas funcionais para voar, enquanto que o par posterior está adaptado em forma de halteres para prover equilíbrio, posicionamento e estabilidade durante o voo (FORATTINI, 1962). Encontramos nos dípteros os culicídeos, uma família de grande importância epidemiológica por abrigar espécies envolvidas na transmissão de patógenos causadores de doenças humanas.

2.1 Família Culicidae (Meigen, 1818)

Culicídeos são insetos de pequeno porte e corpo delgado, comumente conhecidos como mosquitos e pernilongos. Existem atualmente 3.583 espécies de mosquitos reconhecidas mundialmente, contidas em três subfamílias (*Toxorhynchitinae*, *Anophelinae* e *Culicinae*), 11 tribos e 190 gêneros (FOSTER; WALKER, 2019; MOSQUITO TAXONOMIC INVENTORY, 2021). Os mosquitos são holometábolos, se desenvolvendo em estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os ovos têm aspecto alongado, simetria bilateral e apresentam uma casca com três camadas - exocório, endocório e cutícula serosa. Por estarem sujeitos às variações ambientais, os ovos podem apresentar diversas adaptações que variam entre as espécies (CRISTINA et al., 2015).

Figura 1- Ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

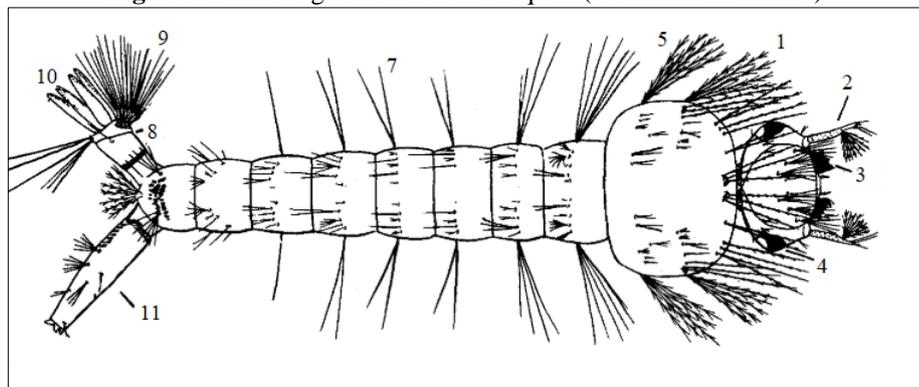


Fonte: O autor.

Legenda: A- ovos; B- larva; C- pupa; D- adultos.

As larvas dos mosquitos (Figura 2) ocupam ambientes aquáticos, são ápodas e móveis. Em sua maioria, possuem hábito filtrador generalista, se alimentando de partículas em suspensão e microrganismos presentes na água com as escovas orais. As larvas também são capazes de morder, triturar e raspar superfícies ou substâncias para adquirir alimento por meio das escovas bucais modificadas, das mandíbulas e das maxilas (CLEMETS, 1992). Outras espécies, como *Toxorhynchites*, são predadoras obrigatórias ou facultativas, capturando e se alimentando principalmente dos estágios imaturos de outros mosquitos (FARMER, 2007). Por outro lado, há as que recorrem ao canibalismo durante a escassez de alimento, ou quando ocasionalmente encontram semelhantes mais jovens, a exemplo de *Anopheles gambiae* (HUANG, et al., 2018) e *Aedes albopictus* (MASTRANTONIO, et al., 2018). A maioria das larvas necessitam ir à superfície para respirar o oxigênio atmosférico, enquanto outras, como as espécies de *Mansonia*, obtêm oxigênio nos reservatórios de ar de plantas aquáticas (RAJENDRAN et al., 1989). As larvas se desenvolvem em quatro estádios, L₁, L₂, L₃, e L₄, sendo o último o mais maduro e normalmente atingido entre o 5° e 7° dia após eclosão dos ovos, mas pressões seletivas, como baixas temperaturas, escassez de alimento e alta densidade de indivíduos, podem retardar o desenvolvimento para aproximadamente 18 dias (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014).

Figura 2- Morfologia da larva do mosquito (subfamília Culicinae).



Fonte: Adaptado de Consoli e Lourenço de Oliveira (1994).

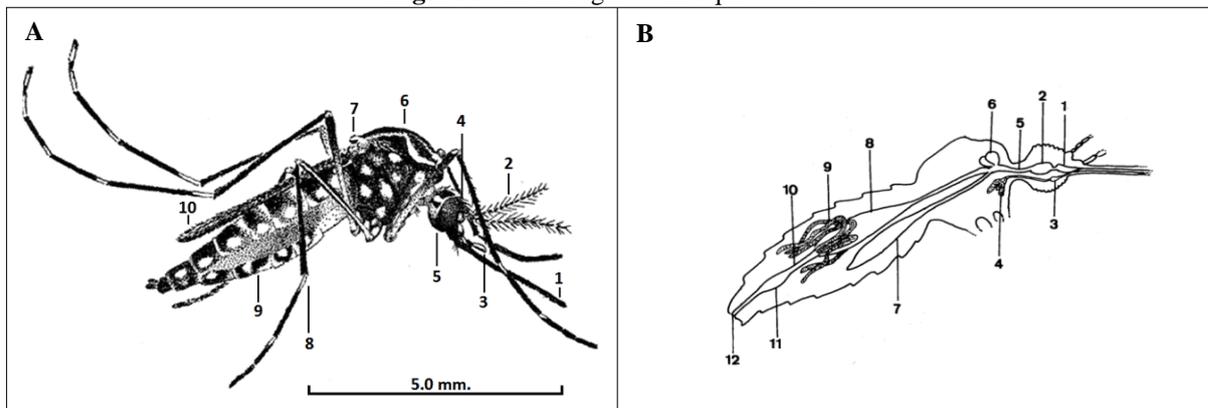
Legenda: 1: cabeça; 2: antena; 3: escova bucal; 4: olho; 5: tórax; 6: órgão de Nuttall & Shipley; 7: abdômen com oito segmentos; 8: lobo anal; 9: escova ventral do lobo anal; 10: brânquias; 11: sifão respiratório.

No estágio de pupa (Figura 1C), os imaturos não se alimentam e normalmente são encontrados na superfície da água graças à reserva de ar acumulada entre os apêndices cefalotorácicos, necessitando de esforço físico apenas para se deslocar. Ao final da metamorfose, os adultos emergem a partir de uma fenda no cefalotórax da pupa, normalmente, entre o 7° e o 8° dia após eclosão dos ovos. Do ponto de vista ecológico, em uma mesma região, os culicídeos ocupam ecótopos distintos como se representassem populações diferentes, pois

os imaturos são aquáticos enquanto os adultos são alados, mas fazem parte da mesma população, com estágios intercorrentes (CLEMENTS, 1992).

Os adultos (Figura 3A) não formam colônias e estão destinados à reprodução e à dispersão da espécie. O corpo do adulto é dividido em cabeça, tórax e abdome, em uma envergadura que oscila ao redor de 0,5 cm na maioria das espécies (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Na cabeça estão os principais órgãos sensoriais, como os olhos compostos, as antenas e os palpos (SUTCLIFFE, 1994). O aparelho bucal dos adultos é composto por uma probóscide destinada à sucção e à punção. O abdome inclui os órgãos reprodutores, digestivos e excretores (Figura 3B). No aparelho digestivo, o divertículo ventral é destinado para reservar a alimentação de carboidratos, enquanto o estômago é responsável pela digestão. Em espécies com fêmeas hematófagas, o estômago é especializado em acomodar e digerir o sangue. No tórax encontram-se os apêndices locomotores: três pares de patas, um par de asas membranosas e um par de halteres (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 3- Morfologia do mosquito adulto.



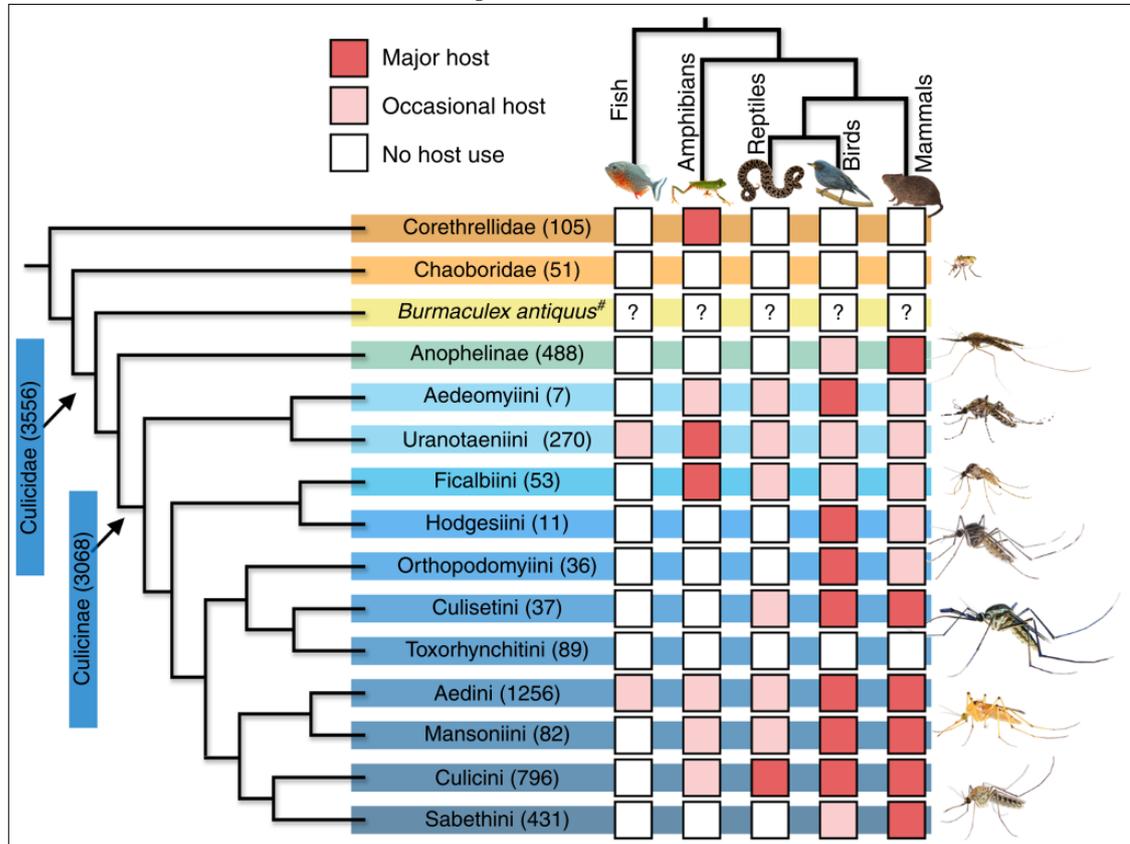
Fonte: Adaptado de Christophers (1960) e Consoli; Lourenço-de-Oliveira (1994).

Legenda: A: Morfologia externa. 1: probóscide; 2: antena; 3: palpo maxilar; 4: olho; 5: cabeça; 6: tórax; 7: halter; 8: pata; 9: abdome; 10: asa. B: Morfologia do sistema digestivo. 1: bomba cibarial; 2: bomba faríngea; 3: bomba salivar; 4: glândula salivar; 5: esôfago; 6: divertículos dorsais; 7: divertículo ventral; 8: estômago; 9: tubos de Malpighi; 10: cólon; 11: reto; 12: ânus.

Na maioria das espécies de mosquitos, fêmeas realizam hematofagia buscando obter no repasto sanguíneo aminoácidos necessários para maturação dos seus ovários e produção de ovos, principalmente em vertebrados de sangue quente, enquanto outras buscam animais de sangue frio, como o mosquito *Uranotaenia lowii*, que se alimenta de anuros, e *Ur. sapphirina*, que se alimenta de anelídeos (REEVES et al., 2018). Por outro lado, em algumas espécies de mosquitos, tanto as fêmeas quanto os machos se alimentam exclusivamente de fluidos vegetais. De modo geral, os mosquitos estabelecem preferências em relação aos hospedeiros, e raramente uma espécie depende exclusivamente de um deles (Figura 4). Em relação ao voo, a distribuição

vertical dos mosquitos depende principalmente das preferências alimentares, onde as fontes podem ser encontradas a poucos metros do solo, enquanto outras ocorrem principalmente no dossel de florestas (REISKIND et al., 2017).

Imagem 4. Padrões de alimentação de sangue para Culicidae e linhagens relacionadas em relação às classes de hospedeiros vertebrados.



Fonte: Editado de Reeves, et al. (2018)

Legenda: Major host- principal hospedeiro. Occasional host- hospedeiro ocasional. No host use- sem relação com este tipo hospedeiro

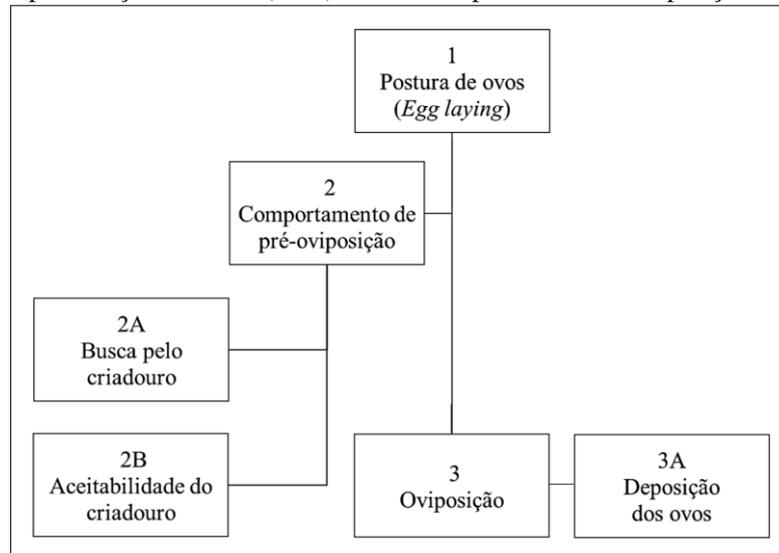
Descrição: o sombreamento rosado dos quadrados indica o grau em que o mosquito ou linhagens relacionadas interagem com as classes de vertebrados. Padrões de rosa escuro sugerem grande interação enquanto rosa claro sugere relação ocasional. Todas as linhagens de mosquitos existem, exceto *Burmaculex antiquus* (#), o fóssil de mosquito mais antigo conhecido, do Cretáceo médio (110 mya). Presume-se que *B. antiquus* era hematófago, apresentava probóscide moderadamente alongada, mas não possuía sensilas palpaes que funcionam como receptores de CO₂ para localização dos hospedeiros.

A cópula ocorre a partir da busca do macho pela fêmea, sendo a última capaz de rejeitar o macho usando sua genitália para impossibilitar a copulação. Havendo aceitação, o acasalamento pode ser realizado durante o voo ou em alguma superfície. Durante a cópula, o macho deposita o sêmen com espermatozoides dormentes, que passa a ser armazenado na espermateca da fêmea, sendo um evento de acasalamento, com um ou mais machos, o suficiente para a fertilização dos ovos produzidos ao longo da vida da fêmea. No entanto, se julgar necessário, a fêmea pode aceitar novas inseminações (FOSTER; WALKER, 2019). Ao empregar a técnica de microscopia crio-eletrônica pela primeira vez para estudar os

espermatozoides de *Aedes aegypti* na espermateca das fêmeas, Noble et al. (2019) descreveram que a transição da dormência dos espermatozoides para uma motilidade rápida está correlacionada à sua perda de glicocálice, resultando em um pico de fertilidade na fêmea. Desta forma, o comportamento de oviposição é fortemente estimulado depois que as fêmeas passam por esses eventos fisiológicos. A cópula tem um papel importante na estimulação das fêmeas para o início da atividade hematofágica e geralmente os mosquitos seguem esta sequência, no entanto, em raras ocasiões, o repasto sanguíneo pode ser observado antes do acasalamento (CLEMENTS, 2006). Após o acasalamento dos mosquitos, as fêmeas realizam ciclicamente a busca por alimentação sanguínea e açucarada; realização do repasto sanguíneo; repouso durante a produção de ovos e o comportamento de oviposição. A maturação dos ovos de mosquitos hematofágicos duram em média 48 horas após o repasto sanguíneo (CLEMENTS, 1992). Todavia, a fecundação dos ovos só é realizada no momento da deposição, quando as fêmeas os fertilizam um a um, utilizando os espermatozoides que foram retidos na espermateca durante o acasalamento (NOBLE et al., 2019).

O termo postura de ovos (*egg laying*) representa um processo comportamental e fisiológico realizado por fêmeas grávidas que resulta na deposição de ovos, considerado um dos eventos mais importantes no ciclo de vida dos culicídeos (SPENCER; BLAUSTEIN; COHEN, 2002). As fêmeas dos mosquitos apresentam comportamentos de pré-oviposição e de oviposição, geralmente obedecendo a seguinte ordem de eventos: voo, orientação, encontro e aceitação. O comportamento de pré-oviposição inicia quando as fêmeas grávidas chegam ao possível criadouro, onde são avaliados três fatores neste ambiente: o habitat, o biótopo e o substrato de oviposição. Durante a avaliação do criadouro, as fêmeas dos mosquitos pousam para avaliar fisicamente diferentes variáveis, como a existência de predadores de seus imaturos, se há colonização intra ou interespecífica, e a qualidade da água em relação a temperatura, ao pH, aos íons e à turbidez (ALBENY-SIMÕES et al., 2014; DAVIS; KLINE; KAUFMAN, 2016; OMOLADE, 2018). Já a oviposição, tem início com a ovulação e emissão de ovócitos, seguida do ato de deposição dos ovos no ambiente (CLEMENTS, 2006). Uma representação esquemática pode ser observada na figura 5.

Figura 5- Representação das fases (1 a 3) sobre o comportamento de oviposição dos culicídeos.



Fonte: O autor.

Alguns termos foram descritos para caracterizar as diferentes formas oviposição. Lote (*batch*) de ovos é o conjunto de ovos maduros depositados pela fêmea em um ciclo gonotrófico. Ninhada (*clutch*) é o número total de ovos depositados por uma fêmea em um sítio de oviposição (CLEMENTS, 2006). Os ovos podem ser depositados separadamente (*singly*), permitindo a fêmea dispersar os ovos em diferentes sítios de oviposição (CORBET; CHADEE, 1993). Massa de ovos (*mass*) é a coleção de ovos depositada por mais de uma fêmea dentro de uma área limitada (REITER, 2007). Algumas espécies de mosquitos depositam toda carga de ovos de forma agrupada, à essa carga dá-se o nome de jangada (*raft*), um lote de ovos interligados depositados na superfície da água (OSGOOD, 1971). Grupo de ovos (*cluster*) é um lote ovos depositados conjuntamente e anexado ao substrato graças à uma secreção adesiva (STAMP, 1980).

Algunas espécies de mosquitos hematofágicos foram beneficiadas pelas ações antrópicas, por disponibilizarem condições para uma interação mosquito-humano (POWELL; TABACHNICK, 2013). A rápida e mal planejada urbanização, as mudanças climáticas e ambientais e o aumento das viagens e do comércio global, estimularam a proliferação de mosquitos e disseminação de patógenos (GUBLER, 2011). A falta de água encanada e o gerenciamento inadequado de resíduos sólidos criam locais para os mosquitos se reproduzirem, o que pode favorecer a ocorrência de surtos explosivos de doenças (FIGUEIREDO et al., 2020; ZANLUCA et al., 2015). Doenças como dengue e filariose linfática prosperam em condições de pobreza há décadas, resultantes de um mau gerenciamento do desenvolvimento urbano (WHO, 2016a).

2.2 O gênero *Aedes*

Compreendido em mais de 900 espécies distribuídas entre 44 subgêneros, o gênero *Aedes* apresenta distribuição em todo planeta, estando 9 subgêneros presentes no continente americano (FOTATTINI, 2002). No Brasil, os mosquitos *Aedes* são também conhecidos como pernilongos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Em relação à importância epidemiológica, estão incluídos os subgêneros *Ochlerotatus* e *Stegomyia*, ganhando destaque o subgênero *Stegomyia*, representado principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, vetores das mais importantes arboviroses em todos os continentes.

2.3.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus, 1762

As principais características morfológicas de *Ae. aegypti* são as de corpo escuro e ornamentação branco-prateada na cabeça, pernas, tórax e abdome (Figura 8). Além disso, se distingue facilmente dos outros membros do subgênero pela presença de marcações em forma de lira no dorso do seu tórax (CLEMENTS, 1992). É uma espécie que em sua forma silvestre estava habituada a ovipor em ambientes naturais de retenção de água, como ocos de árvores, axilas das folhas, cascas de frutas e fendas naturais que acumulassem água das chuvas (LOUNIBOS, 1981), mas graças à sua capacidade antropofílica, hoje a espécie é completamente urbanizada e raramente encontrada longe das habitações humanas (REITER, 2007). Por esta razão, dentre a família dos culicídeos, é uma das espécies mais associadas aos seres humanos (NATAL, 2002). Esse mosquito foi primeiramente descrito no Egito, acompanhou processos de migrações humanas e se estabeleceu em locais onde o clima e as alterações antrópicas favorecessem seu desenvolvimento. Provavelmente, *Ae. aegypti* chegou ao Brasil no período colonial, através dos navios que traziam escravos da África (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As regiões tropicais e subtropicais do planeta oferecem condições favoráveis para o seu estabelecimento, mas são as regiões tropicais que apresentam melhores oportunidades por apresentarem temperatura e umidade mais elevadas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A densidade populacional é geralmente mais elevada nos períodos chuvosos do ano, podendo aumentar explosivamente o número de mosquitos nas cidades e, conseqüentemente, potencializar a transmissão de agentes causadores de doenças aos humanos (BECKER et al., 2010). No entanto, isso não significa que nos períodos menos chuvosos sua densidade populacional seja baixa, pois os criadouros artificiais, sobretudo reservatórios de

água potável, podem oferecer recursos para a permanência dos eu desenvolvimento nas cidades (KILLICK-KENDRICK, 1996).

Figura 5- *Aedes aegypti*.



Fonte: James Gathany (2019).

Os seres humanos são os hospedeiros de maior preferência para *Ae. aegypti* em virtude da qualidade nutricional que o sangue apresenta para maturação dos seus ovos (BERNIER; KLINE; POSEY, 2006). Depois da alimentação sanguínea, as fêmeas buscam locais escuros e sem perturbação para abrigo enquanto digerem o sangue e amadurecem os ovos (CLEMENTS, 1992). A longevidade dos adultos depende de fatores intrínsecos, referentes à fisiologia e saúde do inseto, e extrínsecos, referente às condições ambientais e disponibilidade de alimento. Em relação ao tempo que fêmeas utilizam para dispersar os ovos, mosquitos selvagens criados em laboratório a partir de ovos coletados no campo levam em média nove dias para completar 95% da sua oviposição, no entanto, mosquitos criados em colônias laboratoriais podem ovipor em até cinco dias (REITER, 2007).

A deposição dos ovos pode ser realizada em diferentes substratos, inclusive nas paredes internas e úmidas de uma ampla variedade de objetos e estruturas que possam acumular água, bem como também na superfície da água. Ovos de *Aedes* são enegrecidos, resistentes à dessecação e proteção contra estresses bióticos e abióticos, possibilitando suportar ambientes áridos uma vez concluída a embriogênese (CRISTINA et al., 2015). Por esta razão, os ovos podem permanecer viáveis nas paredes dos criadouros por mais de um ano, aguardando condições de umidade favoráveis para eclosão das larvas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Quando a oviposição é realizada na superfície da água, as larvas eclodem rapidamente e se desenvolvem. Esta particularidade pode assegurar rápida colonização de *Ae. aegypti* em criadouros disponíveis, poupar efeito de predação nos ovos e conservar sua viabilidade em relação aos ovos que esperam épocas de chuvas (GOMES; SCIAVICO; EIRAS, 2006).

Os mosquitos *Aedes* têm estratégia de oviposição baseada na dispersão dos ovos em mais de um criadouro, conhecida como oviposição em saltos (*skip oviposition*), podendo percorrer uma área de 800 metros em busca de diferentes sítios de oviposição (HONÓRIO et al., 2003) embora estudos recentes tenham verificado indivíduos da mesma progênie a 1312 m de distância, sugerindo que a longa distância provavelmente foi realizada passivamente pelo transporte humano (SCHMIDT et al., 2018). Em relação à oviposição em saltos, Abreu et al. (2015) descreveram que uma fêmea de *Ae. aegypti* pôde dispersar ovos em 11 dos 16 recipientes disponíveis para oviposição, podendo haver predileção de um sítio em relação aos demais. Um único sítio de postura pode conter imaturos de diferentes fêmeas, como foi demonstrado por (COLTON; CHADEE; SEVERSON, 2003), utilizando marcadores de genes codominantes para determinar o número de fêmeas que visitaram determinado criadouro, a partir das amostras de ovos recolhidos.

O desenvolvimento larvário de *Ae. aegypti* é favorecido por temperaturas entre 24 e 30 °C (temperatura ambiente de regiões tropicais), baixa densidade populacional, e disponibilidade moderada de alimentação, uma vez que larvas não se desenvolvem bem em ambientes de superlotação. Altas densidades populacionais em criadouros podem levar à competição por espaço e alimento, causando retardo na maturação e aumentando a taxa de letalidade das formas imaturas (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014).

2.3.2 *Aedes (Stegomyia) albopictus*, Suke, 1894

De origem asiática, conhecido popularmente como tigre asiático, *Ae. Albopictus* também conseguiu se estabelecer todos os continentes em virtude da dispersão passiva de ovos quiescentes. No Brasil, foi registrado pela primeira vez em 1986 no estado do Rio de Janeiro e, em menos de um ano, já havia se estabelecido em todos os estados do sudeste brasileiro (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

No que diz respeito à morfologia, os adultos dessa espécie se diferem de *Ae. aegypti* pelo corpo de tonalidade preta e a existência de uma linha longitudinal de escamas prateadas no escudo (Figura 6) (FORATTINI, 2003). Semelhante ao comportamento de *Ae. aegypti*, as principais atividades são exercidas durante o dia, incluindo a deposição de ovos resistentes a dessecação (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Apesar de *Ae. albopictus* ser considerado um vetor silvestre ou de ambientes rurais de arbovírus, esta espécie se adaptou aos ambientes suburbanos e urbanos, tornando-se o mais importante, e às vezes o único, vetor da transmissão de arbovírus em áreas urbanizadas de alguns países (LI et al., 2014). Regiões com processos iniciais de urbanização, sobretudo próximas de áreas arborizadas, ou com resquícios

de Mata Atlântica, são cenários de desenvolvimento simpátrico entre *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* (ALBUQUERQUE et al., 2000; ALMEIDA et al., 2006; BARBOSA et al., 2020) mas relatos acusam gradativa redução na população de *Ae. albopictus* à medida que o ambiente assume características mais urbanizadas, favorecendo a proliferação de *Ae. aegypti* em seu lugar (TSUDA et al., 2006). Sobre esse aspecto, há hipóteses que discutem sobre essa competição interespecífica que resulta no crescimento populacional de uma espécie em detrimento da redução da outra. Na maioria das vezes, são as características da vegetação circundante e os tipos de criadouros disponíveis que determinam a predominância de uma espécie (CLEMENTES, 2006).

Figura 6- *Aedes albopictus*.

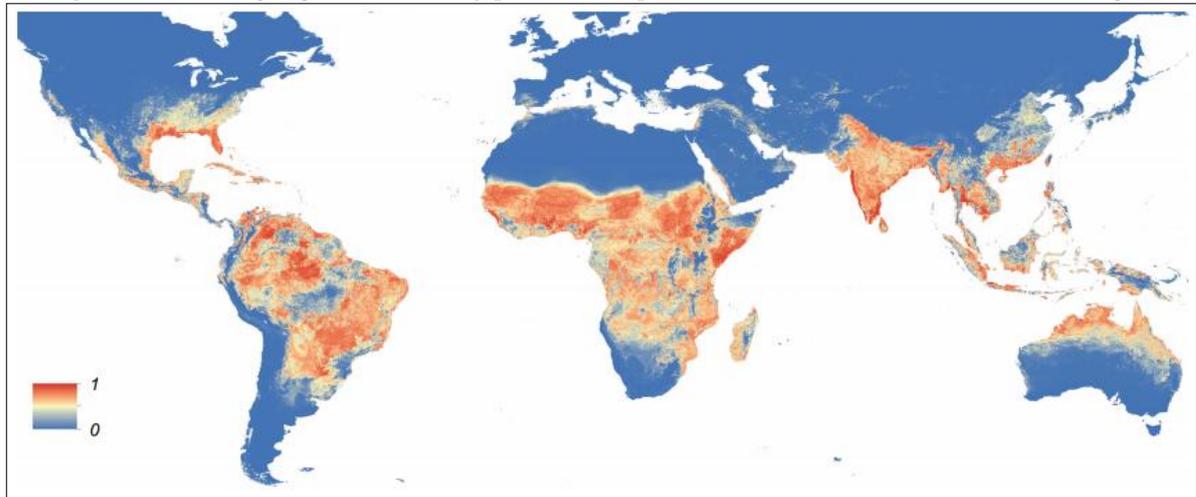


Fonte: James Gathany (2019).

2.3.3 Importância epidemiológica

A transmissão horizontal de arbovírus acontece através da picada de fêmeas infectadas, cuja saliva repleta de partículas virais ativas pode entrar na corrente sanguínea do hospedeiro (CLEMENTS, 2011). Entre os mosquitos transmissores de arboviroses, o gênero *Aedes* é considerado o mais importante. *Ae. aegypti* é o principal vetor do vírus Dengue na maioria dos países, enquanto *Ae. albopictus* o vetor secundário (WHO, 2019). Devido à predominância dessas duas espécies nas regiões mais quentes e úmidas do planeta, são também esses os locais com maior risco de transmissão vetorial, expondo mais da metade da população mundial à febre da dengue (Figura 10). Além disso, estas espécies também estão envolvidas na transmissão do vírus Mayaro (TESH et al., 2011), Febre amarela urbana (FREDERIKSEN, 1955), Chikungunya (ROSS, 1956) e Zika (DICK et al. 1952).

Figura 7- Distribuição global de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e o risco de transmissão do vírus Dengue.

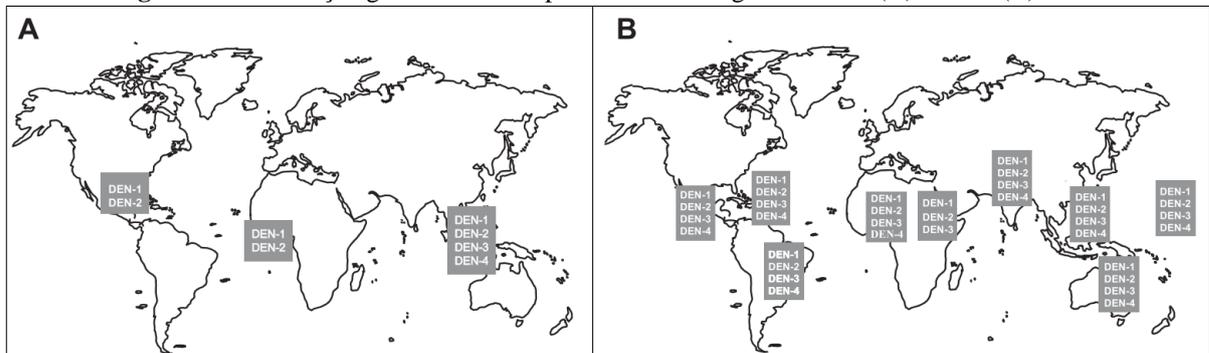


Fonte: Kraemer et al. (2015).

Legenda: Risco de infecção entre 0 (sem risco) e 1 (maior risco).

Em 2013, foi descrito na Malásia o 5º sorotipo vírus Dengue, que embora não esteja circulando em outras áreas, pode representar um desafio ainda maior para o desenvolvimento de vacinas (NORMILE, 2013). O movimento de pessoas infectadas com vírus tem sido o principal impulsionador da expansão global das doenças (Fig. 11). Desde 2011 toda extensão tropical do planeta está hiperendêmico, com vários sorotipos virais circulando na maioria dos grandes centros urbanos (GUBLER, 2011). Em abril de 2015 foi confirmada a transmissão autóctone do vírus Zika no Brasil e, no mesmo ano, registrado números exorbitantes de nascidos com microcefalia e síndrome congênita do Zika. O ocorrido foi registrado inicialmente em Pernambuco, posteriormente em outros estados do Nordeste brasileiro (AYRES, 2016). Pesquisas relacionadas à produção e utilização de vacinas contra arboviroses estão em andamento, todavia, a Organização Mundial da Saúde sugere o controle vetorial para prevenção de surtos epidemiológicos e para impedir a disseminação e estabelecimento de novos arbovírus em outros países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016b).

Figura 8- Distribuição global dos sorotipos virais de Dengue em 1970 (A) e 2011 (B).



Fonte: Gubler (2011).

2.3 O gênero *Culex*

Constituído por mais de 750 espécies divididas em 24 subgêneros (HARBACH & KITCHING 1998), o gênero *Culex* está presente nas américas em 13 subgêneros, incluindo o subgênero *Culex*, com pelo menos 320 espécies (FORATTINI, 2002). No que diz respeito à importância epidemiológica, algumas espécies estão em bastante evidência no Brasil, como *Culex quinquefasciatus* (ALBUQUERQUE et al., 2020).

2.4.1 *Culex (Culex) quinquefasciatus*, Say, 1823

É uma espécie considerada cosmotropical, presente nas regiões meridionais da Ásia, da África, das Américas e da Oceania. Sua distribuição é fortemente influenciada pelas ações antrópicas, em ambientes urbanos e rurais, tornando-se rara à medida que a aglomeração humana diminui (FORATTINI, 2002). No Brasil, *Cx. quinquefasciatus* está presente em todas as regiões, sendo comumente conhecido como muriçoca e carapanã. Os adultos (Figura 12) apresentam tarsos escuros, sem marcação evidente, escudo com tegumento marrom, e recoberto de escamas amarelo-douradas em todo corpo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). As atividades de *Cx. quinquefasciatus* geralmente se iniciam ao final do horário vespertino, com maior intensidade durante os horários mais avançados da noite e próximos do amanhecer. Em áreas de infestação, esses mosquitos estão geralmente abrigados entre o peridomicílio e o intradomicílio, buscando em seres humanos e animais domésticos o exercício da hematofagia (FORATTINI, 2002).

Figura 9- *Culex quinquefasciatus*.

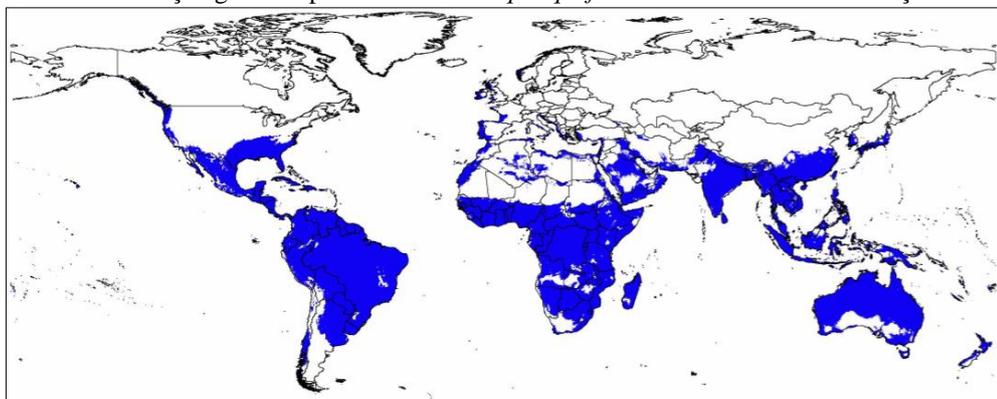


Fonte: James Gathany (2019).

As regiões tropicais, onde a temperatura e a umidade relativa têm pouca oscilação, favorecem o estabelecimento de *Cx. quinquefasciatus* (Figura 13). Todavia, são nos períodos mais chuvosos do ano que as populações atingem índices explosivos (RAMAIAH; DAS, 1992). Ensaio de marcação e soltura de adultos, machos e fêmeas, mostraram capacidade de dispersão de até pouco mais de 2 km a partir do ponto de soltura, sendo recapturados por armadilhas

exalando atraentes de oviposição ou CO₂, demonstrando a capacidade migratória que esses mosquitos apresentam em busca de hospedeiro e de criadouros para oviposição (MEDEIROS et al., 2017).

Figura 10- Distribuição global hipotética de *Culex quinquefasciatus* com base nas condições climáticas.



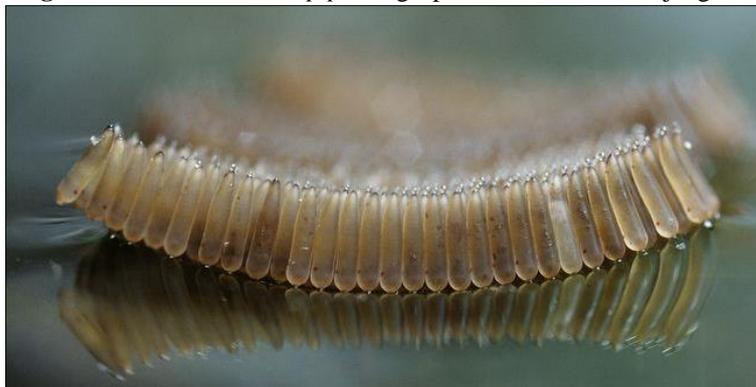
Fonte: SAMY; ELAAGIP; KENAWY, 2016.

Descrição: Apenas as regiões azuladas estabelecem condições climáticas adequadas.

Diferente do que é observado no ciclo gonotrófico dos mosquitos *Aedes*, toda carga de ovos dos mosquitos *Culex* é produzida após uma alimentação sanguínea e depositada de uma vez na superfície da água, formando um grupamento de ovos ligeiramente curvados no eixo longitudinal, produzindo superfícies côncavas e convexas, denominada jangada (CLEMENTS, 2006). O ápice de cada ovo é provido de uma gotícula de do feromônio atraente de oviposição (LAURENCE; PICKETT, 1985), como observado na figura 14. O feromônio de oviposição foi identificado e sintetizado, sendo hoje empregado em armadilhas para atrair e coletar fêmeas grávidas em campo (BARBOSA et al., 2007; BRAKS; LEAL; CARDÉ, 2007). Alguns parâmetros entre os ovos dos mosquitos *Culex* e *Aedes* são diferentes, e que estão relacionados a resistência dos ovos e quiescência das larvas em função das condições ambientais adversas. Os ovos de *Cx. quinquefasciatus* carecem de quitina, aumentam de tamanho em função da absorção de líquido durante a embriogênese, e apresentam uma grande densidade de superfície, enquanto os ovos *Ae. aegypti* têm uma camada densa de quitina, que minimiza a perda de água para o ambiente, possibilitando manter as larvas quiescentes (CRISTINA et al., 2015). As larvas eclodem dos ovos após aproximadamente 1 dia, colonizando rapidamente o criadouro (EASTWOOD et al., 2019). O desenvolvimento das larvas de *Cx. quinquefasciatus* é beneficiado entre temperaturas de 24 a 29 °C, sendo mais favorecido quanto mais aquecida a água for dentro desta margem (BHATTACHARYA; BASU; SAJAL BHATTACHARYA, 2016). Além disso, *Cx. quinquefasciatus* tem capacidade de se desenvolver em criadouros superlotados, por onde a densidade de larvas por criadouros em campo é mensurada utilizando

a técnica de conchada, que consiste em coletar porções de larvas utilizando conchas entomológicas, seguido de triagem das espécies coletadas (CARVALHO et al., 2017).

Figura 11- Ovos de *Culex pipens* agrupados formando uma jangada.



Fonte: Martin Dohrn (2005).

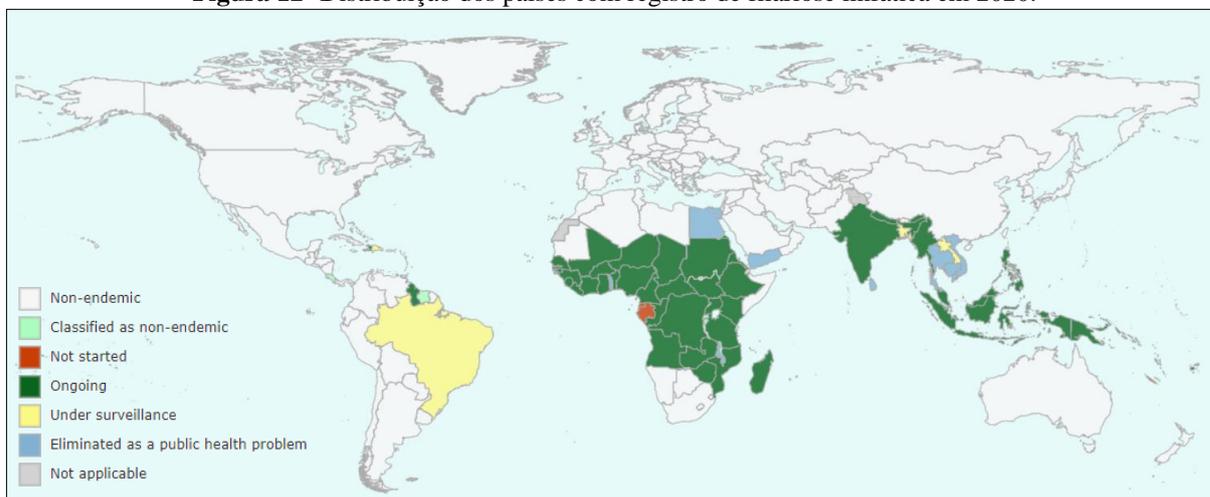
Os adultos emergem em maior frequência no crepúsculo vespertino, vivem entre 45 e 50 dias (RAMIAH; DAS, 1992), e podem realizar neste período quatro ciclos gonotróficos, produzindo nos dois primeiros ciclos uma média de 150 a 280 ovos, reduzindo o quantitativo nos ciclos posteriores. O número de ovos por jangada é influenciado pelo estado fisiológico das fêmeas, sendo as fêmeas jovens as mais propensas a produzirem quantidades maiores de ovos. Além disso, a qualidade da fonte alimentar também influencia na fecundidade, sendo o sangue das aves o mais nutritivo para produção de ovos (BRIEGEL; REZZONICO, 1985).

2.4.2 Importância epidemiológica

Além do desconforto das picadas e dos ruídos emitidos durante a noite, *Cx. quinquefasciatus* está implicado na transmissão de alguns arbovírus como o Vírus do Nilo Ocidental e o Vírus da encefalite (PESKO; MORES, 2009), além de ser o vetor mais importante de filariose bacronftiana nas Américas, também conhecida como elefantíase (ALBUQUERQUE et al., 2020). A filariose é causada por três espécies de nematoides, *Brugia malayi*, *Brugia timori* e *Wuchereria bancrofti*, sendo a última o principal agente etiológico e responsável por mais de 90% dos casos, cuja transmissão é realizada por meio da picada de mosquitos infectados com nematódeos (WHO, 2019). Considerada uma doença negligenciada e prevalente em países subdesenvolvidos com climas tropicais, a filariose é observada em 49 países entre a Ásia, África e Américas, afetando aproximadamente 100 milhões de pessoas e colocando em risco cerca de 893 milhões de pessoas (WHO, 2021). Quatro países nas Américas apresentam cidades endêmicas: Brasil, República Dominicana, Guiana e Haiti. No Brasil, a transmissão está limitada aos municípios do Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista,

todos localizados na Região Metropolitana do estado de Pernambuco. Outras cidades brasileiras já foram endêmicas, como Belém-PA e Manaus-AM, mas hoje não há relatos de novos casos de infecção da filariose (MARTINS; GUIMARÃES; FONTES, 2021).

Figura 12- Distribuição dos países com registro de filariose linfática em 2020.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (adaptado) (2020).

Legenda: Non-endemic- não endêmico; Classified as non-endemic- classificado como não endêmico. Not started- não iniciado. Ongoing- em progresso. Under surveillance- sob vigilância; Eliminated as a public health problem- problema de saúde pública eliminado. Not applicable- não aplicável.

Embora *Ae. aegypti* seja considerado o único vetor envolvido na transmissão do vírus Zika, Guedes et al. (GUEDES et al., 2017b) descreveram pela primeira vez a possível implicação de *Cx. quinquefasciatus* em sua transmissão durante a epidemia entre 2015 e 2017, onde a cepa viral circulante em Pernambuco conseguiu ser replicada na glândula salivar de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* em condições de laboratório. Mais adiante, Paiva et al. (2020) comprovou esta evidência, detectando genomas virais do Zika em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, cujas amostras foram coletadas em Recife entre 2015 e 2016, selecionando as fêmeas sem qualquer vestígio de sangue em seu abdome. Esses dados reforçam a importância em promover um programa nacional para controle de *Cx. quinquefasciatus*, e apontam a necessidade de realizar estudos sobre competência vetorial entre as diferentes populações de mosquitos coexistentes.

2.4 O ambiente urbano sob a ótica do estabelecimento de populações de mosquitos

À medida que os seres humanos se desenvolveram em número e ocupação da Terra, habitats nativos de muitas espécies foram invadidos e transformados. Frente às mudanças ambientais, muitas espécies migraram ou foram extintas, outras se adaptaram, conseguindo se estabelecer e se reproduzir em ambientes transformados pelos seres humanos (POWELL;

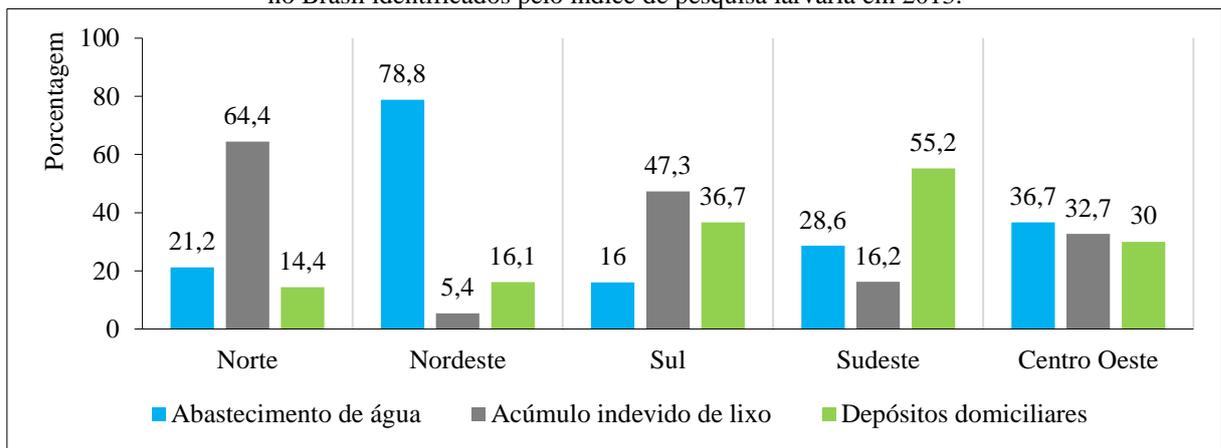
TABACHNICK, 2013). Quando isso ocorre com insetos hematófagos, as consequências podem ser desafiadoras, pois os seres humanos podem acabar se tornando a fonte de sangue mais disponível e estável. Consequentemente, a mudança da zoofagia para antropofagia inclui os seres humanos em ciclos de transmissão de patógenos antes restritos aos ambientes silvestres. O subsequente desafio desse tipo de relação, é o potencial para a disseminação de vetores para além do território nativo, tornando-as espécies invasoras (LOUNIBOS, 2002). Nesse sentido, algumas espécies de mosquitos estão aptas ao ambiente rural e/ou urbano, sendo constantemente consideradas espécies “domiciliadas”, ganhando destaque as espécies *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*, presentes nas áreas urbanas e rurais de todo planeta (BHATTACHARYA; BASU; SAJAL BHATTACHARYA, 2016; POWELL; TABACHNICK, 2013; ZAHOULI et al., 2017).

Os critérios adotados para categorizar uma cidade urbana ou rural variam entre países. O termo urbano geralmente está envolvido nos seguintes aspectos: desenvolvimento industrial, mudança na paisagem natural e densidade populacional de habitantes. Por outro lado, a urbanização refere-se ao aumento da população humana em áreas urbanas, sendo uma tendência global resultante do desenvolvimento econômico (MONTE-MÓR, 2005). Todavia, a maioria das cidades urbanas apresentam um fator em comum, o desenvolvimento heterogêneo entre de bairros que levam à implicações no planejamento da distribuição de energia e de água, e nos fenômenos climáticos (COLLIER, 2006). Entre as consequências do desenvolvimento heterogêneo, o planejamento eficiente de saneamento ambiental se torna um desafio, e está relacionado à proliferação de pragas, inclusive de mosquitos.

Em relação aos subsídios do ambiente urbano no desenvolvimento de mosquitos, há uma reconfiguração na disponibilidade de criadouros de habitats naturais para habitats artificiais. Por ser generalista na escolhas de sítios de oviposição, espécies de *Aedes* podem colonizar pequenos recipientes, como pneus usados e outros objetos indevidamente descartados, possibilitando o uso desses artefatos para abrigo e criadouros preenchidos por águas pluviais (BRITO; FORATTINI, 2004). Há também os reservatórios de água para consumo humano, por vezes indevidamente vedados, possibilitando o desenvolvimento de larvas e mantendo as populações flutuantes mesmo em períodos de estiagem. Além disso, a temperatura da água nesses habitats é geralmente mais alta do que nos criadouros de áreas rurais, podendo variar em até 5 °C para mais, acelerando o desenvolvimento dos mosquitos (LI et al., 2014). Apesar das mudanças na vegetação e na superfície do solo também influenciarem nos microambientes de alguns criadouros, a temperatura da água demonstra ser a variável mais importante no desenvolvimento de larvas de *Aedes* (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014).

Por outro lado, as fêmeas de *Aedes* também podem depositar ovos em coleções de água de maior dimensão, inclusive com alta concentração de matéria orgânica, como os esgotos a céu aberto geralmente colonizados por *Cx. quinquefasciatus* (SANTOS; BARBOSA, 2014). No Brasil, pela diversidade socioeconômica e de infraestrutura entre as regiões, são também diferentes as características e a disponibilidade de criadouros para *Ae. aegypti*, muito embora esteja abundante em todas as regiões do país (Figura 6).

Figura 13- Comparação em porcentagem entre os principais focos de proliferação de *Aedes aegypti* por região no Brasil identificados pelo índice de pesquisa larvária em 2013.



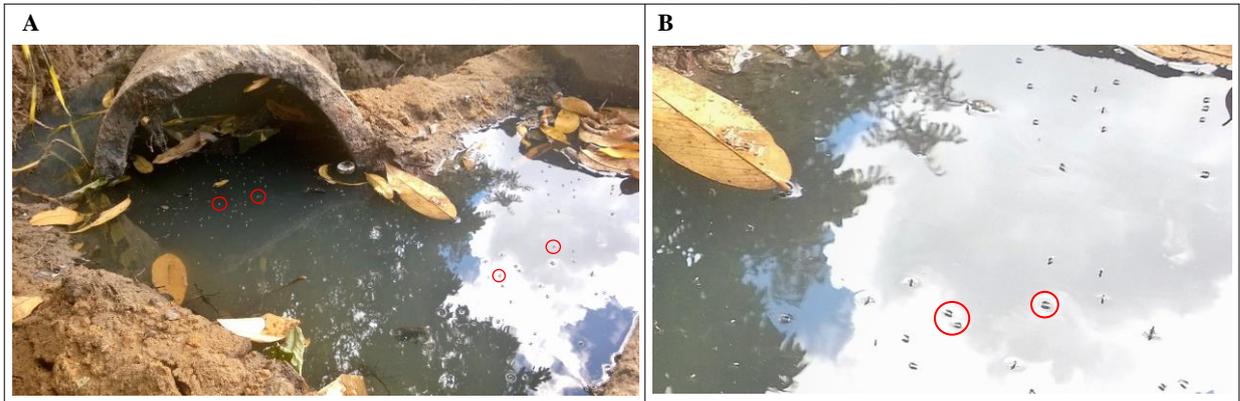
Fonte: Ministério da Saúde (2013). Dados adaptados em gráfico pelo autor.

Apesar da prevalência de *Ae. aegypti* em áreas urbanas, ambientes rurais também merecem atenção, pois apresentam reservatórios artificiais de água similares, além dos reservatórios naturais, muitas vezes irremovíveis, resultantes do acúmulo de água em ocos de árvores e em fendas rochosas, onde os mosquitos podem se desenvolver (CHADEE; MARTINEZ, 2000; REISKIND et al., 2017). Portanto, o tratamento de criadouros artificiais em áreas rurais pode não ser o suficiente para controlar efetivamente as populações de mosquitos, devendo as estratégias de controle ser baseadas em abordagens localmente adaptadas, combinando diferentes ferramentas e métodos de eficácia comprovada (ZAHOULI et al., 2017).

Cx. quinquefasciatus é geralmente relacionado à colonização de ambientes de água poluída, ricas em matéria orgânica e em fermentação, cujo volume de água é permanente, admitindo pouca movimentação, sendo frequentemente encontrado em regiões com precariedade no saneamento básico (Figura 7). Além disso, a presença de vegetação aquática nas margens dos criadouros pode abrigar adultos, influenciando o seu desenvolvimento (EASTWOOD et al., 2019). Ambientes como fossas mal fechadas, efluentes de tanques sépticos, valas de escoamento e esgoto a céu aberto, são exemplos de criadouros para a espécie,

cuja infestação pode chegar a números quase 10 vezes maiores em relação às populações de *Ae. aegypti*, com registros de médias de 60 a 120 fêmeas por quarto por noite em bairros de grande infestação (RAMESH et al., 2018; REGIS et al., 1995).

Figura 14- Registro fotográfico de um esgoto a céu aberto (Recife, PE), com destaque nos círculos vermelhos mosquitos (*Culex* sp.) pousados na superfície da água estagnada.



Fonte: O autor.

Legenda: A- Imagem registrada em 04 de outubro de 2015. B- Imagem ampliada em aproximadamente 3x.

A década de 90 ganhou cenários de discussões relacionando o aquecimento global com o aumento na disseminação de doenças de origem vetorial, quando se associou a proliferação de *Culex tarsalis* e *Aedes melanimon* ao efeito do aquecimento nos EUA, e suas implicações na disseminação do Vírus do Oeste Nilo (REEVES et al., 1994). No entanto, a dinâmica das populações de mosquitos em relação ao aquecimento global deve ser analisada pontualmente, pois a sazonalidade pode influenciar no desenvolvimento de mosquitos de diferentes maneiras. Na China, simulações baseadas em dados climáticos de 35 anos serviram para projetar variações de aquecimento entre 0,5 e 5 °C, e mostraram que o ciclo de vida de *Ae. albopictus* pode ser inibido pelo aquecimento global em meses de verão, mas ser facilitado tanto nos meses da primavera quanto nos meses do inverno (JIA et al., 2017). Em uma visão panorâmica, o aquecimento global provavelmente promoverá a invasão de mosquitos em regiões de altas latitudes, onde baixas temperaturas ainda são limitantes para o estabelecimento de suas populações, especialmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (REINHOLD; LAZZARI; LAHONDÈRE, 2018).

2.5 Sistema sensorial e comportamento dos mosquitos

A capacidade de perceber e se relacionar em um meio heterogêneo de forma eficiente garante o sucesso de todas as formas de vida (REINHARD, 2004). Para isso, os mosquitos integram sinergicamente informações olfativas, visuais e termossensoriais, que influenciam na seleção de hospedeiros (KOTHERA et al., 2020), na busca por locais de repouso (DZUL-

MANZANILLA et al., 2018) e por sítios de oviposição (BARBOSA et al., 2007), com base em sinais físicos e químicos.

2.5.1 Fatores físicos

No campo meteorológico, os ventos mais leves reduzem a eficiência de voo dos mosquitos, tornando o primeiro desafio para fêmeas grávidas que procuram hospedeiros ou locais para deposição dos ovos, pois a velocidade de voo do mosquito oscila apenas entre 1 m/seg. Uma das primeiras avaliações sobre a eficiência das armadilhas em capturar mosquitos frente às condições meteorológicas, mostra redução de quase 50% de coleta em condições de ventos de 0,5 m/seg e redução de quase 75% para ventos de 1,0 m/s. Por essa razão, o poder de captura das armadilhas de mosquitos está inversamente relacionado à velocidade do vento no campo (BIDLINGMAYER et al., 1974). Outros fatores, como baixa temperatura, umidade do solo e umidade relativa, também são desafios para o voo do mosquito (DOW; GERRISH, 1970).

Os mosquitos têm baixa capacidade de discernimento visual (com resolução de 5°, enquanto os seres humanos apresentam 0,02°), portanto é improvável que o sistema visual forneça as principais informações sobre o ambiente, ao contrário do sistema olfativo e de sua grande sensibilidade aos odores (VINAUGER et al., 2019). No entanto, a percepção da luz influencia no ciclo circadiano, regulando os estímulos das suas principais atividades, assim, diferentes espécies evoluíram para ocupar nichos temporais distintos, provavelmente para minimizar a competição e otimizar as chances de sobrevivência (BAIK et al., 2020). Enquanto *Cx. quinquefasciatus* busca em reflexos de baixa luminosidade sobre a presença de hospedeiros e de locais para oviposição, *Ae. aegypti* é estimulado pela alta luminosidade (CLEMENTS, 2006).

Foi demonstrado em condições de laboratório que *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* podem continuar ativos durante a noite em ambientes artificialmente iluminados, ressaltando a importância epidemiológica deste comportamento por estender o tempo da sua busca por hospedeiros (CHADEE; MARTINEZ, 2000; KAWADA et al., 2005). *Culex pipiens* f. *molestus* também mostrou em laboratório que a luz artificial durante a noite influencia em seus padrões de atividade e fecundidade, pois os genes regulados pelo estímulo da luz também podem ser afetados (HONNEN et al., 2019). No entanto, ainda é desconhecido se esses aspectos são prejudiciais, ou se as populações de campo são aptas a regularem o seu comportamento como resposta adaptativa.

Foi relatado pela primeira vez por Kennedy (1942), que enquanto *Ae. aegypti* é generalista em colonizar locais com retenção de água, tanto em reservatórios suspensos quanto a nível do solo, contrastando ou não com a luz, mas preferindo existência de sombra, e admitindo pouca ou muita turbidez na água, *Culex* prioriza reservatórios de água a nível do solo e com alta turbidez. Espécies adaptadas a ovipor em reservatórios de água suspensos utilizam as cores dos recipientes como um dos critérios de seleção. *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são atraídos por recipientes pretos, ou a medida que as cores se tornam mais escuras em detrimento dos tons mais claros (KUMAWAT et al., 2014; PAVLOVICH; ROCKETT, 2000). Os limites nos comprimentos de onda para *Ae. aegypti* (621 nm a 323 nm) impossibilita-o de enxergar vermelho, mas não significa que seja insuficiente para as suas necessidades (MUIR; THORNE; KAY, 1992). Por esta razão, recipientes vermelhos também se mostram atrativos à oviposição, uma vez que é uma cor confundida com a preta por não haver discernimento entre suas diferenças (MARIN et al., 2020). Dessa forma, há corroboração generalizada de que armadilhas de cor preta, ou com contraste de branco e preto, são mais promissoras para coletar mosquitos (HOEL et al., 2011; KUMAWAT et al., 2014; XAVIER et al., 2020).

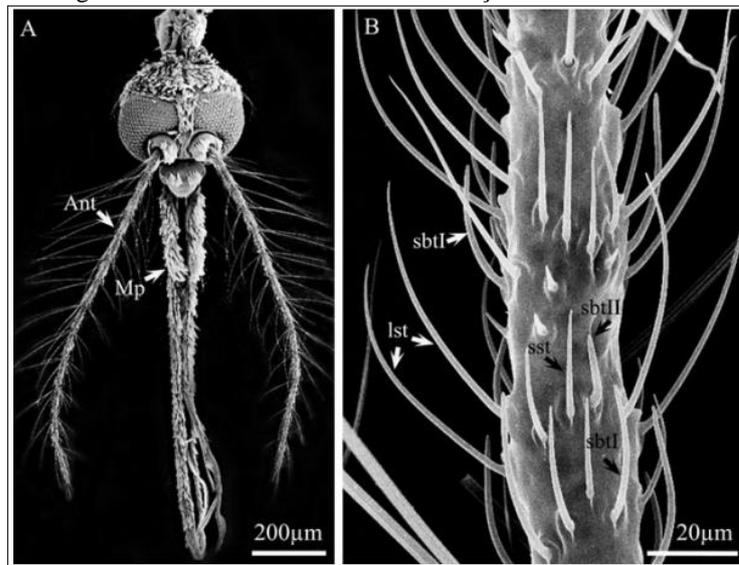
2.5.1 Fatores químicos

O estímulo químico é percebido por células quimiorreceptoras, que provavelmente compõem os órgãos mais antigos no sentido evolutivo e são de grande importância para a vida dos insetos (REINHARD, 2004). Nos mosquitos, essas estruturas estão localizadas nas sensilas (Figura 16), convertendo estímulos químicos em potenciais elétricos e originando respostas motoras (LIU et al., 2010). As sensilas estão presentes principalmente nas antenas, órgão fundamental na captação e reconhecimento de plumas de odores, e nas pernas, captando sinais químicos através do contato direto. Em menor proporção, as sensilas podem ser encontradas nos palpos e no aparelho ovipositor (CLEMENTS, 2006). São consideradas generalistas quando respondem a odores variados, ou especialistas quando respondem a uma ou poucas substâncias, principalmente aos feromônios (SUTCLIFFE, 1994).

Dentre os tipos de sensilas, destacam-se as tricóides (cerca de 800 por antena em *Ae. aegypti* e 1.362 em *Cx. quinquefasciatus*) que captam sinais químicos, enviam mensagens dos aproximados 1.600 neurônios receptores olfativos para o lobo antenal, a primeira estação de processamento de sinais olfatórios, por onde a informação é processada até cérebro do inseto, nos corpos fungiformes (regiões de aprendizado) e protocérebro lateral (região para respostas de esquiva) (HILL; HANSSON; IGNELL, 2008; KANDEL et al., 2014; MCLVER, 1982). A importância das informações químicas é tanta, que entre os neurônios presentes no par de

flagelos que compõem as antenas dos mosquitos (Figura 16), cerca de 90% trazem informações sobre odores nas fêmeas e 75% nos machos. Portanto, presume-se que a maioria dos comportamentos olfativos, tais como a busca do hospedeiro, sítios de oviposição e localização de alimentos ricos em carboidratos, é realizada pelas sensilas tricóides (CLEMENTS, 2006; MCLVER, 1982).

Figura 16- Micrografia eletrônica de varredura da cabeça e antena de uma fêmea *Aedes aegypti*.



Fonte: Ghaninia; Ignell; Hansson (2007).

Legenda: A- Órgãos olfatórios: um par de antenas (Ant) e de palpos maxilares (Mp). B- Segmento individual da antena da mesma fêmea demonstrando os subtipos de sensilas tricóides: pequena e pontiaguda (sst); curta e de ponta cortada I (sbtI); curta e de ponta cortada II (sbtII); longa e pontiaguda (lst).

Em meados de 1950 e 1970, foi definida a nomenclatura de substâncias químicas responsáveis pela interação entre organismos, conhecida hoje como semioquímicos, podendo atuar como feromônios, substâncias mediadoras de informações entre organismos da mesma espécie, ou aleloquímicos, substâncias que conferem comunicação entre espécies (KARLSON; LUSCHER, 1959; WHITTAKER; FEENY, 1971). São substâncias geralmente compostas por hidrocarbonetos de baixo peso molecular (BIRCH; HAYNES, 1984). Os semioquímicos podem atuar como atraentes ou estimulantes, bem como inibidores ou repelentes. Os atraentes são responsáveis por induzir os insetos ao deslocamento ativo em direção à fonte de odor (XU et al., 2013), enquanto os estimulantes intensificam o comportamento do indivíduo após o contato físico, como os estimulantes de oviposição, que induzem fêmeas grávidas a depositar mais ovos em um sítio de postura em relação aos sítios sem a presença de estimulantes (FAIERSTEIN et al., 2019). Por sua vez, os repelentes podem atuar a longa distância, fazendo com que os insetos se desloquem para longe da fonte de estímulo, desencadeando comportamento de rejeição

(LEAL et al., 2008), enquanto os deterrentes evocam respostas de rejeição após o contato do inseto com o estímulo (LU et al., 2017; SHAALAN; CANYON, 2018).

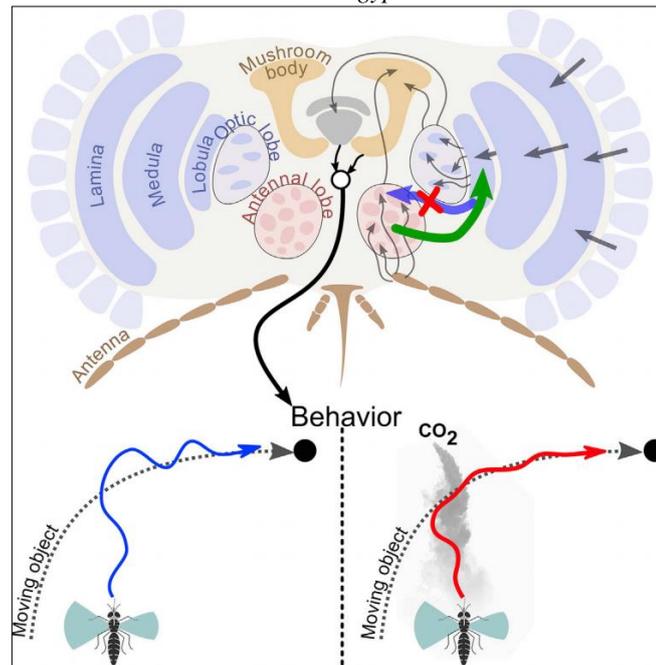
Feromônios podem trazer vantagens tanto para o organismo emissor quanto para o receptor e que são classificados, dentre outras formas, como feromônios sexuais, de trilha, defesa, recrutamento (KARLSON; LUSCHER, 1959) e de oviposição (SEENIVASAGAN et al., 2009). Ao longo do processo evolutivo dos insetos, os hidrocarbonetos também passaram a ser utilizados na comunicação química, atuando como mediadores para reconhecimento entre indivíduos da mesma espécie, sinais de fertilidade nos ovos, feromônios sexuais e, no caso de insetos formadores de colônias, para reconhecimento das suas classes sociais (EBBS; AMREIN, 2007; FERVEUR, 2005; MONNIN; MARIE, 2006; PAIXÃO, 2011; SCHAL et al., 1998). O lipídeo epicuticular dos mosquitos está relacionado com hidrocarbonetos, responsável pela impermeabilização, dessecação e, ao mesmo tempo, constituem uma barreira de proteção contra patógenos (LOCKEY, 1988).

Os aleloquímicos, na maioria das vezes, são provenientes de compostos que originalmente não foram metabolizados para fins de comunicação. São substâncias que apresentam ampla diversidade e que podem ser classificadas de acordo com a vantagem de um organismo sobre outro (WHITTAKER; FEENY, 1971). Quando a vantagem é para o organismo emissor, a substância é denominada alomônio (REED, 1998), e quando ao receptor, é denominada cairomônio (OLDHAM; BOLAND, 1996), quando confere vantagens para ambos, é chamada de sinomônios (NORDLUND; LEWIS, 1976). Nesse sentido, estão presentes na relação mosquito-hospedeiro cairomônios emitidos por hospedeiros que atraem fêmeas para o repasto sanguíneo (BERNIER et al., 2002). Os principais cairomônios utilizados como iscas são: CO₂ (XU; WEN; LEAL, 2020); octenol, substância presente no hálito e no suor humano (KLINE, 2007); e outros compostos secundários do suor, como a amônia e o ácido láctico (SMALLEGANGE, 2005). Esse conhecimento possibilitou o desenho de armadilhas associadas à iscas para capturar mosquitos, como a Techno Bam Trap, exalando CO₂ e octenol enquanto uma aparelhagem movida à energia aspira os mosquitos atraídos (POULIN et al., 2017). Apesar do maior interesse nas fêmeas durante a coleta de mosquitos no campo, machos de *Ae. aegypti* também acabam atraídos pelas iscas. Embora sua relação com seres humanos não esteja associada ao repasto sanguíneo, essa informação reforça a estreita relação que a espécie tem com seres humanos (PAIXÃO, 2011).

Estudos recentes sobre a influência das integrações entre estímulos visuais com presença e ausência de CO₂, descreveram que 67% da região óptica exibiu respostas a um estímulo visual, sem qualquer odor. Os demais 23% foram estimulados apenas quando o

estímulo visual foi precedido por um pulso de CO₂. Além disso, a região correspondente ao estímulo dos 23% da região óptica também responderam a um pulso de CO₂ sem qualquer estímulo visual (Figura 17). Desta forma, o odor pode modular as respostas visuais em mosquitos e otimizar a dinâmica do seu voo durante o rastreamento de hospedeiros (VINAUGER et al., 2019).

Figura 17- Esquema gráfico sobre a integração entre o estímulo de CO₂ e de luz no comportamento de voo de *Aedes aegypti*.

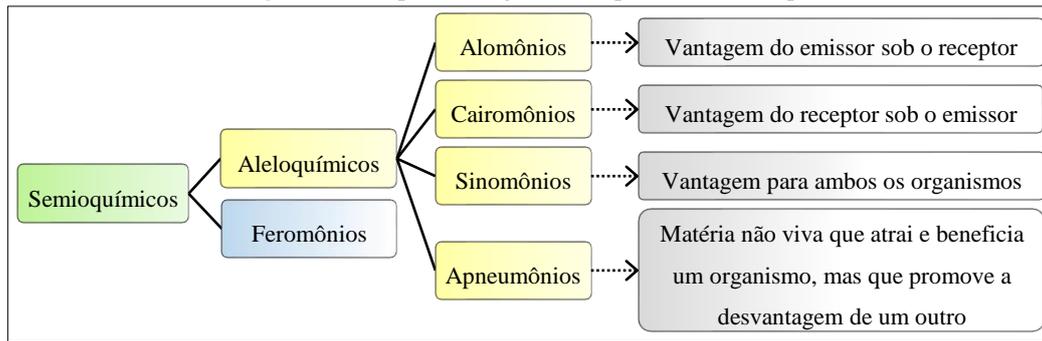


Fonte: Vinauger, et al. (2019).

Legenda: Antenna- antena. Antennal lobe- lobo da antena. Behavior- comportamento. CO₂- Dióxido de carbono. Lamina- lâmina. Lobula- lóbula. Medula- medula. Moving object- objeto em movimento. Mushroom body- corpo pendunculado. Optic lobe- lobo óptico.

Descrição: Quando os mosquitos encontram pistas de CO₂ em um corpo sob movimento (seta vermelha), suas antenas enviam sinais que são modulados não apenas do neurônio do lobo antenal para os corpos esponjosos, mas também para a lóbula (seta verde). O impulso da lóbula prossegue para o lobo óptico, seguindo para os corpos fungiformes, por onde é realizado o processamento da informação com integração entre os estímulos visuais e olfatórios. Por fim, o corpo central produzirá uma resposta comportamental ao estímulo. Respostas visuais da lóbula não são conduzidas para o lobo antenal (seta roxa). Mosquitos que rastreiam corpos sem presença de CO₂ apresentam dinâmica de voo menos eficiente (seta azul).

Por fim, os apneumônios atraem organismos à uma matéria não viva, que os beneficiam, mas essa relação acaba indiretamente sendo prejudicial para outras espécies (NORDLUND; LEWIS, 1976). Os voláteis podem atuar simultaneamente, entre feromônios e cairomônios, por onde a percepção entre as diferentes equivalências de um meio heterogêneo regulam o comportamento dos insetos (MARQUES et al., 2012). Uma representação hierárquica dos semioquímicos pode ser observada na figura 18.

Figura 18- Esquematização hierárquica dos semioquímicos.

Fonte: O autor.

Estudos relacionados à estrutura, função, origem e significado dos semioquímicos são desafiadores por representarem baixas quantidades de compostos presentes no meio, por onde um montante de informações acabam sendo processadas a partir de uma quantidade mínima de amostra investigada (MEINWALD; LEAL; KUBANEK, 2018). Normalmente, a identificação de semioquímicos deve ser seguida de ensaios comportamentais para compreender o seu significado, formando bases para compreensão sobre como os organismos interagem quimicamente com o meio. É possível utilizar esse conhecimento para criação de iscas que auxiliem no manejo de insetos de forma sustentável, pois são seletivas para espécies alvo e não trazem risco para outras formas de vida, inversamente observado na maioria dos inseticidas (OLIVEIRA et al., 2018).

2.6 Método mecânico-comportamental: monitoramento, vigilância e controle

No Brasil, a principal estratégia para o controle de *Ae. aegypti* desde 1996 tem sido a utilização de inseticidas das classes dos organofosforados e piretróides (BRASIL, 2009), que apresentam o sistema nervoso dos insetos como alvo em comum. Os organofosforados atuam como inibidores da acetilcolinesterase AChE, enquanto os piretróides têm como alvo os canais de sódio dependentes de voltagem (SANTOS et al., 2007). Com a estruturação do Programa Nacional de Controle da Dengue (BRASIL, 2002), tais inseticidas passaram a ser utilizados de forma frequente, levando ao longo dos últimos 25 anos à seleção de populações resistentes em diversos municípios brasileiros (ARAÚJO et al., 2013, 2019; CHEDIK et al., 2016; LIMA et al., 2007). No entanto, o Plano de Contingência Nacional para Epidemias de Dengue, revisado em 2015, reforçou métodos semelhantes, priorizando o uso de inseticidas químicos (BRASIL, 2015). Populações *Ae. aegypti* de todas as mesorregiões de Pernambuco demonstram resistência à cipermetrina, um adulticida do grupo dos piretróides, e ao temefós, um larvicida organofosfato

(ARAÚJO et al., 2019). A aplicação do temefós em Pernambuco por mais de 10 anos consecutivos atingiu até mesmo algumas populações de *Cx. quinquefasciatus*, espécie não-alvo, desencadeando genes de resistência (AMORIM et al., 2013).

Por outro lado, a OMS desde 2017 aponta o Plano de Controle Efetivo de Vetores Sustentável e Localmente Adaptado para incentivar países a adotarem medidas inovadoras para controlar vetores até 2030 (WHO, 2017). Nesse sentido, um dos pilares que sustentam este plano está relacionado ao monitoramento e à vigilância entomológica. O monitoramento acompanha indicadores da população de insetos, enquanto a vigilância busca compreender o significado dos índices gerados pelos indicadores, estabelecendo bases técnicas para o controle efetivo e prevenção de novas infestações, bem como estimando os riscos dos agravos à saúde humana (KILLICK-KENDRICK, 1996). Para alcançar os índices entomológicos de forma eficaz, o método mecânico-comportamental se destaca pela utilização de armadilhas projetadas para coletar formas adultas e imaturas dos mosquitos, explorando o comportamento destes insetos em resposta aos estímulos atrativos físicos e/ou químicos (FLACIO et al., 2015; POULIN et al., 2017; REGIS et al., 2014).

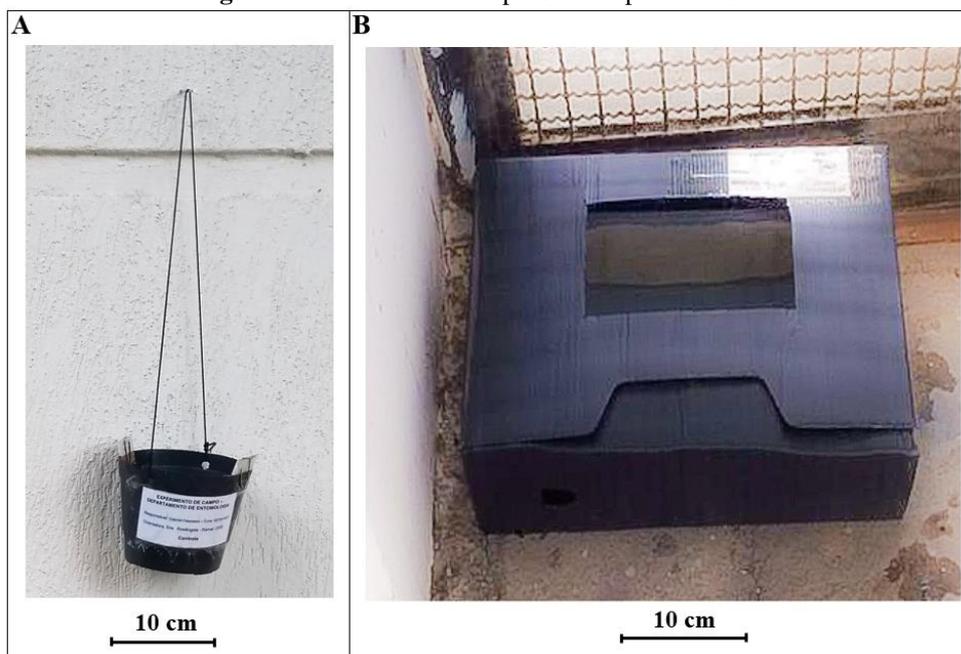
2.6.2 Armadilhas para coletar formas imaturas dos mosquitos

A ovitrampa foi a primeira armadilha projetada para coletar ovos de mosquitos colonizadores de criadouros artificiais, sobretudo espécies de *Aedes* (FAY; PERRY, 1965). A ovitrampa está representada por um recipiente de cor preta, com capacidade volumétrica variável, que abriga em seu interior um substrato, de natureza variada como madeira, tecido, papel ou outro, para a deposição de ovos. A adesão dos ovos aos diferentes substratos permite visualizá-los, realizar a contagem e até mesmo induzir a eclosão das larvas para identificação taxonômica. A ovitrampa, embora desenhada para instalação suspensa, também pode ser usada a nível do solo (CARVALHO-LEANDRO et al., 2010). É considerada uma das ferramentas mais sensíveis para detecção dos mosquitos *Aedes*, e vem sendo utilizada em trabalhos envolvendo controle populacional e dinâmica espaço-temporal (MELO-SANTOS et al., 2017).

Regis et al. (2013) revelaram o grande potencial da ovitrampa como ferramenta para o controle populacional de *Ae. aegypti*. Em seu Programa Piloto realizado em duas cidades do Estado de Pernambuco, a distribuição extensiva de ovitrampas por três anos consecutivos suprimiu as populações de mosquitos. Em outro contexto, Melo-Santos et al. (2017) utilizou uma rede de ovitrampas na ilha de Fernando de Noronha para o monitoramento de *Ae. aegypti*, cujos indicadores entomológicos serviram para acompanhar o efeito dos métodos integrados de controle que foram aplicados. Desta forma, a versatilidade das ovitrampas, seja para controlar

ou monitorar, endossam sua importância nas estratégias de controle integrado. Com objetivo de coletar ovos do gênero *Culex*, a BR-OVT foi desenvolvida por Barbosa et al. (2007b) com especificidade, eficácia e baixo custo. A armadilha é formada por uma caixa retangular preta, com uma abertura central na região superior que possibilita as fêmeas acessarem o local de postura. No interior da caixa existe um recipiente que pode ser preenchido com água. Diferente da ovitrampa, a BR-OVT é exclusivamente instalada a nível do solo. Anos mais tarde, Xavier (2018) adaptou a BR-OVT para também coletar ovos dos mosquitos *Aedes*, adicionando tecido de algodão cru na borda do recipiente para oferecer um substrato de oviposição (Figura 19).

Figura 19- Armadilhas do tipo Ovitampa e BR-OVT.



Fonte: O autor.

Legenda: A- ovitampa adaptada do modelo original de Fay e Perry (1965). B- BR-OVT adaptada pelo modelo original de Barbosa et. al. (2007) para coletar ovos dos mosquitos *Aedes* e *Culex*.

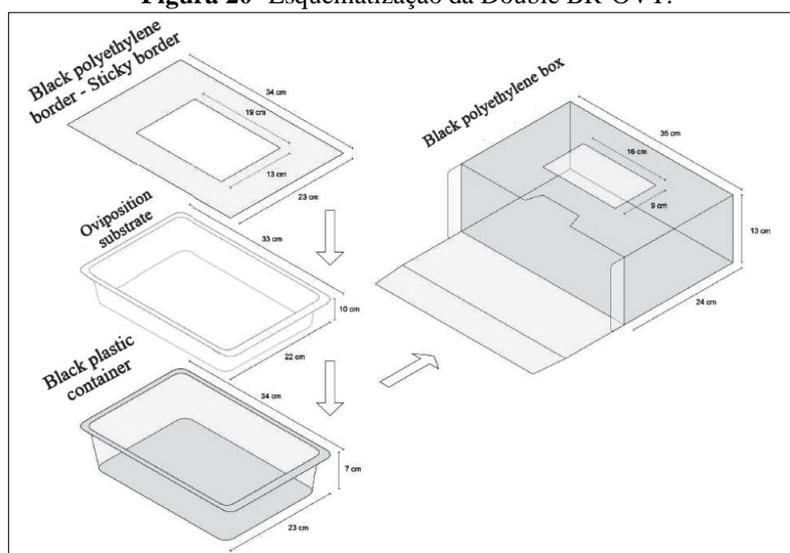
2.6.1 Armadilhas para formas adultas dos mosquitos

As primeiras armadilhas a ganharem evidência foram a New Jersey Light Mosquito Trap (MULHERN, 1942) e a CDC-light trap (SUDIA; CHAMBERLAIN, 1962), amplamente utilizadas com ou sem emissão de dióxido de carbono. A emissão da luz nas armadilhas atrai mosquitos de hábito noturno, especialmente do gênero *Culex*, os quais são aspirados e mantidos aprisionados em um recipiente ou saco coletor. Os espécimes assim coletados permanecem vivos e podem ser utilizados para estimar a densidade populacional das espécies, bem como para o diagnóstico de infecção vetorial por vírus e outros patógenos. A primeira armadilha para fêmeas grávidas de mosquitos (sem nome) foi desenvolvida por Reiter (1983) e sua estrutura se divide em duas partes, a primeira disponibiliza uma fonte de água com um atrativo orgânico

de oviposição (infusão de grama ou de alfafa), enquanto há acima uma aparelhagem movida a bateria para aspirar os mosquitos. Além disso, foi avaliado que essas armadilhas associadas à atrativos orgânicos capturaram significativamente mais mosquitos, especialmente fêmeas grávidas, demonstrando pela primeira vez a importância de associar iscas odoríferas para potencializar a coleta de fêmeas grávidas.

Atualmente há diversos modelos de armadilhas para mosquitos usadas com objetivos diversos, especialmente para auxiliar no monitoramento populacional de espécies de importância epidemiológica em programas de controle (GIORDANO et al., 2021; JOHNSON; RITCHIE; FONSECA, 2017; XAVIER et al., 2018). Mais raramente usadas também na vigilância de arbovírus, uma vez que as fêmeas grávidas representam a parte da população que realizou repasto sanguíneo e podem revelar a circulação viral (BARBOSA et al., 2010; BRAKS; LEAL; CARDÉ, 2007). Alguns aperfeiçoamentos foram realizados em armadilhas de oviposição para capturar mosquitos, entre elas a adição de bordas adesivas como descrito na AedesTrap (SANTOS et al., 2012).

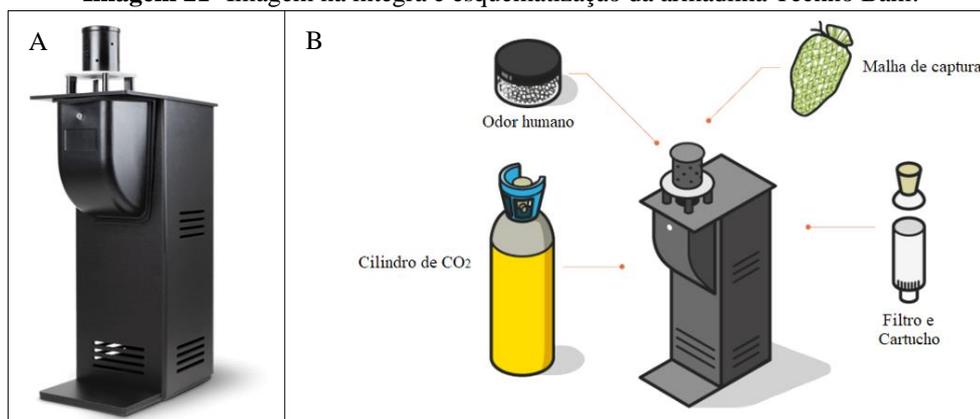
Por outro lado, observando que a BR-OVT servia de abrigo para mosquitos adultos, uma adaptação foi realizada por Xavier et al. (2018), transformando a BR-OVT em uma armadilha para coletar adultos, a Sticky BR-OVT. Para isso, o recipiente de oviposição foi substituído por uma borda adesiva para capturar mosquitos. Uma nova adaptação foi realizada na BR-OVT com propósito de coletar tanto os mosquitos adultos quanto os imaturos, criando então a Double BR-OVT (Figura 20), divergindo da maioria das armadilhas que se propõem a coletar mosquitos em uma de suas fases de desenvolvimento. A Double BR-OVT disponibiliza em seu interior uma fonte de água para oviposição, enquanto há nas proximidades da água uma superfície pegajosa para capturar os mosquitos que pousarem, sobretudo as fêmeas grávidas que buscam sítios de oviposição (XAVIER et al., 2020). Para garantir que as armadilhas de oviposição não acabem se tornando criadouros de desenvolvimento larvário, duas medias geralmente são observadas, de permanência em campo ou de visitação para sua manutenção, inferior a sete dias ou a aplicação de larvicidas (BECKER, 2000; CARVALHO-LEANDRO et al., 2010; MELO-SANTOS et al., 2017; REGIS et al., 2008, 2013).

Figura 20- Esquemática da Double BR-OVT.

Fonte: Xavier et al. (2020).

Legenda: Black plastic container- recipiente de plástico preto. Black polyethylene border – Sticky border- Borda preta de polietileno – borda adesiva. Black polyethylene box- caixa preta de polietileno. Oviposition substrate- substrato de oviposição.

O efeito do aprisionamento dos mosquitos está relacionado a capacidade de aspiração, ligada a alguma fonte de energia de armadilhas como a BG-Sentinel (KROCKEL et al., 2006) e a Techno Bam (POULIN et al., 2017) (Figura 21), ou à existência de uma superfície adesiva, geralmente a base de cola entomológica ou de óleo vegetal, como a Sticky BR-OVT e a Double BR-OVT (XAVIER et al., 2018, 2020). Todavia, ainda não há qualquer evidência de uma armadilha independente de energia com um interior arquitetado para dificultar a rota de saída do mosquito, sendo, portanto, capaz de atrair e aprisionar mosquitos vivos.

Imagem 21- Imagem na íntegra e esquematização da armadilha Techno Bam.

Fonte: Editado de Qista® (2019).

Descrição: A- Foto da armadilha Techno Bam. B- esquema sobre a composição interna da Techno Bam.

2.6.3 Iscas de oviposição

O uso de iscas de oviposição tem se mostrado cada vez mais importante para potencializar o efeito de coleta das armadilhas, pois passam a entregar para as fêmeas grávidas

informações similares aos dos criadouros com grande potencial de desenvolvimento larvário. Foi demonstrado em meados de 1960 e 1980 que as infusões naturais e artificiais a partir de uma ampla variedade de materiais orgânicos, incluindo feno, grama, estrume, ração para animais de laboratório e cascas de frutas em decomposição, influenciam a oviposição dos mosquitos *Culex* (ANDREADIS; MICHAELAKIS, 2014). O comportamento de oviposição de *Ae. aegypti* frente às infusões de feno (CHADEE et al., 1993), também se mostraram promissoras e alguns estudos relatam a preferência pelas armadilhadas iscadas, com percentuais elevados (80%), de coleta dos ovos. A identificação dos produtos atrativos derivados de infusões de grama (MILLAR; CHANEY; MULLA, 1992), possibilitou a síntese do Skatol, uma isca de baixo custo frequentemente utilizado em armadilhas de oviposição de *Cx. quinquefasciatus* (OLAGBEMIRO et al., 2004). Assim, vem sendo descrito em muitos trabalhos de vigilância e controle dos mosquitos *Aedes* e *Culex* o diferencial em associar armadilhas de oviposição com infusões de plantas, ou, mais recentemente, associar com as contrapartes atrativas sintetizadas das infusões (NASCIMENTO et al., 2020; PAIVA et al., 2019; REGIS et al., 2014).

Por outro lado, a identificação de feromônios de oviposição dos ovos de *Cx. quinquefasciatus* (LAURENCE; PICKETT, 1982) possibilitou a formulação da isca erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, cujas avaliações mostraram coletas de aproximadamente 82% das jangadas nos recipientes tratados (OTIENO et al., 1988). Posteriormente, Barbosa et al. (2007) avaliaram a BR-OVTs associada com o feromônio de oviposição sintético, demonstrando aplicabilidade desta combinação em ações de monitoramento, vigilância e controle em áreas infestadas por *Cx. quinquefasciatus*, envolvido na transmissão da filariose linfática em Pernambuco.

Paralelamente às descobertas sobre o potencial das infusões e dos feromônios sintéticos como iscas de oviposição, outras pesquisas buscavam entender a influência que os imaturos presentes em coleções de água exerciam sobre a escolha das fêmeas pelos sítios de oviposição. Soman e Rueben (1970) descreveram pela primeira vez que a presença de imaturos de *Ae. aegypti* em sítios de desenvolvimento estimularam a oviposição de seus semelhantes, e a escolha da fêmea diferiu entre os recipientes com grupos de diferentes estágios de desenvolvimento (entre L₂ e pupa). Em seguida, foi verificado que o *fitness* dos adultos de *Ae. aegypti* estava relacionado à densidade de larvas no ambiente de desenvolvimento, e que quanto menos indivíduos, mais rápido foi desenvolvimento larvário e mais robustos foram os adultos, à contraste dos indivíduos que se desenvolveram em criadouros com superlotação de larvas, onde os adultos demoraram mais para se desenvolverem e apresentaram uma massa corporal

inferior (BARBOSA; PETERS; GREENOUGH, 1972). Esses relatos formaram bases importantes para investigações sobre a influência da presença de larvas intra e interespecíficas sobre a escolha dos sítios de oviposição.

Em relação a oviposição de *Ae. aegypti*, recipientes com larvas intraespecíficas coletaram mais ovos do que os demais recipientes avaliados (SERPA; MONTEIRO; VOLTOLINI, 2008). Em outra análise, fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* evitaram depositar ovos em sítios com alta densidade de larvas, provavelmente por estar relacionado a um desenvolvimento competitivo (GONZALEZ; GONZÁLEZ AUDINO; MASUH, 2016). No entanto, os estudos sobre os compostos presentes na água de criação dos mosquitos *Aedes* até o momento não levaram a síntese, ou da síntese dos seus produtos, como iscas em armadilhas. Já em relação a *Anopheles gambiae*, os sinais atrativos presentes nos sítios de desenvolvimento com L₁ foram quimicamente caracterizados, relacionando a presença de nonano e 2,4-pentanodiona como os atraentes de oviposição, ao contrário das coleções de água com L₄ que repelem pela existência de dimetildissulfeto e dimetiltrissulfeto (SCHOELITSZ et al., 2020).

O conhecimento prévio de que fêmeas de mosquitos são estimuladas a ovipor em ambientes previamente colonizados, levaram Marques e Miranda (1992) a descreverem pela primeira vez que os recipientes tratados com extratos aquosos, tanto de larvas quanto de pupas de *Ae. albopictus*, coletavam em laboratório 78% dos ovos observados em relação aos recipientes não tratados. Estudos subsequentes com extratos aquosos desta e mais duas outras espécies, *Ae. aegypti* e *Cx. Quinquefasciatus*, confirmaram o efeito estimulante à oviposição intra e interespecíficas, evidenciando, pela primeira vez, o potencial do extrato de larvas de *Ae. aegypti* como isca de oviposição em ovitrampas para coleta de ovos de mosquitos *Aedes* (Faienstein et al., 2019). Em continuidade com os resultados publicados, o presente estudo descreve a eficiência em associar extratos larvais e biolarvicida como uma estratégia para transformar armadilhas em modelos atrativos e letais, estratégia conhecida como *attract-and-kill*, utilizando extrato larval de *Ae. aegypti* como isca para coletar simultaneamente ovos dos mosquitos *Aedes* e *Culex* em campo. Diante do exposto, este estudo almejou contribuir com o conhecimento da ecologia e da biologia dos mosquitos, apresentando uma isca alternativa para auxiliar no monitoramento e no controle de *Aedes* e *Culex*, espécies que estão entre os mais importantes vetores do mundo. Por outro lado, almejando contribuir para a vigilância de arboviroses, o presente estudo também desenvolveu um novo modelo de armadilha, de baixo custo e independente de energia, para coletar ovos e fêmeas vivas de mosquito.

3 HIPÓTESES

- Extratos de *Aedes aegypti*, obtidos a partir de larvas congeladas ou desidratadas estimulam a oviposição intra e interespecífica
- A BR-Adult é uma proposta de armadilha capaz de coletar ovos e adultos vivos de *Aedes aegypti*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar extratos larvais de *Aedes aegypti* como estimulantes de oviposição e desenvolver uma armadilha para coletar ovos e mosquitos vivos

4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar em laboratório a eficiência dos extratos larvais de *Aedes aegypti* aquosos em estimular à oviposição desta espécie e de *Culex quinquefasciatus*;
- b) Avaliar em laboratório o uso de diferentes solventes orgânicos para a obtenção dos extratos larvais de *Aedes aegypti* e sua estimulação à oviposição intraespecífica;
- c) Avaliar em campo a associação entre extratos larvais de *Aedes aegypti* e *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* como iscas letais em armadilhas de oviposição;
- c) Propor um modelo de armadilha para coletar ovos e adultos vivos de mosquitos.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

As avaliações sobre o comportamento de oviposição dos mosquitos *Aedes* e *Culex* envolveram ensaios em laboratório e em campo, realizados, respectivamente, no Laboratório de Comportamento de Culicídeos Vetores do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE (IAM), e nas dependências externas do IAM e nas dependências do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CB-UFPE). Por outro lado, os ensaios que observaram o potencial do novo modelo de armadilha foram realizados em campo simulado, na Sala de Experimentação Comportamental André Furtado & Lêda Regis do IAM.

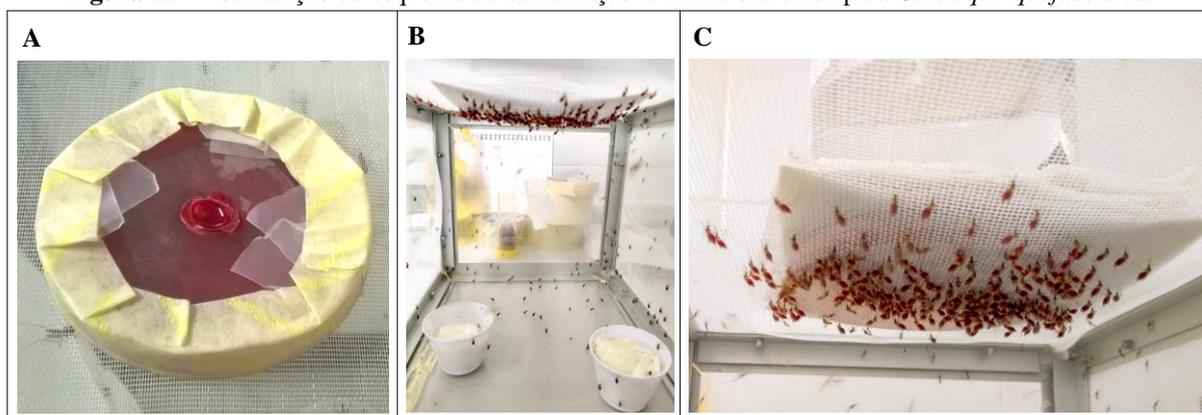
5.1 Obtenção de mosquitos e repasto sanguíneo para ensaios de oviposição

Mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foram obtidos das colônias mantidas no insetário do IAM. A colônia de *Ae. aegypti* (RecL) foi estabelecida em 1996 a partir de ovos coletados em bairros de Recife-PE, enquanto a colônia de *Cx. quinquefasciatus* (CqsL) foi estabelecida a partir de ovos coletados no bairro de Peixinhos, Olinda-PE em 1996. Os imaturos foram criados em cubas plásticas brancas (20 x 30 cm) contendo uma proporção aproximada de 300 indivíduos para cada litro de água de abastecimento público, e oferta de alimento (ração para gatos Friskies®) a cada dois dias. Na sala de criação larvária, o fotoperíodo foi ajustado para 14:10 h, com temperatura média de 27 ± 2 °C e registros diários de umidade relativa, que variaram entre 70 e 89%.

Quando as larvas atingiram o estágio de pupa, os recipientes de criação foram telados para aprisionamento dos mosquitos adultos. Após a emergência, os mosquitos foram transferidos para uma gaiola apropriada para contenção dos adultos (30 x 22 x 20 cm), com disponibilidade de alimento *ad libitum* em um par de algodões, um embebido com água e outro com solução de sacarose a 10%. Os mosquitos foram agrupados em aproximadamente 800 indivíduos, entre machos e fêmeas (1:1), e entre o sétimo e o décimo dia após a emergência, foi oferecido um repasto sanguíneo artificial com 20 ml de sangue desfibrinado do coelho *Oryctolagus cuniculus*. Para isso, foi utilizada uma placa de Petri de plástico, sem tampa, possibilitando revestir a face exposta com 2 camadas de parafilme, previamente esfregado no tornozelo do operador 10 vezes para absorver o odor humano. A adesão do parafilme na placa foi reforçada com fita adesiva. Além disso, havia uma perfuração na placa por onde o sangue, aquecido a 37 °C, foi adicionado com uma pipeta Pasteur descartável. A placa com sangue foi colocada em cima da gaiola durante 1 hora, possibilitando que as fêmeas perfurassem o

parafilme para se alimentarem do sangue (Figura 22). Para manter o sangue aquecido, um béquer com 150 ml de água aquecida a 45 °C foi colocado por cima da placa, com reaquecimento a cada 15 minutos. Um dia após alimentação, trinta fêmeas foram transferidas para cada gaiola experimental.

Figura 22- Visualização do esquema de alimentação artificial oferecida para *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: O autor.

Legenda: A- visão superior da gaiola de mosquitos com uma placa de Petri preenchida com 20 ml de sangue de *Oryctolagus cuniculus*. B- visão interna da gaiola com fêmeas se alimentando artificialmente. C- visão interna da gaiola focando os mosquitos realizando repasto sanguíneo.

5.2 Criação das larvas para preparação dos extratos

Semanalmente, larvas de *Ae. aegypti* foram criadas em cubas (7 x 27 x 33 cm) preenchidas com dois litros de água, possibilitando o desenvolvimento de aproximadamente 800 larvas. Para otimizar a alimentação larvária, e conseqüentemente o seu crescimento, a ração (Friskies®) foi triturada até atingir o estado arenoso antes de serem distribuídas nas cubas. As larvas foram alimentadas no primeiro dia (L₁) e no quarto dia de desenvolvimento (L₃). Entre o quinto e sexto dia após início da criação, a maioria das larvas alcançou o quarto estágio (L₄) e foi utilizada para a preparação do extrato larval. Este processo permitiu a cada semana obtenção de aproximadamente 30 gramas de larvas, equivalente a aproximadamente 9.000 indivíduos (esta equivalência será descrita na página 52). Para os extratos larvais de *Cx. quinquefasciatus*, as larvas foram obtidas da criação do insetário do IAM, cujas características foram descritas no tópico 5.1.

5.3 Avaliação dos extratos larvais aquosos em laboratório

O extrato larval foi inicialmente testado utilizando amostras com as seguintes características: *in natura*, dessecadas por liofilização e dessecadas em estufa. Os ensaios de oviposição foram realizados, utilizando gaiolas apropriadas para contenção de mosquitos com dimensões de 40 x 32 x 50 cm (altura x largura x profundidade). Acima das gaiolas, foram

colocados algodões embebidos com água e com sacarose a 10%, disponibilizando alimento para os mosquitos durante todo o experimento. Foram transferidos para o interior das gaiolas recipientes de oviposição (170 ml) com 150 ml de extrato, ou de água destilada, para avaliar o potencial estimulativo das soluções em relação a 30 fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* ou de *Cx. quinquefasciatus*.

Todos os ensaios de oviposição tiveram duração de 7 dias. No final dos ensaios, foi realizada a contagem dos ovos ou das jangadas em cada recipiente. Para os ensaios avaliando a oviposição de *Ae. aegypti*, um substrato de oviposição (papel de filtro Whatman # 1 n° de catálogo 1001-110, com 12,5 cm de diâmetro) foi inserido em cada recipiente, e posteriormente recolhido para contagem dos ovos. Para os ensaios com *Cx. quinquefasciatus*, por não haver necessidade de oferecer substrato de oviposição e pela rápida eclosão das larvas, as jangadas foram contadas e removidas diariamente, e ao final do sétimo dia, foi considerado a soma de todas as jangadas recolhidas em cada recipiente para posteriores comparações. Em cada repetição, todos os recipientes foram rotacionados sem sentido horário.

5.3.1 Avaliações dos extratos larvais *in natura*

Uma equivalência de 0,33 larva/ml de água destilada foi estabelecida para preparação dos extratos larvais (MARQUES; MIRANDA, 1992). Montantes de larvas foram retirados das cubas de criação com auxílio de uma peneira e transferidos para um béquer com 300 ml de água destilada. Este procedimento de lavagem foi repetido três vezes para reduzir os vestígios da água de criação (TRIMBLE; WELLINGTON, 1980). Através de uma pipeta Pasteur, as larvas foram transferidas da água de criação para um papel de filtro sobre camadas de papel absorvente, e com auxílio de uma pinça entomológica, as larvas foram contadas e transferidas para um microtubo de 2 ml.

Para realização de 12 repetições simultâneas, 600 larvas em L₄ foram transferidas para um microtubo contendo 0,5 ml de água destilada. Em seguida, as larvas foram trituradas utilizando um dispersor (IK ULTRA TURRAX® modelo T10 basic), formando um extrato bruto. Para aproveitar todo material, o dispersor foi lavado em outros dois microtubos com 1 ml de água destilada. Em seguida, o extrato foi adicionado a 300 ml de água destilada, por onde foi levemente agitado com auxílio de uma espátula de alumínio. Em seguida, o extrato foi filtrado por um filtro de papel Whatman. Por fim, para atingir a concentração de 0,33 larva/ml, foi adicionado 1.500 ml de água destilada no extrato filtrado, totalizando 1.800 ml de extrato. Em alguns eventos que exigiram a realização de menos repetições simultâneas, a quantidade de larvas foi ajustada para atingir a mesma equivalência final de larva/ml. O extrato de larvas *in*

natura (ELin) se mostrou homogêneo e levemente acinzentado. O ELin foi imediatamente transferido para recipientes (150 ml/ recipiente) e submetidos aos ensaios de oviposição, sendo inicialmente avaliados sobre cinco aspectos em relação a oviposição de *Ae. aegypti* ou *Cx. quinquefasciatus*, conforme a tabela abaixo.

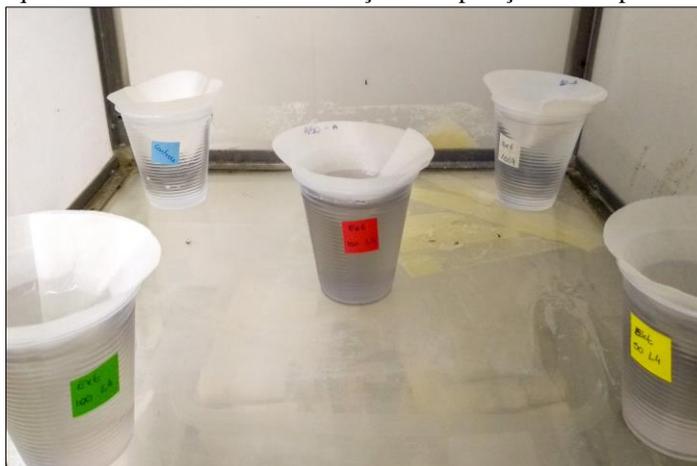
Tabela 1- Avaliações sobre o comportamento de oviposição de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em relação aos extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* sob diferentes processamentos.

Grupos avaliados	Avaliações comparativas	Número de recipientes		Repetições
		Tratamentos	Controle	
1	Extratos em diferentes equivalências	4	1	12
2	Extratos com larvas pesadas	2	1	12
3	Extratos larvais não filtrados	2	1	12
4	Extratos com larvas descongeladas	1	1	5 ou 6
5	Influência do Bti no extrato	1	1	12
	Influência do Bti no controle	1	1	12
	Influência do Bti no extrato e no controle	1	1	12

Fonte: O autor.

1º Grupo: Para compreender a influência entre diferentes concentrações de extratos larvais de *Ae. aegypti* no comportamento de oviposição intraespecífico, realizamos 12 repetições avaliando quatro diferentes equivalências de extratos: 0,1, 0,33, 0,66 e 1 larva/ml em recipientes com 150 ml de cada suspensão. Para esta avaliação múltipla, foram realizados diluições seriadas de um extrato concentrado, utilizando água destilada. Inicialmente, utilizadas 3.720 larvas para formação do extrato concentrado, filtrado em 186 ml de água destilada. Em seguida, 6 ml do extrato concentrado foi diluído em 1.794 ml de água (0,1 larva/ml), 30 ml do extrato foi diluído em 1.770 ml de água (0,33 larva/ml), 60 ml do extrato foi diluído em 1.740 ml de água (0,66 larva/ml) e 90 ml do extrato foi diluído em 1.710 ml de água (1 larva/ml). Em seguida, quatro recipientes com 150 ml das diferentes equivalências do extrato foram posicionados no interior da gaiola, juntamente com um recipiente controle apenas com 150 ml de água destilada (Figura 23).

Figura 23- Visão interna da gaiola avaliando extratos larvais de *Ae. aegypti in natura* com diferentes equivalências de larva/ml em relação à oviposição intraespecífica.



Fonte: O autor.

2º Grupo: Para otimização dos ensaios de campo, onde milhares de larvas foram necessárias para produzir vários de litros de extrato, foi avaliado se haveria diferença na coleta de ovos de *Ae. aegypti* entre os recipientes tratados com extratos de larvas contadas manualmente, seguindo método convencional de Miranda (1992), e os extratos a partir de um peso equivalente de larvas. Inicialmente, foi calculado o peso de 6 *pools* de 300 larvas em balança analítica, transferindo os indivíduos para uma placa de Petri, cujos valores geraram uma média de $0,96 \pm 0,04$ g. Desta forma, consideramos que 1 g de larvas equivale a 300 indivíduos.

Para pesar o grupo de larvas sem contabilização dos indivíduos, a umidade foi reduzida ao máximo utilizando papel absorvente. Em seguida, as larvas foram transferidas para uma placa de Petri para pesagem de 1 grama, para compor um extrato de 900 ml de água destilada. Paralelamente, um novo *pool* de 300 indivíduos foi contado para realização de um extrato em 900 ml de água destilada (0,33 larva/ml). Por fim, em 12 repetições de múltipla escolha, comparamos 3 diferentes recipientes de oviposição em relação à oviposição de *Ae. aegypti*: um com extrato de larvas contadas (ELC); outro com extrato de larvas pesadas (ELP); e um controle apenas com água destilada. Posicionados os recipientes em formato triangular, cujo distanciamento entre eles foi de aproximadamente 30 cm.

3º Grupo: Considerando que o processo de filtração dos extratos larvais descritos por Miranda (1992) é uma etapa que exige tempo, testes comparativos entre extratos filtrados (EF) e extratos não filtrados (ENF) foram conduzidos em 12 repetições de múltipla escolha, com fêmeas de *Ae. aegypti*. Os recipientes com extratos não filtrados (ENF), com extratos filtrados

(EF), e com controle foram posicionados em formato triangular com distanciamento entre si de aproximadamente 30 cm.

4° Grupo: A obtenção de quantitativos relevantes de larvas em L₄ para produção de extratos em larga escala pode ser um desafio, pois as manutenções das armadilhas em campo dependerão do tempo de desenvolvimento larvário. Por essa razão, foi avaliado se o congelamento de larvas, que visa otimizar a logística de acondicionamento, alteraria o efeito estimulativo à oviposição. Foram realizados estoques de larvas em tubos de Falcon e congelados a -20 °C para posteriores avaliações de extratos a partir de larvas descongeladas. As larvas em L₄ foram inicialmente removidas da água de criação e lavadas com água destilada com auxílio de uma peneira, semelhante aos procedimentos para obtenção do ELin. Em seguida, a umidade foi reduzida utilizando papel absorvente, e as larvas foram transferidas para uma placa de Petri, onde foram pesadas em uma balança analítica. Após a pesagem, larvas foram transferidas para tubos de Falcon de 50 ml, com notas sobre espécie, peso e a data, e congeladas. Uma das amostras foi conservada a -20 ° por 3 meses e outra por 3 anos. A amostra congelada há 3 meses foi utilizada para avaliação do extrato de 1 grama de larvas descongeladas em 900 ml de água destilada (ELD 3 meses), para distribuir em 6 recipientes de oviposição (150 ml) que foram transferidos para gaiolas experimentais e avaliados aos pares com controles (150 ml de água destilada), totalizando 6 repetições. Em outro experimento semelhante, uma amostra de larvas congeladas em fevereiro de 2018, foi descongelada em maio de 2021 para realização de um ELD. Nesse sentido, 0,83 g de larvas foram utilizados para realização de 750 ml de extrato, avaliados em 5 repetições pareadas com controles (150 ml de água destilada). Os experimentos utilizaram extratos com a mesma equivalência de 0,33 larva/ml em cada repetição.

5° Grupo: Uma vez que a estratégia *attract-and-kill* consiste em associar fatores atrativos e letais, avaliamos a influência de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti, VectorBac® WG, cepa AM65-62, lote: 257-352-PG) nos extratos larvais e na água destilada em três diferentes experimentos que ocorreram simultaneamente, cada um com quatro repetições, utilizando as 12 gaiolas experimentais disponíveis. Para minimizar variações na média de ovos coletados e possibilitar comparações entre os 3 diferentes experimentos que aconteceram paralelamente, foram utilizadas fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* do mesmo período de criação em laboratório. Foram preparados e reservados 1.800 ml de ELin e 1.800 ml de água destilada, quantidades suficientes para realização de 12 repetições pareadas (teste vs controle, respectivamente). Em seguida, foram transferidos 1.200 ml do ELin para outro recipiente, no qual foi adicionado 1,2 g de Bti, cuja solução foi homogeneizada utilizando uma

espátula. De forma semelhante, 1.200 ml de água destilada foi transferida para outro recipiente para diluição de 1,2 g de Bti. Foram utilizados recipientes de oviposição (150 ml) e avaliados em três diferentes experimentos: quatro repetições avaliaram recipientes tratados com extrato larval e Bti *versus* recipientes com água destilada; outras 4 repetições avaliaram recipientes com extrato larval *versus* recipientes com água destilada e Bti; e 4 repetições avaliaram recipientes com extrato larval e Bti *versus* recipientes água destilada e Bti. Trinta fêmeas grávidas obtidas do mesmo período de criação foram transferidas para as 12 gaiolas experimentais. Em seguida, os experimentos foram repetidos mais duas vezes, para totalizar 12 repetições para cada tipo de observação utilizando fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*.

5.3.2 Avaliação do extrato liofilizado e do extrato de larvas dessecadas

Considerando que substâncias estimulativas à oviposição presentes nas larvas podem perder suas propriedades durante a secagem da amostra, três diferentes extratos foram avaliados: extrato feito a partir de larvas liofilizadas (L₄Liof); extrato liofilizado de larvas (ELiof); e extrato a partir de larvas desidratadas em estufa (EST). Inicialmente, foi avaliado se a liofilização das larvas poderia deteriorar os estimulantes de oviposição. Para ter uma contraprova de que os estimulantes de oviposição estavam presentes na amostra antes da liofilização, larvas da mesma criação foram divididas em dois *pools* de 600 indivíduos, enquanto uma parte foi submetida à liofilização, a outra foi utilizada para realização de ELin (0,33 larva/ml) e posteriormente mantido em geladeira (4 °C) em uma garrafa de vidro tampada. Após a liofilização das larvas (15 h), a amostra foi utilizada para preparar o L₄Liof (0,33 larva/ml). Em seguida, o ELin foi retirado da geladeira e mantido em temperatura ambiente até não apresentar indícios de resfriamento. Desta forma, os extratos foram avaliados separadamente, enquanto seis das doze gaiolas experimentais foram utilizadas para avaliar o ELin pareado com controle (150 ml de água destilada), outras 6 gaiolas foram utilizadas para avaliação do L₄Liof pareado com controle. Essa metodologia foi repetida para avaliar os extratos de larvas *in natura* e de larvas liofilizadas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em relação a oviposição intra e interespecífica, conforme a tabela abaixo.

Tabela 2- Avaliações sobre o comportamento de oviposição de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em relação aos extratos de larvas liofilizadas e aos extratos larvais *in natura*.

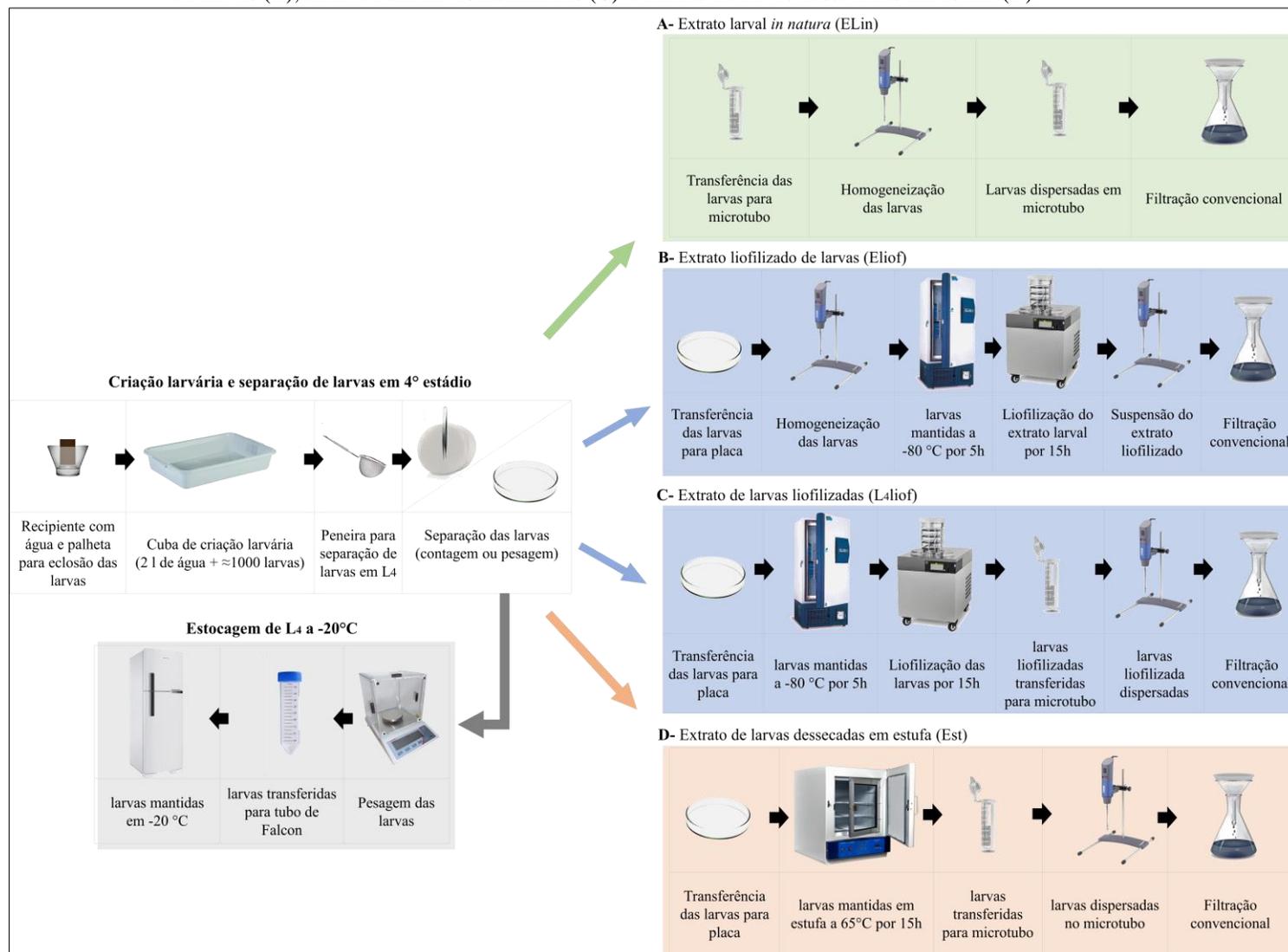
Grupos avaliados	Fêmeas grávidas	Extratos avaliados	Repetições
1	<i>Ae. aegypti</i>	Larvas <i>in natura</i> de <i>Ae. aegypti</i>	6
		Larvas liofilizadas de <i>Ae. aegypti</i>	6
2	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Larvas <i>in natura</i> de <i>Ae. aegypti</i>	6
		Larvas liofilizadas de <i>Ae. aegypti</i>	6
3	<i>Ae. aegypti</i>	Larvas <i>in natura</i> de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	6
		Larvas liofilizadas de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	6

Fonte: O autor.

Por outro lado, avaliamos o extrato aquoso de larvas de *Ae. aegypti*. Inicialmente, 600 larvas foram dispersadas em 15 ml de água destilada em um recipiente de vidro, cuja abertura foi posteriormente revestida com parafilme perfurado. A amostra foi acondicionada a -80 °C por cinco horas, e em seguida foi liofilizada (Edward® modelo LHKR Boc) durante quinze horas. Em seguida, o extrato liofilizado de larvas foi suspenso em 300 ml de água destilada com auxílio do dispersor, e foi filtrado convencionalmente em filtro de papel. Por fim, foi adicionado 1.500 ml de água para atingir a equivalência de 0,33 larva/ml. Recipientes de oviposição com 150 ml do ELiof foram pareados com recipientes controle (150 ml de água destilada) e distribuídos em gaiolas experimentais, totalizando 12 repetições utilizando fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*.

Por outro lado, para obtenção de extratos larvais a partir de larvas dessecadas em estufa (EST), larvas de *Ae. aegypti* do mesmo período de criação foram separadas em dois grupos, enquanto 300 indivíduos foram transferidos para uma placa de Petri e mantida em estufa (Biopar®, modelo estufa bacteriológica – digital PID) a 65 °C por quinze horas, outro grupo de 300 larvas foi encaminhando para liofilização por 15 horas. Em seguida, as larvas desidratadas foram utilizadas para produzir diferentes extratos aquosos, atingindo a equivalência final de 0,33 larva/ml. Os extratos foram avaliados separadamente, utilizando recipientes tratados (150 ml de um dos extratos) pareados com controle (150 ml de água destilada), totalizando 6 repetições de cada extrato utilizando fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*. Uma esquematização sobre o preparo dos diferentes extratos aquosos avaliados em laboratório pode ser observada na Figura 24.

Figura 24- Esquematização dos processos para estocagem de larvas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e para obtenção do extrato larval *in natura* (A), extrato liofilizado de larvas (B), extrato com larvas liofilizadas (C) e extrato de larvas dessecadas em estufa (D).



Fonte: O autor

5.4 Avaliação dos extratos larvais com solventes

Extração por solventes é um processo de transporte de massa, possibilitando a separação de um ou mais componentes em uma solução, pois a polaridade dos solventes auxilia na transferência das moléculas de interesse. Estudos que envolvem a atividade de semioquímicos podem utilizar solventes orgânicos para realização de extratos biológicos, (LEAL et al., 2006). Para auxiliar nos posteriores procedimentos sobre a caracterização química do extrato larval de *Ae. aegypti*, foram avaliados extratos larvais hexânicos (EL hexano), solvente capaz de desnaturar lipídeos, mas não solúvel em água, e extratos larvais em dimetilsulfóxido (EL dmsO), ambos os solventes tiveram grau de pureza igual ou superior a 99%.

Inicialmente, larvas em L₄ foram removidas da água de criação e lavadas com água destilada, semelhante ao procedimento para obtenção do ELin (TRIMBLE; WELLINGTON, 1980). Em seguida, 600 larvas foram trituradas em 30 ml de hexano para posterior filtração convencional em filtro de papel (0,00009 g). Por apresentar alta volatilidade e toxicidade, a evaporação do hexano foi aguardada em capela de exaustão, até restar aproximadamente 1 ml do extrato. Pelo fato do hexano ser um solvente apolar, o mililitro restante do EL hexano foi dissolvido em 4 ml de álcool etílico, que é solúvel tanto em hexano quanto em água. Em seguida, o extrato foi adicionado em um béquer com 1.800 ml de água destilada, por onde foi levemente agitado com auxílio de uma espátula. Para preparação do controle, 1.800 ml de água destilada foi reservado em um béquer, onde foi posteriormente adicionado 4 ml de álcool etílico e foi levemente agitado com uma espátula. A avaliação do EL hexano em relação ao comportamento de oviposição de *Ae. aegypti* foi realizada em 12 repetições pareadas, utilizando um recipiente com 150 ml do EL hexano, e outro com 150 de água destilada, em gaiolas com 30 fêmeas grávidas.

Para avaliação da extração larvária em dimetilsulfóxido, as larvas também foram dispersadas em 30 ml do solvente, onde foi posteriormente filtrado em filtro de papel Whatman. No entanto, pelo dimetilsulfóxido apresentar baixa volatilidade, o extrato foi imediatamente diluído em 1.770 ml de água destilada, resultando em 1.800 ml de EL dmsO. Para preparação do controle, 30 ml de dimetilsulfóxido foi diluído em 1.770 ml de água destilada. Em seguida, o extrato foi avaliado em 12 repetições, utilizando recipientes com 150 ml do EL dmsO pareados com os recipientes controles, em gaiolas contendo 30 fêmeas grávidas.

5.5 Avaliação dos extratos larvais como estratégia de *attract-and-kill* em campo

Para avaliar a eficiência dos extratos larvais *in natura* como estimulantes de oviposição sofrendo interferências das variáveis ambientais, testes em campo foram conduzidos nas dependências externas do IAM e do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CB-UFPE), utilizando armadilhas associadas com extratos larvais e Bti. Inicialmente, foram utilizadas ovitrampas (FAY; PERRY, 1965) em 8 localidades, quatro pontos no IAM e quatro no CB-UFPE, para avaliações pareadas sobre o potencial desta combinação como estratégia de *attract-and-kill* para mosquitos *Aedes*. Todos os extratos avaliados em armadilhas foram realizados a partir da equivalência de larvas pesadas, e os extratos não foram filtrados.

Para tratamento de cada ovitrampa, um tubo de Falcon (15 ml) foi utilizado para macerar 1 g de larvas *in natura* em 5 ml de água com auxílio de um pistilo, enquanto 0,5 g de Bti foi reservado em outro tubo de Falcon. As ovitrampas tratadas foram preenchidas com 1 litro de água de abastecimento público, obtido nas proximidades da instalação, e foi adicionado ao litro de água o macerado de larvas e o Bti (ELin + Bti). Por outro lado, as ovitrampas controles foram preenchidas apenas com 1 litro de água da torneira e 0,5 g de Bti. Duas palhetas de Eucatex (5 x 15 x 0,5 cm) foram anexadas com clips no interior de cada ovitrampa. Todas as ovitrampas foram instaladas ao abrigo do sol, da chuva, e em suspensão a 1,5 metro em relação ao solo (Figura 25A). As avaliações tiveram duração de 15 dias, com renovação de todo material e inversão da posição das armadilhas a cada repetição. As ovitrampas tratadas com ELin + Bti foram avaliadas 51 vezes entre outubro de 2017 e fevereiro de 2018. Em seguida, foi avaliado ovitrampas tratadas com larvas liofilizadas e Bti (EL₄Liof + Bti), com procedimentos similares, exceto pela substituição da larva *in natura* por 0,13 g de larvas liofilizadas/tubo de Falcon/armadilha, respeitando a mesma equivalência de larva/ml em relação às armadilhas com ELin + Bti. As ovitrampas tratadas com EL₄Liof + Bti foram observadas 50 vezes, nas mesmas localidades, entre setembro e dezembro de 2018. Os ovos presentes nas palhetas foram contados manualmente com auxílio de um microscópio estereoscópio e um contador manual.

Com o propósito de avaliar simultaneamente o efeito do extrato de larvas sobre a oviposição dos mosquitos *Aedes* e *Culex* no campo, foram utilizadas BR-OVTs (XAVIER et al., 2018) em 8 localidades, três pontos no IAM e cinco no CB-UFPE, ao abrigo de sol e chuva. Essas armadilhas também foram avaliadas em pareamento, uma sob tratamento de 2 litros de água, obtidos nas proximidades da instalação, com adição de um macerado de 2 g de larvas *in natura* em tubos de Falcon (15 ml) com 10 ml de água, e 1 g de Bti (ELin + Bti). Enquanto as

armadilhas controles foram preenchidas apenas com 2 litros de água da torneira e 1 g de Bti (Figura 25B). No entanto, as observações dos ovos dos mosquitos *Aedes* e *Culex* foram feitas de maneiras diferentes. Os tecidos utilizados como substrato de oviposição para *Aedes* foram avaliados quinzenalmente, ao término do experimento, enquanto as jangadas de *Culex* foram contadas e removidas a cada semana, pois não persistem no ambiente por muitos dias. A cada duas semanas, todo material das armadilhas foi renovado e suas posições foram invertidas. As observações em relação ao número de ovos/jangadas de *Aedes/Culex* nas BR-OVTs tratadas com ELin + Bti foram avaliadas 63 e 44 vezes, respectivamente, entre julho e dezembro de 2018. Em seguida, também foi avaliado o efeito dos extratos de larvas liofilizadas nas BR-OVTs. Para o tratamento de cada armadilha, um tubo de Falcon (15 ml) foi utilizado para macerar 0,26 g de larvas liofilizadas em 10 ml de água, enquanto outro tubo de Falcon foi reservado com 1 g de Bti. As BR-OVTs tratadas foram preenchidas com 2 litros de água da torneira, e foram adicionados o extrato bruto e do Bti (EL₄Liof + Bti). Em relação a avaliação do EL₄Liof + Bti sobre a oviposição de *Aedes* e de *Culex*, foram realizadas 55 e 46 repetições, respectivamente, entre abril e julho de 2019.

Figura 25- Ovitrapas e BR-OVTs instaladas em campo.



Fonte: O autor.

Legenda: A- Ovitrapas suspensas instaladas nas dependências do IAM. B- BR-OVTs ao nível do solo instaladas nas dependências do CB-UFPE.

Para entender os limites em relação ao tempo em que os extratos larvais são estimulantes à oviposição no campo, avaliamos o seu efeito ao longo de dois meses de

exposição em ovitrampas com palhetas de Eucatex. Para isso, os 8 locais utilizados anteriormente para instalações de ovitrampas foram escolhidos para realização de testes pareados, com observações quinzenais, entre os meses de fevereiro e abril de 2018. Em cada local, uma ovitrampa preenchida com 1 litro de extrato larval (0,33 larva/ml) e Bti foi pareada com uma ovitrampa controle (água e Bti). Antes da instalação, todas as armadilhas foram submetidas em seu interior à uma arranhadura, delimitando o volume de 1 litro do conteúdo avaliado. A cada observação, o conteúdo evaporado de todas as armadilhas foi preenchido por água de abastecimento público, que não ultrapassou 200 ml/armadilha/quinzena. Além da reposição de água, as palhetas de Eucatex foram substituídas quinzenalmente, durante 60 dias, a quantidade de ovos depositados pelos mosquitos *Aedes*. Ao final da oitava semana, as armadilhas foram recolhidas e os resultados foram avaliados.

Esse experimento nos levou a questionar se a decomposição das palhetas de Eucatex na água em armadilhas de oviposição poderia exercer algum efeito em relação à oviposição dos mosquitos *Aedes*. Para compreender esse aspecto, ovitrampas foram instaladas nos mesmos pontos avaliados anteriormente, entre os meses de junho e agosto de 2018. Em cada local, as ovitrampas foram pareadas, mas a variável que modificou foi em relação ao substrato de oviposição. Enquanto uma ovitrampa foi preenchida por 1 litro do ELin + Bti com uma palheta de Eucatex anexada na borda interna, a outra ovitrampa foi preenchida por 1 litro do ELin + Bti, mas havia como substrato de oviposição tecido de algodão cru, semelhante ao que foi utilizado nas armadilhas BR-OVT. Quinzenalmente, os substratos de oviposição foram substituídos e o conteúdo evaporado em cada armadilha foi preenchido por água da torneira. Após 60 dias de exposição no campo, o conteúdo das armadilhas foi recolhido (Figura 26), e encaminhado para o laboratório para avaliação, em 12 repetições, sobre o comportamento de oviposição de *Ae. aegypti* frente a três recipientes (150 ml) de oviposição: recipientes com ELin expostos em armadilhas com palhetas de Eucatex; recipientes com ELin expostos em armadilhas com tecido de algodão; e recipientes com água da torneira e Bti (controle). Em cada gaiola experimental, foram transferidas 30 fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*. Após uma semana, os filtros de papel utilizados como substrato de oviposição foram recolhidos para contagem dos ovos.

Figura 26- Aspecto de coloração do conteúdo da ovitrampa com palheta (béquer esquerdo) e com tecido (béquer direito), retirado após 60 dias de exposição em campo após 60 dias de exposição no campo.



Fonte: O autor.

5.6 Desenvolvimento do um novo modelo de armadilha

O novo modelo de armadilha (BR-Adult) se propôs a coletar ovos e fêmeas vivas de mosquitos. A BR-Adult foi desenvolvida a partir de recipientes plásticos e tecidos de baixo custo, cujos componentes estão descritos na Tabela 3. O custo total para montagem da armadilha foi de aproximadamente R\$ 40,00.

Tabela 3- Lista de objetos de suas características para montagem da nova armadilha.

Objetos	Cor	Medições (cm)	Capacidade	Objetivos
Balde com alça e tampa	preto	26 x 30	12 litros	Retenção de água
Recipiente com tampa	transparente	21 x 20	5,1 litros	Câmara de mosquitos
Funil	preto	13 x 13,5*	-	Entrada para mosquitos
Tule	preto	7 x 50	-	Impedir saída dos mosquitos
Palheta de Eucatex	marrom	45 x 15	-	Substrato de oviposição
Tela de nylon	branco	20 x 20	-	Escoamento de água

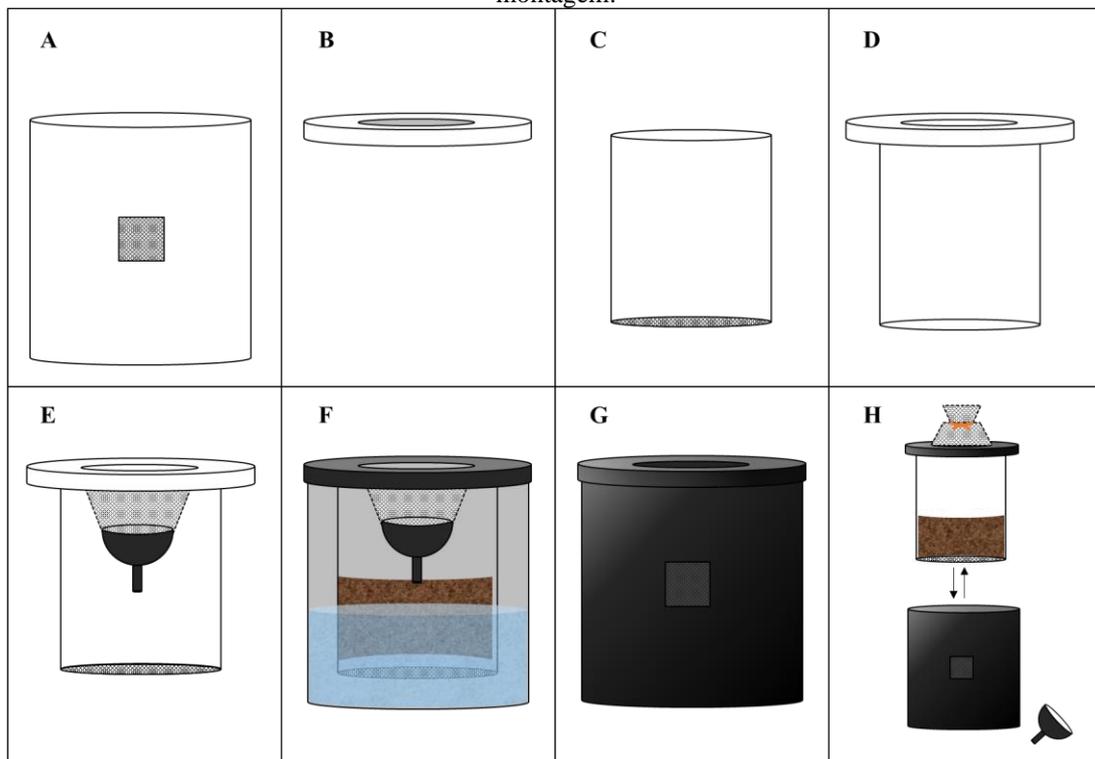
Fonte: O autor.

Descrição: Objetos sob medida de altura x largura. A palheta de Eucatex apresenta profundidade de 0,2 mm. Os demais objetos não têm profundidade por apresentarem formato circular ou, no caso da tela de nylon, por estar cobrindo uma abertura. *O funil apresenta 13 cm de altura, cujo diâmetro da abertura é de 13,5 cm, por onde forma uma concavidade em torno de 6,5 cm de altura, até atingir uma abertura de 1,7 cm de diâmetro, por onde se estende por mais 6,5 cm. A tela de nylon foi usada para revestir duas aberturas de 5 cm² no balde, e uma abertura circular de 15cm de diâmetro na tampa do recipiente.

O balde para retenção de água foi pintado de preto fosco. Nas laterais do balde, foram realizadas duas aberturas paralelas de 5 cm², permitindo iluminação e circulação de ar, funcionando como falsa saída para os mosquitos (Figura 27A). No centro da tampa do balde, foi realizado um corte circular de 15 cm de diâmetro, configurando a entrada e saída da armadilha (Figura 27B). Em seguida, um recipiente transparente fosco com tampa foi adaptado para servir como câmara para contenção de mosquitos. Foi realizado um corte circular de 15

cm de diâmetro na tampa do recipiente, e posteriormente o corte foi revestido com tela, permitindo escoamento de água. Além disso, o fundo do recipiente foi removido. O recipiente foi girado a 180°, para que a tampa vazada se posicionasse para baixo (Figura 27C). O fundo do recipiente foi anexado na tampa do balde, por onde as aberturas coincidiram (Figura 27D). Desta forma, o recipiente foi capaz de entrar e sair do balde, sempre aderido a tampa. Em torno da abertura da tampa, foi colado tecido de tule afunilado voltado para o interior da armadilha até atingir um diâmetro de 10 cm, possibilitando suspender o funil (Figura 27E). O funil também foi pintado de preto fosco, e quando suspenso pelo tule no interior da armadilha, se distanciava entre 3 e 5 cm da lâmina d'água (Figura 27F). Uma palheta de Eucatex foi torcida para formar uma concavidade e inserida dentro da câmara coletora, contornando cerca de 1/3 do seu interior, servindo como substrato de oviposição para mosquitos *Aedes*. Uma ilustração (PowerPoint Office 365) sobre os componentes da armadilha pode ser observada na imagem 27.

Figura 27- Ilustração dos componentes da armadilha BR-Adult e da sua visualização interna e externa após montagem.



Fonte: O autor.

Descrição: A- Balde para retenção de água. Nesta ilustração, a alça do balde foi removida para melhor compreensão; B- Tampa do balde coletor, onde foi realizada uma abertura circular no centro; C- Recipiente com giro de 180°, com abertura no centro da tampa, posteriormente revestida com tela; D- O fundo do recipiente foi removido e anexado no centro da tampa do balde, por onde as aberturas coincidiram. E- Tecido de tule colado em torno da abertura da tampa do balde e voltado para o interior da armadilha. O tule afunila para suspender o funil. F- Visão interna da armadilha. Uma palheta de Eucatex está inserida dentro da câmara coletora e o balde está preenchido com água; G- Visão externa da armadilha. H- Visão externa da armadilha com entrada ou saída da câmara coletora de mosquitos. O tule está posicionado para fora da armadilha, com um nó, para evitar a fuga dos mosquitos aprisionados.

A capacidade da armadilha de coletar mosquitos vivos foi observada em condições simuladas de campo, sofrendo influência das variáveis de temperatura e umidade. Foi utilizada a Sala de Experimentação Comportamental André Furtado & Lêda Regis do IAM/FIOCRUZ-PE, em uma estrutura de 26 m² que simula o ambiente peridomiciliar, abrigada do sol e da chuva, permitindo circulação de ar entre o ambiente interno e externo (Figura 28). Foram adicionados 4 litros de ELin (0,33 larva/ml) e 2 g de Bti em seu interior. Para cada observação, foram liberadas 50 fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue há 3 dias. As avaliações foram encerradas após três dias de exposição, com recolhimento da armadilha, e aspiração manual dos mosquitos que ainda estavam soltos. Os mosquitos aprisionados e os ovos foram contabilizados manualmente.

Figura 28- BR-Adult instalada em ambiente peridomiciliar simulado.



Fonte: O autor.

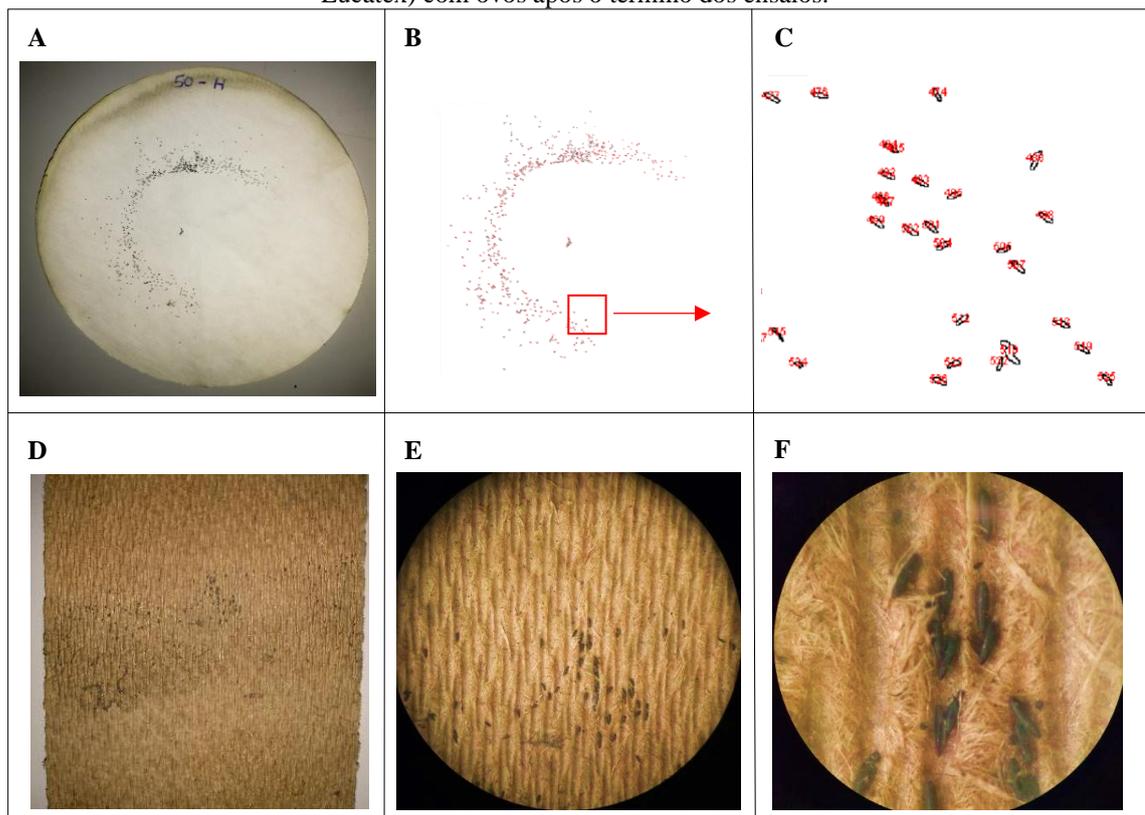
Descrição: A- ambiente peridomiciliar simulado com a nova armadilha instalada. B- uma das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* liberada para testar a armadilha.

5.7 Análise Estatística

Para contabilização dos ovos coletados nos substratos após o término dos ensaios de laboratório (Figura 29), foi utilizado o software ImageJ, enquanto as palhetas e os tecidos de oviposição foram analisados utilizando um estereomicroscópio e contador manual. A atividade de oviposição nos recipientes e nas armadilhas foi determinada pelo Índice de Atividade de

Oviposição (IAO), calculado pela fórmula $IAO = (NT - NC) \div (NT + NC)$, em que NT é a média de ovos depositados nos recipientes tratados e NC é a média de ovos depositados nos recipientes controle. Os valores de IAO variam de +1 (atração/estimulação) a -1 (repulsão/inibição) (KRAMER; MULLA, 1979). Os valores das armadilhas geraram outros dois índices, o Índice de Positividade de Ovitampas (IPO), calculado pela fórmula $IPO = n^{\circ} \text{ de armadilhas com ovos} \div n^{\circ} \text{ total de armadilhas}$, e o Índice de Densidade de Ovos (IDO), calculado pela fórmula: $IDO = n^{\circ} \text{ total de ovos} \div n^{\circ} \text{ de armadilhas positivas}$. Para análise estatística dos ensaios de laboratório, as avaliações pareadas foram avaliadas pelo teste de T pareado, enquanto as avaliações com múltipla escolha foram avaliadas pelo Teste Múltiplo de Tukey's (ANOVA). Os ensaios pareados de campo foram avaliados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Todas as análises foram realizadas pelo software GraphPad (Prism 9ª versão), enquanto os Gráficos e as tabelas foram criados no Excel (Microsoft Office 360).

Figura 29- Substratos de oviposição utilizados em laboratório (filtro de papel) e campo (palheta de Eucatex) com ovos após o término dos ensaios.



Fonte: O autor.

Legenda: A- Papel filtro (12,5 cm) com ovos de *Aedes aegypti* a vista desarmada. B- Imagem do substrato analisado pelo ImageJ. C- Imagem ampliada em três vezes com ovos contabilizados pelo ImageJ. D- Palheta de Eucatex com ovos de *Aedes* sp. a vista desarmada. E- Observação da palheta utilizando estereoscópio ampliada em três vezes. F- Observação da palheta utilizando estereoscópio ampliada em oito vezes.

5.8 Considerações éticas

Os experimentos de campo realizados neste estudo estavam inseridos em um projeto maior da pesquisadora Rosângela Maria Rodrigues Barbosa, intitulado “Avaliação de dois métodos de coleta para vigilância de arbovírus em mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*”, cujas anuências para realização da pesquisa foram dadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Registro no CAAE: 51012015.9.0000.5190 / N° do parecer na Plataforma Brasil: 547.598), de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

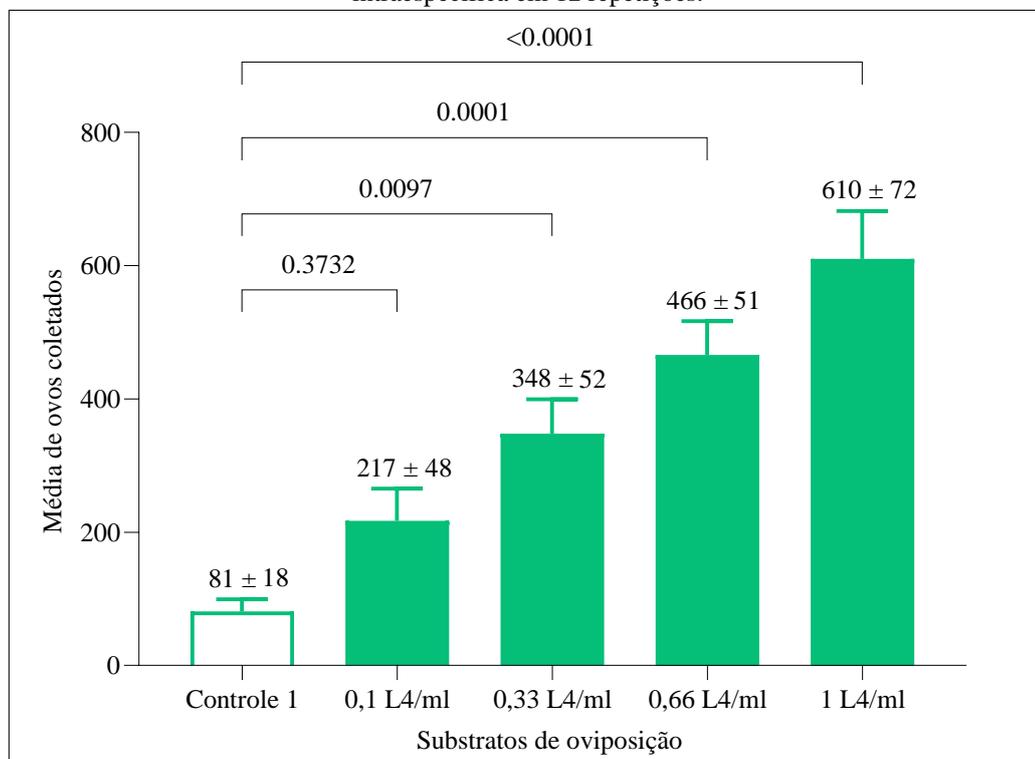
6 RESULTADOS

Experimentos preliminares foram realizados para dimensionar o potencial dos extratos larvais, cujas avaliações nortearam os subseqüentes ensaios de laboratório e de campo. Para isso, os primeiros resultados avaliaram a concentração mínima eficiente como estimulante de oviposição, o peso equivalente ao número de larvas para otimizar o tempo de separação da amostra, a influência de partículas sólidas do próprio extrato, a influência de manter larvas congeladas para futuras extrações, e a influência do biolarvicida Bti nos extratos, o componente letal na estratégia *attract-and-kill*.

6.1 Avaliações preliminares com extratos aquosos de larvas *in natura*

Avaliando o efeito de diferentes concentrações de larva/ml nos extratos larvais de *Ae. aegypti* sobre a oviposição intraespecífica, observamos coletas progressivamente maiores de ovos nos recipientes tratados com extratos à medida que as equivalências de larva/ml foram maiores (Figura 30) (Apêndice 1). No teste de comparação múltipla, a equivalência de 0,33 larva/ml foi a concentração mínima com eficiência para estimular a oviposição intraespecífica (FAIERSTEIN, et al. 2019).

Figura 30- Avaliação de diferentes equivalências de extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* na oviposição intraespecífica em 12 repetições.

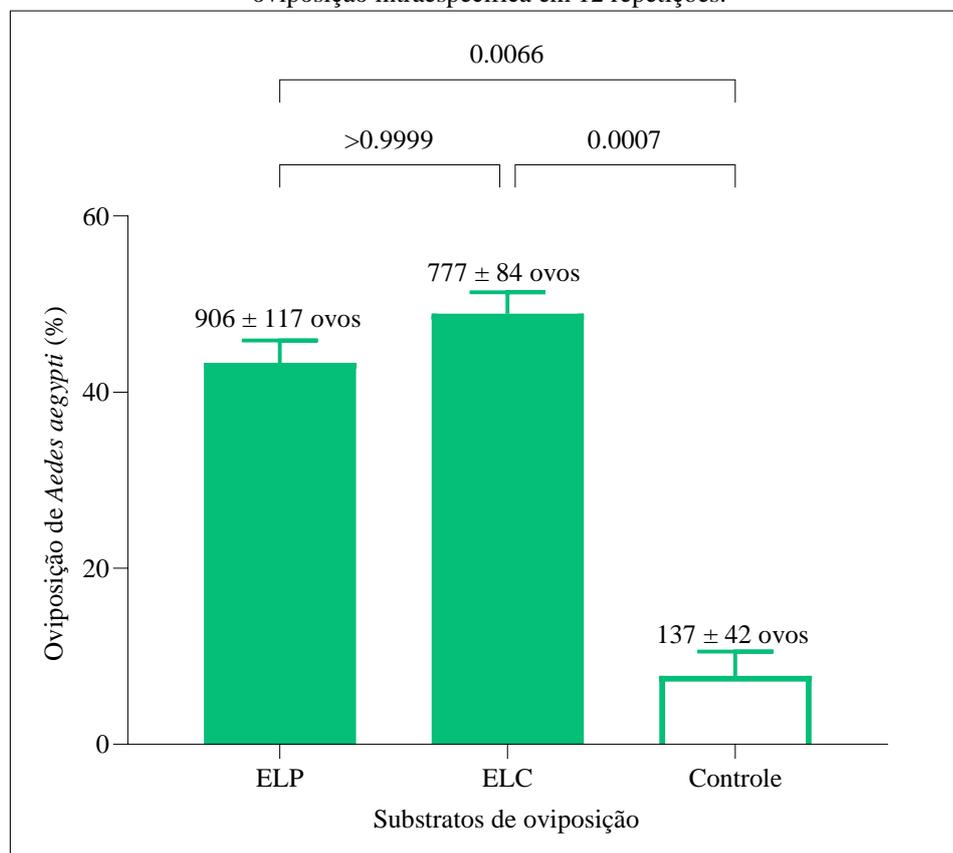


Fonte: Editado de Faiierstein et al. (2019).

Legenda: L4/ml – larvas em 4º estágio por mililitro

Para otimizar os ensaios de campo, padronizamos o peso médio de larvas para obtenção de extratos aquosos a 0,33 larva/ml. Para isso, seis *pools* de 300 larvas foram pesados (0,951 g; 0,973 g; 1,025 g; 0,906 g; 0,934 g; 0,972 g), gerando uma média de $0,96 \pm 0,04$ g. Logo, consideramos que 1 grama de larvas é constituído de aproximadamente 300 larvas, quantidade necessária para fazer um litro de extrato ($\approx 0,33$ larva/ml). Em seguida, testamos em laboratório extratos feitos a partir de larvas contadas em relação aos extratos de larvas pesadas e não observados diferenças significativas ($p = 0,5497$) na coleta de ovos entre os diferentes tratamentos. Além disso, ambos coletaram significativamente mais ovos ($p < 0,0001$) em relação ao controle, tendo o extrato de larvas contadas um IAO de +0,73 e o extrato de larvas pesadas +0,69 (Figura 31) (Apêndice 2).

Figura 31- Avaliação de extratos aquosos a partir de larvas contadas e de larvas pesadas de *Aedes aegypti* na oviposição intraespecífica em 12 repetições.



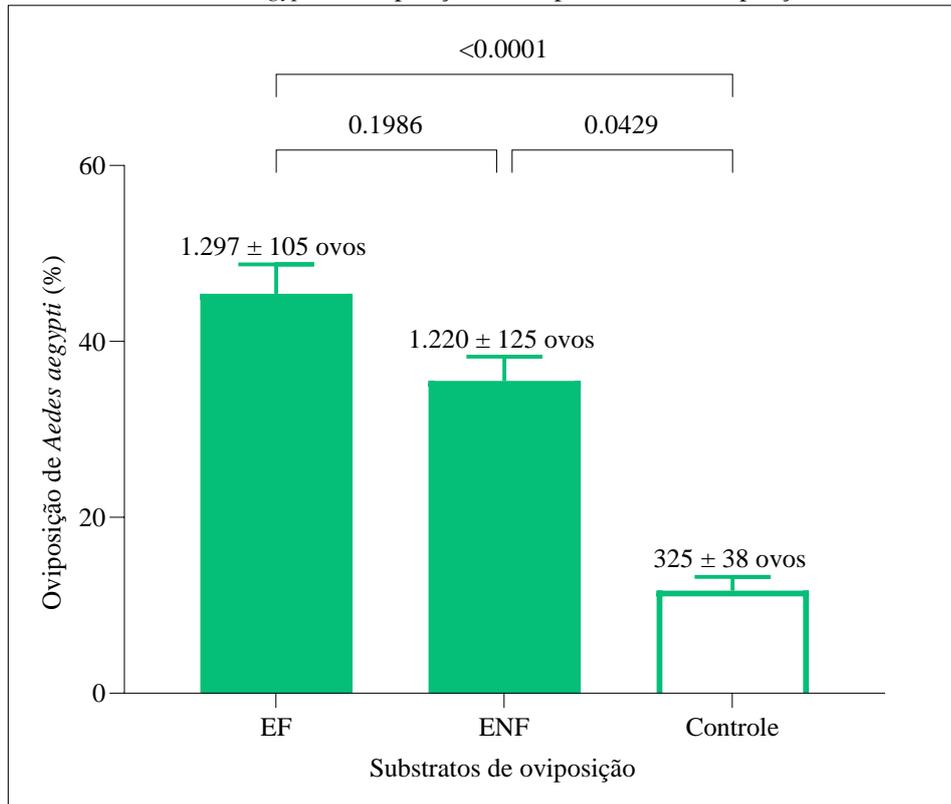
Fonte: O autor.

Legenda: ELC- Extratos de larvas contadas; ELP- Extratos de larvas pesadas.

Por outro lado, foi avaliado se haveria diferença significativa na coleta de ovos entre extratos filtrados de larvas em relação aos extratos não filtrados, mas não foi observada diferença significativa na coleta de ovos entre os recipientes com extratos filtrados de larvas em relação aos não filtrados ($p = 0,8233$), e que ambos coletaram significativamente mais ovos em relação aos recipientes controles ($p < 0,0001$), tendo o extrato de larvas não filtradas um

IAO de +0,58 e o extrato de larvas filtradas de +0,60 (Figura 32) (Apêndice 3). Os resultados mostraram que a mensuração das larvas a partir do seu peso e a transferência do extrato bruto de larvas nas armadilhas, são formas mais práticas de se trabalhar em campo para avaliação dos extratos *in natura* como iscas de oviposição.

Figura 32- Avaliação de extratos larvais filtrados e extratos larvais não filtrados de *Aedes aegypti* na oviposição intraespecífica em 12 repetições.

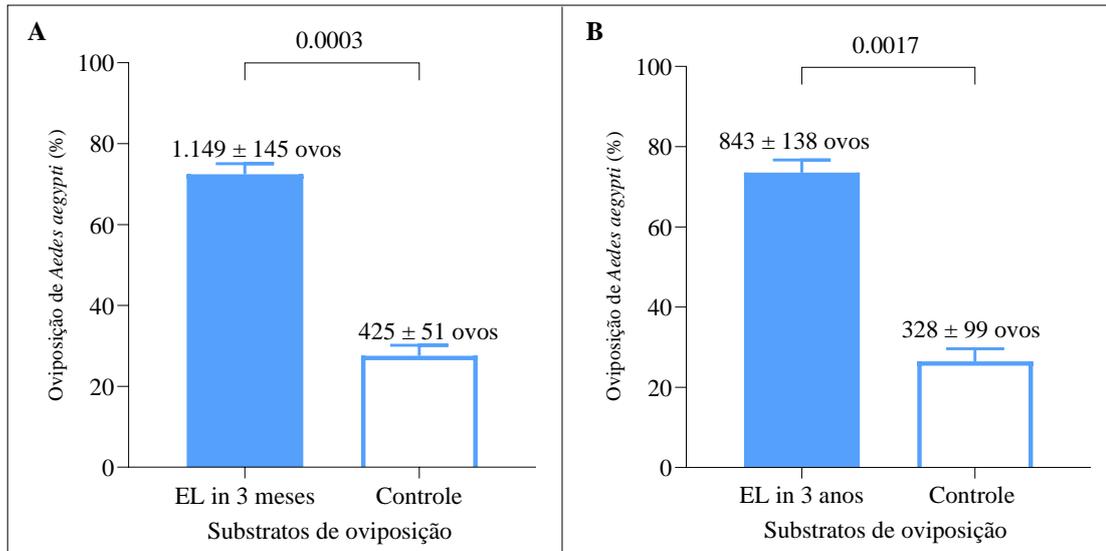


Fonte: O autor.

Legenda: EF- Extratos larvais filtrados; ENF- Extratos larvais não filtrados.

A necessidade de obter um quantitativo relevante de larvas para ensaios de campo nos levou a testar se estoques de larvas congeladas (-20 °C) poderiam servir para produção dos extratos. Desta forma, os recipientes tratados com extratos a partir de larvas congeladas há 3 meses coletaram significativamente mais ovos em relação aos controles ($p = 0,0023$, IAO = +0,46), assim como os extratos de larvas congeladas há 3 anos ($p = 0,0012$, IAO = +0,44). Os resultados apontam que há viabilidade nas larvas conservadas a -20 °C para produção de extratos, mesmo quando são conservadas durante vários meses (Figura 33) (Apêndice 4).

Figura 33- Avaliações paralelas de extratos larvais de *Aedes aegypti* utilizando larvas congeladas em relação à oviposição intraespecífica em 12 repetições.

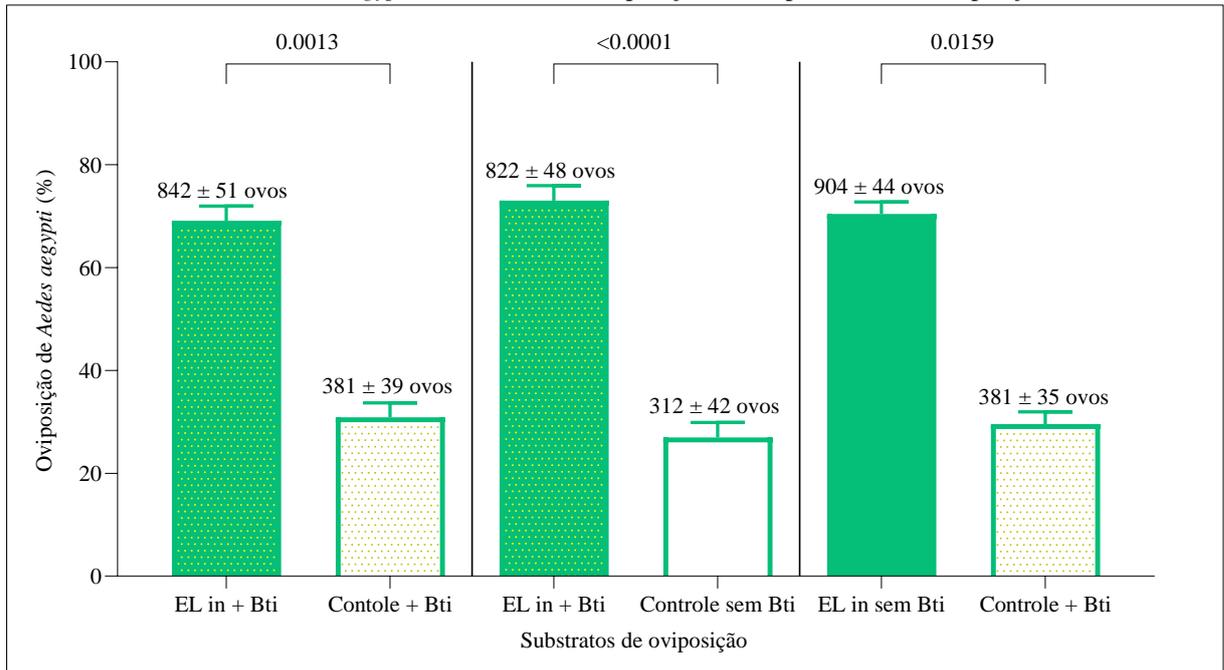


Fonte: O autor.

Legenda: EL in 3 meses: extratos com larvas descongeladas de *Ae. aegypti* que foram conservadas há 3 meses; EL in 3 anos: extratos com larvas descongeladas de *Ae. aegypti* que foram conservadas há 3 anos.

Para posteriores avaliações sobre o potencial do extrato larval associado ao Bti como uma isca de oviposição letal, verificamos primeiro a influência do Bti nos extratos e na água (controle) em relação ao comportamento de oviposição de *Ae. aegypti*. Todos os recipientes tratados com os extratos, independente da adição do Bti, coletaram significativamente mais ovos ($p < 0,0001$) em relação aos controles (Figura 34). Além disso, não houve diferenças significativas entre os extratos avaliados, assim como não foi observado diferença entre os controles. Portanto, admitimos que o Bti não interfere na eficiência do extrato larval em coletar ovos de *Ae. aegypti* (Apêndice 5).

Figura 34- Avaliações paralelas sobre a influência do Bti nos recipientes tratados e não tratados com extratos larvais de *Aedes aegypti* na atividade de oviposição intraespecífica em 12 repetições.



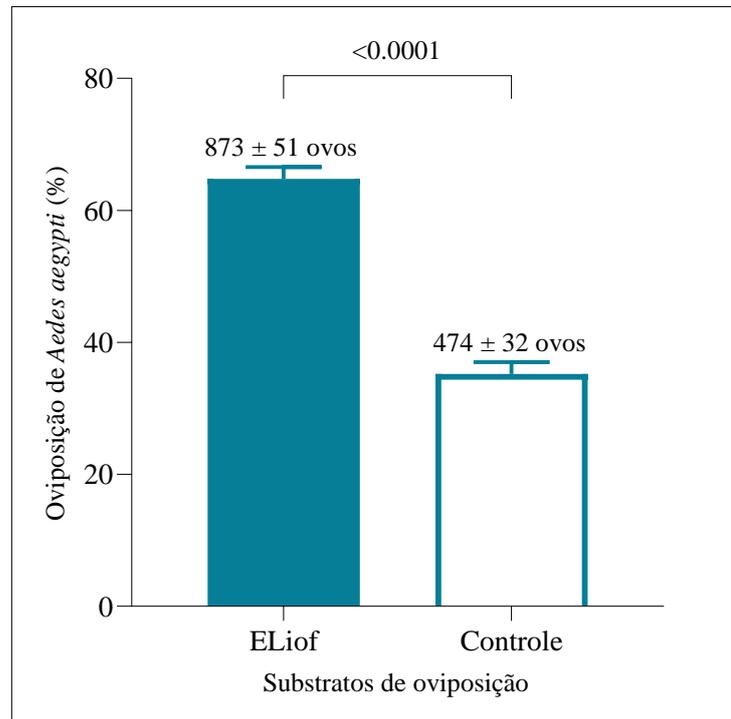
Fonte: O autor.

Legenda: EL in- extratos de larvas *in natura*; Bti- *Bacillus thuringiensis* serovar *israelenses*.

6.2 Avaliação dos extratos larvais liofilizados e extratos de larvas dessecadas

Em seguida, avaliamos extratos larvais liofilizados de *Ae. aegypti* como estimulantes de oviposição em uma dosagem de 1,66 larva/ml, e verificamos que os recipientes tratados continuaram a coletar significativamente mais ovos em relação aos controles ($p < 0,0001$), apresentando um IAO de +0,30 (Imagem 35) (Apêndice 6).

Imagem 35. Avaliação do extrato de larvas liofilizados de *Aedes aegypti* em relação a oviposição intraespecífica em 12 repetições.



Fonte: O autor.

Legenda: ELiof- Extrato larval liofilizado.

Uma outra etapa de experimentos de laboratório avaliou larvas desidratadas de diferentes espécies como estimulantes de oviposição. Dividimos a mesma amostra em duas partes, enquanto uma parte foi liofilizada para posterior extração (L₄Liof), a outra foi utilizada para extrações *in natura* (ELin) para serem avaliadas paralelamente em relação à oviposição dos mosquitos. Desta forma, observamos que os recipientes tratados com ELin de *Ae. aegypti* coletaram significativamente mais ovos na oviposição intraespecíficas ($p < 0,0001$, IAO +0,55), assim como na oviposição de *Cx. quinquefasciatus* ($p = 0,0007$, IAO = +0,45). Médias semelhantes no número de ovos de *Ae. aegypti* foram observadas nos recipientes tratados com ELin de *Cx. quinquefasciatus* ($p < 0,0001$, IAO = +0,42). De modo semelhante, observamos que os recipientes com L₄Liof de *Ae. aegypti* coletaram uma média significativamente maior de ovos em relação aos controles ($p < 0,0001$), mas não observamos diferenças nas médias de jangadas de *Cx. quinquefasciatus* ($p = 0,7842$, IAO = +0,03). No entanto, L₄Liof de *Cx. quinquefasciatus* estimularam significativamente mais a oviposição de *Ae. aegypti* ($p < 0,0415$, IAO = +0,29) apesar de uma perceptível redução no número de ovos coletados nos recipientes tratados (Tabela 4) (Apêndice 7).

Tabela 4- Avaliações paralelas sobre diferentes extratos de larvas *in natura* e de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em relação à oviposição intra e interespecífica em 12 repetições/avaliação.

Avaliação	Extrato larval avaliado	Fêmeas grávidas	Média de ovos/jangadas		IAO	Teste T pareado (p)
			Tratamento	Controle		
1	Larvas <i>in natura</i> de <i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. aegypti</i>	1182 ± 311	341 ± 84	+0,55	< 0,0001*
	Larvas liofilizadas de <i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. aegypti</i>	1.211 ± 341	334 ± 141	+0,57	< 0,0001*
2	Larvas <i>in natura</i> de <i>Aedes aegypti</i>	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	15 ± 4	6 ± 4	+0,45	0,0007*
	Larvas liofilizadas de <i>Ae. aegypti</i>	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	13 ± 6	12 ± 6	+0,03	0,7842
3	Larvas <i>in natura</i> de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Ae. aegypti</i>	1.481 ± 253	598 ± 174	+0,42	< 0,0001*
	Larvas liofilizadas de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Ae. aegypti</i>	1.328 ± 414	727 ± 145	+0,29	0,0415*

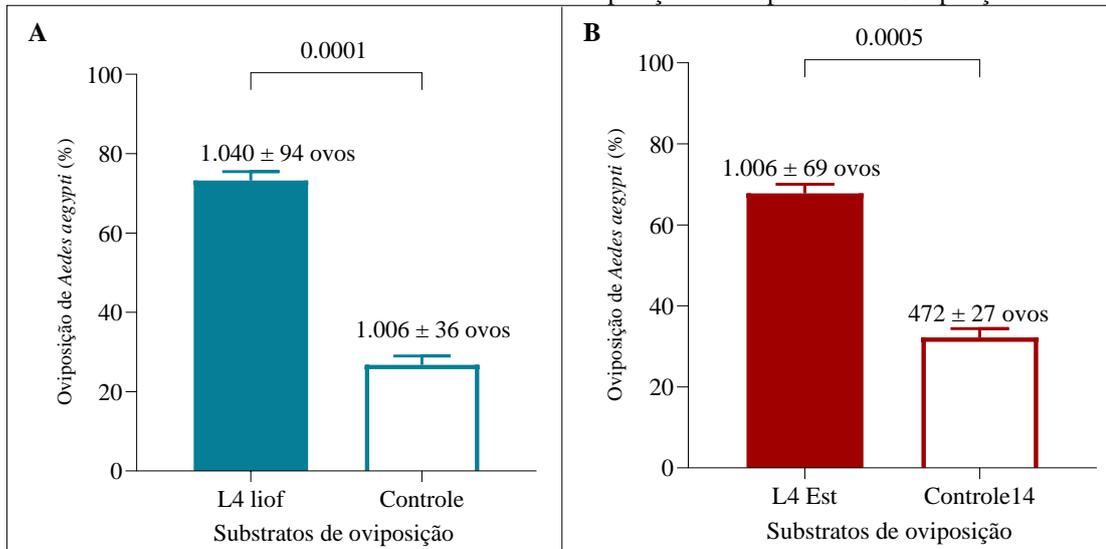
Fonte: O autor.

Legenda: IAO- Índice de Atividade de Oviposição.

Descrição: *- com diferença significativa.

Verificamos se extratos com larvas de *Ae. aegypti* desidratadas pelo calor continuam estimulando à oviposição intraespecífica. Para isso, duas amostras de larvas foram analisadas, uma delas desidratadas em liofilizador (L4Liof), e a outra desidratada em estufa (EL est). Em seguida, analisamos simultaneamente extratos aquosos das amostras dessecadas, e observamos coletas significativamente maiores de ovos nos recipientes com L4Liof ($p < 0,0001$, IAO = +0,47) em relação aos controles, assim como nos recipientes tratados com EL est ($p < 0,0001$, IAO = +0,36). Os diferentes tratamentos não diferiram significativamente entre si ($p = 0,9792$), assim como os controles ($p = 7077$), demonstrados na figura 36 (Apêndice 8).

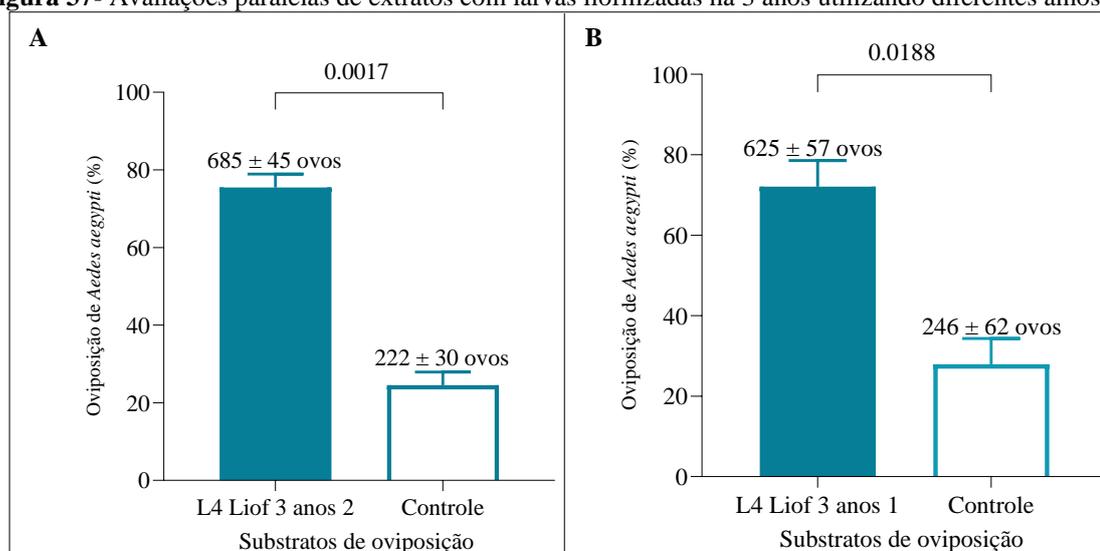
Figura 36- Avaliações paralelas de extratos larvais de *Aedes aegypti* a partir de amostras dessecadas em liofilizador e em estufa sobre a oviposição intraespecífica em 6 repetições.



Fonte: O autor.

Legenda: L4liof: extrato com larvas liofilizadas (grupo 1); EL est: extrato com larvas dessecadas em estufa (grupo 2).

Avaliamos em outubro de 2020 duas amostras de larvas que foram liofilizadas entre agosto e outubro de 2017. Desta forma, foram realizados dois extratos aquosos (0,33larva/ml) para verificar sua eficiência como estimulantes de oviposição. Coletas significativas de ovos foram observadas nos tratamentos com extratos larvais ($p < 0,0001$), cujos valores apresentaram IAO de +0,53 e +0,51 entre as amostras 1 e 2, respectivamente (Figura 37). Os resultados reforçam a evidência de que os compostos presentes nas larvas que estimulam a oviposição tem uma estabilidade considerável, pois o processo de desidratação das larvas não comprometeu as propriedades estimulativas, mesmo posteriormente mantidas à temperatura ambiente (24 °C) (Apêndice 9).

Figura 37- Avaliações paralelas de extratos com larvas liofilizadas há 3 anos utilizando diferentes amostras.

Fonte: O autor.

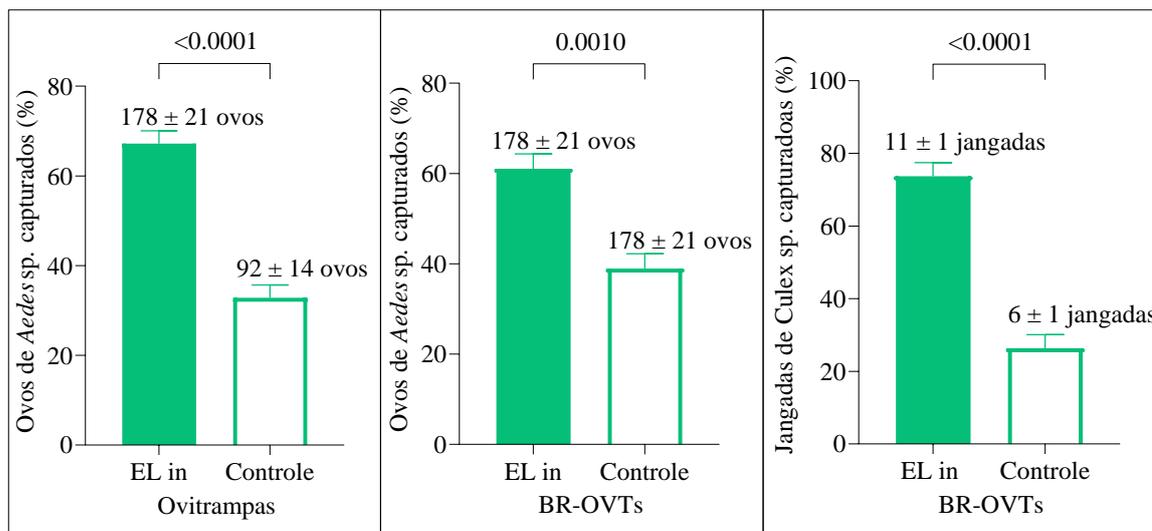
Legenda: L4liof (3 anos): extrato com larvas liofilizadas.

Descrição: Amostra 1- larvas liofilizadas em agosto de 2017. Amostra 2- larvas liofilizadas em outubro de 2017.

6.3 Avaliação de extratos larvais *in natura* como iscas de oviposição no campo

Para avaliação dos extratos larvais *in natura* (ELin) no campo, utilizamos armadilhas do tipo ovitrampa e BR-OVT associadas ao Bti para eliminação das larvas que porventura eclodissem dos ovos. Inicialmente, comparamos ovitrapas tratadas com extratos larvais ($\approx 0,33$ larva/ml) em relação às ovitrapas controles, cujos tratamentos resultaram em coletas de ovos significativamente maiores ($p < 0,0001$ e IAO = +0,32). As ovitrapas tratadas apresentaram um IDO ≈ 176 ovos/armadilha/quinzena, com um IPO = 100%. Por outro lado, as ovitrapas controles apresentaram um IDO ≈ 92 ovos/ovitrampa/quinzena e um IPO $\approx 92\%$ (Figura 27) (Apêndice 10). Dados semelhantes foram observados quando adicionamos o mesmo tratamento nas BR-OVTs, onde as armadilhas com ELin coletaram significativamente mais ovos dos mosquitos *Aedes* ($p < 0,0001$ e IAO = +0,28), demonstrando um IDO ≈ 601 ovos/BR-OVT/quinzena e um IPO $\approx 97\%$ durante a avaliação (Figura 28). Já as BR-OVTs controles apresentaram um IDO ≈ 331 ovos/BR-OVT/quinzena com um IPO $\approx 98\%$ durante as avaliações (Apêndice 11). Em relação a oviposição dos mosquitos *Culex* nas BR-OVTs tratadas com extratos larvais, também observamos coletas significativamente maiores nas armadilhas ($p < 0,0001$ e IAO = +0,30), cujos valores resultaram um IDO ≈ 11 jangadas/BR-OVT/quinzena com um IPO $\approx 98\%$ durante as avaliações, enquanto as BR-OVTs controles mostraram um IDO ≈ 6 jangadas/BR-OVT/quinzena, e um IPO $\approx 73\%$ (Figura 38) (Apêndice 12).

Figura 38- Avaliações da ovitrapa e da BR-OVT associadas com Bti e com extrato larval *in natura* de *Aedes aegypti* em relação à oviposição dos mosquitos *Aedes* e *Culex* em campo.



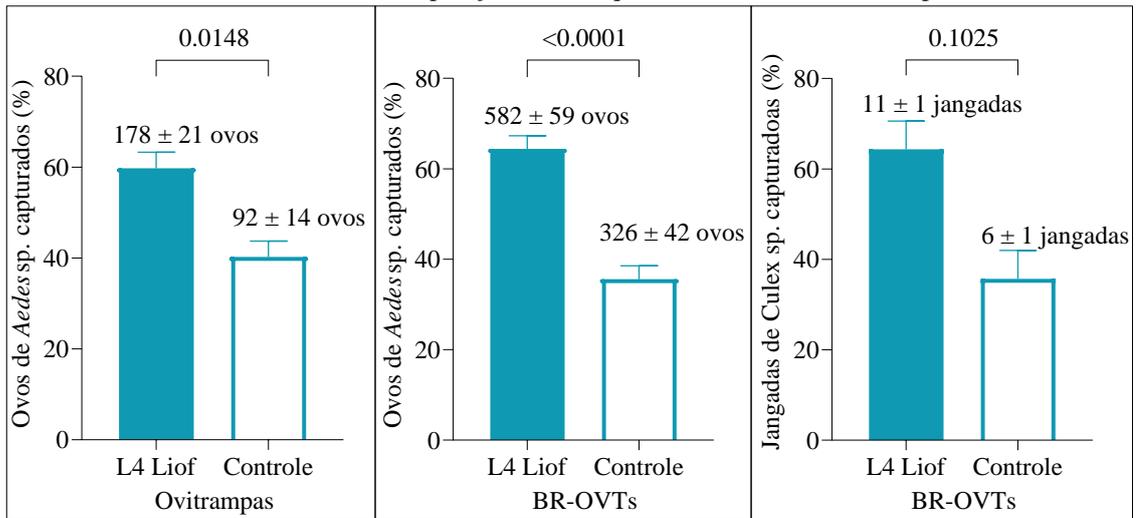
Fonte: O autor.

Legenda: EL in: extratos de larvas *in natura*.

6.4 Avaliação de larvas liofilizadas como iscas de oviposição no campo

Avaliando as armadilhas de oviposição com fragmentos de larvas liofilizadas (L₄Liof) para observar o potencial desta associação como iscas de oviposição, os resultados mostraram diferenças significativas na coleta de ovos quando as ovitampas foram tratadas ($p < 0,0001$ e IAO = +0,24), demonstrando um IDO ≈ 260 ovos/ovitrampa/quinzena e com IPO de 100% durante toda avaliação. Já as ovitampas controles demonstraram um IDO de ≈ 169 ovos/ovitrampa/quinzena, com positividade de 94% das armadilhas (Figura 38) (Apêndice 13). À semelhança das ovitampas, as BR-OVTs associadas à L₄Liof, também coletaram significativamente mais ovos ($p < 0,0001$ e IAO = +0,24) em relação à oviposição dos mosquitos *Aedes*, demonstrando um IDO de ≈ 305 ovos/ovitrampa/quinzena e com IPO de 100% durante toda avaliação (Apêndice 14). Avaliando a oviposição dos mosquitos *Culex* nas BR-OVTs, também observamos coletas significativas nas armadilhas tratadas com L₄Liof ($p = 0,0010$ e IAO = +0,30), cujos valores resultaram um IDO de ≈ 4 jangadas/BR-OVT/semana com positividade de 74%. Já as BR-OVTs controles, observamos valores inferiores, com IDO ≈ 2 jangadas/BR-OVT/semana e com positividade de 63% durante as avaliações (Figura 39) (Apêndice 15).

Figura 39- Avaliações da ovitrapa da BR-OVT associadas com Bti e com fragmentos larvais de *Aedes aegypti* liofilizados sobre a oviposição dos mosquitos *Aedes* e *Culex* em campo.

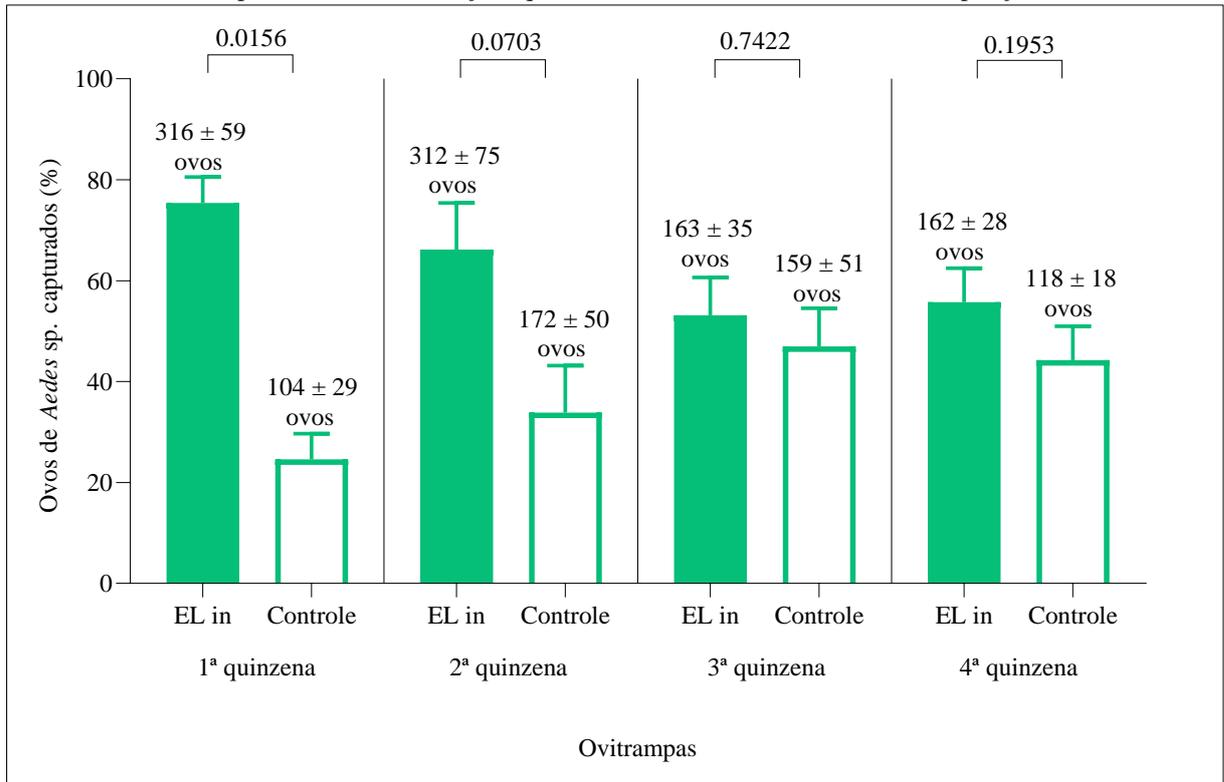


Fonte: O autor.

Legenda: EL4liof: extratos com larvas liofilizadas.

Na penúltima etapa de experimentos em campo, observamos por quanto tempo os extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* associados ao Bti estimulam a oviposição intraespecífica. Nesse sentido, observamos que as armadilhas coletaram valores significativamente maiores de ovos na primeira quinzena ($p < 0,0156$, IAO = +0,51), mas que a partir da 2ª quinzena de observação não verificamos diferenças significativas na coleta de ovos em relação às ovitrapas controle ($p > 0,005$), embora aparentemente tenha coletado médias superiores de ovos (IAO = +0,29) (Figura 40) (Apêndice 16).

Figura 40- Avaliações de extratos *in natura* de *Aedes aegypti* observando o efeito estimulativo à oviposição intraespecífica com observações quinzenais durante 2 meses entre 7 e 8 repetições.

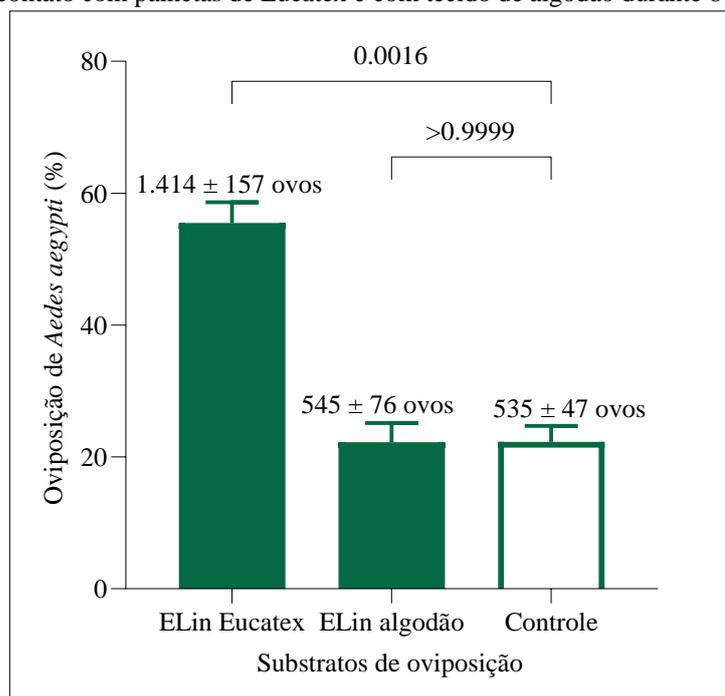


Fonte: O autor.

Legenda: EL in: extratos larvais *in natura*.

Uma vez que os experimentos sobre a persistência dos extratos larvais em ovitrapas demonstraram que a decomposição da palheta de Eucatex pode exercer influências no comportamento de oviposição de mosquitos *Aedes*, reinstalamos as armadilhas aos pares no campo durante 60 dias de exposição, uma com extrato larval e palheta de Eucatex (ELin Eucatex), e outra com extrato larval e tecido de algodão (ELin algodão), para posteriormente avaliarmos em laboratório os diferentes extratos em relação à oviposição de *Ae. aegypti*. Observamos coletas significativamente maiores nos recipientes tratados com ELin Eucatex, e que os ELin algodão apresentaram médias significativamente indiferentes em relação ao controle (Figura 41) (Apêndice 17). Os resultados mostram influências atrativas e/ou estimulativas à oviposição dos extratos em que houve decomposição da palheta de Eucatex, um substrato de oviposição comumente utilizado para coletar ovos de mosquitos *Aedes* em armadilhas.

Figura 41- Avaliação de extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* após exposição no campo em contato com palhetas de Eucatex e com tecido de algodão durante 60 dias.



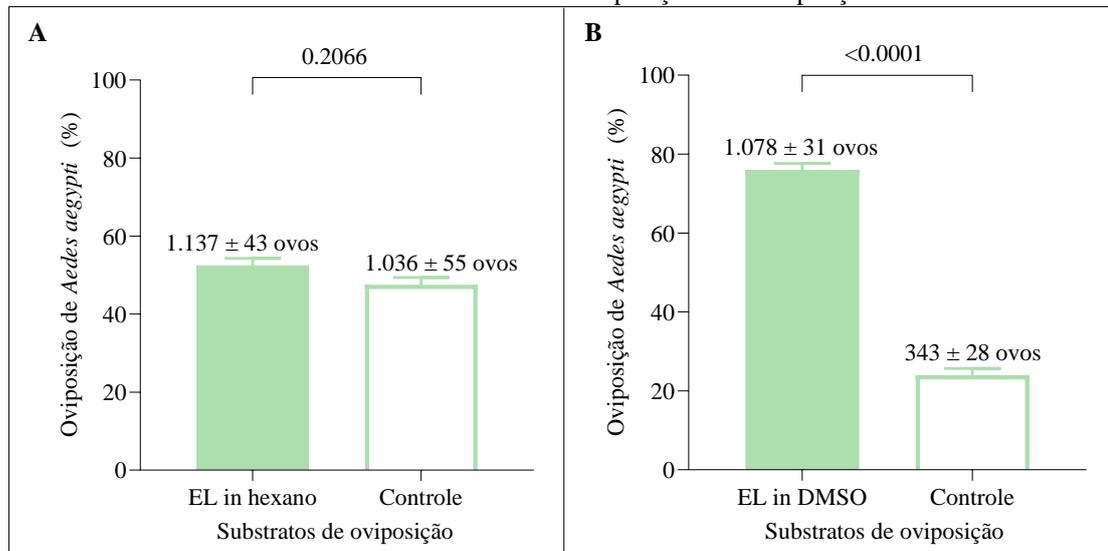
Fonte: O autor.

Legenda: EL in Eucatex: extratos larvais *in natura* expostas em armadilhas com palhetas de Eucatex. EL in algodão: extratos larvais *in natura* expostas em armadilhas com tecido de algodão.

6.5 Avaliação de extratos de larvas *in natura* utilizando solventes

Avaliando hexano e dimetilsulfóxido como solventes para extratos larvais de *Aedes aegypti*, observamos que apenas o dimetilsulfóxido mostrou eficiência em extrair os compostos estimulantes de oviposição presentes nos corpos das larvas, tendo os recipientes tratados coletado uma média significativamente maior ($p < 0,001$ e IAO= +0,52) em relação aos recipientes com controle. Por outro lado, o inverso foi observado nas avaliações com extratos hexânicos, cujos recipientes tratados coletaram uma média indiferente ($p = 0,2177$ e IAO de +0,05) em relação aos recipientes controles (Figura 42) (Apêndice 18).

Figura 42- Avaliações paralelas do hexano e do dimetilsulfóxido como solventes para realizar extratos larvais estimulantes de oviposição em 12 repetições.



Fonte: O autor.

Legenda: EL in hexano: Extrato larval hexânico. EL in DMSO: Extrato larval utilizando dimetilsulfóxido como solvente.

6.6 Observação da nova armadilha em campo simulado

Os resultados dos sete testes realizados em condições simuladas de campo, revelaram uma baixa eficácia da nova armadilha, visto que apenas 20% das fêmeas liberadas foram capturadas (Tabela 5). Por outro lado, também observamos que números relevantes de mosquitos não foram encontrados, o que pode estar relacionado a interferência causada pela entrada de predadores, como formigas e aranhas, frequentemente observados ao final de cada observação. Não foi possível correlacionar ($p > 0,005$) o número de ovos nas palhetas com o número de adultos que se mantiveram aprisionados até o final da repetição. No entanto, em nenhuma observação a armadilha foi recolhida sem mosquitos adultos aprisionados, o que sugere que sua eficácia pode ser melhorada a medida em que o instrumento for modificado e aperfeiçoado.

Tabela 5- Observações do novo modelo de armadilha para coletar ovos e fêmeas de *Aedes aegypti* em condições simuladas de campo.

Observações	Mosquitos liberados	Ovos coletados	Mosquitos capturados	Mosquitos recuperados	Mosquitos desaparecidos
1	50	339	3	24	23
2	50	454	3	22	25
3	50	423	25	10	15
4	50	182	17	20	13
5	50	164	13	14	23
6	50	450	2	15	33
7	50	159	8	0	42
Soma	350	2171	71	105	174
Média	50	310	10 ± 9	15 ± 8	25 ± 10
Porcentagem	100	-	20,29	30,00	49,71

Fonte: O autor.

7 DISCUSSÃO

Para as fêmeas grávidas dos mosquitos, a seleção de sítios apropriados para o desenvolvimento larvário são cruciais e é considerada uma das etapas mais importantes para o estabelecimento de suas populações, uma vez que os imaturos não são migratórios, e muitos deles se desenvolvem em ambientes confinados, como *Aedes aegypti*, cujos os sítios de retenção de água tem capacidades variadas, desde os que suportam alguns mililitros, até os preenchidos por dezenas ou centenas de litros (FORATTINI; BRITO, 2003). Por esta razão, as fêmeas dos mosquitos buscam por pistas físicas e químicas no ambiente, havendo predileções entre os sítios de oviposição. Nesse sentido, semioquímicos de oviposição atuam como atraentes/estimulantes, ou repelentes/deterrentes, dos quais dois fatores merecem discussão: feromônios e cairomônios de oviposição produzidos por larvas e ovos de mosquitos (GONZALEZ; GONZÁLEZ AUDINO; MASUH, 2014, 2016), e cairomônios de oviposição produzidos por bactérias, relacionadas ou não, com o desenvolvimento larvário (PONNUSAMY et al., 2015; TREXLER et al., 2003).

Faienstein, et al. (2019) descreveram pela primeira vez a influência que os extratos de ovos, larvas e pupas de *Ae. aegypti*, de *Cx. quinquefasciatus* e de *Ae. albopictus* exercem no comportamento de oviposição intra e interespecífico, cujos relatos apontaram os extratos larvais como os mais promissores para realização de iscas de oviposição com múltiplos alvos, possivelmente por haver semelhanças entre alguns compostos dos diferentes extratos que influenciaram no comportamento de oviposição das diferentes espécies de mosquitos. Este estudo reforça a eficiência dos extratos larvais de *Ae. aegypti* como isca de oviposição, uma vez que os recipientes tratados com amostras *in natura* e/ou desidratadas com dosagens entre 0,33 e 1,66 larva/ml estimularam mosquitos à deposição dos ovos. No entanto, não há estudos além dos de Faienstein, et al. (2019) e Marques & Miranda (1992), onde os recipientes tratados com extratos larvais *in natura* (0,33 larva/ml) foram estimulantes e/ou atraentes de oviposição.

Alguns fatores de confusão podem ser encontrados na literatura em relação ao que representa um extrato larval. Enquanto os nossos extratos foram realizados a partir da trituração do corpo das larvas, Boullis et al. (2021) descreveram que os extratos avaliados foram obtidos a partir da exposição da água destilada à larvas vivas por três dias, relatando recipientes com densidades larvais elevadas na água (1 larva/ml) fora deterrentes de oviposição de *Ae. aegypti* em relação aos controles, cujos compostos identificados nos extratos e avaliados isoladamente apontaram que o ácido pentadecanóico (1 ppm) são estimulantes de oviposição, enquanto o ácido miristolico (10 ppm ou mais) é deterrente de oviposição. As diferenças metodológicas

em comparação com nossos estudos provavelmente levaram a resultados dessemelhantes, já que os recipientes tratados com extratos de larvas homogeneizadas (1 larva/ml) coletaram significativamente mais ovos nas concentrações mais elevadas de larva/ml (FAIERSTEIN, 2021). Os resultados de Boullis et al. (2021) se assemelham aos de Alan & Kline (1998) e Davis et al. (2015), que descreveram que *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* admitem ou preferem recipientes em que larvas intraespecíficas se desenvolveram em baixas densidades (0,33 larva/ml), enquanto a água de criação em que se desenvolveram muitas larvas intraespecíficas foi deterrente/repelente. Em relação à outras espécies de mosquitos, também foi observado que água de desenvolvimento larvário influenciam no comportamento de oviposição das fêmeas grávidas de *Aedes togoi* (TRIMBLE; WELLINGTON, 1980), *Aedes triseriatus*, *Aedes atropalpus* (BENTLEY; MCDANIEL; LEE, 1976) e *Anopheles gambiae*, tendo os anofelinos um comportamento diferente, pois apenas recipientes com as fases iniciais do desenvolvimento larvário atraíram fêmeas para oviposição, enquanto os recipientes com estádios mais avançados foram evitados, independente da concentração de larva/ml (BLACKWELL; JOHNSON, 2000; HIMEIDAN et al., 2013). O exercício de canibalismo que as larvas de *Anopheles gambiae* apresentam, em que larvas mais desenvolvidas predam as mais jovens independente da disponibilidade de alimento (KOENRAADT; TAKKEN, 2003), pode estar relacionado com as respostas de repelência/deterrência de oviposição.

Do ponto de vista ecológico, parece positivo inibir a oviposição intraespecífica em ambientes que beiram a superlotação, evitando competição e otimizando o sucesso da proliferação da espécie. No entanto, durante a competição interespecífica, tanto *Ae. aegypti* quanto *Ae. albopictus* depositaram significativamente mais ovos nos sítios com superlotação de larvas (8,33 larvas/ml) (GONZALEZ; GONZÁLEZ AUDINO; MASUH, 2016). Em condições de campo, *Ae. albopictus* também foi mais estimulado a ovipor em recipientes onde larvas de *Ae. aegypti* se desenvolviam, em detrimento dos recipientes sem larvas (SHRAGAI et al., 2019). Para evitar a competição intraespecífica, foi suposto que a produção de alguma substância inibitória larvária poderia ter evoluído como mecanismo regulador da oviposição (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014; GONZALEZ; GONZÁLEZ AUDINO; MASUH, 2016), mas a hipótese ainda não está esclarecida. Além disso, menos ainda é explicado sobre a atuação deste possível inibidor entre diferentes espécies, surgindo a questão: os criadouros superlotados continuam atrativos/estimulantes para outras espécies por não haver reconhecimento da substância inibitória, ou a oviposição interespecífica foi uma resposta intencional para competir com a espécie dominante? Em relação às nossas avaliações sobre extratos com diferentes equivalências de larvas por mililitro (0,1 a 1,66 larva/ml) na oviposição

intraespecífica, não encontramos efeito dissuasor em nenhum tratamento, ao contrário, mais ovos foram observados nos recipientes com maiores concentrações do extrato. Desta forma, supomos que a avaliação das fêmeas grávidas não esteja relacionada à percepção de lotação de imaturos intraespecíficos, senão nossos extratos não seriam tão atrativos/estimulativos, mas certamente estão relacionadas às substâncias decorrentes do desenvolvimento larvário, como bactérias e metabólitos larvais secretados na água de criação, que foram reduzidos durante a lavagem das larvas para preparação do extrato.

Embora os estudos de ecologia química geralmente apontem substâncias sob efeito dose-dependente, sendo geralmente atrativos em baixas dosagens e repelentes a medida em que se intensificam (MEINWALD; LEAL; KUBANEK, 2018; ZANARDI et al., 2019), Faienstein et al. (2019) demonstraram que no mesmo extrato larval de *Cx. quinquefasciatus* (0,33 larva/ml) existia uma fração atrativa/estimulativa à oviposição intraespecífica, enquanto outra se mostrou repelente/deterrente, sendo a primeira fração compensadora da última. Os limites da compensação atrativa/estimulativa sobre a repelência/deterrência na mesma solução ainda precisam ser compreendidos e avaliados entre as espécies, mas, para isso, a caracterização dos compostos envolvidos na regulação do comportamento de oviposição precisam ser identificados. Um composto muito hidrofóbico, *n*-heneicosano, foi isolado de ovos de *Ae. aegypti* e demonstrou estimular as antenas das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, portanto, sugerido como um feromônio e cairomônio de oviposição. O mesmo composto foi também observado em água por onde larvas de *Ae. aegypti* se desenvolveram, cujo isolamento e posterior utilização com baixas dosagens (10 ppm) em recipientes de oviposição levaram a coletas significativamente maiores de ovos intraespecíficos, enquanto concentrações dez vezes maiores provocaram efeito reverso (MENDKI et al., 2000; SEENIVASAGAN et al., 2009). No entanto, além das predileções inerentes dos mosquitos sobre os sítios de oviposição, é descrito que o seu comportamento também sofre influências das experiências obtidas durante o seu desenvolvimento. Quando larvas de *Ae. aegypti* se desenvolveram em recipientes com 100 ppm de *n*-heneicosano, as fêmeas grávidas derivadas desta criação foram expostas a diferentes sítios de postura, mas depositaram mais ovos nos recipientes tratados com dosagens altas do feromônio, se contrapondo às fêmeas derivadas de uma criação com baixas concentrações de *n*-heneicosano (AFIFY, 2014).

Desta forma, a avaliação entre sítios de oviposição não é sempre inata (moldada apenas por adaptação evolutiva), mas pode ser influenciada pelas experiências obtidas nas fases imaturas do mosquito. Também foi relatado que fêmeas grávidas *Cx. quinquefasciatus* criadas em água contendo o deterrente Skatole preferiram depositar jangadas em água contendo a

mesma concentração do deterrente em relação *p*-cresol, um composto normalmente atrativo (MCCALL; EATON, 2001). De forma semelhante, adultos de *Ae. aegypti* foram menos afetados pelo repelente Mozaway® quando seus imaturos foram criados em água de criação contendo dosagens semelhantes do repelente (KAUR; LAI; GIGER, 2003). Entretanto, uma vez que o repelente normalmente não apresenta dosagens letais, não foi descrito se as larvas expostas ao Mozaway® se desenvolveram em mosquitos tolerantes ao composto, ou se genes de resistência foram desencadeados para perpetuarem entre gerações.

Em um aspecto mais amplo, estudos mais recentes mostram que a qualidade do desenvolvimento larvário no campo pode gerar adultos com mudanças no seu comportamento e na sua fisiologia, que podem influenciar nos níveis populacionais e, eventualmente, na transmissão de patógenos. A exposição de *Ae. aegypti* criados em diferentes densidades larvais e submetidas a diferentes tratamentos de predadores, influenciou no comportamento das larvas e aumentou seu tempo de desenvolvimento, cujo custo energético resultou em adultos com perda de massa corporal, perda de fecundidade, e na maior latência para alimentação de sangue (CHANDRASEGARAN et al., 2018; CHANDRASEGARAN; JULIANO, 2019). Em outro contexto, a exposição de larvas de *Ae. aegypti* ao estresse de superlotação influenciou no desenvolvimento de adultos menos susceptíveis ao vírus Dengue em relação aos adultos que se desenvolveram em ambientes com condições favoráveis (KANG et al., 2017), enquanto as que foram submetidas ao desenvolvimento em ambientes acima da temperatura média foram mais susceptíveis a infecção do vírus Chikungunya (YADAV; MOURYA; MISHRA, 2004). Portanto, os padrões de desenvolvimento larvário afetam a desenvoltura e a fisiologia dos mosquitos adultos, e essas especificidades merecem atenção em relação às diferentes populações de campo, ainda que sejam da mesma espécie.

Outro importante aspecto envolve a influência de bactérias e de seus metabólitos como atraentes e/ou estimulantes de oviposição. Benzon & Aperson (1988) avaliaram pela primeira vez a influência da proliferação de bactérias na água de desenvolvimento larvário de *Ae. aegypti*. Após filtração de bactérias para posteriores ensaios de oviposição, os recipientes tratados continuaram coletando significativamente mais ovos. No entanto, quando a proliferação de bactérias e seus subsequentes metabólitos foi impedida pelo uso de antibióticos desde o início do desenvolvimento larvário, os recipientes tratados foram repelentes/deterrentes de oviposição, sendo *Acinetobacter calcoaceticus* a bactéria responsável pela coleta de ovos nos recipientes tratados. Já em relação ao desenvolvimento larvário de *Aedes albopictus*, isolados de *Psychrobacter immobilis* exerceram atratividade à oviposição, mas não à estimulação (TREXLER et al., 2003).

Avaliando extratos larvais de *Ae. aegypti* em relação à oviposição intra e interespecífica, observamos em laboratório que apenas os recipientes tratados com extratos de larvas liofilizadas coletaram médias indiferentes de jangadas de *Cx. quinquefasciatus* em relação ao controle, mas o inverso aconteceu no campo, onde as BR-OVTs tratadas com fragmentos de larvas liofilizadas coletaram mais jangadas do que as BR-OVTs controles. Em laboratório, mais de 90% das jangadas foram coletadas entre o primeiro e o segundo dia de observação, sendo então a composição inicial do extrato o fator determinante. Nos experimentos de campo, as armadilhas com fragmentos de larvas liofilizadas foram expostas por 15 dias, onde possivelmente a existência de bactérias relacionadas à decomposição da matéria orgânica atraiu mosquitos *Culex* para oviposição, enquanto as armadilhas controles não apresentaram o mesmo enriquecimento orgânico. Portanto, ainda que não seja por um fator diretamente ligado às larvas liofilizadas de *Ae. aegypti*, é vantajoso que as armadilhas tratadas atraíam mosquitos *Culex* para oviposição.

Os estudos de laboratório que avaliam a influência dos padrões de desenvolvimento larvário sobre as escolhas das fêmeas grávidas, são geralmente pontuais e limitados, enquanto no campo uma gama de compostos reguladores influencia no comportamento de oviposição dos mosquitos. Estudos que envolvem a avaliação das bactérias em água de criação estão quase sempre limitados às condições controladas de um insetário, distantes da realidade dos criadouros naturais e artificiais encontrados no campo. Ensaio baseado na cultura e na metagenômica de bactérias e microrganismos eucarióticos encontrados em criadouros naturais e artificiais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, não foram capazes de correlacionar a presença dos mosquitos com a prevalência de microrganismos (SHELOMI, 2019). A diversidade microbiana de 57 amostras analisadas das 2 cidades de Taiwan foi altamente variável, cujas espécies ultrapassaram 6.000 unidades taxonômicas entre bactérias e microrganismos eucarióticos, e chegou a aproximadamente 1.800 espécies em apenas um microambiente. Portanto, é improvável que apenas algumas espécies de bactérias nos criadouros estejam relacionadas à atratividade de oviposição. As tentativas de entender a ecologia dos mosquitos usando variáveis isoladas fornecem resultados fragmentados, e assumir esses dados como um padrão de comportamento no campo, onde os diferentes fatores de escala fina afetam o desenvolvimento dos mosquitos (MURDOCK et al., 2017), é bastante arriscado. Por essas razões, avaliar o comportamento dos mosquitos no campo é de extrema importância.

A primeira isca de oviposição testada em campo para coletar fêmeas grávidas de mosquitos utilizou infusões a partir de uma mistura de plantas desidratadas (REITER, 1983). As infusões podem ser atrativas para fêmeas grávidas de *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e

Ae. albopictus, sendo bastante utilizadas como iscas em armadilhas para coletar ovos durante o controle entomológico, ou coletar fêmeas grávidas para auxiliar na vigilância de arbovírus (BARBOSA et al., 2007; LEE; KOKAS, 2004; SANTOS et al., 2003). Apesar dos seus odores fétidos decorrentes da decomposição de folhas em meio aquoso terem sido apontados como um fator atrativo, infusões não fétidas das folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale*) também atraíram fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*, demonstrando uma alternativa que reduz o desconforto em trabalhar com essas soluções (SANTOS et al., 2010).

No entanto, a eficiência das infusões não está diretamente relacionada aos odores produzidos durante processo de fermentação. Ponnusamy et al. (2010) avaliaram a atratividade dos mosquitos frente à oito diferentes infusões, merecendo destaque infusão de folhas de grama (*Arundinaria gigantea*) e do carvalho branco (*Quercus alba*), mas a coleta de ovos nos recipientes tratados com infusão esterilizada por filtração não diferiu da coleta dos controles, mesmo na presença do aspecto odorífero nas infusões esterilizadas. Analisando os metabólitos bacterianos mais prevalentes nas infusões de grama, uma mistura de ácidos carboxílicos foi identificada e sintetizada para avaliação em ensaios de oviposição, merecendo destaque o ácido tetradecanoico, cujos recipientes tratados com 10 ng em 30 ml de água coletaram aproximadamente 85% dos ovos observados de *Ae. aegypti* (PONNUSAMY et al., 2008). Além disso, isolados de 14 bactérias comumente encontradas nas infusões de grama foram avaliadas e demonstraram que, na mesma infusão, alguns isolados foram altamente atraentes para fêmeas grávidas dos mosquitos, enquanto outras foram altamente repelentes (PONNUSAMY et al., 2015). Portanto, as infusões provavelmente são atrativas no campo em virtude dos metabólitos produzidos por algumas bactérias, e que os subsequentes odores envolvidos na decomposição das folhas podem não garantir sua eficiência.

É importante mencionar que a prevalência das espécies de bactérias que atraem sobre as que repelem na mesma infusão pode mantê-la atrativa, mas o controle desta importante variável não é esclarecido. Não há relatos sobre a influência dos diferentes procedimentos metodológicos para obtenção de infusões em relação a produção de bactérias atrativas para oviposição. É possível que a diversidade de bactérias seja influenciada pelo tipo de água utilizado, pela seleção das folhas e sua possível dessecação, pela forma de acondicionamento da infusão, por quanto tempo deverá fermentar e qual a possível validade. Além disso, a exposição das plantas a diferentes fatores ambientais, como a diversidade de nutrientes ou de poluição no solo, de temperatura e umidade e de infecção por patógenos, influenciam no estresse oxidativo das plantas e nos seus metabólitos secundários (XIE et al., 2019), que podem resultar na produção de infusões com diferentes composições. Portanto, mais esclarecimentos

são necessários, e o uso dos isolados das bactérias como iscas de oviposição, ao invés da infusão, deve ser considerado para padronizar o efeito de coleta nas armadilhas (PONNUSAMY et al., 2015).

Efetuar controle de mosquitos utilizando armadilhas associadas à isca de oviposição com praticidade e baixo custo é um desafio. Nascimento et al. (2020) compararam a sensibilidade das ovitrampas tratadas com infusão de grama (*Megathyrsus maximus*) em relação ao método convencional do LIRAA (Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti*), em Cambé-PR. A sensibilidade do Índice de Infestação nas Propriedade gerados pelas armadilhas (54%) foi extremamente mais sensível em relação ao LIRAA (1,3%), mas produzir infusões de grama para ações de monitoramento e/ou controle em larga escala, implica na produção e no transporte de centenas de litros da infusão. Em relação ao tratamento de ovitrampas com nossos extratos larvais, foi necessário transportar tubos de Falcon com até 10 ml do extrato bruto, para então serem transferidos para armadilhas com 1 ou 2 litros de água adquirida no próprio lugar de instalação, demonstrando maior praticidade para cobrir armadilhas em larga escala. Costa (2010) comparou em campo a eficiência de armadilhas MosquiTRAP® tratadas com água de criação larvária em relação às armadilhas com infusão de grama (*Panicum maximum*) e armadilhas controles, onde ambos os tratamentos coletaram médias superiores de ovos em relação às armadilhas controles, enquanto as médias dos tratamentos não difeririam entre si. No entanto, sua avaliação também envolveu transportar litros de água de criação larvária e reproduzir esse método em larga escala pode ser um grande desafio. Outro aspecto vantajoso constatado em nosso estudo sobre o uso dos extratos larvais como iscas de oviposição, foi a sua viabilidade mesmo após três anos de congelamento (-20 °C), podendo fazer diferença não apenas para a rotina de criação em larga escala, quanto para a viabilidade do material produzido e seu transporte para o campo.

A associação das ovitrampas e das BR-OVTs com extratos larvais e biolarvicidas demonstram ser alternativas eficientes para o monitoramento e, principalmente, para o controle entomológico, especialmente envolvendo mosquitos *Aedes*, uma vez que as espécies são capazes de dispersar ovos do mesmo ciclo gonotrófico em mais de 10 recipientes, graças ao comportamento de oviposição em saltos (ABREU et al., 2015). Armadilhas com estimulantes de oviposição podem induzir mosquitos *Aedes* a depositarem mais ovos em um ambiente tratado com biolarvicida, reduzindo assim o número de ovos depositados em locais não tratados, ou até mesmo reduzir a procura por outros sítios de oviposição. Nossas armadilhas tratadas e não tratadas mostraram um IPO de quase 100%, comprovando a sua sensibilidade, com IDO das armadilhas tratadas com extratos larvais sempre superiores em todas as avaliações. Durante

três anos, Regis et al. (2013) disseminaram 5.680 ovitrampas tratadas com água e Bti como um dos métodos de controle integrado para mosquitos *Aedes* em Santa Cruz do Capibaribe e Ipojuca, dois municípios de Pernambuco, eliminado mais de 3.500.000 ovos nas regiões, cujas ações auxiliaram a reduzir a densidade populacional dos mosquitos em mais de 90%. Supomos que se as ovitrampas fossem tratadas com extratos de larvas desidratadas, a coleta de ovos poderia ser ainda mais expressiva, auxiliando a reduzir a densidade populacional a níveis superiores.

Em relação à estabilidade dos estimulantes e/ou atraentes à oviposição presentes nas larvas liofilizadas, as amostras continuaram viáveis mesmo após 3 anos de liofilização, o que provavelmente está relacionada a algum componente conservador presente no corpo da larva, uma vez que os semioquímicos apresentam voláteis ou estimulantes que não costumam persistir no campo por muito tempo (ZANARDI et al., 2019). Avaliando a persistência da estimulação à oviposição dos extratos larvais *in natura* em campo, as armadilhas tratadas coletaram significativamente mais ovos em relação às armadilhas controle em até 15 dias de exposição, mas nas subsequentes semanas, a coleta de ovos foi indiferente em relação às armadilhas controle. Entre os mosquitos *Aedes*, é provável que a comunicação química por meio de compostos de lenta degradação também seja um importante fator adaptativo, uma vez que a busca por sítios de oviposição e a dispersão de ovos podem durar mais de 9 dias (REITER, 2007). Além disso, os criadouros artificiais podem ter temperaturas mais elevadas (± 5 °C) em relação aos criadouros naturais (LI et al., 2014).

Ao final dos 60 dias das avaliações sobre a persistência estimulativa dos extratos larvais em campo, notamos que tanto os extratos larvais quanto a água do controle estavam escurecidos, provavelmente em decorrência da decomposição das palhetas de Eucatex. Este fato se tornou intrigante quando nos questionamos se a decomposição de fibras de madeira em meio aquoso exerceria algum efeito na deposição de oviposição de *Ae. aegypti*. Para testar essa influência, avaliamos em laboratório extratos larvais expostos em campo durante 60 dias em contato com palheta de Eucatex. Ao término das avaliações, observamos que os extratos das armadilhas com palhetas de Eucatex coletaram médias superiores ovos em relação aos extratos das armadilhas com tecido de algodão. Provavelmente a degradação da madeira no ambiente aquoso estimula a proliferação de bactérias, fator que pode ter criado um viés nos experimentos de persistência da atividade estimulativa à oviposição dos extratos. Apesar dos recipientes com extratos larvais expostos em tecido de algodão coletarem valores semelhantes aos dos recipientes controles, parece arriscado afirmar que o extrato não é estimulativo, pois um ensaio pareado com um recipiente controle não foi realizado. Portanto, nos limitamos a afirmar que a

degradação das palhetas pode exercer uma influência estimulativa/atrativa no comportamento de oviposição dos mosquitos *Aedes*. Avaliações sobre o comportamento de oviposição dos mosquitos frente a recipientes contendo água em que houve degradação de palhetas de Eucatex são importantes, uma vez que é um substrato de oviposição muito utilizado e que pode provocar atratividade/estimulação à oviposição.

Em outro contexto, as iscas de oviposição também são valiosas para coleta de fêmeas grávidas dos mosquitos durante vigilância de arbovírus, pois as armadilhas tratadas terão maior probabilidade de coletar fêmeas infectadas com patógenos circulantes (LEAL et al., 2008). Assim, é possível detectar com mais precisão a circulação de arbovírus nas proximidades por onde as armadilhas foram instaladas. Esta particularidade é importante, pois a escolha equivocada da isca pode trazer dados falso-negativos em relação a vigilância entomológica. O uso de CO₂ como isca para captura de adultos em armadilhas é observado em alguns contextos (AMOS; CARDÉ, 2021; WU et al., 2020), porém, o estado fisiológico das fêmeas atraídas para este tipo de isca, que encontram no CO₂ uma evidência de hospedeiro, podem não servir para a vigilância, pois são atrativas para os mosquitos que procuram alimentação sanguínea, consequentemente atraindo a grande parcela da população de mosquitos que ainda não realizou repasto sanguíneo, dificultando coletar informações sobre a circulação de arbovírus. No entanto, as iscas utilizadas para atrair fêmeas grávidas dos mosquitos têm maior eficiência para trazer índices verdadeiros sobre a circulação de arbovírus (JOHNSON; RITCHIE; FONSECA, 2017).

Schultes et al. (2021) avaliou os índices entomológicos gerados pelas ovitrampas entre 2006 e 2018 em Belo Horizonte, para analisar a dinâmica espaço-temporal de *Ae. aegypti* em relação a incidência da febre da dengue, e verificou que as mudanças na distribuição espacial entre ovos de *Aedes* não explicaram os padrões espaciais na incidência da doença. Dessa forma, a utilidade das ovitrampas na vigilância de adultos e de arboviroses pode ser ineficaz, pois não trazem dados relacionados à densidade de adultos, uma vez que os ovos coletados de *Aedes* não informam o número de visitas de fêmeas, nem o de visitas por estas nas armadilhas, senão por análise de marcadores genéticos (COLTON; CHADEE; SEVERSON, 2003), nem sobre o sorotipo viral circulante, pois eventos de transmissão transovariana são raros em comparação à transmissão vertical (GUEDES et al., 2010). Entre as armadilhas de mosquitos, apenas as que capturam adultos vivos são capazes de fornecer subsídio para vigilância de arbovírus, e devido ao alto investimento necessário para promover uma cobertura efetiva de vigilância, a coleta de adultos é realizada eventualmente por operadores munidos de aspiradores de insetos (GUEDES et al., 2017b; PAIVA et al., 2020).

Para auxiliar na vigilância de arbovírus transmitidos por mosquitos, armadilhas de baixo custo que sejam capazes de coletar mosquitos vivos, servindo então para o diagnóstico vetorial, são importantes. Desenvolvemos um modelo de armadilha com o propósito de coletar ovos e mosquitos adultos, e observamos seu desempenho em campo simulado, expondo 50 fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em um ambiente confinado com interferências das variações de temperatura, luminosidade e umidade do campo. Observamos coletas que geraram uma média de aproximadamente 20% entre os mosquitos soltos no ambiente, mas as repetições variaram entre 4 e 50% de coleta. Como em uma das repetições observamos que apenas 2 dos 50 mosquitos foram capturados, mas foram coletados na mesma armadilha 450 ovos, um dos maiores valores de ovos observados, acreditamos que existe uma margem de fuga que merece atenção. O entendimento sobre os limites do comportamento de busca e de fuga do mosquito ainda são desconhecidos e por isso o desenho de armadilhas com esse propósito se torna um desafio. No entanto, a armadilha está recebendo aperfeiçoamentos para otimizar o seu poder de aprisionamento.

Embora em nossas observações de campo simulado as armadilhas estivessem associadas aos extratos de larvas e Bti, ainda não sabemos o potencial atrativo desta isca, podendo apenas ter sido estimulativo à oviposição. O novo modelo de armadilha pode ter sido atrativo graças aos fatores de umidade e de cor preta do recipiente, mas não pela existência de cairomônios e feromônios de oviposição. Portanto, para observar a eficiência da nova armadilha, alguns aspectos estão sendo avaliados. O primeiro deles, está relacionado a utilização de atraentes de oviposição, pois outros modelos de armadilhas comprovaram sua eficiência associando atraentes de oviposição de *Aedes* e de *Culex*, demonstrando ser um fator decisivo para o sucesso da armadilha (BARBOSA et al., 2010; JOHNSON; RITCHIE; FONSECA, 2017; LEAL et al., 2008; POULIN et al., 2017; XAVIER et al., 2020). O segundo aspecto está relacionado a sua eficiência no campo frente a coexistência entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, possibilitando observar seu poder de coleta para ambas as espécies. Por último, estamos observando o potencial da nova armadilha em coletar mosquitos machos, uma vez que a remoção dos machos no campo também pode ser um fator que auxilie no controle entomológico, pois pode reduzir o encontro entre mosquitos que buscam acasalamento.

Diante do exposto, extratos larvais de *Ae. aegypti* e Bti têm potencial para aplicação no manejo integrado entre os mosquitos *Aedes* e *Culex*, que representam os gêneros mais importantes no âmbito da entomologia médica. A logística desta estratégia *attract-and-kill* pode ser ainda mais simplificada quando os ingredientes ativos forem identificados, substituindo o extrato larval pelas contrapartes atrativas e/ou estimulativas sintéticas de oviposição. Por

enquanto, larvas descongeladas ou liofilizadas podem ser usadas como isca de oviposição em campo para monitoramento e controle populacional de mosquitos. Por outro lado, observamos que há potencial no novo modelo de armadilha, mas que sua estrutura requer mudanças que permitam o aprisionamento definitivo dos mosquitos. O aperfeiçoamento da nova armadilha, além do seu uso atrelado com atraentes de oviposição em campo, trarão resultados mais esclarecedores sobre a sua eficácia.

8 CONCLUSÕES

1. Extratos aquosos de larvas de *Aedes aegypti* foram eficientes para coletar ovos intra e interespecíficos em condições de laboratório;
2. O congelamento e a desidratação por liofilização ou estufa não comprometeram as propriedades estimulativas à oviposição presentes no extrato aquoso de larvas;
3. Amostras de larvas conservadas por congelamento mantiveram-se viáveis por mais de seis meses, aspecto que potencializa o aproveitamento da sua produção em larga escala.
4. As armadilhas associadas com extratos larvais de *Aedes aegypti* e Bti foram eficientes na estratégia *attract-and-kill*, podendo esta combinação ser utilizada no campo como uma isca de oviposição letal;
5. Extratos larvais utilizando o solvente dimetilsufóxido mantiveram as propriedades estimulativas para oviposição de *Aedes aegypti*, mas o oposto foi observado nos extratos larvais hexânicos;
6. A BR-Adult mostrou baixo potencial para a coleta de mosquitos adultos, embora foi eficaz para coletar ovos de *Aedes aegypti* em campo simulado.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. V. S. DE et al. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 5, p. 669–76, ago. 2015.

AFIFY, A. **Cues of mosquito host finding and oviposition site selection**. 2014. 139p. Dissertation (Doctor of Natural Sciences) - Universität Konstanz, Konstanz, 2014.

ALBENY-SIMÕES, D. et al. Attracted to the enemy: *Aedes aegypti* prefers oviposition sites with predator-killed conspecifics. **Oecologia**, Berlin, v. 175, n. 2, 2014.

ALBUQUERQUE, A. L. DE et al. Development of a molecular xenomonitoring protocol to assess filariasis transmission. **Experimental Parasitology**, New York, v. 215, n. May, p. 107918, ago. 2020.

ALBUQUERQUE, C. M. DE et al. Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área da Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 314–315, jun. 2000.

ALLAN, S. A.; KLINE, D. L. Larval Rearing Water and Preexisting Eggs Influence Oviposition by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 35, n. 6, p. 943–947, 1 nov. 1998.

ALMEIDA, P. S. DE et al. Distribuição espacial de *Aedes albopictus* na região sul do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1094–1100, dez. 2006.

AMORIM, L. B. et al. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. **Pest Management Science**, v. 69, n. 12, p. 1307–1314, dez. 2013.

AMOS, B. A.; CARDÉ, R. T. Efficiency of the CO₂-baited omni-directional Fay-Prince trap under semi-field conditions and characterizing response behaviours for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 1, p. mve.12516, 29 mar. 2021.

ANDREADIS, S. S.; MICHAELAKIS, A. *Culex* sp. oviposition pheromone: a review on its synthesis and behavioural studies. **Pheromones and other semiochemicals**, Antibes, v. 99, p. 199–206, 2014.

ARAÚJO, A. P. et al. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Pernambuco, Brazil for Resistance to Temephos, Diflubenzuron, and Cypermethrin and Characterization of Potential Resistance Mechanisms. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 19, n. 3, 1 maio 2019.

ARAÚJO, A. P. et al. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Pernambuco, Brazil for Resistance to Temephos, Diflubenzuron, and Cypermethrin and Characterization of Potential Resistance Mechanisms. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 19, n. 3, 1 maio 2019.

AYRES, C. F. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. March, p. 278–279, 2016.

BAIK, L. S. et al. Circadian Regulation of Light-Evoked Attraction and Avoidance Behaviors in Daytime- versus Nighttime-Biting Mosquitoes. **Current Biology**, London, v. 30, n. 16, p. 3252- 3259.e3, ago. 2020.

BARBOSA, P.; PETERS, T. M.; GREENOUGH, N. C. Overcrowding of Mosquito Populations: Responses of Larval *Aedes aegypti* to Stress. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 1, n. 1, p. 89–93, 1972.

BARBOSA, R. M. R. et al. Evaluation of an oviposition-stimulating kairomone for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, in Recife, Brazil. **Journal of vector ecology, Santa Ana**, Santa Ana, v. 35, n. 1, p. 204–7, 25 jun. 2010.

BARBOSA, R. M. R. et al. Infestation of an endemic arbovirus area by sympatric populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, n. 4, p. 1–9, 2020.

BARBOSA, R. M. R. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 523–9, 1 jun. 2007b.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: CHARLES, J.F; DELÉCLUSE A.; NIELSEN-LE R. C. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 383–398.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and Their Control**. 2. ed. New York: Springer, 2010.

BENTLEY, M. D.; MCDANIEL, I. N.; LEE, H. P. Studies of *Aedes triseriatus* oviposition attractants produced by larvae of *Aedes triseriatus* and *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 13, n. 1, p. 112–115, 1976.

BENZON, G. L.; APPERSON, C. S. Reexamination of Chemically Mediated Oviposition Behavior in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 25, n. 3, p. 158–164, 1 maio 1988.

BERNIER, U. R. et al. Chemical analysis of human skin emanations: comparison of volatiles from humans that differ in attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 18, n. 3, p. 186–95, 2002.

BERNIER, U. R.; KLINE, D. L.; POSEY, K. H. Human Emanations and Related Natural Compounds That Inhibit Mosquito Host-Finding Abilities. In: DEBBOUN, M.; FRANCES, S. P.; STRICKMAN, D. (Eds.). **Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 495.

BHATTACHARYA, S.; BASU, P.; SAJAL BHATTACHARYA, C. The Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Delhi, v. 73, n. 42, p. 73–81, 2016.

BIDLINGMAYER, W. L. et al. Mosquito Flight Paths in Relation to the Environment. Influence of Blood Meals, Ovarian Stage and Parity. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 67, n. 6, p. 919–927, 1974.

BIRCH, K. F.; HAYNES, E. A. Insect Pheromones. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 10, n. 1, p. 189–191, 1984.

BLACKWELL, A.; JOHNSON, S. N. Electrophysiological investigation of larval water and potential oviposition chemo-attractants for *Anopheles gambiae* s.s. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 94, n. 4, p. 389–398, 2000.

BOULLIS, A. et al. Behavioural and antennal responses of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) gravid females to chemical cues from conspecific larvae. **PLoS ONE, San Francisco**, v. 16, n. 2, p. e0247657, 24 fev. 2021.

BRAGA, I. A. et al. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 347–353, 2000.

BRAKS, M. A. H.; LEAL, W. S.; CARDÉ, R. T. Oviposition Responses of Gravid Female *Culex quinquefasciatus* to Egg Rafts and Low Doses of Oviposition Pheromone Under Semifield Conditions. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 33, n. 3, p. 567–578, 15 fev. 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. 2009. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf> Acesso em: 28 mai. 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Plano de Contingência Nacional para Epidemias de Dengue**. 2015. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_contingencia_nacional_epidemias_dengue.pdf> Acesso em: 25 mai. 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf> Acesso em: 25 mai. 2021.

BRITO, M.; FORATTINI, O. P. Productivity of *Aedes albopictus*' breeding containers in Paraíba Valley, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 209–215, 2004.

CARVALHO-LEANDRO, D. DE et al. Temporal distribution of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae), in a Hospital in Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 701–706, 2010.

CARVALHO, G. C. DE et al. Composition and diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban parks in the South region of the city of São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 17, n. 2, 2017.

CHADEE, D. D. et al. Oviposition response of *Aedes aegypti* mosquitoes to different concentrations of hay infusion in Trinidad, West Indies. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno,, v. 9, n. 3, p. 346–8, 1993.

CHADEE, D. D.; MARTINEZ, R. Landing periodicity of *Aedes aegypti* with implications for dengue transmission in Trinidad, West Indies. **Journal of vector ecology**, Santa Ana, v. 25, n. 2, p. 158–163, dez. 2000.

CHANDRASEGARAN, K. et al. Context-dependent interactive effects of non-lethal predation on larvae impact adult longevity and body composition. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e0192104, 5 fev. 2018.

CHANDRASEGARAN, K.; JULIANO, S. A. How Do Trait-Mediated Non-lethal Effects of Predation Affect Population-Level Performance of Mosquitoes? **Frontiers in Ecology and Evolution**, Melbourne, v. 7, n. FEB, p. 1–12, 12 fev. 2019.

CHEDIAK, M. et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 5, p. 311–21, maio 2016.

CHISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.) **The yellow fever mosquito**. I ed. Cambridge: The Syndics of the Cambridge University Press, Cambridge, 1960.

CILEK, J. E.; KNAPP, J. A.; RICHARDSON, A. G. Comparative Efficiency of Biogents Gravid *Aedes* Trap, Cdc Autocidal Gravid Ovitrap, and CDC Gravid Trap in Northeastern Florida. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno,, v. 33, n. 2, p. 103–107, 2017.

CLEMENTS, A. N. **Biology of mosquitoes**. Development, nutrition and reproduction. 1. Ed. Wallingford: The Centre for Agriculture and Bioscience International, 1992.

CLEMENTS, A. N. **Biology of Mosquitoes**. Sensory Reception and Behaviour. 1. ed. Wallingford: The Centre for Agriculture and Bioscience International, 1999.

CLEMENTS, A. N. **Biology of Mosquitoes**. Transmission of Viruses and Interactions with Bacteria. 1. ed. Wallingford: The Centre for Agriculture and Bioscience International, 2011.

CODEÇO, C. T. et al. Surveillance of *Aedes aegypti*: Comparison of House Index with Four Alternative Traps. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e0003475, 10 fev. 2015.

COLLIER, C. G. The impact of urban areas on weather. **Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society**, Malden, v. 132, n. 614, p. 1–25, 1 jan. 2006.

COLTON, Y. M.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 195–204, jun. 2003.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1994.

CORBET, P. S.; CHADEE, D. D. An improved method for detecting substrate preferences shown by mosquitoes that exhibit 'skip oviposition'. **Physiological Entomology**, London, v. 18, n. 2, p. 114–118, 1993.

COSTA, L. H. **Avaliação de infoquímicos presentes em ovos e larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) como atraentes e/ou estimulantes de oviposição para grávidas co-específicas**. 2010. 129p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

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**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e87468, 3 fev. 2014.

CRISTINA, L. et al. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 83, n. 43–52, p. 43–52, 2015.

DAVIS, T. J. et al. The Effects of Larval Habitat Quality on *Aedes albopictus* Skip Oviposition. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 31, n. 4, p. 321–328, dez. 2015.

DAVIS, T. J.; KLINE, D. L.; KAUFMAN, P. E. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) oviposition preference as influenced by container size and *Buddleja davidii* plants. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DOW, R. P.; GERRISH, G. M. Day-to-day change in relative humidity and the activity of *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 63, n. 4, p. 995–999, 1970.

DZUL-MANZANILLA, F. et al. Indoor resting behavior of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Acapulco, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 54, n. 2, p. 501–504, 2018.

EASTWOOD, G. et al. The vector ecology of introduced *Culex quinquefasciatus* populations, and implications for future risk of West Nile virus emergence in the Galápagos archipelago. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 44–55, 31 mar. 2019.

EBBS, M. L.; AMREIN, H. Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, Berlin, v. 454, n. 5, p. 735–747, 2007.

FACCHINELLI, L. et al. Development of a novel sticky trap for container-breeding mosquitoes and evaluation of its sampling properties to monitor urban populations of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 183–195, jun. 2007.

FAIERSTEIN, G. B. et al. Conspecific and allospecific larval extracts entice mosquitoes to lay eggs and may be used in attract-and-kill control strategy. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 13747, 24 dez. 2019.

FARMER, E. E. Toxorhynchites. **The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 8, p. 129–132, 2007.

FAY, R. W.; PERRY, A. S. Laboratory studies of ovipositional preference of *Ae. aegypti*. **Mosquito News**, Fresno, v. 25, n. 3, p. 276–281, 1965.

FERVEUR, J. F. Cuticular hydrocarbons: Their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. **Behavior Genetics**, New York, v. 35, n. 3, p. 279–295, 2005.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. **Viruses**, Basel, v. 12, n. 11, p. 1233, 30 out. 2020.

FLACIO, E. et al. Strategies of a thirteen year surveillance programme on *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*) in southern Switzerland. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 1962.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 676–677, 2003.

FOSTER, Woodbridge A.; WALKER, Edward D. Mosquitoes (Culicidae). In: **Medical and Veterinary Entomology**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 261–325.

FREDERIKSEN, H. Historical evidence for interference between dengue and yellow fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 4, n. 3, p. 483–491, 1955.

GHANINIA, M.; IGNELL, R.; HANSSON, B. S. Functional classification and central nervous projections of olfactory receptor neurons housed in antennal trichoid sensilla of female yellow fever mosquitoes, *Aedes aegypti*. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 1611–1623, 2007.

GIORDANO, B. V. et al. Light Trap Collections of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Using Dry Ice and Octenol Attractants in Adjacent Mosquito Control Programs. **Florida Entomologist**, Florida, v. 103, n. 4, p. 499–504, 13 jan. 2021.

GOMES, A. D. S.; SCIAVICO, C. J. D. S.; EIRAS, Á. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 327–332, 2006.

GONZALEZ, P. V.; GONZÁLEZ AUDINO, P. A.; MASUH, H. M. Electrophysiological and behavioural response of *Aedes albopictus* to n-heinecosane, an ovipositional pheromone

of *Aedes aegypti*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 191–197, jun. 2014.

GONZALEZ, P. V.; GONZÁLEZ AUDINO, P. A.; MASUH, H. M. Oviposition Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Response to the Presence of Heterospecific and Conspecific Larvae. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 53, n. 2, p. 268–272, mar. 2016.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, London, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S3–S11, 2011.

GUEDES, D. R. D. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal of vector borne diseases**, Delhi, v. 47, n. 2, p. 67–75, jun. 2010.

GUEDES, D. R. D. et al. Circulation of DENV2 and DENV4 in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Praia , Santiago Island , Cabo Verde. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 17, n. 4, p. 1–6, 2017a.

GUEDES, D. R. D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging microbes & infections**, Philadelphia, v. 6, n. 8, p. e69, 9 ago. 2017b.

HILL, S. R.; HANSSON, B. S.; IGNELL, R. Characterization of Antennal Trichoid Sensilla from Female Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. **Chemical Senses**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 231–252, 16 dez. 2008.

HIMEIDAN, Y. E. et al. Chemical Cues for Malaria Vectors Oviposition Site Selection: Challenges and Opportunities. **Journal of Insects**, London, v. 2013, p. 1–9, 2013.

HOEL, D. F. et al. Efficacy of Ovitrap Colors and Patterns for Attracting *Aedes albopictus* at Suburban Field Sites in North-Central Florida. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 27, n. 3, p. 245–251, 2011.

HOLIGHAUS, G.; ROHLFS, M. Fungal allelochemicals in insect pest management. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5681–5689, 5 jul. 2016.

HONNEN et al. Artificial Light at Night Influences Clock-Gene Expression, Activity, and Fecundity in the Mosquito *Culex pipiens* f. *molestus*. **Sustainability**, v. 11, n. 22, p. 6220, 6 nov. 2019.

JIA, P. et al. How does the dengue vector mosquito *Aedes albopictus* respond to global warming? **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 140, 11 dez. 2017.

JOHNSON, B.; RITCHIE, S.; FONSECA, D. The State of the Art of Lethal Oviposition Trap-Based Mass Interventions for Arboviral Control. **Insects**, Basel, v. 8, n. 1, p. 5, 8 jan. 2017.

KANDEL, E. R. et al. **Princípios de Neurociências**. 5. ed. New York: Artmed, 2014.

KANG, D. S. et al. Larval stress alters dengue virus susceptibility in *Aedes aegypti* (L.) adult females. **Acta Tropica**, v. 174, p. 97–101, 2017.

KARLSON, P.; LUSCHER, M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, v. 183, n. 4653, p. 55–56, 1959.

KAUR, J. S.; LAI, Y. L.; GIGER, A. D. Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 457–460, dez. 2003.

KAWADA, H. et al. Comparative study on nocturnal behavior of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 42, n. 3, p. 312–8, maio 2005.

KENNEDY, J. S. On water-finding and oviposition by captive mosquitoes. **Bulletin of Entomological Research**, v. 32, n. 1922, p. 279–301, 1942.

KILLICK-KENDRICK, R. Medical entomology for students. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, n. 5, p. 590, set. 1996.

KLINE, D. L. Semiochemicals, traps/targets and mass trapping technology for mosquito management. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 2 Suppl, p. 241–51, jan. 2007.

KOENRAADT, C. J. M.; TAKKEN, W. Cannibalism and predation among larvae of the *Anopheles gambiae* complex. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 61–66, mar. 2003.

KOTHERA, L. et al. Bloodmeal, Host Selection, and Genetic Admixture Analyses of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in Chicago, ILfile:///C:/Users/GFaie/Desktop/artigos para anexar Mendeley/dzul-manzanilla2016.pdf. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 57, n. 1, p. 78–87, 9 jan. 2020.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 2015.

KROCKEL, U. et al. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 2, p. 229–38, jun. 2006.

KUMAWAT, R. et al. Use of different coloured ovitraps in the surveillance of *Aedes* Mosquitoes in an arid-urban area of western rajasthan, india. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 51, n. 4, p. 320–326, 2014.

LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. erythro-6-Acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, London, v. 1992, n. 1, p. 59, 1982.

LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. An oviposition attractant pheromone in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 75, n. 2, p. 283–290, 1985.

LEAL, W. S. et al. Identification, Synthesis, and Field Evaluation of the Sex Pheromone from the Citrus Leafminer, *Phyllocnistis citrella*. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 32, n. 1, p. 155–168, 26 jan. 2006.

LEAL, W. S. et al. Reverse and Conventional Chemical Ecology Approaches for the Development of Oviposition Attractants for *Culex* Mosquitoes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 8, p. e3045, 22 ago. 2008.

LEE, J.-H.; KOKAS, J. E. Field evaluation of CDC gravid trap attractants to primary West Nile virus vectors, *Culex* mosquitoes in New York State. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 20, n. 3, p. 248–53, set. 2004.

LI, Y. et al. Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e3301, 13 nov. 2014.

LIMA, J. B. P. et al. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 77, n. 3, p. 467–477, 2007.

LIU, C. et al. Distinct olfactory signaling mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. 27–28, 2010.

LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 89, n. 4, p. 595–645, 1988.

LOUNIBOS, L. P. Habitat Segregation among African Treehole Mosquitos. **Ecological Entomology**, London, v. 6, n. 2, p. 129–154, 1981.

LOUNIBOS, L. P. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 233–66, 2002.

LU, W. et al. DEET as a feeding deterrent. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 12, p. e0189243, 14 dez. 2017.

LUNA, E. J. A. et al. A cohort study to assess the incidence of dengue, Brazil, 2014–2018. **Acta Tropica**, Basel, v. 204, n. October 2019, p. 105313, abr. 2020.

MARIN, G. et al. Does colour of ovitrap influence the ovipositional preference of *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera: Culicidae). **International Journal of Mosquito Research**, Delhi v. 7, n. 2, p. 11–15, 2020.

MARQUES, C. C. A.; MIRANDA, C. Influência de extratos de formas evolutivas sobre atividades de oviposição de fêmeas de *Aedes (s) albopictus* (Skuse). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 269–271, ago. 1992.

MARQUES, G. R. A M. et al. Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti*. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 579–587, 2012.

MARTINS, M.; GUIMARÃES, R. C. S.; FONTES, G. Interruption of lymphatic filariasis transmission in Manaus, a former focus of *Wuchereria bancrofti* in the Western Brazilian Amazon. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v. 45, p. 1–6, 2021.

- MCCALL, P. J.; EATON, G. Olfactory memory in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 197–203, 2001.
- MCLVER, S. B. Sensilla of Mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 19, n. 5, p. 489–535, 1982.
- MEDEIROS, M. C. I. et al. Dispersal of male and female *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes using stable isotope enrichment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, London, v. 11, n. 1, p. e0005347, 30 jan. 2017.
- MEINWALD, J.; LEAL, W. S.; KUBANEK, J. Molecules as Biotic Messengers. **ACS Omega**, Madrid, v. 3, n. 4, p. 4048–4053, 30 abr. 2018.
- MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Integrated technologies for biological, mechanical and genetic control of *Aedes aegypti*. **Revista brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 28, n. 1, p. 58–63, 2017.
- MENDKI, M. J. et al. Heneicosane: An oviposition-attractant pheromone of larval origin in *Aedes aegypti* mosquito. **Scientific Correspondence**, London, v. 78, n. 11, p. 1295–1296, 2000.
- MILLAR, J. G.; CHANEY, J. D.; MULLA, M. S. Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented *Bermuda* grass infusions. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 8, n. 1, p. 11–17, 1992.
- MONNIN, T.; MARIE, P. Chemical recognition of reproductive status in social insects. **Annales Zoologici Fennici**, Helsinki, v. 43, n. 5/6, p. 515–530, 2006.
- MONTE-MÓR, R. L. What is the urban in the contemporary world? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 942–948, jun. 2005.
- MUIR, L. E.; THORNE, M. J.; KAY, B. H. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vision: spectral sensitivity and other perceptual parameters of the female eye. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 29, n. 2, p. 278–281, 1992.
- MULHERN, T. D. New Jersey mechanical trap for mosquito surveys. 1942. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 1, dez. 1942.
- MURDOCK, C. C. et al. Fine-scale variation in microclimate across an urban landscape shapes variation in mosquito population dynamics and the potential of *Aedes albopictus* to transmit arboviral disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. 1–23, 2017.
- NASCIMENTO, K. L. C. et al. Comparison Between Larval Survey Index and Positive Ovitrap Index in the Evaluation of Populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) North of Paraná, Brazil. **Environmental Health Insights**, New York, v. 14, p. 117863021988657, 6 jan. 2020.
- NATAL, D. Bioecologia de *Aedes aegypti*. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 205–207, jul./dez. 2002.

NOBLE, J. M. et al. Cryo-Electron Microscopy Reveals That Sperm Modification Coincides with Female Fertility in the Mosquito *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 18537, 6 dez. 2019.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 2, n. 2, p. 211–220, 1976.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, Oxford, v. 342, n. 6157, p. 415–415, 25 out. 2013.

OLAGBEMIRO, T. O. et al. Laboratory and Field Responses of the Mosquito, *Culex quinquefasciatus*, to Plant-Derived *Culex* spp. Oviposition Pheromone and the Oviposition Cue Skatole. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 30, n. 5, p. 965–976, maio 2004.

OLDHAM, N. J.; BOLAND, W. Chemical ecology: Multifunctional compounds and multitrophic interactions. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 83, n. 6, p. 248–254, jun. 1996.

OLIVEIRA, D. S. et al. Functional Characterization of Odorant Binding Protein 27 (RproOBP27) From *Rhodnius prolixus* Antennae. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 9, n. AUG, p. 1–11, 23 ago. 2018.

OMOLADE, O. O. Oviposition and Breeding Water Sites Preferences of Mosquitoes within Ojo area, Lagos State, Nigeria. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, Chicago, v. 7, n. 5, 10 ago. 2018.

ONG, S.-Q.; JAAL, Z. Investigation of mosquito oviposition pheromone as lethal lure for the control of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 28, 2015.

OSGOOD, C. E. An oviposition pheromone associated with the egg rafts of *Culex tarsalis*. **Journal of economic entomology**, College Park, v. 64, n. 5, p. 1038–41, out. 1971.

OTIENO, W. A. et al. A field trial of the synthetic oviposition pheromone with *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae) in Kenya. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 78, n. 3, p. 463–470, 10 set. 1988.

PAIVA, M. H. S. et al. An unsettling explanation for the failure of skatole-baited ovitraps to capture *Culex* mosquitoes. **Insect Science**, Beijing, v. 26, n. 5, p. 873–880, 17 out. 2019.

PAIVA, M. H. S. et al. Sequencing of ZIKV genomes directly from *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes collected during the 2015–16 epidemics in Recife. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 80, n. July 2019, p. 104180, jun. 2020.

PAIXÃO, K. S. **Ecologia química de machos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) e identificação química de compostos presentes na cutícula de adultos**. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PAVLOVICH, S. G.; ROCKETT, C. L. Color, bacteria, and mosquito eggs as ovipositional attractants for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Great Lakes Entomologist**, East Lansing, v. 33, n. 2, p. 141–153, 2000.

PESKO, K.; MORES, C. N. Effect of Sequential Exposure on Infection and Dissemination Rates for West Nile and St. Louis Encephalitis Viruses in *Culex quinquefasciatus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New York, v. 9, n. 3, p. 281–286, jun. 2009.

PONNUSAMY, L. et al. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 27, p. 9262–9267, 8 jul. 2008.

PONNUSAMY, L. et al. Oviposition Responses of the Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to Experimental Plant Infusions in Laboratory Bioassays. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 36, n. 7, p. 709–719, 3 jul. 2010.

PONNUSAMY, L. et al. Oviposition responses of *Aedes* mosquitoes to bacterial isolates from attractive bamboo infusions. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 486, 23 dez. 2015.

POULIN, B. et al. Mosquito Traps: An Innovative, Environmentally Friendly Technique to Control Mosquitoes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 14, n. 3, p. 313, 18 mar. 2017.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108 Suppl, p. 11–7, jan. 2013.

RAJENDRAN, G. et al. Attachment behaviour of immatures of *Mansonia annulifera* (Theobald), 1901. **The Indian journal of medical research**, New Dehi, v. 89, p. 192–197, 1989.

RAMAIAH, K. D.; DAS, P. K. Seasonality of adult *Culex quinquefasciatus* and transmission of bancroftian filariasis in Pondicherry, South India. **Acta Tropica**, Basel, v. 50, n. 4, p. 275–283, abr. 1992.

RAMESH, A. et al. Development of an urban molecular xenomonitoring system for lymphatic filariasis in the Recife Metropolitan Region, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 10, p. e0006816, 16 out. 2018.

REED, J. D. ECOLOGICAL BIOCHEMISTRY OF SECONDARY PLANT COMPOUNDS IN HERBIVORE NUTRITION -Invited paper. **XVIII International Grassland Congress. Winnipeg, Manitoba (Canadá)**, Winnipeg, p. 221–226, 1998.

REEVES, L. E. et al. Identification of *Uranotaenia sapphirina* as a specialist of annelids broadens known mosquito host use patterns. **Communications Biology**, London, v. 1, n. 1, p. 92, 12 dez. 2018.

REEVES, W. C. et al. Potential Effect of Global Warming on Mosquito-Borne Arboviruses. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 31, n. 3, p. 323–332, 1 maio 1994.

- REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 115–119, 1995.
- REGIS, L. et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: Basis for surveillance, alert and control system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 50–59, fev. 2008.
- REGIS, L. N. et al. Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e67682, 3 jul. 2013.
- REGIS, L. N. et al. Characterization of the spatial and temporal dynamics of the dengue vector population established in urban areas of Fernando de Noronha, a Brazilian oceanic island. **Acta Tropica**, Londo, v. 137, p. 80–87, 2014.
- REINHARD, J. Insect Chemical Communication. **Chemosense**, Zurich, v. 6, n. 4, p. 2–6, 2004.
- REINHOLD, J.; LAZZARI, C.; LAHONDÈRE, C. Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. **Insects**, Basel, v. 9, n. 4, p. 158, 6 nov. 2018.
- REISKIND, M. H. et al. Mosquitoes of field and forest: the scale of habitat segregation in a diverse mosquito assemblage. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 44–54, mar. 2017.
- REITER, P. A portable battery-powered trap for collecting gravid *Culex* mosquitoes. **Mosquito News**, Fresno, v. 43, p. 496–498, 1983.
- REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New Rochelle, v. 7, n. 2, p. 261–73, jun. 2007.
- ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **The Journal of hygiene**, New York, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.
- SAMY, A. M. et al. Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*, Vector of West Nile Virus and Lymphatic Filariasis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. e0163863, 3 out. 2016.
- SANTOS, E. et al. Oviposition activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in response to different organic infusions. **Neotropical Entomology**, London, v. 39, n. 2, p. 299–302, abr. 2010.
- SANTOS, E. M. M. et al. Evaluation of a sticky trap (*Aedes*TraP), made from disposable plastic bottles, as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, n. 1, p. 195, 7 dez. 2012.
- SANTOS, S. A.; BARBOSA, R. M. R. Immature *Aedes* mosquitoes colonize *Culex quinquefasciatus* breeding sites in neighborhoods in the municipality of Olinda, State of

Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 775–777, 2014.

QISTA. **Qista: the eco-friendly mosquito trap. Smart Bam**. 2019. Disponível em: <https://qista.com/en/smart-bam.html>. Acesso em: 13 maio. 2021.

SANTOS, S. R. A. et al. Field evaluation of ovitraps consociated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to determine oviposition rates of *Aedes aegypti*. In: World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. **Dengue Bulletin**. v. 27, p. 156–162, 2003.

SANTOS, V. M. R. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 159–170, fev. 2007.

SCHAL, C. et al. Sites of Synthesis and Transport Pathways of Insect Hydrocarbons: Cuticle and Ovary as Target Tissues. **American Zoologist**, Utica, v. 38, p. 382–393, 1998.

SCHMIDT, T. L. et al. Fine-scale landscape genomics helps explain the slow spatial spread of *Wolbachia* through the *Aedes aegypti* population in Cairns, Australia. **Heredity**, Edinburgh, v. 120, n. 5, p. 386–395, 26 dez. 2018.

SCHOELTSZ, B. et al. Chemical Mediation of Oviposition by *Anopheles* Mosquitoes: a Push-Pull System Driven by Volatiles Associated with Larval Stages. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 46, n. 4, p. 397–409, 2 abr. 2020.

SCHULTES, O. L. et al. Spatial analysis of dengue incidence and *Aedes aegypti* ovitrap surveillance in Belo Horizonte, Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 237–255, 27 fev. 2021.

SEENIVASAGAN, T. et al. Electroantennogram, flight orientation, and oviposition responses of *Aedes aegypti* to the oviposition pheromone n-heneicosane. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, n. 4, p. 827–833, 19 mar. 2009.

SERPA, L. L. N.; MONTEIRO, S. D. B.; VOLTOLINI, J. C. Effect of larval rearing water on *Aedes aegypti* oviposition in the laboratory. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 515–517, 2008.

SHAALAN, E. A. S.; CANYON, D. V. Mosquito oviposition deterrents. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 25, n. 11, p. 10207–10217, 2018.

SHELOMI, M. Bacterial and eukaryote microbiomes of mosquito habitats in dengue-endemic southern Taiwan. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 471–480, jun. 2019.

SHRAGAI, T. et al. Oviposition site attraction of *Aedes albopictus* to sites with conspecific and heterospecific larvae during an ongoing invasion in Medellín, Colombia. **Parasites & Vectors**, Londo, v. 12, n. 1, p. 455, 18 dez. 2019.

SMALLEGANGE, R. C. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). **Chemical Senses**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 145–152, 2005.

SOMAN, R. S.; REUBEN, R. Studies on the Preference Shown by Ovipositing Females of *Aedes aegypti* for Water Containing Immature Stages of the Same Species. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 7, n. 4, p. 485–489, 25 ago. 1970.

SPENCER, M.; BLAUSTEIN, L.; COHEN, J. E. Oviposition habitat selection by mosquitoes (*Culiseta longiareolata*) and consequences for population size. **Ecological Society of America**, Washington, v. 83, n. 3, p. 669–679, 2002.

STAMP, N. E. Egg deposition patterns in butterflies: why do some species cluster their eggs rather than deposit them singly? **The American Naturalist**, Chicago, v. 115, n. 3, p. 367–380, 1980.

SUDIA, W. D.; CHAMBERLAIN, R. W. Battery-operated light trap, an improved model. **Mosquito News**, Fresno, v. 22, p. 126–129, 1962.

SUTCLIFFE, J. F. Sensory bases of attractancy: morphology of mosquito olfactory sensilla - a review. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 10, n. 2 Pt 2, p. 309–15, 1994.

TESH, R. B. et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 85, n. 4, p. 750–757, 1 out. 2011.

TREXLER, J. D. et al. Role of Bacteria in Mediating the Oviposition Responses of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 40, n. 6, p. 841–848, 1 nov. 2003.

TRIMBLE, R. M.; WELLINGTON, W. G. Oviposition Stimulant Associated with Fourth-Instar Larvae of *Aedes Togo* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 17, n. 6, p. 509–514, 30 dez. 1980.

TSUDA, A. Y. et al. Different spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* along an urban-rural gradient and the relating environmental factors examined in three villages in northern Thailand. **Journal of The American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 2, p. 222–228, 2006.

VINAUGER, C. et al. Visual-Olfactory Integration in the Human Disease Vector Mosquito *Aedes aegypti*. **Current Biology**, London, v. 29, n. 15, p. 2509–2516.e5, ago. 2019.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. **Science**, Washington, v. 171, n. 3973, p. 757–770, 1971.

WHO. **Mosquito (vector) control emergency response and preparedness for Zika virus.** Disponível em:

<http://www.who.int/neglected_diseases/news/mosquito_vector_control_response/en/>.

Acesso em: 7 mai. 2021.

WHO. **Dengue control**. Disponível em:

<http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/en/>. Acesso em: 7 mai. 2021

WHO. **Global vector control response 2017–2030**. Disponível em: <

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/259205> > Acesso em: 1 mai. 2021

WHO. **Weekly Epidemiological Record**. Disponível em:

<<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329087/WER9441-eng-fre.pdf>>. Acesso em: 10 maio. 2021.

WHO. **Vector-borne diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 10 maio. 2021.

WHO. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 5 maio. 2021.

WHO. **Lymphatic filariasis (Elephantiasis)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/lymphatic-filariasis#tab=tab_1>. Acesso em: 10 maio. 2021.

WU, Y. et al. Effect of different carbon dioxide (CO₂) flows on trapping *Aedes albopictus* with BG traps in the field in Zhejiang Province, China. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 12, p. e0243061, 1 dez. 2020.

XAVIER, M. DO N. et al. Field evaluation of sticky BR-OVT traps to collect culicids eggs and adult mosquitoes inside houses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 51, n. 3, p. 297–303, 2018.

XAVIER, M. DO N. et al. Double BR-OVT: a new trap model for collecting eggs and adult mosquitoes from *Culex quinquefasciatus* and *Aedes* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 62, n. 3, p. 257–261, 2020.

XIE, X. et al. The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. **BioMed Research International**, Hindawi, v. 2019, p. 1–11, 8 maio 2019.

XU, P. et al. Silent, generic and plant kairomone sensitive odorant receptors from the Southern house mosquito. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 961–966, 2013.

XU, P.; WEN, X.; LEAL, W. S. CO₂ per se activates carbon dioxide receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 117, n. October 2019, p. 103284, 2020.

YADAV, P.; MOURYA, D. T.; MISHRA, A. C. Effect of temperature stress on immature stages and susceptibility of *Aedes aegypti* mosquitoes to chikungunya virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 70, n. 4, p. 346–350, 1 abr. 2004.

ZAHOULI, J. B. Z. et al. Urbanization is a main driver for the larval ecology of *Aedes* mosquitoes in arbovirus-endemic settings in south-eastern Côte d'Ivoire. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0005751, 13 jul. 2017.

ZANARDI, O. Z. et al. Laboratory and field evaluation of acetic acid-based lures for male Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 12920, 9 dez. 2019.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569–572, 9 jun. 2015.

ZARA, L. DE S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.

APÊNDICE 1

Tabela S1- Número de ovos coletados avaliando diferentes equivalências de extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* na oviposição intraespecífica.

Repetições	Controle	0,1 L ₄ /ml	0,33 L ₄ /ml	0,66 L ₄ /ml	1 L ₄ /ml
1	26	187	414	571	584
2	12	78	485	679	711
3	79	188	122	556	270
4	105	105	357	492	928
5	174	132	280	511	930
6	19	42	543	89	847
7	100	282	340	660	208
8	73	128	131	178	547
9	192	433	131	493	712
10	0	357	699	406	480
11	129	591	235	551	772
12	67	81	434	404	332
Soma	976	2.604	4.171	5.590	7.321
Porcentagem	4,72	12,60	20,19	27,05	35,43
Média	81 ± 62	217 ± 167	348 ± 180	466 ± 177	610 ± 249
IAO	-	+0,45	+0,62	+0,70	+0,76

Fonte: O autor.

Legenda: L₄/ml – larva em quarto estágio por mililitro. IAO – Índice de atividade de oviposição.

APÊNDICE 2

Tabela S2- Número de ovos coletados avaliando extratos aquosos a partir de larvas contadas e de larvas pesadas de *Aedes aegypti* na oviposição intraespecífica.

Repetições	ELC	ELP	Controle
1	137	662	1.443
2	5	674	480
3	315	1.209	1.102
4	72	721	649
5	99	681	621
6	81	1.026	1.520
7	62	579	713
8	125	616	528
9	203	1.153	1.421
10	0	440	638
11	511	374	527
12	39	1.193	1.235
Soma	1.649	9.328	10.877
Porcentagem	7,55	42,68	49,77
Média	144 ± 147	795 ± 292	924 ± 405
IAO	-	+0,69	+0,73

Fonte: O autor.

Legenda: ELC- extrato larval a partir de indivíduos contados. ELP- extrato larval a partir de amostra pesada. IAO – Índice de atividade de oviposição.

APÊNDICE 3

Tabela S3- Número de ovos coletados avaliando extratos larvais filtrados e extratos larvais não filtrados de *Aedes aegypti* na oviposição intraespecífica.

Repetições	EF	ENF	Controle
1	1.199	425	467
2	1.045	1.225	400
3	800	1.490	524
4	1.901	1.428	486
5	1632	1.607	321
6	1661	1411	288
7	1807	1546	397
8	1461	1010	214
9	1059	2006	240
10	926	1235	201
1	1095	728	352
12	1484	860	77
Soma	16.070	14.971	3.967
Porcentagem	45,90	42,76	11,33
Média	1.297 ± 317	1.220 ± 444	325 ± 138
IAO	+0,60	+0,58	

Fonte: O autor.

Legenda: EF- extrato larval filtrado. ENF- extrato larval não filtrado. IAO – Índice de atividade de oviposição.

APÊNDICE 4

Tabela S4- Número de ovos coletados em duas avaliações sobre extratos larvais de *Aedes aegypti* utilizando larvas congeladas em relação à oviposição intraespecífica.

Repetições	Larvas congeladas há 3 meses		Larvas congeladas há 3 anos	
	ELD	Controle	ELD	Controle
1	725	372	596	140
2	810	399	594	297
3	1.230	580	846	227
4	1.182	348	827	267
5	1.224	278	1.351	708
6	1.720	575	-	-
Soma	6.891	2.552	4.214	1.639
Porcentagem	72,97	27,03	72	28
Média	1.149 ± 332	425 ± 116	843 ± 283	328 ± 202
IAO	+0,46	-	+0,44	-

Fonte: O autor

Lenda: ELD- extrato de larvas descongeladas. IAO – Índice de atividade de oviposição.

APÊNDICE 5

Tabela S5- Número de ovos coletados em três diferentes avaliações sobre a influência do Bti nos extratos larvais de *Aedes aegypti* e no controle em relação à oviposição intraespecífica.

Repetições	Avaliação 1		Avaliação 2		Avaliação 3	
	EL in + Bti	Controle + Bti	EL in + Bti	Controle	EL in	Controle + Bti
1	439	336	1.191	18	956	358
2	602	340	603	340	563	324
3	945	394	805	230	1.107	74
4	905	25	628	106	1.002	341
5	874	405	708	301	884	423
6	974	481	862	439	784	308
7	725	389	784	389	957	419
8	987	478	693	237	814	427
9	1.025	601	885	336	967	454
10	785	331	1.036	518	1.174	528
11	857	387	876	441	941	547
12	986	401	794	385	704	369
Soma	10.104	4.568	9.865	3.740	10.853	4.572
Porcentagem	68,87	31,13	72,51	27,49	70,36	29,64
Média	842 ± 177	381 ± 136	822 ± 167	312 ± 144	904 ± 169	381 ± 122
IAO	+0,38	-	+0,45	-	+0,41	-

Fonte: O autor

Legenda: Bti- *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*. ELin- extrato larval *in natura*. Bti- . IAO- Índice de Atividade de Oviposição.

APÊNDICE 6

Tabela S6- Número de ovos coletados avaliando extratos larvais liofilizados de *Aedes aegypti* em relação a oviposição intraespecífica.

Repetição	ELiof	Controle
1	1.049	539
2	905	475
3	752	369
4	1.006	290
5	753	465
6	1.086	486
7	677	550
8	629	269
9	629	508
10	950	577
11	958	531
12	1.083	631
Soma	10.477	5.690
Porcentagem	64,80	35,20
Média	873 ± 176	474 ± 112
IAO	-	+0,30

Fonte: O autor

Legenda: ELiof – extrato larval liofilizado. IAO- Índice de Atividade de Oviposição.

APÊNDICE 7

Tabela S7- Número de ovos/jangadas coletados em seis diferentes avaliações sobre os extratos de larvas *in natura* e de larvas liofilizadas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em relação à oviposição intra e interespecífica.

Repetições	Extrato larval de <i>Ae. aegypti</i> vs fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>				Extrato larval de <i>Ae. aegypti</i> vs fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i>				Extrato larval de <i>Cx. quinquefasciatus</i> vs fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>			
	Avaliação 1		Avaliação 2		Avaliação 3		Avaliação 4		Avaliação 5		Avaliação 6	
	EL in	Controle	L4Liof	Controle	EL in	Controle	L4Liof	Controle	EL in	Controle	L4Liof	Controle
1	1.286	299	1.223	479	14	4	5	18	1.717	826	1.005	832
2	1.234	451	1.662	156	11	2	6	7	1.560	669	2.068	490
3	1.336	276	1.266	532	11	3	24	1	1.352	413	1.506	748
4	1.334	201	1.240	174	17	7	15	7	1.214	575	1.219	836
5	1.454	363	1.738	173	6	12	11	19	1.232	386	940	840
6	1.502	414	1.683	259	11	2	16	3	1.808	718	1.232	616
7	1.237	431	839	477	16	11	6	6	-	-	-	-
8	550	327	906	357	17	3	18	17	-	-	-	-
9	1.384	373	1.203	309	15	11	19	10	-	-	-	-
10	969	424	1.297	485	25	2	8	18	-	-	-	-
11	684	207	817	406	15	3	7	22	-	-	-	-
12	1.208	329	659	198	17	7	18	14	-	-	-	-
Soma	14.178	4.095	14.533	4.005	175	67	153	142	8.883	3.587	7.970	4.362
Porcentagem	77,59	22,41	78,40	21,60	72,31	27,69	51,86	48,14	71,23	28,77	64,63	35,37
Média	1.182 ± 298	341 ± 84	1.211 ± 358	334 ± 140	15 ± 5	6 ± 4	13 ± 6	12 ± 7	1.481 ± 253	598 ± 174	1.328 ± 414	727 ± 145
IAO	+0,55	-	+0,57	-	+0,45	-	+0,04	-	+0,42	-	+0,29	-

Fonte: O autor.

Legenda: vs- versus (frente a). ELin- extrato de larvas *in natura*. L4Liof- extrato de larvas liofilizadas. IAO – Índice de atividade de oviposição.

APÊNDICE 8

Figura S8- Número de ovos coletados em duas avaliações sobre os extratos larvais de *Aedes aegypti* a partir de amostras dessecadas em liofilizador e em estufa na oviposição intraespecífica

Repetições	Avaliação 1		Avaliação 2	
	L4Liof	Controle	EL est	Controle
1	1.148	355	1.044	440
2	885	243	903	528
3	1.093	377	874	549
4	900	508	918	382
5	1.420	431	1.331	428
6	795	346	964	503
Soma	6.241	2.260	6.034	2.830
Porcentagem	73,41	26,59	68,07	31,93
Média	1.040 ± 229	377 ± 89	1.006 ± 170	472 ± 65
IAO	+0,47	-	+0,36	-

Fonte: O autor.

Legenda: L₄Liof- extrato de larvas liofilizadas. EL est- extrato de larvas dessecadas em estufa. IAO – Índice de atividade de oviposição.

APÊNDICE 9

Tabela S9- Avaliações simultâneas de extratos com larvas liofilizadas há 3 anos utilizando diferentes amostras.

Repetição	Avaliação 1		Avaliação 2	
	Amostra 1	Controle	Amostra 2	Controle
1	836	132	780	236
2	720	129	520	265
3	641	130	750	213
4	596	220	703	113
5	470	392	671	283
6	489	474	-	-
Soma	3.752	1.477	3.424	1.110
Porcentagem	71,75	28,25	75,52	24,48
Média	625 ± 139	246 ± 151	685 ± 101	222 ± 67
IAO	+0,44	-	+0,51	-

Fonte: O autor.

APÊNDICE 10

Tabela S10- Número de ovos coletados avaliando ovitrampas associadas com extrato larval *in natura* de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos em *Aedes* campo.

Repetições	ELin + Bti	Controle +Bti
1	1	22
2	2	73
3	176	72
4	90	1
5	129	37
6	58	43
7	291	127
8	443	585
9	51	28
10	59	45
11	120	0
12	157	130
13	47	0
14	231	44
15	682	256
16	610	167
17	60	36
18	4	3
19	466	274
20	237	115
21	161	46
22	157	130
23	47	0
24	231	44
25	116	108
26	115	97
27	65	48
28	201	5
29	110	80
30	59	29
31	146	40
32	206	125
33	57	0
34	71	57
35	127	0
36	193	156
37	103	48
38	232	153
39	136	42
40	95	197
41	122	102
42	47	9
43	203	92
44	173	75
45	262	217
46	50	33
47	299	130
48	416	217
49	441	192
50	111	31
51	389	150

Tabela S10- Número de ovos coletados avaliando ovitrampas associadas com extrato larval *in natura* de *Aedes aegypti* e Bti e em relação à oviposição de mosquitos *Aedes* em campo (continuação).

Soma	9.055	4.711
Porcentagem	66%	34%
Média	178 ± 151	92 ± 100
IAO	+0,32	-
IPO	100%	92%
IDO	178	92

Fonte: O autor

Legenda: ELin + Bti- Extrato larval *in natura* associado ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*.
IAO- Índice de Atividade de Oviposição. IPO- Índice de Positividade das Ovitrapas. IDO- Índice de Densidade de Ovos.

APÊNDICE 11

Tabela S10- Número de ovos coletados avaliando BR-OVTs associadas com extrato larval *in natura* de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos em *Aedes* campo.

Repetições	ELin + Bti	Controle +Bti
1	227	116
2	113	0
3	42	395
4	252	180
5	91	164
6	28	32
7	53	186
8	519	298
9	482	95
10	49	4
11	501	110
12	889	476
13	1.002	138
14	529	91
15	574	441
16	120	621
17	1.539	162
18	1.539	162
19	230	92
20	1.273	7
21	237	10
22	713	16
23	1.072	1.235
24	693	801
25	15	36
26	205	151
27	999	739
28	715	290
29	404	28
30	371	140
31	1.225	1.672
32	1.277	624
33	0	40
34	0	157
35	467	708
36	1.689	330
37	502	94
38	617	86
39	533	247
40	186	571
41	2	34
42	558	0
43	1.211	1.124

Tabela S10- Número de ovos coletados avaliando BR-OVTs associadas com extrato larval *in natura* de *Aedes aegypti* e Bti e em relação à oviposição de mosquitos em *Aedes* campo (continuação).

44	602	371
45	469	151
46	717	194
47	828	285
48	84	113
49	187	561
50	1.034	631
51	1.262	755
52	267	144
53	1.090	506
54	704	507
55	46	132
56	238	365
57	1.056	653
58	493	601
59	129	112
60	748	420
61	1.477	912
62	205	36
63	1.304	182
Soma	36.683	20.534
Porcentagem	64,11	35,89
Média	582 ± 467	326 ± 336
IAO	+0,28	-
IPO	97%	98%
IDO	601	331

Fonte: O autor

Legenda: ELin + Bti- Extrato larval *in natura* associado ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*.
IAO- Índice de Atividade de Oviposição. IPO- Índice de Positividade das Ovitampas. IDO- Índice de Densidade de Ovos.

APÊNDICE 12

Tabela S12- Número de jangadas coletadas avaliando BR-OVTs associadas com extrato larval *in natura* de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos *Culex* em campo.

Repetições	ELin + Bti	Controle +Bti
1	0	27
2	9	1
3	4	0
4	9	0
5	4	2
6	4	6
7	3	0
8	17	1
9	28	0
10	22	25
11	4	2
12	30	19
13	3	2
14	24	28
15	2	0
16	12	0
17	5	1
18	31	36
19	4	0
20	5	3
21	33	4
22	8	2
23	9	3
24	21	19
25	3	0
26	4	2
27	23	17
28	12	1
29	6	3
30	26	5
31	6	0
32	17	1
33	2	0
34	19	2
35	2	2
36	1	0
37	6	1
38	3	1
39	9	1
40	1	3
41	10	13
42	6	6
43	6	12

Tabela S12- Número de jangadas coletadas avaliando BR-OVTs associadas com extrato larval *in natura* de *Aedes aegypti* e Bti e em relação à oviposição de mosquitos *Culex* em campo (continuação).

	44	25	7
Soma	478	258	258
Porcentagem	64,95	35,05	35,05
Média	11 ± 10	6 ± 9	6 ± 9
IAO	+0,30	-	-
IPO	97,78%	73,33%	73,33%
IDO	11	6	6

Fonte: O autor

Legenda: ELin + Bti- Extrato larval *in natura* associado ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*.
IAO- Índice de Atividade de Oviposição. IPO- Índice de Positividade das Ovitampas. IDO- Índice de Densidade de Ovos.

APÊNDICE 13

Tabela S13- Número de ovos coletados avaliando ovitrampas associadas com extratos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos *Aedes* em campo.

Repetições	L ₄ Liof + Bti	Controle + Bti
1	40	0
2	22	73
3	112	31
4	116	39
5	828	127
6	459	443
7	84	138
8	384	162
9	114	145
11	297	220
12	190	88
13	78	470
14	193	351
15	87	219
16	224	103
17	338	144
18	33	164
19	506	395
20	138	29
21	102	280
22	242	90
23	108	287
24	207	177
26	711	286
27	29	77
28	636	0
29	11	28
30	931	200
31	269	185
32	695	437
33	486	201
36	269	133
38	483	213
39	391	19
40	359	296
41	378	97
44	231	130
45	206	0
46	528	514
47	344	188
48	381	404
49	432	148
50	309	221
Soma	12.981	7.952

Tabela S13- Número de ovos coletadas avaliando ovitrampas associadas com fragmentos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* e Bti e em relação à oviposição de mosquitos *Aedes* campo (continuação).

Porcentagem	62,01%	37,99%
Média	302 ± 225	185 ± 137
IAO	+0,24	-
IPO	100%	94%
IDO	260	169

Fonte: O autor.

Legenda: L₄Liof + Bti- fragmentos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* associado ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*. IAO- Índice de Atividade de Oviposição. IPO- Índice de Positividade das Ovitrapas. IDO- Índice de Densidade de Ovos.

APÊNDICE 14

Tabela S14- Número de ovos coletados avaliando BR-OVTs associadas com extratos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos *Aedes* em campo.

Repetições	L ₄ Liof + Bti	Controle +Bti
1	504	502
2	1277	1164
3	137	182
4	525	601
5	955	601
6	456	429
7	561	74
8	199	122
9	48	442
10	1517	759
11	41	76
12	1055	813
13	675	60
14	242	11
15	2225	462
16	662	195
17	1623	1528
18	182	117
19	2140	1250
20	1690	1472
21	658	62
22	141	177
23	581	146
24	671	264
25	1064	1206
26	509	169
27	890	370
28	276	516
29	56	133
30	6	0
31	43	338
32	253	160
33	318	110
34	75	24
35	936	241
36	774	74
37	162	103
38	30	56
39	211	66
40	391	91
41	462	432
42	61	49
43	211	312
44	209	141

Tabela S14- Número de ovos coletados avaliando BR-OVTs associadas com fragmentos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos *Aedes* em campo (continuação).

45	15	16
46	138	34
47	214	0
48	165	19
49	615	117
50	130	224
51	15	1
52	248	101
53	182	50
54	367	156
55	294	30
Soma	28085	16848
Porcentagem	62,50%	37,50%
Média	511 ± 531	306 ± 381
IAO	+0,25	-
IPO	100%	96,36%
IDO	511	392

Fonte: O autor

Legenda: L₄Liof + Bti- fragmentos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* associado ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*. IAO- Índice de Atividade de Oviposição. IPO- Índice de Positividade das Ovitrapas. IDO- Índice de Densidade de Ovos.

APÊNDICE 15

Tabela S15- Número de jangadas coletadas avaliando BR-OVTs associadas com extratos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos *Culex* em campo.

Repetições	L ₄ Liof + Bti	Controle
1	7	0
2	0	11
3	3	1
4	3	0
5	1	0
6	12	1
7	0	2
8	7	1
9	0	1
10	3	0
11	0	4
12	0	3
13	6	9
14	7	0
15	0	0
16	10	5
17	0	2
18	4	0
19	3	0
20	5	5
21	9	5
22	1	1
23	5	1
24	5	0
25	15	6
26	1	0
27	14	2
28	0	3
29	0	0
30	6	0
31	0	4
32	0	0
33	13	4
34	3	0
35	0	0
36	0	0
37	2	1
38	6	1
39	8	4
40	3	0
41	0	2
42	11	2

Tabela S15- Número de jangadas coletadas avaliando BR-OVTs associadas com fragmentos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* e Bti em relação à oviposição de mosquitos *Culex* em campo (continuação).

43	8	1
44	2	0
45	7	0
46	0	1
Soma	190	83
Porcentagem	69,60%	30,40%
Média	4 ± 4	2 ± 2
IAO	+0,39	-
IPO	67,39%	63,04%
IDO	6	3

Fonte: O autor

Legenda: L₄Liof + Bti- fragmentos de larvas liofilizadas de *Aedes aegypti* associado ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*. IAO- Índice de Atividade de Oviposição. IPO- Índice de Positividade das Ovitampas. IDO- Índice de Densidade de Ovos.

APÊNDICE 16

Figura S16- Número de ovos de mosquitos *Aedes* coletados quinzenalmente avaliando o efeito dos extratos de larvas *in natura* de *Aedes aegypti* em ovitrampas durante 2 meses de exposição no campo.

Repetições	1ª quinzena		2ª quinzena		3ª quinzena		4ª quinzena	
	ELin + Bti	Controle +Bti						
1	158	71	707	191	126	97	204	115
2	243	193	147	0	80	19	18	124
3	208	30	513	137	161	70	93	39
4	370	162	226	45	222	196	126	104
5	539	191	160	400	288	115	229	177
6	189	68	378	359	299	490	235	197
7	505	10	67	159	21	106	233	73
8	-	-	298	84	108	180	159	115
Soma	2.212	725	2.496	1.375	1.305	1.273	1.297	944
Média	316 ± 156	104 ± 77	312 ± 213	172 ± 143	163 ± 99	159 ± 145	162 ± 79	118 ± 51
IAO	+0,51	-	+0,29	-	+0,01	-	+0,16	-

Fonte: O autor.

Legenda: ELin + Bti- Extrato larval *in natura* associado ao *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*. IAO- Índice de Atividade de Oviposição.

APÊNDICE 17

Figura S17- Número de ovos coletados avaliando extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* após exposição no campo em contato com palhetas de Eucatex e com tecido de algodão durante 60 dias.

Repetições	ELin Eucatex	ELin algodão	Controle
1	509	602	366
2	1591	438	572
3	1020	345	338
4	1315	737	360
5	2012	509	675
6	1679	563	486
7	1965	763	588
8	1626	256	530
9	803	244	775
10	1617	994	664
Soma	14.137	5.451	5.354
Porcentagem	56,68%	21,85%	21,47%
Média	1.414 ± 479	545 ± 290	535 ± 154
IAO	+0,45	+0,01	-

Fonte: O autor.

Legenda: ELin Eucatex- extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* após exposição no campo em contato com palhetas de Eucatex. ELin algodão- extratos larvais *in natura* de *Aedes aegypti* após exposição no campo em contato com tecido de algodão. IAO: Índice de Atividade de Oviposição.

APÊNDICE 18

Tabela S18- Número de ovos coletados avaliando extratos larvais hexânicos e extratos larvais com dimetilsulfóxido em relação à oviposição intraespecífica

Repetições	Avaliação 1		Avaliação 2	
	ELin hexano	Controle	ELin DMSO	Controle
1	1.346	662	1.221	421
2	929	847	1.165	440
3	1.329	1.021	1.067	235
4	1.116	1.094	998	430
5	1.274	981	1.093	294
6	874	1.217	985	426
7	1.120	1.096	1.139	262
8	1.121	1.094	1.093	298
9	1.206	983	1.194	206
10	1.047	871	846	397
11	1.228	1.374	981	235
12	1.051	1.197	1.149	474
Soma	13.641	12.437	12.931	4.118
Porcentagem	52,31%	47,69%	75,85%	24,15%
Média	1.137 ± 106	1.036 ± 174	1.078 ± 115	343 ± 97
IAO	+0,05	-	+0,52	-

Fonte: O autor.

Legenda: EL hexano- extratos larvais hexânicos. EL dmsso- extratos larvais com dimetilsulfóxido.

APÊNDICE 19

Artigo relacionado à tese:

FAIERSTEIN, G. B. et al. Conspecific and allospecific larval extracts entice mosquitoes to lay eggs and may be used in attract-and-kill control strategy. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 13747, 24 dez. 2019.

ANEXO 1



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Avaliação de dois Métodos de Coleta para Vigilância de Arbovírus em Mosquitos do Gênero Aedes e Culex".

Pesquisador responsável: Rosângela Maria Rodrigues Barbosa

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/11/2015

Registro no CAAE: 51012015.9.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: : 1.547.598

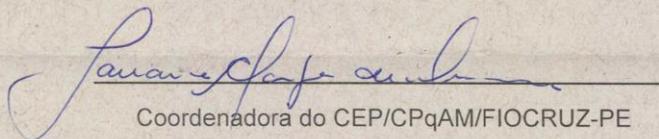
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de junho de 2016.


Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

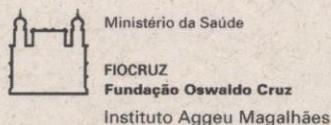
Janaina Campos de Mirano
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br


Centro de Pesquisas
AGGEU
MAGALHÃES


FIOCRUZ
Ministério da Saúde

ANEXO 2



Ofício Nº 01 / 2021

Recife, 14 de junho de 2021.

À Secretária Acadêmica

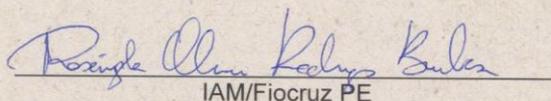
Assunto: **Anuência do Comitê de Ética em Pesquisas**

Prezado (a)

Venho através deste, informar a Secretária Acadêmica, que o projeto intitulado "Desenvolvimento de ferramentas aplicáveis no controle de mosquitos: avaliação do extrato larval de *Aedes aegypti* e desenvolvimento de uma armadilha para coleta de ovos e adultos", desenvolvido pelo aluno Gabriel Bezerra Faienstein do curso de doutorado em Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde, faz parte de um projeto maior, que foi desenvolvido por mim, intitulado " Avaliação de dois Métodos de Coleta para Vigilância de Arbovírus em Mosquitos do Gênero *Aedes* e *Culex*". Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE (CAAE: 51012015.9.0000.5190).

Todos os experimentos de campo realizado pelo aluno Gabriel, no Centro de Biotecnologia da UFPE e no Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, estão de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

Atenciosamente,


IAM/Fiocruz PE

Rosângela Maria Rodrigues-Barbosa
Chefe do Dept. de Entomologia
Matrícula Sisppe 1604918
IAM / Fiocruz