

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

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

Laila Heringer Costa

Belo Horizonte  
2010

Laila Heringer Costa

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Álvaro Eduardo Eiras (UFMG)

Co-orientadora: Dra. Luciane Gomes Batista-Pereira (UFMG)

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2010

Dedico este trabalho à  
Vó Cremilda, Vô Hélio,  
Vó Lourdes, Tia Fátima,  
pai e mãe,  
pelo amor e incentivo.

Dedico também à Dra. Rosana,  
pelo carinho e fé na vida.

## **Agradecimentos**

À Deus, por todas as intervenções em minha vida que me fazem parecer o ser mais sortudo do mundo, com sorte até nos momentos de azar. Obrigada por todas as chances de “viver de novo”.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Álvaro Eduardo Eiras, pela orientação, ensinamentos, incentivo e solicitude. Agradeço ainda pela convivência harmoniosa tanto no laboratório quanto em situações de lazer.

À Luciane Gomes Batista-Pereira, pelo carinho, amizade, ensinamentos e paciência. Muito obrigada pela ajuda incondicional, pelas revisões do texto e boa vontade descomunal.

À Pri Barbi, pela dedicação e ajuda na execução dos experimentos, sem a qual seria impossível terminar. Muito obrigada pelo exemplo de sensatez.

Ao Caio, muito obrigada pela originalidade, amizade e pelas fotos tiradas com tanta boa vontade.

À Thais, uma parceira sensacional, muito obrigada pelo verão inesquecível, amizade, confiança e pelos insetos!

Ao Andrey e ao Moreno pela paciência e boa vontade com as inúmeras dúvidas que surgiram no processo.

Aos amigos do Labeq, Andrey, Ana Paula Carrusca, Ana Pessoa, Caio, Célia, Claudinha, Débora, Gigante, Iancor, Isadora, Iuri, Jivago, Jordana, Kelly, Luciane, Lucilene, Madson, Marcelo, Márcia, Marcinha, Maria Cristina, Marcos, Matheus, Milton, Moreno, Nayara, Pri, Renatinha, Robertinha, Rose, Tati, Thais, aos quais poderia agradecer por toda a vida e ainda assim não seria suficiente.

À Sumara e aos professores do Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG que tanto contribuíram para a minha formação.

Ao meu pai, por ser, além do melhor pai do mundo, um exemplo de garra, serenidade, seriedade e conduta.

À minha mãe, pelo carinho, alegria, amizade e pelo lado “non sense” da vida.

Ao Rodrigo Picolé, por ser um bom irmão, por compartilhar alegrias e ser motivo delas, pela sensibilidade e amizade.

À Vó Cremilda e ao Vô Hélio, pelo amor, fé e todo o incentivo.

À minha “fada” madrinha Tia Fátima por todos os mimos e cuidados.

À minha grande família com respectivos agregados e segregados, pelo amor, harmonia e alegria.

Às educadoras, Tia Batide, Tia Carmem, Helena, Tia Jaira, Tia Lídia e mãe, pelo exemplo.

Aos amigos, obrigada pela lealdade.

Aos amigos da turma de mestrado que me permitiram vários dias alegres: Alexandre, Angeliquinha, Emília, Fernando, Lanuze, Letícia, Luiza, Pedro e Rafa. Sem vocês não teria a menor graça e seria mais difícil, quiçá impossível.

Aos queridos Dra. Rosana e Dr. Lister por terem acreditado na vida e lutado por ela. Obrigada pelo carinho e incentivo.

Paula, Anthony, James e Miriam, muito obrigada pela amizade que persistiu mesmo com toda esta distância. Paula, muito obrigada pelo apoio final com a revisão do Abstract. Como é bom reconhecer os amigos verdadeiros!

À equipe amorA, pela pluralidade, seriedade, paixão pelo trekking e amor pelas trilhas.

À Emília, que com toda a sua inteligência e astúcia faz a convivência muito engraçada.

À Maria Cristina, agradeço a amizade e a oportunidade de ver a vida de outra forma.

Ao Gustavo, primo, amigo, contemporâneo no ICB, tão próximo e tão distante. Obrigada pela amizade, por caminharmos com companheirismo e muita torcida um pelo outro.

Ao Guilherme agradeço por estar sempre tão presente: parceria, lembranças, “filosofias” de vida e histórias que me tornaram diferente.

À Jackeline Barros, pela confiança, carinho, incentivo e descoberta de virtudes.

Ao Roberto, pela percepção irônica da vida, humor, amizade e ensinamentos.

Ao Lucas, o grande estranho amor da minha vida, por todo o auxílio, paciência e companheirismo.

**“Que possamos tocar a nossa alma e a daqueles que de nós se aproximam;  
que o brilho dos verdadeiros mestres nos lembre sempre da nossa própria luz;  
que o poder dos que estão acima de nós desperte o nosso próprio;  
que a cada respiração sejamos nutridos e conscientes  
do potencial da nossa própria natureza.”**

(Autor desconhecido)

## RESUMO

A escolha do criadouro adequado por fêmeas *Aedes (Stegomyia) aegypti* é influenciada por estímulos visuais, físicos e químicos. Buscou-se avaliar a influência de estímulos químicos (infoquímicos) provenientes de imaturos co-específicos no comportamento de oviposição de *A. aegypti* que, se identificados, apresentam potencial uso em armadilha para captura do vetor. Os objetivos do estudo foram avaliar: (a) extratos de larvas (L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>) de *A. aegypti* como estimulantes de oviposição; (b) extratos de larvas de *A. aegypti* na armadilha adesiva MosquiTRAP<sup>®</sup> como atraentes de oviposição; (c) ovos de *A. aegypti* de diferentes idades como estimulantes de oviposição e (d) comparar o perfil químico de extratos de larvas e de ovos com infoquímicos já identificados. Os testes com estimulantes de oviposição foram realizados em gaiolas (30x30x30 cm) em laboratório onde foi observada uma única fêmea grávida por teste. Foram avaliados como estimulantes de oviposição extratos: (1) água de criação de larvas (EAL); (2) hexânicos de água de criação de larvas (EHAL) e (3) metanólicos do corpo de larvas (EMCL), nas concentrações de 0,5; 2,0; 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada, além de (4) 150 ovos de *A. aegypti* de 0, 2, 7, 15, 30, 90 ou 180 dias. Em campo, foram realizados testes com armadilhas iscadas com: (1) água de torneira; (2) infusão do capim *Panicum maximum* a 10%; (3) água com alimento; (4) água de criação de larvas com alimento (8 larvas/mL); (5) água de criação de larvas sem alimento e (6) água de criação de larvas sem alimento associada à infusão. Extratos de larvas e ovos foram submetidos à cromatografia gasosa e comparados com padrões sintéticos de estimulantes e atraentes de oviposição (ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico e *n*-heneicosano). Os resultados demonstraram que os extratos de larvas (0,5 larvas/mL) estimularam a oviposição (Qui quadrado,  $p > 0,05$ ) e ovos com 2, 7, 15 e 30 dias estimularam a oviposição ( $p < 0,05$ ). Verificou-se a presença de *n*-heneicosano em EHAL e em extrato hexânico do corpo de larvas, enquanto os ácidos dodecanóico e tetradecanóico foram encontrados nos extratos metanólicos de ovos. Nos testes de campo, o número de fêmeas de *A. aegypti* capturadas nas armadilhas com água de criação de larvas sem alimento foi similar ao da infusão (Kruskal Wallis,  $p > 0,05$ ). Testes com água de criação de larvas associada a infusão não aumentaram significativamente a captura ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que infoquímicos produzidos por larvas e ovos interferem na oviposição de co-específicos dependendo da concentração de manutenção das larvas e da idade dos ovos.

## ABSTRACT

The choice of a suitable breeding site by *Aedes (Stegomyia) aegypti* is influenced by visual, physical and chemical stimuli. We aimed to evaluate the influence of chemical stimuli (infochemicals) present in waters inhabited by immature conspecifics that, once identified, have a potential use in *A. aegypti* gravid traps. The objectives of this study were to evaluate: (a) larval extracts of 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> instars of *A. aegypti* as oviposition stimulants, (b) larval extracts of *A. aegypti* as oviposition attractant in the sticky trap MosquiTRAP<sup>TM</sup>, (c) *A. aegypti* eggs at different ages as oviposition stimulants, (d) the chemical profile of larval and eggs extracts. In the laboratory, tests were set up in cages (30×30×30 cm) where only one *A. aegypti* gravid female was evaluated in each test. We evaluated as oviposition stimulant extracts of (1) larval rearing water (LRW), (2) hexane extracts of larval rearing water (HLRW) and (3) methanol extracts of the body of larvae (MBL) at concentrations of 0.5, 2.0, 3.0 and 6.0 larvae/ml distilled water, and (4) 150 *A. aegypti* eggs at different ages (0, 2, 7, 15, 30, 90 and 180 days). In field experiments, MosquiTRAP<sup>®</sup> were baited with (1) tap water, (2) grass infusion of *Panicum maximum* (10%), (3) water and food pet pellet, (4) larval rearing water with pellet (8 larvae/ml), (5) larval rearing water without pellet and (6) larval rearing water without ration associated with infusion. Larval and eggs extracts were analyzed by gas chromatography and compared with standards synthetic oviposition stimulants or attractants (dodecanoic acid, tetradecanoic acid and *n*-heneicosane). The results showed that larval extract at concentration of 0.5 larvae/ml stimulated oviposition (Chi square,  $p > 0.05$ ). Only eggs at 2, 7, 15 and 30 days old stimulated oviposition ( $p < 0.05$ ). We identified *n*-heneicosane in the body and larval rearing water extracts with hexane, while dodecanoic acid and tetradecanoic acid were found in methanol extracts of eggs. We observed many other compounds in larval and eggs extracts that were not identified. In the field, we observed that the mean number of *A. aegypti* female captured in traps containing LRW without pet food pellet was similar to that for the trap with grass infusion (Kruskal Wallis  $p > 0.05$ ). The mixture of the extract of LRW with infusion did not significantly increase the capture ( $p > 0.05$ ). We concluded that infochemicals produced by eggs and larvae interfere in oviposition of conspecifics, depending on the concentration of larvae and age of eggs.



## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1. | Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> em processo de hematofagia .....  | 19 |
| Figura 2  | Armadilha MosquiTRAP <sup>®</sup> : a) Armadilha montada; b) Componentes da armadilha: base (II), tampa (I), cartão adesivo (III), AtrAedes <sup>®</sup> (IV) e suporte para cartão adesivo (V) .....   | 22 |
| Figura 3. | Esquema de alimentação artificial utilizado para fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> . (a) Banho-Maria mantido a 38°C, placa de acrílico e potes telados para o aprisionamento de fêmeas e para possibilitar a introdução de suas probóscides nos alimentadores artificiais. (b) Detalhe de como o sangue é colocado no alimentador artificial .....   | 38 |
| Figura 4. | Funil de decantação e extração líquido-líquido de compostos provenientes da água de criação de larvas .....   | 42 |
| Figura 5. | Gaiola de polipropileno (com a parte superior removida) utilizada para os testes de dupla escolha contendo dois recipientes para oviposição e uma única fêmea/teste de <i>Aedes aegypti</i> .....   | 46 |
| Figura 6. | Percentual médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por <i>Aedes aegypti</i> em recipientes de oviposição contendo extrato de água de criação de larvas co-específicas de 3 <sup>o</sup> e 4 <sup>o</sup> ínstaes, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada), em condições de laboratório ( $27,4 \pm 0,32$ °C, $60,9 \pm 1,96$ % URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado, $p < 0,05$ ) .....                                   | 53 |
| Figura 7. | Percentual médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por <i>Aedes aegypti</i> em recipientes de oviposição contendo extrato hexânico de água de criação de larvas co-específicas de 3 <sup>o</sup> e 4 <sup>o</sup> ínstaes, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada e hexano), em condições de laboratório ( $27,0 \pm 0,13$ °C, $56,7 \pm 0,94$ % URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado, $p < 0,05$ ) .....                 | 55 |
| Figura 8. | Percentual médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em recipientes de oviposição contendo extrato metanólico do corpo de larvas de 3 <sup>o</sup> e 4 <sup>o</sup> ínstaes, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada e metanol) em condições de laboratório ( $26,1 \pm 0,43$ °C, $52,8 \pm 0,85$ %URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado, $p < 0,05$ . * sobre as barras indicam diferença |    |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | significativa entre tratamento e controle) .....  | 58 |
| Figura 9.  | Índices de Atividade de Oviposição (IAO) obtidos na avaliação de diferentes extratos como estimulantes de oviposição no comportamento de fêmeas individualizadas de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório. A) extrato de água de criação de larvas de 3° e 4° instares (EAL), B) Extrato hexânico de água de criação de larvas de 3° e 4° instares (EHAL), C) Extrato metanólico do corpo de larvas de 3° e 4° instares (EMCL) .....  | 61 |
| Figura 10. | Cromatogramas sobrepostos do extrato hexânico da água de 1.200 larvas (L <sub>3</sub> /L <sub>4</sub> ) de <i>Aedes aegypti</i> (linha preta), padrão sintético do <i>n</i> -heneicosano a 0,1 mg/mL (linha vermelha) e co-injeção do extrato hexânico da água de 1.200 larvas de <i>Aedes aegypti</i> acrescido do padrão <i>n</i> -heneicosano (linha rosa). No detalhe, região ampliada do cromatograma em que a elipse verde indica os picos correspondentes ao <i>n</i> -heneicosano dos três cromatogramas .....    | 63 |
| Figura 11. | Cromatogramas sobrepostos do extrato hexânico do corpo de 1.200 larvas (L <sub>3</sub> /L <sub>4</sub> ) de <i>Aedes aegypti</i> (linha preta), padrão sintético do <i>n</i> -heneicosano a 0,1 mg/mL (linha vermelha) e co-injeção do extrato hexânico do corpo de 1.200 larvas de <i>Aedes aegypti</i> acrescido do padrão <i>n</i> -heneicosano (linha rosa). No detalhe, região ampliada do cromatograma em que a elipse verde indica os picos correspondentes ao <i>n</i> -heneicosano dos três cromatogramas .....  | 64 |
| Figura 12. | Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico do corpo de 1200 larvas (L <sub>3</sub> /L <sub>4</sub> ) de <i>Aedes aegypti</i> (linha preta), padrão sintético do <i>n</i> -heneicosano a 0,1 mg/mL (linha vermelha) e co-injeção do extrato metanólico do corpo de 1200 larvas de <i>Aedes aegypti</i> acrescido do padrão <i>n</i> -heneicosano (linha rosa). No detalhe, região ampliada do cromatograma em que a elipse verde indica os picos correspondentes ao <i>n</i> -heneicosano de dois cromatogramas ..... | 65 |
| Figura 13. | Média ( $\pm$ EP) de fêmeas capturadas em armadilhas adesivas MosquiTRAP <sup>®</sup> contendo diferentes estímulos em testes no <i>Campus Pampulha</i> da UFMG, março e abril de 2010 (n=10) ( $24,1 \pm 0,25$ °C, $50,9 \pm 1,07$ % URA) (Kruskal Wallis, $p < 0,05$ . Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa) .....   | 66 |

- Figura 14. Média ( $\pm$  EP) de fêmeas capturadas em armadilhas adesivas MosquiTRAP<sup>®</sup> contendo diferentes estímulos em testes no *Campus* Pampulha da UFMG, setembro de 2010 (n=10) ( $23,3 \pm 0,79$  °C;  $38,9 \pm 0,92\%$  URA) (Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ ) ..... 67
- Figura 15. Bioensaio de avaliação da influência de ovos de *Aedes aegypti* na oviposição de co-específicos em laboratório. a) Gaiola de polipropileno (com a parte superior removida) em que foram realizados os testes contendo dois recipientes para oviposição; b) Recipientes para oviposição: à esquerda o recipiente tratamento contendo 150 ovos (indicados pela seta vermelha) e à direita, o controle (sem ovos) ..... 83
- Figura 16. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmeas de *Aedes aegypti* em recipientes de oviposição contendo 150 ovos co-específicos de diferentes idades e respectivo controle (sem ovos), em condições de laboratório ( $25,4 \pm 0,21$  °C,  $62,7 \pm 1,28$  % URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ . \* Indicam diferença estatística entre controle e respectivo tratamento) ..... 88
- Figura 17. Índices de Atividade de Oviposição (IAO) obtidos na avaliação de ovos com diferentes idades como estimulantes de oviposição no comportamento de fêmeas individualizadas de *A. aegypti* em laboratório ..... 89
- Figura 18. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com “zero dia” de idade (linha vermelha); mistura de padrões sintéticos (A - ácido dodecanóico, B - ácido tetradecanóico e C - *n*-heneicosano (linha preta); e co-injeção do extrato metanólico de 1.000 ovos acrescido da mistura com os três padrões sintéticos (linha rosa) ..... 91
- Figura 19. Figura 19. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com “zero dia” de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos a 0,1mg/mL (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano..... 92
- Figura 20. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com dois dias de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos a 0,1mg/mL (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B)

|            |  |    |
|------------|--|----|
|            | ácido tetradecanóico e (C) <i>n</i> -heneicosano .....   | 93 |
| Figura 21. | Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de <i>Aedes aegypti</i> com <i>sete dias</i> de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) <i>n</i> -heneicosano ..... | 93 |
| Figura 22. | Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de <i>Aedes aegypti</i> com <i>15 dias</i> de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) <i>n</i> -heneicosano .....   | 94 |
| Figura 23. | Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de <i>Aedes aegypti</i> com <i>30 dias</i> de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) <i>n</i> -heneicosano .....   | 94 |
| Figura 24. | Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de <i>Aedes aegypti</i> com <i>90 dias</i> de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) <i>n</i> -heneicosano .....   | 95 |
| Figura 25. | Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de <i>Aedes aegypti</i> com <i>180 dias</i> de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) <i>n</i> -heneicosano .....  | 95 |

## LISTA DE TABELAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1. | Peso (g) de 600 larvas de terceiro e quarto ínstares de <i>Aedes aegypti</i> criadas em laboratório (n=30) ( $27,2 \pm 0,15$ °C, $63,2 \pm 1,18$ % URA, fotofase: 12 horas) .....  | 50 |
| Tabela 2. | Número e peso (g) de larvas de terceiro e quarto ínstares de <i>Aedes aegypti</i> após a pesagem com base no valor do peso médio de 600 indivíduos (n=30) ( $27,2 \pm 0,15$ °C, $63,2 \pm 1,18$ % URA, fotofase: 12 horas) .....   | 51 |
| Tabela 3. | Percentual médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por <i>Aedes aegypti</i> na água e no papel dos recipientes de oviposição contendo extrato de água de criação de larvas co-específicas de 3° e 4° ínstares, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada), em condições de laboratório ( $27,4 \pm 0,32$ °C, $60,9 \pm 1,96$ % URA, fotofase: 12 horas) ....                      | 54 |
| Tabela 4. | Percentual médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por <i>Aedes aegypti</i> na água ou no papel dos recipientes de oviposição contendo extrato hexânico de água de criação de larvas co-específicas de 3° e 4° ínstares, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada com hexano) em condições de laboratório ( $27,0 \pm 0,13$ °C, $56,7 \pm 0,94$ % URA, fotofase: 12 horas) ..... | 56 |
| Tabela 5. | Percentual médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por <i>Aedes aegypti</i> na água ou no papel dos recipientes de oviposição contendo extrato metanólico do corpo de larvas co-específicas de 3° e 4° ínstares, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada com metanol) em condições de laboratório ( $26,1 \pm 0,43$ °C, $52,8 \pm 0,85$ %URA, fotofase: 12 horas) .....         | 59 |
| Tabela 6. | Percentual médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por <i>Aedes aegypti</i> na água ou no papel dos recipientes de oviposição contendo ovos co-específicos de diferentes idades e respectivo controle em laboratório ( $27,40 \pm 0,32$ °C, $60,93 \pm 1,96$ % URA, fotofase: 12 horas) .....  | 90 |
| Tabela 7. | Proporções relativas das quantidades (mV) de ácido dodecanóico e tetradecanóico presentes nos extratos metanólicos de ovos de diferentes idades (0, 2, 7, 15, 30, 90, e 180 dias) (N=5) .....  | 96 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| ACA -            | Água destilada com acréscimo de alimento  |
| CG               | Cromatógrafo a gás  |
| EAL-             | Extrato de água de criação de larvas de 3º e 4º ínstaes   |
| EALCA -          | Extrato de água de criação de larvas de 3º e 4º ínstaes com acréscimo de alimento                     |
| EALSA -          | Extrato de água de criação de larvas de 3º e 4º ínstaes sem acréscimo de alimento                     |
| EHAL -           | Extrato hexânico de água de criação de larvas de 3º e 4º ínstaes                                      |
| EHALCG -         | Extrato hexânico de água de criação de larvas de 3º e 4º ínstaes para avaliação no cromatógrafo a gás |
| EHCLCG -         | Extrato hexânico do corpo de larvas de 3º e 4º ínstaes para avaliação no cromatógrafo a gás           |
| EMCL -           | Extrato metanólico do corpo de larvas de 3º e 4º ínstaes  |
| EMCLCG -         | Extrato metanólico do corpo de larvas de 3º e 4º ínstaes para avaliação no cromatógrafo a gás         |
| IAO -            | Índice de atividade de oviposição   |
| L <sub>1</sub> - | Larvas de primeiro ínstar de <i>Aedes aegypti</i>   |
| L <sub>2</sub> - | Larvas de segundo ínstar <i>Aedes aegypti</i>   |
| L <sub>3</sub> - | Larvas de terceiro ínstar <i>Aedes aegypti</i>  |
| L <sub>4</sub> - | Larvas de quarto ínstar <i>Aedes aegypti</i>  |
| LabEQ -          | Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores  |

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUCAO GERAL</b> .....   | 18 |
| 1.1 Considerações gerais sobre a biologia de <i>Aedes aegypti</i> .....   | 18 |
| 1.2 Importância do <i>Aedes aegypti</i> na saúde pública .....  | 19 |
| 1.3 Controle do <i>Aedes aegypti</i> .....  | 20 |
| 1.4 Monitoramento do <i>Aedes aegypti</i> .....   | 21 |
| 1.5 MosquiTRAP® e o monitoramento inteligente do mosquito da dengue .....   | 22 |
| 1.6 Comportamentos de oviposição .....  | 24 |
| 1.7 Infoquímicos e a oviposição de <i>Aedes aegypti</i> .....   | 25 |
| 1.8 Atraentes e estimulantes de oviposição .....  | 27 |
| 1.9 Percepção olfativa de insetos .....   | 28 |
| 1.10 Extração de infoquímicos .....   | 29 |
| <br>  |    |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 31 |
| 2.1 Objetivo Geral .....  | 31 |
| 2.2 Objetivos específicos .....   | 31 |
| <br>  |    |
| <b>Capítulo I - Avaliação de infoquímicos presentes em larvas e água de criação de larvas de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) como atraentes e/ou estimulantes de oviposição para grávidas co-específicas</b> ..... | 32 |
| RESUMO .....  | 33 |
| I.1 INTRODUÇÃO .....  | 34 |
| I.2 METODOLOGIA .....   | 36 |
| I.2.1 Criação e manutenção da colônia de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório .....  | 36 |
| I.2.2 Peso médio de 600 larvas de terceiro e quarto ínstaes de <i>Aedes aegypti</i> .....   | 39 |
| I.2.3 Extratos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....  | 40 |
| <b>Preparação de extratos avaliados como estimulantes de oviposição</b> .....   | 40 |
| <u>I.2.3.1 Preparação do material</u> .....   | 40 |
| <u>I.2.3.2 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EAL)</u> .....  | 41 |
| <u>I.2.3.3 Extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EHAL)</u> .....  | 41 |
| <u>I.2.3.4 Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes</u> .....   |    |

|   |    |
|---|----|
| (EMCL) .....  | 43 |
| <b>Preparação de extratos avaliados no cromatógrafo a gás</b> .....   | 43 |
| <u>I.2.3.5 Extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares para avaliação no cromatógrafo a gás (EHALCG)</u> .....                            | 43 |
| <u>I.2.3.6 Extrato hexânico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstares para avaliação no cromatógrafo a gás (EHCLCG)</u> .....                                      | 43 |
| <u>I.2.3.7 Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstares para avaliação no cromatógrafo a gás (EMCLCG)</u> .....                                    | 43 |
| <b>Preparação de extratos avaliados como atraentes de oviposição</b> .....  | 44 |
| <u>I.2.3.8 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares sem acréscimo de alimento (EALSA)</u> .....   | 44 |
| <u>I.2.3.9 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares com acréscimo de alimento (EALCA)</u> .....   | 44 |
| <u>I.2.3.10 Água destilada com acréscimo de alimento (ACA)</u> .....  | 44 |
| <u>I.2.3.11 Infusão de <i>Panicum maximum</i> (10%)</u> .....   | 45 |
| I.2.4 Índice de Atividade de Oviposição (IAO) .....   | 45 |
| I.2.5 Experimento I: Avaliação de extratos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> como estimulantes de oviposição em laboratório .....   | 45 |
| I.2.6 Avaliação cromatográfica de extratos de larvas e água de criação de larvas .....  | 47 |
| <u>I.2.6.1 Investigação da presença de <i>n</i>-heneicosano nos extratos de larvas da população brasileira de <i>Aedes aegypti</i></u> .....                              | 47 |
| I.2.7 Experimento II: Avaliação de extratos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> como atraente de oviposição em campo .....  | 48 |
| I.2.8 Experimento III: Avaliação de extratos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> associados à infusão de <i>Panicum maximum</i> como atraentes de oviposição em campo ..... | 49 |
| I.2.9 Análises estatísticas .....   | 49 |
| I.3 RESULTADOS .....  | 50 |
| I.3.1 Peso médio de 600 larvas de terceiro e quarto ínstares de <i>Aedes aegypti</i> .....  | 50 |
| I.3.2 Experimento I: Avaliação de extratos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> como estimulantes de oviposição em laboratório .....   | 52 |
| <u>I.3.2.1 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares (EAL)</u> .....   | 52 |
| <u>I.3.2.2 Extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares (EHAL)</u> .....   | 54 |



|  |    |
|--|----|
| <u>I.3.2.3 Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstares (EMCL)</u> .....  | 57 |
| <u>I.3.2.4 Valores dos Índices de Atividade de Oviposição (IAO) dos extratos avaliados como estimulantes de oviposição</u> .....   | 59 |
| I.3.3 Avaliação de extratos no cromatógrafo a gás .....  | 62 |
| I.3.4 Experimento II: Avaliação de extratos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> como atraentes de oviposição em campo .....  | 65 |
| I.3.5 Experimento III: Avaliação de extratos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> associados à infusão de <i>Panicum maximum</i> como atraentes de oviposição em campo..... | 66 |
| I.4 DISCUSSÃO .....  | 68 |
| I.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 77 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Capítulo II - Influência de ovos de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de diferentes idades na oviposição de co-específicas em condições de laboratório</b> ..... | 78 |
| RESUMO .....   | 79 |
| II.1 INTRODUÇÃO .....  | 80 |
| II.2 METODOLOGIA .....   | 82 |
| II.2.1 Criação e manutenção da colônia de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório .....  | 82 |
| II.2.2 Experimento I: Influência de ovos de <i>Aedes aegypti</i> de diferentes idades na oviposição de co-específicos em laboratório .....   | 82 |
| II.2.3 Índice de Atividade de Oviposição .....   | 84 |
| II.2.4 Extratos metanólicos de ovos de <i>A. aegypti</i> .....   | 84 |
| II.2.5 Experimento II: Avaliação cromatográfica dos extratos de ovos com diferentes idades após a oviposição .....   | 85 |
| <u>II.2.5.1 Investigação da presença dos compostos: ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico e <i>n</i>-heneicosano nos extratos de ovos da população brasileira de <i>Aedes aegypti</i></u> .....        | 85 |
| II.2.6 Análises Estatísticas .....   | 86 |
| II. 5 RESULTADOS .....   | 86 |
| II.5.1 Experimento I: Influência de ovos de <i>Aedes aegypti</i> de diferentes idades na oviposição de co-específicos em laboratório .....   | 86 |
| II.5.2 Experimento II: Avaliação cromatográfica dos extratos de ovos com   |    |

|   |            |
|---|------------|
| diferentes idades após a oviposição .....   | 91         |
| II. 6 DISCUSSÃO .....   | 96         |
| II.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 103        |
| <b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>105</b> |
| <b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>108</b> |
| <b>APÊNDICE 1</b> : Avaliação de extratos de água de criação de larvas (EAL) de <i>Aedes aegypti</i> como estimulantes de oviposição - Dados integrais .....            | 117        |
| <b>APÊNDICE 2</b> : Avaliação de extratos hexânicos de água de criação de larvas (EHAL) de <i>Aedes aegypti</i> como estimulantes de oviposição - Dados integrais ..... | 119        |
| <b>APÊNDICE 3</b> : Avaliação de extratos metanólicos dos corpos de larvas (EMCL) de <i>Aedes aegypti</i> como estimulantes de oviposição - Dados integrais .....       | 122        |
| <b>APÊNDICE 4</b> : Influência de ovos de <i>Aedes aegypti</i> de diferentes idades na oviposição de co-específicos em laboratório - Dados Integrais .....              | 125        |

## 1 INTRODUCAO GERAL

### 1.1 Considerações gerais sobre a biologia de *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é um inseto antropofílico, proveniente do velho mundo, possivelmente da região Etiópica (Nordeste da África). Este inseto foi transportado da África Ocidental para o novo mundo entre os séculos XV e XVII a bordo dos navios negreiros (Lozovei 2001, Christophers 1960 *apud* Lounibos 2002).

O *A. aegypti* apresenta desenvolvimento holometabólico, com ciclo biológico que envolve ovo, larva (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>), pupa e adulto. Os ovos são depositados preferencialmente nas paredes do criadouro e, eventualmente, diretamente na água (Gadelha & Toda 1985, Gomes et al. 2006). O córion dos ovos é resistente à dessecação, permitindo que se mantenham viáveis na ausência de água por até 450 dias. O embrião completa seu desenvolvimento dois ou três dias após a oviposição e, após este período, assim que o ovo entra em contato com a água, a larva pode eclodir. As larvas se desenvolvem em diferentes tipos de coleções de água doce parada e passam a maior parte do tempo se alimentando de detritos orgânicos e bactérias. A fase larval se completa entre cinco e sete dias após a eclosão, sob condições ideais de temperatura (25,0 a 29,0 °C), logo após se inicia a fase de pupa. Este período pode ser ampliado sob condições adversas (Gadelha & Toda 1985).

Os adultos de *A. aegypti* (Fig. 1) podem ser facilmente identificados pela coloração escura. O tórax apresenta escamas claras formando ornamentos branco-prateados típicos. São características morfológicas marcantes da espécie a presença de duas faixas longitudinais curvilíneas, uma em cada lado do tórax, formando um desenho comparado ao instrumento musical lira, tendo em sua porção mediana, duas faixas longitudinais mais estreitas. No abdômen e nas pernas observam-se ainda manchas branco-prateadas e no clipeo, dois tufos de escamas também branco-prateadas (Nelson 1986, Lozovei 2001).



Figura 1. Fêmea de *Aedes aegypti* em processo de hematofagia.

Fonte: <http://www.biolib.cz/en/image/id48792/>

Machos e fêmeas de culicídeos realizam repasto açucarado, nutrindo-se, em condições naturais, de néctar de flores e suco de frutos. Entretanto, fêmeas de algumas espécies realizam o repasto sangüíneo, que é imprescindível para a maturação dos seus ovos. Em geral, a fêmea de culicídeo faz uma postura após cada repasto sangüíneo. Entretanto, *A. aegypti* pode se alimentar mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando perturbada antes de totalmente ingurgitada. Esta característica aumenta a possibilidade de o mosquito ingerir e transmitir patógenos. Sucedendo o repasto sanguíneo, inicia-se a ovogênese ou maturação dos ovos (Barata et al. 2001).

## 1.2 Importância do *Aedes aegypti* na saúde pública

O *A. aegypti* apresenta importância na saúde pública uma vez que é o vetor da dengue e da febre amarela urbana. Além disso, também é vetor de outras arboviroses, como o vírus do Mayaro, do Chikungunya, da encefalite equina venezuelana e outros (Figueiredo 2007).

A dengue é considerada o principal problema de saúde pública internacional. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas correm o risco de serem infectadas (WHO 2008 *apud* Teo et al. 2009).

No Brasil, em 2009, foram registrados 529.237 casos suspeitos de dengue. A partir de novembro, os registros de casos apresentaram tendência ascendente ultrapassando os números do mesmo período em 2008 (Ministério da Saúde 2009a). Em 2010, até a semana epidemiológica 13, foram registrados 447.764 casos da enfermidade (Ministério da Saúde 2010a). Em agosto deste ano divulgou-se a presença do sorotipo quatro no Estado de Roraima que não era detectado no Brasil desde 1982. Caso o vírus quatro volte a circular no país, existem riscos de novas epidemias (Ministério da Saúde 2010b).

O vírus causador da dengue, família Flaviviridae, apresenta quatro sorotipos principais e é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* sp., sendo o *A. aegypti* o principal vetor em todo o mundo. Humanos infectados são os principais transportadores e amplificadores do patógeno, embora ocorra também a transmissão transovariana nos insetos (Mourya et al. 2001, Joshi et al. 2002, Braga & Valle 2007).

A febre amarela é uma zoonose causada por vírus da família Flaviviridae, caracterizada pelos ciclos de transmissão silvestre, mantida entre primatas silvestres por vetores dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, e urbana, transmitida para os seres humanos pelo *A. aegypti* (Monath 2001, Vasconcelos 2003). Anualmente ocorrem aproximadamente 200.000 casos da doença, sendo 90% na África e 10% nas regiões tropicais da América do Sul (Vasconcelos 2002, Barnett 2007). No Brasil, entre setembro de 2008 e setembro de 2009 foram notificados 274 casos humanos suspeitos de febre amarela silvestre, com 51 casos (18,6%) confirmados, dos quais 21 vieram a óbito. (Ministério da Saúde 2009b).

Na família Togaviridae, existem alguns arbovírus do gênero *Alphavirus* que podem ser transmitidos pelo *A. aegypti* como o vírus do Chikungunya, do Mayaro, da encefalite equina venezuelana, entre outros (Figueiredo 2007). O vírus do Chikungunya, apesar de não ser comum no Brasil, tem sido observado com cautela em alguns locais do mundo. Endêmico em países da África, ilhas dos oceanos Índico e Pacífico, além do Sudeste Asiático (Reiter et al. 2006, Powers & Logue 2007), a arbovirose começou a atingir áreas indenes nos últimos anos (Soumahoro et al. 2009). O surto ocorrido na Itália em 2007, primeiro na Europa, confirmou a possibilidade da doença se tornar global, devido ao transporte aéreo (Pialoux et al. 2007, Tilston et al. 2009).

### **1.3 Controle do *Aedes aegypti***

A prevenção e o combate à dengue historicamente envolvem o controle do *A. aegypti* (FUNASA 2001), visando manter as populações do vetor em um tamanho aceitável. Nas

últimas décadas, vem sendo enfatizado o uso do controle integrado do *A. aegypti* com implementação descentralizada, envolvendo o poder público e a sociedade. O controle integrado é a combinação dos métodos de controle disponíveis de forma eficiente, econômica e segura (WHO 1997, WHO 2006), sendo recomendável ações preventivas simples e eficazes de modo que possam ser adotadas pelas comunidades (Donalísio & Glasser 2002). São medidas do controle integrado: controlar a população de mosquitos a partir de fatores limitantes à sua sobrevivência; educação sanitária, visando à mobilização comunitária; saneamento básico para eliminação de potenciais criadouros; controle biológico; barreiras mecânicas e controle químico (PAHO 1995). A estratégia de controle integrado demanda o uso de novos indicadores que sinalizem melhor o risco de transmissão da doença como as armadilhas adesivas MosquiTRAP<sup>®</sup> (WHO 2006).

#### **1.4 Monitoramento do *Aedes aegypti***

O monitoramento de insetos vetores consiste em determinar suas mudanças geográficas e realizar medições relativas à população ao longo do tempo, facilitando as intervenções no âmbito de saúde pública (OPAS 1991 *apud* Gama 2005). Para o Ministério da Saúde, o monitoramento do *A. aegypti* é prioritário para a erradicação da febre amarela urbana e da dengue no Brasil (FUNASA 2001, FUNASA 2002).

O monitoramento pode envolver a coleta de ovos, larvas, pupas e adultos, sendo mais habitual a realização da pesquisa larvária. A pesquisa larvária consiste da inspeção dos depósitos de água do imóvel em busca de formas imaturas. O material coletado é levado para o laboratório e, a partir destes dados, são estimados índices entomológicos utilizados como medidas dos níveis de infestação e indicadores de risco de transmissão de dengue (Gomes 1998, FUNASA 2009).

No monitoramento do vetor podem ser empregadas armadilhas. As larvitampas, por exemplo, são utilizadas para a coleta de larvas e sua finalidade básica é a detecção precoce da introdução do vetor em locais vulneráveis, como portos, aeroportos, terminais rodoviários, ferroviários e outros (Gomes, 1998, FUNASA 2001, FUNASA 2009). Com a ovitrampa (armadilha de oviposição) são coletados ovos. Esta armadilha foi desenvolvida na década de 1960 (Fay & Perry 1965, Fay & Eliason 1966) e ainda é ferramenta nos programas de monitoramento. Consiste num recipiente de plástico preto, com capacidade de 500 mL, contendo uma palheta de eucatex para coletar os ovos de fêmeas de *A. aegypti* (FUNASA 2001, FUNASA 2009).

A coleta de adultos pode ser realizada através do uso de armadilhas ou da busca ativa com o auxílio de capturadores manuais (puçá, capturador de castro e aspirador elétrico) (Nelson 1994). Já existem várias armadilhas utilizadas para a captura de insetos vetores, entre eles o *A. aegypti*, como a CDC (Sudia & Chamberlain 1962), Fay Prince (Fay & Prince 1970), armadilha Shannon (Shannon 1939 *apud* Taípe-lagos & Natal 2003), CFG (Kline 1999), BG-Sentinel (Krockel et al 2006) e MosquiTRAP<sup>®</sup> (Eiras 2002, WHO 2006, Eiras & Resende 2009).

### 1.5 MosquiTRAP<sup>®</sup> e o monitoramento inteligente do mosquito da dengue

A MosquiTRAP<sup>®</sup> foi desenvolvida no Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (LabEQ) e patenteada pela UFMG (Eiras 2002) (Fig. 2).



Figura 2. Armadilha MosquiTRAP<sup>®</sup>: a) Armadilha montada; b) Componentes da armadilha: base (II), tampa (I), cartão adesivo (III), AtrAedes<sup>®</sup> (IV) e suporte para cartão adesivo (V).

A armadilha adesiva consiste num recipiente preto com 33 centímetros de altura e 15 centímetros de diâmetro. A base (Fig. 2a II) é um reservatório para 300 mL de água. No interior da armadilha há um cartão adesivo (38 x 19 cm) preto e inodoro (Fig. 2a III), onde as fêmeas de *A. aegypti* ficam aderidas após o pouso na superfície interna da armadilha. Dois suportes para cartão adesivo (12 cm diâmetro) (Fig. 2a V) sustentam o cartão no interior do

dispositivo (Eiras 2002, Favaro et al. 2006, Gama et al. 2007, Roque & Eiras 2008, Eiras & Resende 2009). No cartão adesivo é colocado um atraente sintético de oviposição (AtrAedes<sup>®</sup>) (Fig. 2a IV), obtido a partir de voláteis de infusão de *Panicum maximum* (capim-colonião), específico para a captura de fêmeas de *A. aegypti* (Sant'Ana et al. 2006, Roque & Eiras 2008).

As armadilhas devem ser instaladas no peridomicílio, pois foi demonstrado que armadilhas no entorno das residências capturam cerca de cinco vezes mais do que as instaladas no intradomicílio, possivelmente devido ao hábito hematofágico das fêmeas no intradomicílio e a oviposição no peridomicílio (Favaro et al. 2006). Além disso, as MosquiTRAP<sup>®</sup> devem ser alocadas em local visível, a uma altura máxima de 1,5 m acima do solo, protegido do sol e da chuva, fora do alcance de animais domésticos e crianças. As vistorias e coletas de dados devem ser semanais (Eiras & Resende 2009).

A principal vantagem da MosquiTRAP<sup>®</sup> em relação à armadilha de oviposição (Ovitampa) é que a primeira captura adultos enquanto que a segunda coleta ovos. Deste modo, a MosquiTRAP<sup>®</sup> permite quantificar e identificar o número de fêmeas que visitaram a armadilha em busca de sítio de oviposição e estimar a população de adultos em uma determinada área. Este método reduz o número de pessoas envolvidas no monitoramento do inseto e permite a obtenção de resultados com maior agilidade que podem ser disponibilizados no dia da inspeção das armadilhas. Além disso, a armadilha adesiva também pode ser utilizada no diagnóstico de vírus, a partir de grávidas de *A. aegypti* por ela capturadas (WHO 2006, Eiras & Resende 2009).

O monitoramento inteligente do mosquito da dengue (MI-Dengue) é uma nova tecnologia que pode ser usada no monitoramento do inseto. Os dados de captura de *A. aegypti* e *A. albopictus* nas armadilhas MosquiTRAP<sup>®</sup> são armazenados num dispositivo eletrônico (palm top ou aparelho celular) contendo software específico. O sistema permite que os dados sejam prontamente enviados a uma central e disponibilizados via internet para os gestores de saúde pública. Com os dados coletados são realizados mapas georreferenciados do município ou região, bem como tabelas analíticas dos locais monitorados além do cálculo de índice entomológico. Diante destas informações semanais, os gestores de saúde pública têm a opção de identificar áreas para as quais deverão ser direcionadas as ações de controle do vetor. Resultados preliminares sugerem que a adoção da estratégia de controle com visitas de casa em casa em um raio de 200m da armadilha positiva contribuiu para a redução dos casos de dengue nos municípios que adotaram o MI-Dengue (WHO 2006, Eiras & Resende 2009).



## 1.6 Comportamentos de oviposição

A seleção de sítios de oviposição é um fator crítico para a sobrevivência e dinâmica populacional dos culicídeos. Esta seleção se inicia com a percepção de estímulos do ambiente (visual, tátil ou olfativo), que podem tanto atrair, estimular, repelir ou inibir, limitando as possibilidades de encontrar locais de oviposição. As informações físico-químicas do possível criadouro incluem cor e densidade óptica de água; textura, umidade, temperatura do recipiente de oviposição, entre outros (Bentley & Day 1989, McCall & Cameron 1995).

Existem muitas semelhanças entre os comportamentos de busca por hospedeiro e sítio para oviposição, uma vez que ambos exigem percepção integrada e complexa de estímulos físicos e químicos pelo inseto. Sinais a longa distância, provavelmente envolvendo a visão, permitem ao inseto identificar diferentes habitats, hospedeiros específicos e características dos sítios de oviposição. À medida que os insetos se aproximam do hospedeiro ou do sítio de oviposição sinais de curto alcance tornam-se importantes, como temperatura e sinais químicos. Por exemplo, estímulos olfativos auxiliam na identificação de plumas de odores de hospedeiros ou de voláteis do sítio de oviposição (Bentley & Day 1989).

No ambiente silvestre original, o mosquito *A. aegypti* estava habituado a realizar a oviposição em buracos de árvores, axilas das folhas, cascas de frutas e sítios similares de retenção de água (Lounibos 1981 *apud* Reiter 2007). Atualmente, o inseto raramente é encontrado longe de habitações humanas, sendo capaz de depositar seus ovos em uma ampla gama de recipientes (Reiter 2007). Os criadouros preferenciais de *A. aegypti* são utensílios artificiais, utilizados pelo homem, como: pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos de plantas, vasos de cemitério; além de caixas de água, tonéis, latões e cisternas destampadas ou mal tampadas; e até mesmo lagos artificiais, piscinas e aquários abandonados. A proliferação do *A. aegypti* ocorre nestes recipientes quando a água acumulada está limpa, com pouca matéria orgânica em decomposição, além de estar acumulada em locais sombreados com fundo ou paredes escuras (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Tanto nos criadouros naturais quanto nos artificiais as larvas dependem de uma fonte alimentar que, freqüentemente, está em quantidade limitada (Reiter 2007).

Além de depositarem os ovos principalmente na superfície interna dos recipientes com acúmulo de água (Fay & Perry 1965, Gadelha & Toda 1985, Nelson 1986, Chadee & Cobert 1987, Allan & Kline 1998, Clements 1999, Gomes et al. 2006), fêmeas de *A. aegypti* também depositam seus ovos diretamente na superfície da água dos recipientes de oviposição (Madeira et al. 2002, Gomes et al. 2006, Ponnusamy et al. 2008, Abreu 2010). Ovos deixados

na água apresentam rápida capacidade de eclosão assegurando ao vetor, em condições naturais, a rápida colonização de criadouros disponíveis, mantendo no período de estiagem uma população de insetos flutuante (Madeira et al. 2002, Gomes et al. 2006). Os ovos anexados ao substrato sólido, perto da borda da água, podem sobreviver por longos períodos de estiagem, e eclodem ao serem submergidos por água (Gadelha & Toda 1985). O número de ovos em cada postura depende da quantidade de sangue ingerido durante a alimentação sangüínea, mas sabe-se que uma fêmea produz em média 120 ovos (Forattini 2002), que são depositados em mais de um criadouro, comportamento denominado “skip oviposition” ou oviposição aos saltos (Chadee et al. 1990, Apostol et al. 1994, Reiter 2007) ou em apenas um criadouro (Harrington & Edman 2001, Williams et al. 2008).

Gomes e colaboradores (2006) observaram a periodicidade de oviposição em laboratório durante o fotoperíodo, demonstrando que fêmeas de *A. aegypti* têm maior atividade ao entardecer (15 às 19 h) e no início da noite (19 às 21 h). No campo, similarmente, observa-se que durante a fotofase, o período da tarde é o de maior oviposição (13 às 17 h), enquanto que na escotofase, a maior atividade de oviposição foi observada no período crepuscular do entardecer (17 às 19 h). Chadee (2010) também verificou a periodicidade de oviposição de *A. aegypti* em laboratório observando a ausência de deposição de ovos durante a escotofase. Demonstrou também que as oviposições ocorrem fundamentalmente à tarde, entre 14 e 18 horas. No dia seguinte, nas duas primeiras horas de fotofase ocorre um pequeno pico de oviposição, sendo que os ovos depositados nesse horário são resíduos do dia anterior.

### **1.7 Infoquímicos e a oviposição de *Aedes aegypti***

A comunicação entre animais é realizada através do uso de sinais visuais, acústicos, táteis e/ou químicos. Embora todos estes sinais tenham sua importância para determinada espécie, são os sinais químicos, de modo geral, os grandes responsáveis pela comunicação entre insetos. Estes compostos agem como gatilhos fisiológicos de reações comportamentais específicas no indivíduo receptor da informação química. É através da detecção e emissão destes compostos químicos que os insetos encontram parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolhem local de oviposição, organizam suas comunidades (insetos sociais) e se defendem contra predadores (Vilela & Della Lucia 2001).

O termo semioquímico abrange tanto as toxinas quanto as substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informação, enquanto o termo infoquímico, foi utilizado por Dicke & Sabelis (1988a *apud* Vilela & Della Lucia 2001) para enfatizar a diferença entre

a categoria de substâncias químicas que transportam informação e as categorias das toxinas e dos nutrientes. Portanto, considera-se infoquímicos aquelas substâncias que, no contexto natural, fornecem informações, em uma interação entre dois indivíduos, provocando no receptor um comportamento ou resposta fisiológica. Quando o composto é mediador de comunicação intraespecífica, ou seja, o emissor e o receptor do sinal químico são da mesma espécie, o semioquímico é denominado feromônio. No entanto, quando os compostos intermedeiam comportamentos de indivíduos de espécies diferentes, numa relação interespecífica, estas substâncias são classificadas como aleloquímicos (Vilela & Della Lucia 2001)

Os aleloquímicos diferenciam-se de acordo com o tipo de organismo que está sendo beneficiado na comunicação. Cairomônios são sinais químicos que, quando liberados, beneficiam apenas o receptor. Alomônios, ao contrário, são sinais químicos que somente favorecem o emissor. Já os sinomônios favorecem tanto o agente emissor quanto o receptor do sinal. Ainda no grupo dos aleloquímicos incluem-se os antimônios e apneumônios (Vilela & Della Lucia 2001, Corrêa & Sant'Ana 2007).

Feromônios são substâncias secretadas por um indivíduo para o ambiente, que recebidas por um segundo indivíduo da mesma espécie, provocam uma reação específica ou processo fisiológico definido. Estes podem incluir diferentes tipos de comportamento, como a agregação sexual, dispersão, alarme, territorialidade, fuga, oviposição e outros. Os feromônios podem atuar de forma prolongada na fisiologia e desenvolvimento dos insetos (preparadores) ou provocarem mudança imediata no comportamento dos indivíduos (desencadeadores) (Vilela & Della Lucia 2001).

Dipteros hematófagos, como o *A. aegypti*, de modo geral, não exibem cuidado parental, assim a seleção de locais para oviposição é crucial, não somente para o aumento das chances de sobrevivência de seus descendentes e economia de energia para a localização de criadouros, como também para a emergência de um grande número de adultos. Assim, o feromônio de oviposição, geralmente liberado pelas formas imaturas de culicídeos tem a função de atrair as fêmeas grávidas para um criadouro já localizado e selecionado por indivíduos da mesma espécie (Eiras 2001).

Os primeiros pesquisadores que desenvolveram a hipótese de existência de um feromônio estimulante de oviposição foram Hudson & Mclintock (1967). Mais tarde, Osgood (1971) verificou tal hipótese ao estudar o comportamento de fêmeas grávidas de *Culex tarsalis*, identificando a preferência por oviposição em água com co-específicos em

detrimento da água destilada. No ano seguinte, Starratt & Osgood (1972) identificaram a mistura de 1,3- diglicerídeos associados à deposição de ovos pelo *C. tarsalis*.

Diferentes autores verificaram que as substâncias químicas provenientes de formas imaturas (ovos e larvas) tornam o ambiente aquático co-específico mais estimulante à deposição de ovos (Soman & Reuben 1970, Allan & Kline 1998, Serpa et al. 2008) por grávidas de *A. aegypti*. Mendki e colaboradores (2000) isolaram e identificaram cinco compostos (miristato isopropílico, octadecano, heneicosano, docosano e nonacosano) relacionados ao *A. aegypti*, analisando a água onde suas larvas se desenvolveram, destacando a ação do *n*-heneicosano. Seenivasagan e colaboradores (2009) observaram, em olfatômetro em Y, que o *n*-heneicosano é um atraente de oviposição para *A. aegypti*, e que a resposta ao hidrocarboneto é dose dependente.

Ganesan e colaboradores (2006), usando extratos metanólicos de ovos de *A. aegypti*, identificaram os ácidos dodecanóico, tetradecanóico, hexadecanóico, (Z)-9-hexadecenóico, octadecanóico e (Z)-9-octadecenóico, além de metil dodecanoato, metil tetradecanoato, metil hexadecanoato, metil octadecanoato, metil (Z) -9 -hexadecenoato metil-(Z)-9-octadecenoato e 6-hexanolactona. Estes autores verificaram em bioensaios laboratoriais, os efeitos destas substâncias no comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Dentre os compostos listados, o ácido dodecanóico e o ácido (Z)-9-hexadecenóico demonstraram ação estimulante para oviposição em diferentes concentrações, enquanto os ésteres demonstraram efeito de repelência para oviposição. Sharma e colaboradores (2008) avaliaram as respostas de oviposição de *A. aegypti* e *A. albopictus* a vários ésteres de 21 carbonos. Eles observaram que hexadecil pentanoato, tetradecil octanoato e tridecil octanoato induziram significativa repelência à oviposição para as duas espécies, enquanto que o propil-octadecanoato apresentou-se como um atraente de oviposição para *A. aegypti*.

Efeitos repelentes de oviposição foram descritos em resposta a água de larvas contendo superpopulações, larvas famintas (Zahiri & Rau 1998) ou larvas infectadas com o parasito *Plagiorchis elegans* (Zahiri et al.1997).

## **1.8 Atraentes e estimulantes de oviposição**

Os fatores responsáveis pela atração de fêmeas grávidas à longa distância são constituídos por estímulos visuais (ex.: cor), físicos (ex.: temperatura, umidade) e químicos (ex.: odores) que auxiliam as fêmeas na localização dos sítios de oviposição (Clements 1999, Eiras & Mafra-Neto 2001). Os compostos químicos que estimulam os insetos a locomoverem-

se em direção à fonte de odor a longa distância (maior que 1 m) são denominados atraentes e são comumente utilizados em armadilhas para atraí-los. Em culicídeos, vários compostos voláteis presentes em criadouros orientam as fêmeas grávidas em direção à fonte de odor (Millar et al. 1992, Eiras & Mafra-Neto 2001). Os estimulantes de oviposição são substâncias que induzem o comportamento de oviposição após as fêmeas terem localizado a fonte de odor (no caso criadouro), sendo responsável pela resposta de curta distância (resposta por contato) (Isoe & Millar 1995). Portanto, é muito importante conhecer como as fêmeas grávidas de *A. aegypti* respondem aos compostos identificados em extratos de larvas e em ovos co-específicos.

Mendki e colaboradores (2000) e Ganesan e colaboradores (2006) identificaram compostos presentes nos ovos e extratos de larvas de *A. aegypti*, respectivamente. No entanto, os testes de comportamento com fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram conduzidos no interior de uma gaiola, onde o inseto tinha como opção a escolha de colocar os ovos em uma placa de Petri contendo água com feromônio ou no controle (apenas água). Este tipo de teste de comportamento apenas elucida os compostos estimulantes de oviposição, não discriminando, portanto os compostos que atuam à longa distância (atraente) (Eiras & Mafra-Neto 2001). Seenivasagan e colaboradores (2009), por outro lado, avaliaram a influência do *n*-heneicosano em diferentes concentrações no olfâmetro em Y e identificaram concentrações atraentes para o composto, sugerindo inclusive seu uso em armadilhas para o vetor.

## 1.9 Percepção olfativa de insetos

Os insetos apresentam um sistema sensorial complexo, composto por quimiorreceptores, mecanorreceptores, higrorreceptores e termorreceptores (Mordue 2003 *apud* Navarro-Silva et al. 2009). A percepção de estímulos químicos por insetos se dá através de células quimiorreceptoras localizadas nas sensilas olfativas, presentes nas antenas, peças bucais, pernas, asas, ovipositor e outras partes (Davis 1976, Van der Goes van Naters & Carlson 2006, Corkum & Belanger 2007).

As antenas são o principal órgão sensorial periférico em insetos. Cada antena de Culicinae consiste de 13 flagelômeros unidos a um pedicelo, que contém o órgão de Johnston's, que se conecta à cabeça através do escapo. O órgão de Johnston's é um aparato sensorial que funciona como órgão auditivo, consistindo de milhares de mecanorreceptores radialmente dispostos (7500 em fêmeas 15000 em machos). Observa-se um dimorfismo sexual nas antenas dos mosquitos, pois na antena dos machos todas as sensilas olfativas estão

presentes nos dois segmentos distais, enquanto que nas fêmeas, elas são relativamente distribuídas em todos os flagelômeros (McIver 1982, Clements 1999).

Estima-se que a maioria dos neurônios sensoriais presentes nas antenas dos mosquitos apresentem função olfativa. Além disso, estão presentes ainda receptores mecânicos, de temperatura e umidade. A sensila é uma estrutura na qual o estímulo externo é transformado em informação transmissível, na forma de um impulso nervoso que é traduzido em uma resposta comportamental (Van der Goes van Naters & Carlson 2006). Elas são amplamente modificadas para a sensibilização térmica, química, mecânica, bem como alterações visuais e de umidade. As sensilas antenais são diferenciadas baseando-se em características morfológicas, padrões de enervação neuronal e funções. As respostas dos insetos a diferentes odores estão relacionadas ao número e aos tipos de receptores presentes nas antenas, ou seja, a resposta a determinado composto é proporcional ao número de receptores capazes de sensibilização diante de cada sinal (McIver 1982).

O desencadeamento de um comportamento diante de determinado infoquímico está relacionado à percepção pelo inseto. O processo compreendido entre a percepção e a resposta envolve uma série de eventos neurofisiológicos que irão capacitá-lo a responder a determinado odor. Começa com a recepção do estímulo pelo sistema sensorial periférico, sendo sucedido pela decodificação e integração pelo sistema nervoso central da informação recebida. Em seguida, ocorre a ativação do sistema eferente apropriado, resultando na resposta do indivíduo. A resposta irá depender ainda de fatores do ambiente, como temperatura, movimentação e umidade relativa do ar (McIver 1982, Van der Goes van Naters & Carlson 2006).

### **1.10 Extração de infoquímicos**

Os infoquímicos, substâncias envolvidas na comunicação entre insetos, normalmente agem em concentrações baixas e costumam influenciar quase todos os aspectos da vida das espécies envolvidas. O estudo químico destas substâncias, aliados às observações comportamentais, possibilita um maior entendimento em relação à comunicação química entre organismos. Tal conhecimento serve de base para a pesquisa aplicada, viabilizando o uso de infoquímicos como metodologia no manejo e controle de insetos, por meio de manipulação comportamental (Vilela & Della Lucia 2001, Sant'Ana & Stein 2007, Navarro-Silva et al. 2009).

Existe uma variedade de métodos e técnicas para extração e identificação de infoquímicos. A metodologia mais apropriada irá depender do tipo de material em estudo e da disponibilidade de equipamentos adequados. Os métodos utilizados para a coleta de feromônios são basicamente dois: aeração e extração por solvente (Zarbin 2001, Sant'Ana & Stein 2007).

A aeração permite a coleta de voláteis emitidos pelo inseto, incluindo os feromônios. As diversas técnicas deste método envolvem um fluxo de ar que purga as substâncias voláteis, emitidas pela amostra, a um adsorvente. Os compostos são adsorvidos em polímeros especiais e a dessorção é realizada com solventes, como diclorometano, hexano e éter com elevado grau de pureza. A preferência por tais solventes se relaciona à volatilidade dos mesmos, que possibilita a evaporação sem que os materiais coletados sejam expostos a altas temperaturas. O processo de dessorção dos voláteis deve ser realizado utilizando-se uma pequena quantidade de solvente, pois, desta forma, aumenta-se o rendimento da extração e diminui-se o grau de impurezas do extrato (Millar & Haynes 1998, Zarbin 2001).

A extração por solventes é, indubitavelmente, a metodologia mais utilizada para a coleta de feromônios, pois, além da praticidade, requer um tempo muito menor para a obtenção do material do que a aeração. É efetuada via processo simples de contato do solvente com a superfície da amostra. Analitos solúveis na fase orgânica são distribuídos entre a substância e o solvente extrator, estando a eficiência do processo diretamente relacionada à solubilidade dos compostos no solvente utilizado (Eiras et al. 1999, Zarbin 2001, Subchev & Jurenka 2001, Batista-Pereira et al. 2006, Sant'Ana & Stein 2007).

As substâncias feromonais são, em geral, moléculas apolares com alta volatilidade. Solventes apolares comuns, como hidrocarbonetos e hidrocarbonetos clorados, são apropriados para a extração porque as substâncias voláteis ativas possuem uma alta solubilidade nesses solventes. No entanto, utilizando-se a extração com solvente, o material coletado apresentará sempre uma quantidade maior de impurezas, como hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros, visto que tecidos de todo o inseto estão sendo extraídos, incluindo gorduras e cutículas (Zarbin 2001, Sant'Ana & Stein 2007).

Após a extração, é necessário remover o solvente, sendo um momento crítico do processo. A volatilidade dos compostos, associadas às pequenas quantidades, faz com que as perdas do material sejam freqüentes, diminuindo o rendimento da extração. Há dois procedimentos principais de concentração: destilação do solvente ou evaporação sob fluxo de gás inerte. A destilação do solvente pode degradar a amostra com processos de oxidação, desidratação, rearranjos ou polimerização. A evaporação do solvente sob fluxo de gás inerte,

por outro lado, apresenta menores efeitos de degradação. Consiste em passar um leve fluxo de gás inerte (nitrogênio ou argônio) sobre a superfície do solvente, até que seja atingida a concentração desejada. Para tal, um frasco de iguais dimensões, contendo um volume conhecido do solvente, deve ser usado como referência (Millar & Haynes 1998, Zarbin 2001, Sant'Ana & Stein 2007).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência de infoquímicos provenientes de imaturos (larvas e ovos) de *Aedes aegypti* no comportamento de oviposição de fêmeas grávidas co-específicas em condições de laboratório e em campo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar os extratos de água de criação de larvas de *A. aegypti* associados à MosquiTRAP® como atraentes de oviposição para fêmeas co-específicas em campo;
- ✓ Avaliar a influência dos extratos de larvas e água de criação de larvas, em diferentes concentrações, como estimulantes de oviposição para grávidas de *A. aegypti* em condições de laboratório;
- ✓ Analisar pela cromatografia gasosa extratos de larvas e água de criação de larvas;
- ✓ Verificar como os ovos de *A. aegypti*, de diferentes idades, influenciam na oviposição de co-específicas em laboratório;
- ✓ Identificar, por cromatografia gasosa, as alterações na composição química dos voláteis emitidos por ovos, de diferentes idades, e relacioná-los com o experimento de comportamento.



## **Capítulo I**

**Avaliação de infoquímicos presentes em larvas e água de criação de larvas de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) como atraentes e/ou estimulantes de oviposição para grávidas co-específicas**

## RESUMO

Estímulos físicos e químicos influenciam na escolha de criadouros adequados por fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, entre eles infoquímicos presentes em águas habitadas por larvas co-específicas. Os objetivos deste estudo foram avaliar: (a) extratos de larvas - L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub> - de *A. aegypti* em diferentes concentrações como estimulantes de oviposição em laboratório, (b) extratos de larvas de *A. aegypti* na armadilha MosquiTRAP<sup>®</sup> como atraentes de oviposição no campo e (c) analisar pela cromatografia gasosa extratos de larvas e água de criação de larvas. O número de larvas dos extratos foi estimado a partir do peso médio de 600 larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstaes (N=30). Foram realizados testes de dupla escolha em gaiolas (30x30x30 cm) no laboratório. Foram preparados, nas concentrações 0,5; 2,0; 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada, os extratos : (1) água de criação de larvas; (2) hexânicos de água de criação de larvas e (3) metanólicos do corpo de larvas. Em campo, os extratos foram adicionados à armadilha adesiva MosquiTRAP<sup>®</sup> para atraírem fêmeas de *A. aegypti*, sendo avaliados os tratamentos: (1) água de torneira, (2) infusão de *Panicum maximum* a 10%, (3) água com ração para répteis aquáticos, (4) água de criação de larvas sem ração (8 larvas/mL de água destilada), (5) água de criação de larvas com ração (8 larvas/mL) e (6) água de criação de larvas sem ração (8 larvas/mL) com infusão. Os resultados indicaram que o peso médio de 600 larvas foi  $1,0 \pm 0,03$  g. Os extratos água de criação de larvas, hexânico de água de criação de larvas e metanólico do corpo das larvas, concentração de 0,5 larvas/mL, foram mais estimulantes do que seus respectivos controles (Qui Quadrado,  $p > 0,05$ ). O extrato metanólico do corpo de larvas (2,0 larvas/mL) foi inibidor à oviposição ( $p < 0,05$ ) quando comparado a seu controle. Verificou-se o *n*-heneicosano, estimulante e atraente de oviposição, em extratos hexânicos do corpo e da água de criação de larvas, não sendo encontrado em extratos metanólicos do corpo das larvas. Outros compostos ainda não foram identificados. Em campo, o número de fêmeas de *A. aegypti* capturadas em armadilhas com infusão foi similar ao das armadilhas com água de criação de larvas sem ração (Kruskal Wallis,  $p > 0,05$ ). A avaliação de água de criação de larvas com infusão não indicou efeito de adição ou sinergia da mistura. Concluiu-se que infoquímicos de origem larval foram atraentes, estimulantes ou inibidores de oviposição para *A. aegypti*. Identificou-se que larvas de populações brasileiras de *A. aegypti* produzem o *n*-heneicosano, sugerindo-se que este feromônio pode ser mais bem estudado como atraente e estimulante para o vetor. Futuramente estes compostos poderão ser identificados e avaliados em armadilhas para captura de fêmeas co-específicas.

## I.1 INTRODUÇÃO

A terminologia e os conceitos empregados em avaliações comportamentais de oviposição precisam ser bem definidos para a determinação de sua real influência no comportamento de culicídeos. Substâncias que, no contexto natural, fornecem informações em uma interação entre dois indivíduos, provocando no receptor um comportamento ou resposta fisiológica são denominados infoquímicos (Vilela & Della Lucia 2001). Os infoquímicos envolvidos no comportamento de escolha por sítios de oviposição podem atuar como atraentes ou estimulantes, bem como inibidores ou repelentes. Os atraentes de oviposição são responsáveis por induzir os insetos a se locomoverem grandes distâncias em direção à fonte de odor enquanto que os estimulantes desencadeiam o comportamento de oviposição após as fêmeas já terem localizado o criadouro, sendo a ação normalmente induzida por contato. Os repelentes de oviposição podem atuar a longa distância, fazendo com que os insetos se desloquem para longe da fonte de estímulo, desencadeando um comportamento de evitar o criadouro. Os inibidores, no entanto, evocam resposta após o contato do inseto com o estímulo. As fêmeas grávidas de culicídeos voam em direção oposta à fonte de infoquímicos repelentes enquanto que os inibidores são responsáveis por impedir a deposição de ovos em um substrato, quando as fêmeas grávidas já localizaram o criadouro (Dethier et al. 1960, Osgood & Kempster 1971, Isoe & Millar 1995, Isoe et al. 1995).

A separação entre os sinalizadores com ação estimulante ou atraente é complexa, uma vez que estes podem se sobrepor. O uso de metodologias diferentes para distinguir estimulantes e atraentes é fundamental para compreender a ação de cada um, sendo que ambos podem ocorrer em consequência de um mesmo estímulo (Mendki et al. 2000, Seenivasagan et al. 2009). Geralmente, testes de laboratório em ambientes confinados (ex.: gaiolas 30 x 30 x 30 cm), onde os insetos deslocam poucos centímetros de distância até os recipientes de oviposição e podem entrar em contato com os infoquímicos, indicam, principalmente, a ação estimulante de oviposição (Isoe & Millar 1995, Isoe et al. 1995). Experimentos em campo, em que os infoquímicos presentes nos criadouros ficam submetidos a correntes de ar e são percebidos a longas distâncias por fêmeas grávidas de culicídeos, determinam a função atrativa destas substâncias.

A escolha pelo sítio de oviposição adequado tem importante influência no sucesso reprodutivo das espécies que apresentam larvas aquáticas. Esta seleção é importante uma vez que as formas imaturas não podem se deslocar para um criadouro mais apropriado se as condições se tornarem desfavoráveis (Onyabe & Roitberg 1997, Spencer et al. 2002). Assim,

a habilidade de fêmeas reconhecerem se um sítio dará ou não suporte ao desenvolvimento e sobrevivência de sua progênie é um fator crítico na manutenção das populações de mosquitos. Uma escolha errada pode resultar na morte de muitos imaturos e na perda do investimento reprodutivo da fêmea (Zahiri & Rau 1998).

O vetor apresenta várias estratégias de oviposição, sendo a maioria dos ovos depositada na parede do criadouro e uma minoria deixada diretamente na água (Fay & Perry 1965, Gadelha & Toda 1985, Nelson 1986, Chadee & Cobert 1987, Allan & Kline 1998, Clements 1999, Gomes et al. 2006). As fêmeas de *A. aegypti* podem tanto depositar os ovos de um único lote em criadouros diferentes (Reiter 2007, Chadee 2009), comportamento denominado “skip oviposition”, ou oviposição aos saltos, (Mogi & Moroky 1980 *apud* Chadee 2009) quanto colocar todos os ovos num único criadouro (Harrington & Edman 2001, Williams et al. 2008).

Diversos são os fatores físicos e químicos envolvidos no reconhecimento de um criadouro adequado por fêmeas de culicídeos, entre eles a presença de infoquímicos provenientes de ambientes anteriormente habitados por imaturos co-específicos (Bentley & Day 1989). Vários autores já verificaram que substâncias químicas provenientes de águas previamente habitadas por larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) tornam o ambiente mais propício à deposição de ovos por fêmeas da espécie (Soman & Reuben 1970, Mendki et al. 2000, Serpa et al. 2008). Fêmeas de *A. aegypti* também são influenciadas por químicos de outras espécies e preferem depositar seus ovos em águas onde larvas de *A. albopictus* se desenvolveram (Allan & Kline 1998, Serpa et al. 2008).

Mendki e colaboradores (2000) identificaram cinco dos compostos presentes em água de criação de larvas de *A. aegypti*. Observaram ainda que entre estes, o *n*-heneicosano é um estimulante de oviposição, pois foi responsável pelo maior número de ovos depositados num criadouro em condições confinadas de laboratório. Seenivasagan e colaboradores (2009) demonstraram pela técnica de olfatometria, que este hidrocarboneto também atua como atraente de oviposição para fêmeas de *A. aegypti*, não descartando, entretanto, sua ação estimulante.

Outras espécies de culicídeos também são influenciadas pela presença de infoquímicos provenientes de águas previamente habitadas por imaturos co-específicos, como *A. togoi* (Trimble & Wellington 1980), *A. triseriatus* (Bentley et al. 1976, McDaniel et al. 1979), *A. atropalpus* (Maire 1985), *A. fluviatilis* (Consoli & Teixeira 1988), *Culex quinquefasciatus*, *Ochlerotatus australis* (Mokany & Shine 2003).

A mensagem química liberada no ambiente aquático por larvas de *A. aegypti* pode ser modulada para refletir o estado nutricional ou parasitológico dos imaturos (Zahiri et al. 1997). Águas habitadas por *A. aegypti*, por exemplo, são ambientes atrativos para fêmeas co-específicas (Soman & Reuben 1970, Mendki et al. 2000, Serpa et al. 2008). No entanto, se as larvas estão famintas, submetidas a excesso populacional ou infectadas com o parasito *Plagiorchis elegans* Rudolphi, o ambiente se torna extremamente repelente. Suspeita-se que a indução de repelência decorre de resposta ao estresse a que os imaturos estão submetidos (Zahiri et al. 1997, Zahiri & Rau 1998), por isso é relevante distinguir situações em que as concentrações de larvas num criadouro sinalizaram, com estimulantes e/ou atraentes, um sítio adequado para oviposição. Neste aspecto, as informações disponíveis para *A. aegypti* em relação à avaliação de água de criação de larvas mantidas em diferentes concentrações são divergentes. Zahiri e Rau (1998), por exemplo, verificaram que água de criação de larvas, concentração de 0,5 larvas/mL de água destilada, são estimulantes de oviposição, enquanto que Ivo e Eiras (1999) verificaram que a concentração mais estimulante foi de 3,0 larvas/mL de água destilada. Outros grupos verificaram que água de criação de larvas mantidas nas concentrações de 0,33 (Allan e Kline 1998) e 0,28 larvas/mL de água destilada (Serpa et al. 2008) foram mais estimulantes do que água pura para a oviposição de *A. aegypti*.

A elucidação da atratividade e/ou estimulação à oviposição pode levar ao desenvolvimento de iscas para armadilhas, utilizando extratos de imaturos co-específicos como atraentes para fêmeas grávidas de *Aedes* sp. Esta ferramenta pode ser útil no monitoramento e, até mesmo, o controle da espécie (Barbosa & Silva 2002, Navarro-Silva et al. 2009). Assim, o presente estudo teve como objetivo selecionar os extratos de larvas co-específicas que induzam preferência de oviposição por *A. aegypti*, em condições de laboratório e em campo.

## **I.2 METODOLOGIA**

### **I.2.1 Criação e manutenção da colônia de *Aedes aegypti* em laboratório**

A colônia de *A. aegypti* utilizada nos experimentos é mantida no insetário do Laboratório de Ecologia Química de Insetos vetores (LabEQ) do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG). A colônia foi estabelecida em janeiro de 2007 a partir de ovos coletados em armadilhas de oviposição (Ovitampa) instaladas no *Campus* Pampulha da UFMG. Os ovos provenientes das armadilhas foram mantidos em bandejas de plástico até o

quarto ínstar para a identificação específica (Sant'Ana 2003). Após a identificação, amostras (n=50) de larvas de quarto ínstar de cada bandeja foram submetidas a RT-PCR no Laboratório de Virologia (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) para verificar a presença dos diferentes sorotipos do vírus do dengue. Apenas as bandejas contendo larvas livres do vírus da dengue foram utilizadas para o estabelecimento da colônia (Roque 2002, Sant'Ana 2003, Roque 2007). Desde o estabelecimento, a criação dos insetos foi realizada sob condições ambientais controladas ( $27 \pm 2$  °C, 75 a 80% U.R. e 12 horas de fotofase) (Eiras 1991).

Papéis de filtro contendo ovos de *A. aegypti* foram colocados em potes plásticos contendo 400 mL de água desclorada até a eclosão das larvas. Posteriormente, as larvas foram transferidas para cubas plásticas contendo 1.800 mL de água desclorada (Roque 2002). Como alimento, foi adicionado ração para peixes (Goldfish, Alcon<sup>®</sup>) em cubas com larvas de primeiro ínstar e ração para répteis aquáticos (Reptofile, Alcon<sup>®</sup>) em cubas contendo larvas de segundo, terceiro e quarto ínstars.

As pupas foram retiradas diariamente das bandejas de criação e transferidas para gaiolas de polipropileno teladas (30 x 30 x 30 cm) (Bugdorm-1, Mega View Science Education Services, Taiwan). Os adultos foram mantidos nestas gaiolas e alimentados com solução açucarada (10 % sacarose). Para a manutenção da colônia e realização dos experimentos, as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em alimentador artificial (Ahmed 1999 *apud* Roque 2002) (Fig.3).



Figura 3. Esquema de alimentação artificial utilizado para fêmeas de *Aedes aegypti*. (a) Banho-Maria mantido a 38°C, placa de acrílico e potes telados para o aprisionamento de fêmeas e para possibilitar a introdução de suas probóscides nos alimentadores artificiais. (b) Detalhe de como o sangue é colocado no alimentador artificial.

Para o repasto sanguíneo foi utilizado um sistema artificial, constituído por uma placa de acrílico (83,0 x 25,0 cm) e oito cilindros de vidro (alimentadores artificiais), conectados em série por tubos de borracha, por onde circulava água aquecida em banho Maria (Fig. 3a). No interior do banho Maria foi colocada uma bomba de aquário (Better 650) com a finalidade de impulsionar a água a 38°C para as mangueiras que unem os alimentadores artificiais,

garantindo o aquecimento do sangue no interior dos cilindros. A extremidade inferior dos alimentadores artificiais foi revestida por uma fita de teflon (politetrafluoretileno) do tipo veda rosca (Pulvitec, 18 mm x 50 m) (Lima 2005). Na extremidade superior, foi acrescentado 1 mL de sangue de galinha contendo o anticoagulante heparina (0,1 mL de heparina/250 mL de sangue) (Fig. 3b). Fêmeas de *A. aegypti* foram acondicionadas em potes plásticos (250 mL) com tampa telada que foram fixados em suporte de madeira. Sobre a tampa telada dos potes com fêmeas foram colocados os alimentadores artificiais (Fig. 3a). As fêmeas ficaram em contato com o alimentador artificial por duas horas e, para se ingurgitarem de sangue, introduziram o aparelho bucal na tela do pote e furaram a membrana do alimentador artificial. Somente fêmeas com 10 a 20 dias de idade cronológica e três a quatro dias após o repasto sanguíneo (período necessário para a maturação dos ovos) foram utilizadas nos experimentos (Roque 2002, Gomes 2003, Roque 2007).

No interior de cada gaiola de manutenção foi colocado um recipiente de oviposição (copo de vidro contendo 100 mL de água desclorada) com papel cartão branco (papel de oviposição) para a deposição de ovos. Os papéis contendo ovos foram mantidos em pote plástico tampado contendo solução de KOH 10% que mantém a umidade relativa do ar adequada para a conservação dos ovos (Roque 2002, Gomes et al. 2006).

### **I.2.2 Peso médio de 600 larvas de terceiro e quarto ínstaes de *Aedes aegypti***

Devido à necessidade de realizar inúmeros extratos de larvas, optou-se por estimar o número de larvas utilizadas nos experimentos a partir do peso médio de imaturos de terceiro e quarto ínstaes. Assim, para padronizar o peso médio de 600 larvas de terceiro e quarto ínstaes contabilizou-se 36.000 larvas. Este procedimento viabilizou a produção dos inúmeros extratos de larvas avaliados no presente estudo, em campo e em laboratório.

Com o objetivo de garantir o desenvolvimento homogêneo das larvas até o terceiro e quarto ínstaes, em diferentes cubas, padronizou-se uma metodologia de criação de larvas. Cerca de 700 ovos foram colocados em cada cuba de plástico contendo 1.800 mL de água desclorada e três unidades trituradas de ração para répteis aquáticos (Reptolife, Alcon<sup>®</sup>). Nos dias subseqüentes, cada cuba recebeu diariamente cinco unidades da ração para alimentação das larvas. Ao atingirem terceiro e quarto ínstaes, foram quantificadas 600 larvas e pesadas em balança de precisão (Sartorius BP221S, Germany). Um béquer contendo 20 mL de água destilada foi colocado sobre a balança e o valor do seu peso zerado. A este béquer foram



acrescentadas as larvas e o valor do peso destas anotado. Este procedimento foi realizado 30 vezes, sendo cada repetição com amostras de larvas diferentes.

A partir do peso médio e do erro padrão de 600 larvas foi realizado o processo inverso, onde as larvas, criadas conforme a metodologia descrita anteriormente, foram pesadas e posteriormente contadas para verificar se a estimativa foi realizada de forma adequada.

### **I.2.3 Extratos de larvas de *Aedes aegypti***

#### **Preparação de extratos avaliados como estimulantes de oviposição**

Foram avaliados três tipos de extratos como estimulantes de oviposição para fêmeas de *A. aegypti*: (1) extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EAL), (2) extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EHAL) e (3) extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EMCL). Os três extratos foram preparados com larvas mantidas por 24 horas em quatro concentrações diferentes: 0,5; 2,0; 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada (Trimble & Wellington 1980, Maire 1985, Consoli & Teixeira 1988, McDaniel et al. 1979, Zahiri & Rau 1998, Ivo & Eiras 1999).

##### I.2.3.1 Preparação do material

Larvas de terceiro e quarto ínstaes de *A. aegypti* foram retiradas da criação, sendo o número de larvas utilizado em cada extrato estimado através do seu peso médio (item: “Peso médio de 600 larvas de terceiro e quarto ínstaes de *Aedes aegypti*”). Os imaturos foram lavados em água destilada. Com uma peneira de plástico (10 x 15 cm), as larvas foram separadas da água e transferidas para um béquer contendo 400 mL de água destilada. O procedimento foi realizado três vezes, sendo que a cada repetição, as larvas foram transferidas para um béquer contendo água destilada limpa. Em seguida as larvas foram transferidas para um béquer de 600 mL contendo água destilada, onde foram mantidas sem acréscimo de alimento por 24 horas (Trimble & Wellington 1980, Consoli & Teixeira 1988, Ivo & Eiras 1999). Após estes procedimentos as larvas foram utilizadas para a produção do extrato metanólico do corpo de larvas (EMCL), enquanto a solução foi empregada na produção de extrato de água de criação de larvas (EAL) e extrato hexânico de água de criação de larvas (EHAL), conforme descrito a seguir.

O material foi preparado de forma que foram produzidos oito extratos de 30 mL em um mesmo béquer, totalizando um volume final de 240 mL de água destilada. Os béqueres continham diferentes quantidades de larvas, correspondendo às quatro concentrações avaliadas (0,5; 2,0; 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada).

#### I.2.3.2 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EAL)

Após o procedimento descrito em “Preparação do material”, as larvas foram mantidas por 24 horas em água destilada num béquer tampado com papel alumínio. Após este período, a água contendo larvas foi filtrada em papel de filtro, armazenada em um frasco de 500 mL e estocada a -20 °C para posterior utilização (Trimble & Wellington 1980, Consoli & Teixeira 1988, Ivo & Eiras 1999).

#### I.2.3.3 Extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EHAL)

Para a produção do extrato hexânico de água de criação de larvas (EHAL) foi utilizada a técnica de extração líquido-líquido. Após a preparação do material, a água de criação de larvas foi filtrada em papel de filtro e a solução sem larvas utilizada no processo de extração. Uma amostra de 100 mL de água previamente habitada por larvas de terceiro e quarto ínstaes de *A. aegypti* foi colocada no funil de decantação. À solução presente no funil foram acrescentados 30 mL de hexano (EMD, 99,90 % pureza), ou seja, um volume de solvente correspondente a 30% do volume de água. A mistura foi agitada por três minutos e deixada em decantação por 30 minutos (Fig. 4). Logo após a separação das fases, foi retirado o sobrenadante, ao qual foi acrescentado 1 ou 2 mL de ácido acético para aprimorar a separação entre a água residual e ácidos graxos. A mistura foi agitada por três minutos e submetida a nova decantação de dez minutos. O sobrenadante (hexano e compostos químicos das larvas) foi armazenado para posterior utilização. O mesmo processo foi realizado para a produção do controle, sendo a água destilada utilizada ao invés de água de criação de larvas (Ivo & Eiras 1999, Mendki et al. 2000, Sant´Ana 2003).



Figura 4. Funil de decantação e extração líquido-líquido de compostos provenientes da água de criação de larvas.

#### I.2.3.4 Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstares (EMCL)

A água onde as larvas de 3° e 4° ínstares se desenvolveram por 24 horas foi filtrada. As larvas foram transferidas para um frasco, ao qual foram acrescentados 5 mL de metanol (EM Science, 99,90 % de pureza). Larvas e metanol permaneceram em contato por 30 minutos sob temperatura de -20 °C (McDaniel et al. 1979).

Todo o material proveniente dos EHAL e EMCL foi concentrado em gás nitrogênio até o volume de 400 µL (Zarbin 2001). Para evitar degradações, que poderiam desencadear perda da atividade dos extratos, estes foram mantidos em freezer (-20 °C) até a realização dos bioensaios.

## **Preparação de extratos avaliados no cromatógrafo a gás**

### I.2.3.5 Extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes para avaliação no cromatógrafo a gás (EHALCG)

O EHALCG foi produzido de acordo com a metodologia descrita em “Extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EHAL)”, com modificações descritas adiante.

### I.2.3.6 Extrato hexânico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes para avaliação no cromatógrafo a gás (EHCLCG)

O EHCLCG foi produzido conforme descrito em “Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EMCL)”, com algumas modificações, incluindo a substituição do solvente metanol por hexano.

### I.2.3.7 Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes para avaliação no cromatógrafo a gás (EMCLCG)

O EMCLCG foi produzido conforme descrito em “Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EMCL)”, com modificações.

Para a produção destes extratos foram realizadas alterações nas metodologias de extração utilizadas em “Preparação de extratos avaliados como estimulantes de oviposição”, devido à acuidade da técnica de cromatografia gasosa.

Foram produzidos cinco extratos contendo 1.200 larvas (número estimado a partir do peso médio destes imaturos) mantidas por 24 horas em 100 mL de água destilada. No processo de extração foram utilizados o metanol (Merck, grau HPLC), para EMCLCG, e o hexano (Merck, grau HPLC), para EHALCG e EHCLCG. Após a extração, a mistura de solvente e compostos químicos foi transferida para um frasco de vidro (Supelco, capacidade de 5 mL) e seca com sulfato de anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Sant’Ana 2003). Todo o material foi concentrado em gás nitrogênio até um volume aproximado de 30  $\mu\text{L}$ , transferido para outro recipiente de vidro contendo um microcapilar de vidro (Micro insert Supelco, 100  $\mu\text{L}$ ); o

solvente foi completamente evaporado em gás nitrogênio e, posteriormente, o extrato armazenado no freezer (-20 °C) até o momento da injeção no cromatógrafo.

### **Preparação de extratos avaliados como atraentes de oviposição**

#### I.2.3.8 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes sem acréscimo de alimento (EALSA)

A preparação deste extrato foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item “Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EAL)”. Foram produzidos cinco extratos de 100 mL simultaneamente. As larvas foram mantidas por 24 horas, na concentração de 8 larvas/mL de água destilada, em béquer de vidro contendo 500 mL de água (Ivo & Eiras 1999).

#### I.2.3.9 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes com acréscimo de alimento (EALCA)

A preparação deste extrato foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item “Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EAL)”. Cerca de 4.000 larvas foram mantidas na concentração de 8 larvas/mL de água destilada (Ivo & Eiras 1999) em béquer contendo 500 mL de água, ao qual foram adicionados 20 unidades de ração para répteis aquáticos (Reptolife, Alcon<sup>®</sup>).

#### I.2.3.10 Água destilada com acréscimo de alimento (ACA)

Os extratos foram preparados deixando 500 mL de água destilada em contato com 20 unidades de ração para répteis aquáticos triturados.

Após 24 horas, os extratos (EALSA, EALCA e ACA) foram filtrados em papel de filtro, acondicionados em recipientes com tampa com capacidade para 500 mL e mantidos em freezer (-20 °C) por no máximo três semanas até a realização dos bioensaios.

#### I.2.3.11 Infusão de *Panicum maximum* (10%)

Amostras de 42,5 g de folhas de *P. maximum* (capim-colonião) foram cortadas em pequenos pedaços (cerca de 5 cm) e colocados dentro de um galão plástico contendo 5 L de água de torneira. O material foi fermentado durante 10 dias e diluído para uma concentração de 10% (Sant'Ana 2003, Sant'Ana et al. 2006, Roque 2007).

#### **I.2.4 Índice de Atividade de Oviposição (IAO)**

A base para medir a resposta do Experimento I foi o número de ovos depositados nos recipientes controle e tratamento. Esta atividade de oviposição foi determinada através do Índice de Atividade de Oviposição (IAO), calculado pela fórmula:  $IAO = (Nt - Nc) / (Nt + Nc)$ , em que Nt = média de ovos depositados no recipiente tratamento e Nc = média de ovos depositados no recipiente controle. Os valores de IAO variam de +1 (atração/estímulo) a -1 (repulsão/inibição). Valores positivos e próximos de +1 indicam que maior número de ovos foi depositado por grávidas de *A. aegypti* no recipiente tratamento do que no controle, sinalizando estimulação/atração do tratamento. Enquanto que maior deposição de ovos no recipiente controle em relação ao tratamento resulta em valores de IAO negativos, indicando que o tratamento é inibidor/repelente (Kramer & Mulla, 1979).

#### **I.2.5 Experimento I: Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* como estimulantes de oviposição em laboratório**

Todos os três extratos (EAL, EHAL, EMCL) foram produzidos nas concentrações de 0,5; 2,0; 3,0; 6,0 larvas/mL de água destilada e foram avaliados em recipientes para oviposição em laboratório (Zahiri & Rau 1998, Ganesan et al. 2006). Foi utilizado o delineamento experimental de quadrado latino (4 x 4) com 32 repetições para cada concentração de extrato na avaliação de EAL. Nos testes com EHAL e EMCL foi utilizado o delineamento de quadrado latino (5 x 5) com 30 repetições para cada concentração de extrato. Os testes de dupla escolha (controle x tratamento) foram conduzidos em gaiolas de polipropileno teladas (Bugdorm-1, 30 x 30 x 30 cm) contendo dois recipientes para oviposição (Fig. 5).



Figura 5. Gaiola de polipropileno (com a parte superior removida) utilizada para os testes de dupla escolha contendo dois recipientes para oviposição e uma única fêmea/teste de *Aedes aegypti*.

Os recipientes de oviposição foram posicionados no centro da gaiola, equidistantes 15 cm e os bioensaios realizados em condições de laboratório mantido a  $27 \pm 2$  °C, 75 a 80% URA e 12 h de fotofase. Para cada teste, foi liberada apenas uma fêmea grávida de *A. aegypti*, três a quatro dias após o repasto sanguíneo (Ponnusamy 2008), das gerações F-60 a F-64 da colônia estabelecida no LabEQ. Os testes, com 22 horas de duração, começaram às 12 horas e terminaram às 10 horas da manhã seguinte (Gomes et al. 2006, Chadee 2010). Após o final do teste de comportamento, as fêmeas foram anestesiadas em freezer (-20 °C) durante 10 min e dissecadas sob um estereomicroscópio (40x) para verificar o número de ovos no interior dos ovários (Detinova 1962, Sucharit & Tumrasvin 1981, Williams et al. 2008). Para eliminar a influência das posições dos recipientes nas gaiolas de teste, estes foram reorganizados diariamente de modo a passarem pelo menos uma vez nas duas posições em todas as gaiolas avaliadas.

Cada recipiente para oviposição consistia de um béquer de 50 mL contendo 30 mL de água destilada, revestido internamente por papel cartão branco (5 x 13 cm). Nos experimentos com extratos metanólicos (EMCL) e hexânicos (EHAL), no recipiente controle foram adicionados 50 µL do respectivo solvente, enquanto que no recipiente tratamento foram acrescentados 50 µL do extrato. Para verificar a interferência do solvente no comportamento de oviposição, foi avaliado o tratamento água destilada em comparação com o recipiente controle, contendo água destilada e 50 µL do solvente. Os extratos e os solventes foram

adicionados diretamente na água e mantidos por 20 minutos na capela (para volatilização do solvente), antes de serem levados para as gaiolas de teste. Nos bioensaios com água de criação de larvas (EAL), no recipiente controle foram acrescentados 30 mL de água destilada e, no tratamento, 30 mL de extrato.

## **I.2.6 Avaliação cromatográfica de extratos de larvas e água de criação de larvas**

Os extratos metanólicos e hexânicos do corpo de larvas, assim como os extratos hexânicos de água de criação de larvas de *A. aegypti* foram avaliados pela técnica analítica de cromatografia gasosa. Os extratos foram produzidos de acordo com a metodologia descrita em “Preparação de extratos avaliados no cromatógrafo a gás”.

Para análise em cromatógrafo a gás os extratos metanólicos e hexânicos foram re-suspendidos em 10 µL de metanol (Merck, grau HPLC) ou hexano (Merck, grau HPLC), respectivamente. Foi injetado 1 µL de cada extrato diretamente no cromatógrafo utilizando uma seringa de vidro (Hamilton, 10 µL, Nevada). Os extratos foram analisados em CG Shimadzu 17A equipado com uma coluna DB-1 (100 % dimetilpolisiloxano, 30m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm de espessura do filme, J & W Scientific), usando hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi 300 °C e do detector 310 °C. O programa de temperatura utilizado iniciou-se a 60 °C, com aquecimento de 10 °C/min até 180 °C, mantido por 2 min, um aquecimento numa taxa de 5 °C/min até 280 °C, mantidos por 25 min; injeção no modo Splitless. Tempo Total de 59 min. Velocidade linear (31,757); pressão da coluna (110,0 KPa) e fluxo de gás (1,6 mL/min a 60 °C) (Ganesan et al. 2006).

### I.2.6.1 Investigação da presença de *n*-heneicosano nos extratos de larvas da população brasileira de *Aedes aegypti*

A investigação da presença do *n*-heneicosano (C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>) (Mendki et al. 2000, Seenivasagan et al. 2009) nos extratos de larvas da população brasileira de *A. aegypti* foi realizada conforme a metodologia do item anterior. Primeiro, foi injetado 1 µL do extrato de larvas. Uma segunda injeção foi realizada com 1 µL do padrão de *n*-heneicosano a 0,1 mg/mL. Portanto, realizou-se a comparação do tempo de retenção do pico da amostra (extrato) com o pico do padrão (*n*-heneicosano). Posteriormente, foi realizada a co-injeção, ou seja, a injeção simultânea do extrato de larvas (1 µL) com o padrão (1 µL) (Batista-Pereira et al. 2006). A técnica da co-injeção possibilita observar no cromatograma a ocorrência do



aumento da área do pico correspondente ao padrão, isso se no extrato de larvas estiver presente o *n*-heneicosano, indicando assim a presença indubitável deste composto.

### **I.2.7 Experimento II: Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* como atraente de oviposição em campo**

Cinco tratamentos foram estabelecidos para a avaliação em campo: (1) água de torneira; (2) infusão de *P. maximum* (capim colônia) diluído a 10%; (3) água com acréscimo de alimento (ACA); (4) extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares sem acréscimo de alimento (EALSA) (8 larvas/mL de água destilada) e (5) extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares com acréscimo de alimento (EALCA) (8 larvas/mL de água destilada) (Ivo e Eiras 1999, Roque 2002, Sant'Ana et al., 2006, Roque 2007).

Os tratamentos foram adicionados à armadilha adesiva MosquiTRAP<sup>®</sup> (Vide: “MosquiTRAP<sup>®</sup> e o monitoramento inteligente do mosquito da dengue” - Introdução geral). Esta armadilha é específica para a captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Consiste num recipiente preto com 33 centímetros de altura e 15 centímetros de diâmetro. A base é um reservatório para 300 mL de água que é fechada com uma tampa que apresenta um funil. No interior da armadilha há um cartão adesivo inodoro (38 x 19 cm) preto, onde as fêmeas de *A. aegypti* ficam retidas, após o pouso na superfície interna da armadilha. Ao cartão adesivo é aderido o AtrAedes<sup>®</sup>, atraente de oviposição sintético, desenvolvido a partir de compostos isolados de infusão de *P. maximum* (10%). Duas telas de suporte (12 cm diâmetro) sustentam o cartão adesivo no interior do dispositivo (Eiras 2002, Favaro et al. 2006, Gama et al. 2007, Roque & Eiras 2008, Eiras & Resende 2009).

À base de cada armadilha adesiva MosquiTRAP<sup>®</sup> foi adicionado 100 mL de um dos tratamentos citados anteriormente. Como a capacidade da base desta armadilha é de 300 mL, suas bordas foram circundadas com tiras de cartões adesivos para garantir a captura de fêmeas que eventualmente pousassem nestas bordas. Os experimentos foram conduzidos no *Campus* Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) usando o delineamento experimental de quadrado latino (5 x 5) com 50 repetições. Foram escolhidas quatro áreas experimentais na Faculdade de Letras (FALE) e uma área no Instituto de Ciências Biológicas (ICB). As armadilhas foram instaladas no chão, em locais sombreados e protegidos de chuva, animais e pessoas (Eiras & Resende 2009). As leituras foram realizadas a cada 24 horas (entre

11 e 12 horas) e os tratamentos substituídos a cada leitura. Os cartões adesivos foram substituídos a cada cinco dias de teste.

### **I.2.8 Experimento III: Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* associados à infusão de *Panicum maximum* como atraentes de oviposição em campo**

Devido aos resultados encontrados no experimento “Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* como atraente de oviposição em campo” foram realizados novos testes no campo. Foram estabelecidos quatro tratamentos: (1) água de torneira; (2) infusão de *P. maximum* (capim colômbio) 10%; (3) extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares sem acréscimo de alimento (EALSA) (8 larvas/mL de água destilada) e (4) extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstares sem acréscimo de alimento (EALSA) (8 larvas/mL de água destilada) associado à infusão de *P. maximum* (Ivo & Eiras 1999, Roque 2002, Sant’Ana 2003, Sant’Ana et al. 2006, Roque 2007). À base de cada MosquiTRAP<sup>®</sup> foi adicionado um volume final de 100 mL de um dos tratamentos citados a cima. Foram utilizados 50 mL de EALSA e 50 mL de infusão de *P. maximum* no tratamento que consistiu da associação dos dois.

Os testes foram realizados de forma semelhante ao que foi executado no experimento “Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* como atraente de oviposição em campo”, usando o delineamento experimental de quadrado latino com 80 repetições. Os testes foram conduzidos em cinco áreas experimentais na Faculdade de Letras e cinco áreas no Instituto de Ciências Biológicas, localizadas no *Campus* Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais.

### **I.2.9 Análises estatísticas**

Os percentuais de ovos depositados nos recipientes de oviposição (experimento I) e o número de fêmeas capturadas em armadilhas MosquiTRAP<sup>®</sup> (experimentos II e III) foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors ( $\alpha = 0,05$ ) e não apresentaram distribuição normal. Os dados do experimento I sofreram transformação arcoseno e os dados dos experimentos II e III, transformação logarítmica. Novamente foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors e verificou-se que eles não apresentaram distribuição normal. Assim, no experimento I, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste Dunn ( $\alpha = 5\%$ ) para verificar as diferenças entre o percentual de ovos

depositados em cada tratamento. Para comparar as diferenças entre deposições de ovos no recipiente tratamento e no respectivo controle foi utilizado o teste Qui Quadrado ( $\alpha= 5\%$ ). Nos experimentos II e III, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste Dunn ( $\alpha= 5\%$ ). As análises estatísticas foram realizados com o programa Bioestat versão 5.0.

Dados de fêmeas que não realizaram oviposição em nenhum dos recipientes de oviposição (experimento I) foram apresentados integralmente nos Apêndices 1, 2 e 3, porém omitidos nas análises estatísticas.

### I.3 RESULTADOS

#### I.3.1 Peso médio de 600 larvas de terceiro e quarto ínstaes de *Aedes aegypti*

Na Tabela 1, observa-se que o peso médio e o erro padrão de 600 larvas de *A. aegypti* de terceiro e quarto ínstaes foi de  $1,0 \pm 0,03$  g.

Tabela 1. Peso (g) de 600 larvas de terceiro e quarto ínstaes de *Aedes aegypti* criadas em laboratório (n=30) ( $27,2 \pm 0,15$  °C,  $63,2 \pm 1,18$  % URA, fotofase: 12 horas).

| Amostragem | Peso das larvas (g) | Amostragem | Peso das larvas (g) | Amostragem        | Peso das larvas (g) |
|------------|---------------------|------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| 1          | 0,807               | 11         | 1,147               | 21                | 1,152               |
| 2          | 0,738               | 12         | 1,075               | 22                | 1,063               |
| 3          | 0,934               | 13         | 1,009               | 23                | 1,036               |
| 4          | 0,785               | 14         | 0,953               | 24                | 0,903               |
| 5          | 1,023               | 15         | 1,091               | 25                | 0,883               |
| 6          | 1,003               | 16         | 1,007               | 26                | 1,080               |
| 7          | 1,034               | 17         | 1,163               | 27                | 1,010               |
| 8          | 1,355               | 18         | 0,993               | 28                | 1,300               |
| 9          | 1,118               | 19         | 1,110               | 29                | 1,201               |
| 10         | 1,051               | 20         | 0,953               | 30                | 1,132               |
|            |                     |            |                     | <b>Média ± EP</b> | <b>1,0 ± 0,03</b>   |

A partir da mensuração do peso médio de 600 larvas foi realizado o processo inverso, ou seja, pesou-se 1,0 g de larvas de terceiro e quarto ínstares, e posteriormente essas larvas foram quantificadas com o intuito de verificar se a estimativa foi realizada de forma adequada. Os valores encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Número e peso (g) de larvas de terceiro e quarto ínstares de *Aedes aegypti* após a pesagem com base no valor do peso médio de 600 indivíduos (n=30) ( $27,2 \pm 0,15$  °C,  $63,2 \pm 1,18$  % URA, fotofase: 12 horas).

| Amostragem | Número de larvas | Peso das larvas (g) | Amostragem        | Número de larvas     | Peso das larvas (g) |
|------------|------------------|---------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 1          | 528              | 1,028               | 16                | 584                  | 1,042               |
| 2          | 459              | 1,052               | 17                | 534                  | 1,057               |
| 3          | 523              | 1,050               | 18                | 569                  | 1,048               |
| 4          | 521              | 1,028               | 19                | 629                  | 1,043               |
| 5          | 544              | 1,025               | 20                | 574                  | 1,052               |
| 6          | 470              | 1,052               | 21                | 634                  | 1,030               |
| 7          | 652              | 1,055               | 22                | 652                  | 1,027               |
| 8          | 643              | 1,042               | 23                | 631                  | 1,049               |
| 9          | 639              | 1,051               | 24                | 597                  | 1,041               |
| 10         | 631              | 1,036               | 25                | 648                  | 1,044               |
| 11         | 660              | 1,025               | 26                | 612                  | 1,037               |
| 12         | 634              | 1,039               | 27                | 647                  | 1,050               |
| 13         | 526              | 1,043               | 28                | 601                  | 1,031               |
| 14         | 456              | 1,038               | 29                | 656                  | 1,036               |
| 15         | 550              | 1,053               | 30                | 671                  | 1,043               |
|            |                  |                     | <b>Média ± EP</b> | <b>607,0 ± 11,70</b> | <b>larvas</b>       |

Observou-se que o número médio de larvas pesadas foi  $607,0 \pm 11,70$ . Em apenas três amostragens notou-se que o número de larvas foi muito inferior a 600 larvas, variando entre 456 a 470.

As larvas utilizadas apresentavam-se entre quatro e sete dias de idade, sendo que em cada grupo predominavam larvas de terceiro ínstar, contendo alguns imaturos de quarto ínstar no momento da pesagem.

### **I.3.2 Experimento I: Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* como estimulantes de oviposição em laboratório**

#### I.3.2.1 Extrato de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EAL)

Foram utilizadas 128 fêmeas de *A. aegypti* nos experimentos com EAL, sendo que 25 destas (19,5 %) não depositaram ovos em nenhum dos recipientes de oviposição e apenas uma possuía ovos nos ovários após a dissecação. Das 103 (80,5 %) fêmeas que depositaram ovos em algum dos recipientes constatou-se, através da dissecação dos ovários, que apenas quatro (3,9 %) apresentaram ovos após as 22 horas de teste. Observou-se ainda que, entre as 103 fêmeas que depositaram ovos, 54 (52,4 %) utilizaram os dois recipientes de oviposição disponíveis na gaiola, 25 (24,3 %) depositaram todos os ovos no recipiente controle e 24 (23,3 %) depositaram ovos apenas no recipiente tratamento. O número médio de ovos depositados pelas fêmeas de *A. aegypti* foi de  $87,6 \pm 3,15$ .

A comparação entre o percentual médio de ovos depositados em cada um dos quatro tratamentos não sugeriu diferença significativa entre eles (Kruskal Wallis,  $H = 1,48$ ,  $p = 0,69$ ).

O percentual médio de ovos ( $62,1 \pm 8,22$  %) depositados por fêmeas de *A. aegypti* no recipiente contendo EAL, concentração de 0,5 larvas/mL, foi maior do que o percentual médio de ovos no seu controle contendo apenas água destilada ( $37,9 \pm 8,22$  %). No entanto, os resultados não diferiram pelo teste Qui Quadrado. Os percentuais médios de ovos depositados nos recipientes contendo os demais tratamentos (2,0; 3,0 e 6,0 larvas/mL) foram similares aos percentuais médios dos respectivos controles (Qui Quadrado,  $p > 0,05$ ), conforme a Figura 6.

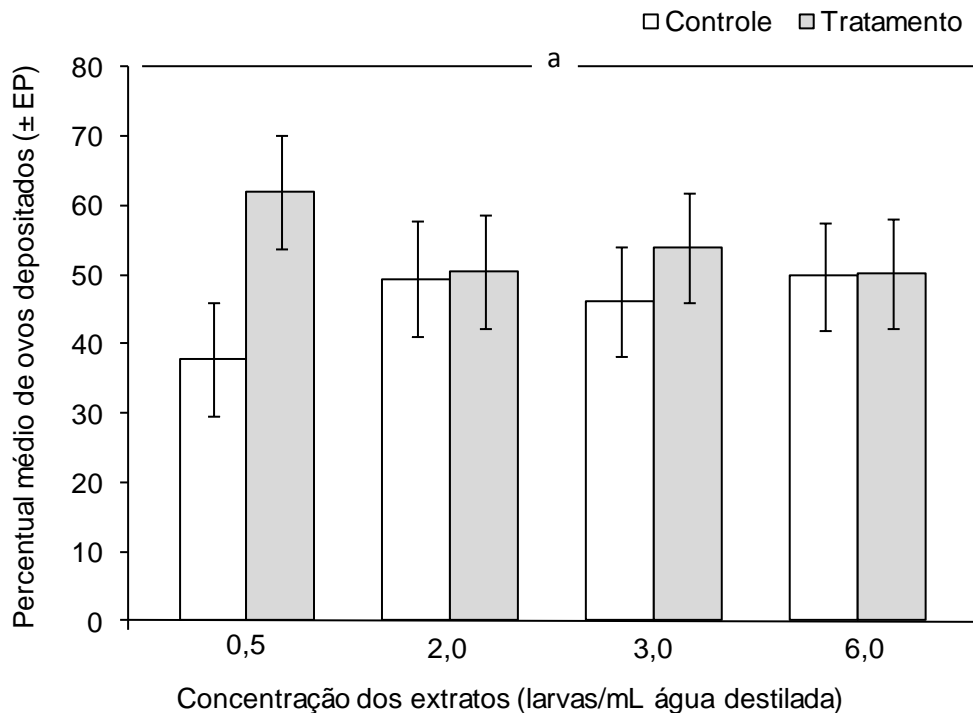


Figura 6. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por *Aedes aegypti* em recipientes de oviposição contendo extrato de água de criação de larvas co-específicas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstaes, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada), em condições de laboratório ( $27,4 \pm 0,32$  °C,  $60,9 \pm 1,96$  % URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ ).

Foi depositado o total de 9.020 ovos pelas 103 fêmeas de *A. aegypti*, sendo que 6.495 ovos (72,0 %) foram colocados diretamente na água, enquanto que 2.525 ovos (28,0 %) foram deixados no papel de oviposição. Notou-se que em todos os recipientes de oviposição a deposição de ovos foi maior na água do que no papel (Tab. 3). Observou-se que nos recipientes contendo EAL (0,5; 2,0 e 3,0 larvas/mL) ocorreu significativamente maior deposição de ovos na água do que no papel de oviposição (Qui Quadrado,  $p < 0,05$ ) (Tab. 3).

Tabela 3. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por *Aedes aegypti* na água e no papel dos recipientes de oviposição contendo extrato de água de criação de larvas co-específicas de 3º e 4º ínstars, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada), em condições de laboratório ( $27,4 \pm 0,32$  °C,  $60,9 \pm 1,96$  % URA, fotofase: 12 horas).

| Recipiente de Oviposição | N  | Local de deposição dos ovos | Percentual médio de ovos ( $\pm$ EP) | Valor de p (Qui Quadrado) |
|--------------------------|----|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Controle                 | 27 | Água                        | $26,7 \pm 6,64$                      | 0,070                     |
|                          |    | Papel                       | $11,2 \pm 4,13$                      |                           |
| 0,5 larvas/mL            |    | Água                        | $45,0 \pm 7,13^*$                    | 0,007                     |
|                          |    | Papel                       | $17,1 \pm 4,71^*$                    |                           |
| Controle                 | 22 | Água                        | $31,3 \pm 6,59$                      | 0,196                     |
|                          |    | Papel                       | $18,2 \pm 4,97$                      |                           |
| 2,0 larvas/mL            |    | Água                        | $36,6 \pm 7,10^*$                    | 0,017                     |
|                          |    | Papel                       | $13,9 \pm 4,29^*$                    |                           |
| Controle                 | 27 | Água                        | $37,3 \pm 7,44^*$                    | 0,001                     |
|                          |    | Papel                       | $8,8 \pm 2,26^*$                     |                           |
| 3,0 larvas/mL            |    | Água                        | $41,9 \pm 7,31^*$                    | 0,002                     |
|                          |    | Papel                       | $12,0 \pm 3,83^*$                    |                           |
| Controle                 | 27 | Água                        | $33,7 \pm 7,00$                      | 0,072                     |
|                          |    | Papel                       | $16,2 \pm 4,33$                      |                           |
| 6,0 larvas/mL            |    | Água                        | $29,4 \pm 5,87$                      | 0,440                     |
|                          |    | Papel                       | $20,8 \pm 4,64$                      |                           |

\* Indica diferença significativa - Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ .

### I.3.2.2 Extrato hexânico de água de criação de larvas de terceiro e quarto ínstars (EHAL)

Das 150 fêmeas individualmente avaliadas, 44 (29,3 %) não realizaram oviposição em nenhum dos recipientes disponíveis e apenas duas apresentaram ovos nos ovários após a dissecação. Das 106 (70,7%) fêmeas que depositaram ovos constatou-se, através da dissecação dos ovários, que apenas seis (5,7%) não depositaram todos os ovos que possuíam durante as 22 horas de teste. Notou-se que entre estas 106 fêmeas, 61 (57,5 %) depositaram ovos nos dois recipientes de oviposição, 23 (21,7 %) realizaram a oviposição apenas no recipiente controle e 22 (20,8 %) apenas no tratamento. O número médio de ovos depositados pelas grávidas de *A. aegypti* foi de  $90,5 \pm 3,61$ .

A comparação entre o percentual médio de ovos depositados em cada tratamento não sugeriu diferença significativa entre eles (Kruskal Wallis,  $H = 6,00$ ,  $p = 0,20$ ).

Observou-se que o hexano presente no extrato não estimulou ou inibiu a deposição de ovos nos recipientes disponibilizados, pois os percentuais de ovos depositados por fêmeas de *A. aegypti* no recipiente controle contendo água e solvente ( $54,1 \pm 8,33$  %) e no tratamento contendo apenas água destilada ( $45,9 \pm 8,33$  %) foram similares (Qui quadrado,  $p > 0,05$ ). Verificou-se que a média percentual de ovos depositados no recipiente contendo EHAL na concentração de 0,5 larvas/mL ( $60,6 \pm 8,82$  %) foi maior do que a média de ovos no seu controle ( $39,4 \pm 8,82$  %). O percentual médio de ovos no recipiente contendo EHAL na concentração de 3,0 larvas/mL ( $40,9 \pm 8,91$  %), por outro lado, foi menor do que o percentual médio no seu controle ( $59,13 \pm 8,91$  %). No entanto, os resultados não diferiram estatisticamente (Qui Quadrado,  $p > 0,05$ ). As médias percentuais de ovos depositados nos recipientes contendo extratos nas concentrações de 2,0 e 6,0 larvas/mL foram similares aos seus respectivos controles (Fig. 7).

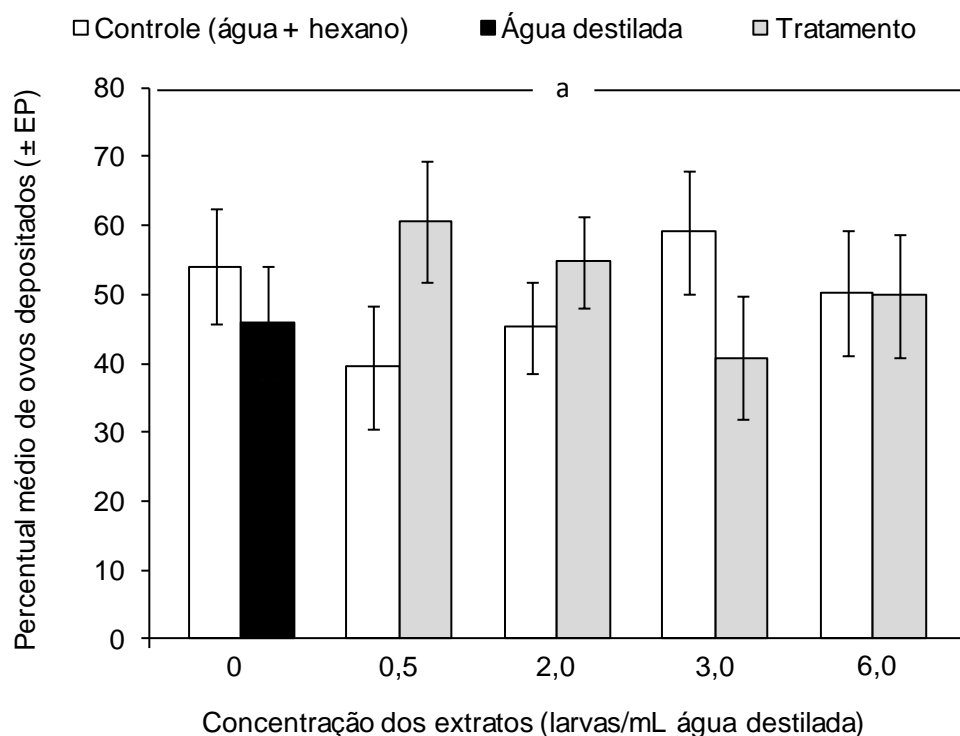


Figura 7. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por *Aedes aegypti* em recipientes de oviposição contendo extrato hexânico de água de criação de larvas co-específicas de 3º e 4º instares, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada e hexano), em condições de laboratório ( $27,0 \pm 0,13$  °C,  $56,7 \pm 0,94$  % URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ ).



As 106 fêmeas de *A. aegypti* depositaram o total de 9.589 ovos, sendo que 6.492 (67,7 %) destes ovos foram colocados diretamente na água, enquanto que 3.097 ovos (32,3 %) foram alocados no papel de oviposição. Os dados da tabela 4 indicam que o percentual médio de ovos depositados na água foi superior na maioria dos recipientes de oviposição, exceto nos recipientes contendo EHAL nas concentrações de 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada, cujos valores foram similares. O percentual médio de ovos depositado na água dos recipientes contendo EHAL (0,5 e 2,0 larvas/mL de água) e água destilada pura foi significativamente maior do que o número de ovos colocados no papel de oviposição (Qui Quadrado,  $p < 0,05$ ).

Tabela 4. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por *Aedes aegypti* na água ou no papel dos recipientes de oviposição contendo extrato hexânico de água de criação de larvas co-específicas de 3° e 4° ínstars, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada com hexano) em condições de laboratório ( $27,0 \pm 0,13$  °C,  $56,7 \pm 0,94$  % URA, fotofase: 12 horas).

| Recipiente de Oviposição | N  | Local de deposição dos ovos | Percentual médio de ovos ( $\pm$ EP) | Valor de p (Qui Quadrado) |
|--------------------------|----|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Controle                 | 24 | Água                        | $39,3 \pm 7,74^*$                    | 0,012                     |
|                          |    | Papel                       | $14,8 \pm 5,24^*$                    |                           |
| Água destilada           | 24 | Água                        | $34,5 \pm 7,37^*$                    | 0,010                     |
|                          |    | Papel                       | $11,4 \pm 4,71^*$                    |                           |
| Controle                 | 21 | Água                        | $29,0 \pm 7,16^*$                    | 0,028                     |
|                          |    | Papel                       | $10,4 \pm 3,36^*$                    |                           |
| 0,5 larvas/mL            | 21 | Água                        | $41,7 \pm 8,38^*$                    | 0,030                     |
|                          |    | Papel                       | $18,9 \pm 5,98^*$                    |                           |
| Controle                 | 24 | Água                        | $29,5 \pm 5,72$                      | 0,151                     |
|                          |    | Papel                       | $15,7 \pm 4,71$                      |                           |
| 2,0 larvas/mL            | 24 | Água                        | $38,4 \pm 7,83^*$                    | 0,026                     |
|                          |    | Papel                       | $16,3 \pm 4,38^*$                    |                           |
| Controle                 | 20 | Água                        | $38,4 \pm 7,83$                      | 0,096                     |
|                          |    | Papel                       | $20,7 \pm 5,22$                      |                           |
| 3,0 larvas/mL            | 20 | Água                        | $19,9 \pm 6,46$                      | 0,940                     |
|                          |    | Papel                       | $21,0 \pm 5,72$                      |                           |
| Controle                 | 17 | Água                        | $39,0 \pm 7,50^*$                    | 0,003                     |
|                          |    | Papel                       | $11,2 \pm 3,97^*$                    |                           |
| 6,0 larvas/mL            | 17 | Água                        | $25,5 \pm 8,52$                      | 0,951                     |
|                          |    | Papel                       | $24,4 \pm 8,07$                      |                           |

\* Indica diferença significativa - Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ .

### I.3.2.3 Extrato metanólico do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes (EMCL)

Nos testes com extratos metanólicos do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstaes de *A. aegypti* (EMCL) foram observadas 150 fêmeas co-específicas, sendo que 31 (20,7 %) não depositaram ovos em nenhum dos recipientes de oviposição e nove (29,0 %) destas fêmeas apresentaram ovos nos ovários após a dissecação. Observou-se que 119 fêmeas (79,3 %) depositaram ovos em pelo menos um dos recipientes presentes nas gaiolas de teste, sendo que 79 (66,4%) utilizaram os dois recipientes disponíveis, 21 (17,7%) realizaram a oviposição apenas no recipiente controle, enquanto que 19 (16,0 %) usaram somente os recipientes contendo os tratamentos. Das 119 fêmeas consideradas nas análises, apenas duas apresentaram ovos nos ovários após o término do teste. O número médio de ovos depositados por estas fêmeas foi  $96,4 \pm 2,56$ .

A comparação entre o percentual médio de ovos depositados em cada tratamento não sugeriu diferença significativa entre eles (Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ ).

A média percentual de ovos depositados no recipiente controle, contendo água destilada e metanol, ( $65,4 \pm 7,26$  %) foi maior do que no tratamento, contendo apenas água destilada ( $34,6 \pm 7,26$  %), porém não diferiram estatisticamente (Qui Quadrado,  $p > 0,05$ ). O percentual médio de ovos depositados por fêmeas de *A. aegypti* no recipiente contendo EMCL ( $61,6 \pm 7,55$  %), na concentração de 0,5 larvas/mL, foi maior do que a média de ovos no recipiente controle contendo água destilada e metanol ( $38,4 \pm 7,55$  %) ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, o percentual médio de ovos ( $33,0 \pm 8,38$  %) depositados por fêmeas de *A. aegypti* no recipiente com EMCL de 2,0 larvas/mL foi significativamente menor do que a média de ovos no controle ( $67,0 \pm 8,38$  %,  $p < 0,05$ ). As médias percentuais de ovos depositados nos demais tratamentos (3,0 e 6,0 larvas/mL) e nos respectivos controles foram similares ( $p > 0,05$ ) (Fig. 8).

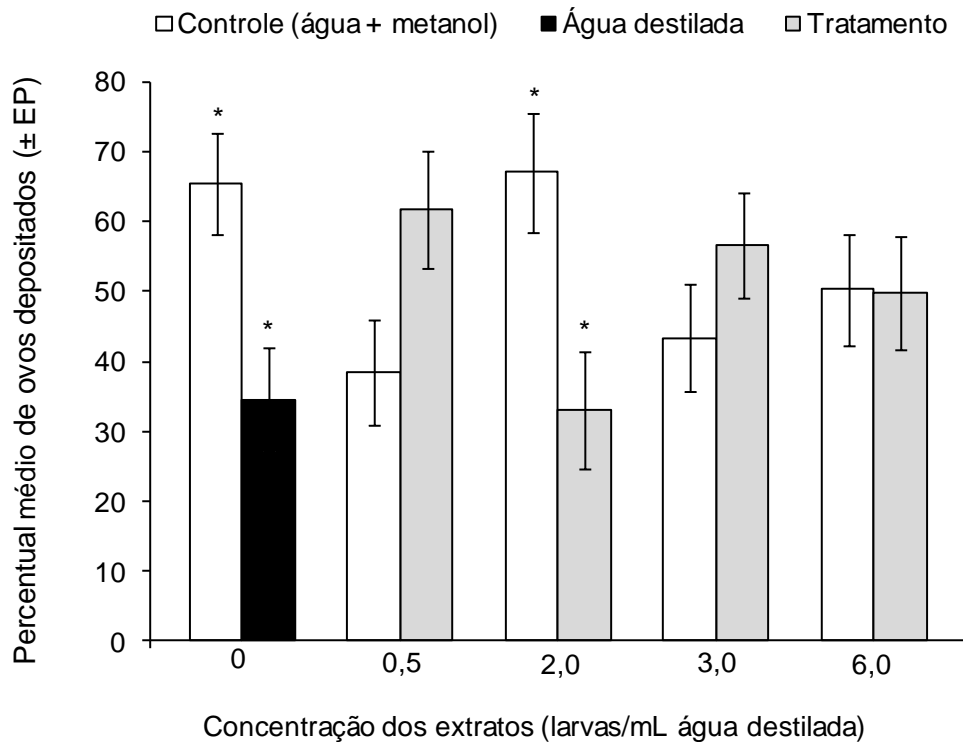


Figura 8. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmeas de *Aedes aegypti* em recipientes de oviposição contendo extrato metanólico do corpo de larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstars, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada e metanol) em condições de laboratório ( $26,1 \pm 0,43$  °C,  $52,8 \pm 0,85$  %URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ . \* sobre as barras indicam diferença significativa entre tratamento e controle).

Foi depositado o total de 11.475 ovos durante o bioensaio, sendo que 8.704 (75,9 %) destes ovos foram alocados diretamente na água, enquanto que 2.771 (24,1 %) foram colocados no papel de oviposição. Os dados apresentados na tabela 5 demonstraram que a tendência de maior oviposição na água do que no papel foi observada em todos os recipientes de oviposição, tanto nos controles quanto nos tratamentos. Notou-se que nos tratamentos contendo água destilada pura e EMCL nas concentrações de 0,5; 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada a oviposição foi significativamente maior na água do que no papel (Qui Quadrado,  $p < 0,05$ ).

Tabela 5. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por *Aedes aegypti* na água ou no papel dos recipientes de oviposição contendo extrato metanólico do corpo de larvas co-específicas de 3° e 4° ínstars, em diferentes concentrações, e respectivo controle (água destilada com metanol) em condições de laboratório ( $26,1 \pm 0,43$  °C,  $52,8 \pm 0,85$  %URA, fotofase: 12 horas).

| Recipiente de Oviposição | N  | Local de deposição dos ovos | Percentual médio de ovos ( $\pm$ EP) | Valor de p (Qui Quadrado) |
|--------------------------|----|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Controle                 | 24 | Água                        | $56,0 \pm 7,18^*$                    | < 0,0001                  |
|                          |    | Papel                       | $9,4 \pm 2,51^*$                     |                           |
| Água destilada           | 24 | Água                        | $28,0 \pm 6,20^*$                    | 0,005                     |
|                          |    | Papel                       | $6,6 \pm 2,16^*$                     |                           |
| Controle                 | 21 | Água                        | $25,7 \pm 6,06$                      | 0,068                     |
|                          |    | Papel                       | $12,7 \pm 4,06$                      |                           |
| 0,5 larvas/mL            | 21 | Água                        | $42,1 \pm 6,33^*$                    | 0,028                     |
|                          |    | Papel                       | $19,5 \pm 4,55^*$                    |                           |
| Controle                 | 24 | Água                        | $54,5 \pm 7,96^*$                    | < 0,0001                  |
|                          |    | Papel                       | $12,5 \pm 2,97^*$                    |                           |
| 2,0 larvas/mL            | 24 | Água                        | $22,0 \pm 6,28$                      | 0,190                     |
|                          |    | Papel                       | $11,0 \pm 4,36$                      |                           |
| Controle                 | 20 | Água                        | $32,1 \pm 6,44^*$                    | 0,018                     |
|                          |    | Papel                       | $11,3 \pm 3,48^*$                    |                           |
| 3,0 larvas/mL            | 20 | Água                        | $42,5 \pm 6,93^*$                    | 0,004                     |
|                          |    | Papel                       | $14,1 \pm 4,08^*$                    |                           |
| Controle                 | 17 | Água                        | $32,6 \pm 6,77$                      | 0,132                     |
|                          |    | Papel                       | $17,6 \pm 5,59$                      |                           |
| 6,0 larvas/mL            | 17 | Água                        | $38,2 \pm 7,49^*$                    | 0,004                     |
|                          |    | Papel                       | $11,6 \pm 3,39^*$                    |                           |

\* Indica diferença significativa - Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ .

#### I.3.2.4 Valores dos Índices de Atividade de Oviposição (IAO) dos extratos avaliados como estimulantes de oviposição

Os valores dos Índices de Atividade de Oviposição (IAO) calculados a partir dos números médios de ovos depositados nos recipientes de oviposição nos experimentos em laboratório estão apresentados na Figura 9. O valor de IAO obtido na comparação entre o número médio de ovos depositados nos recipientes com água destilada e hexano em relação à água pura (tratamento) foi próximo de zero ( $- 0,01$ ), enquanto que o valor de IAO na comparação entre recipientes contendo água destilada e metanol em relação à água pura

(tratamento) foi negativo (-0.26). Os valores de IAO foram positivos em todos os extratos avaliados na concentração de 0,5 larvas/mL de água destilada: (EAL: +0,32), (EHAL: +0,21) e (EMCL: +0,26). Os valores do IAO foram similares em cada um dos três tipos de extratos EAL, EHAL, EMCL avaliados nas concentrações de 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada, sendo: (EAL: +0,04 e +0,05), (EHAL, -0,11 e -0,10) e (EMCL: +0,12 e +0,10), respectivamente.

Observou-se que os perfis dos gráficos dos valores de IAO correspondentes à avaliação de EAL (Fig 9 A) e EMCL (Fig 9 C) foram parecidos, sendo os valores dos Índices acentuados na avaliação dos extratos metanólicos. Notou-se uma redução do valor de IAO quando aumentou a concentração das larvas de 0,5 para 2,0 larvas/mL e esta redução foi mais expressiva nos EMCL do que nos EAL. Quando a concentração das larvas aumentou de 2,0 para 3,0, o valor de IAO no EAL tornou-se ligeiramente maior, enquanto que em EMCL esse aumento foi expressivamente observado. Os valores dos Índices dos EAL (3,0 e 6,0 larvas/mL) foram um pouco maiores do que na concentração de 2,0 larvas/mL, isto também foi evidenciado nos valores dos Índices de Atividade de Oviposição dos EMCL.

Por outro lado, o IAO correspondente ao EHAL (Fig. 9 B) apresentou perfil diferente. Os valores dos Índices de EAL foram positivos e similares nas concentrações de 0,5 (+0,21) e 2,0 larvas/mL (+0,20) de água destilada. Entretanto, os valores dos Índices decresceram com o aumento da concentração de larvas (3,0 a 6,0 larvas/mL).

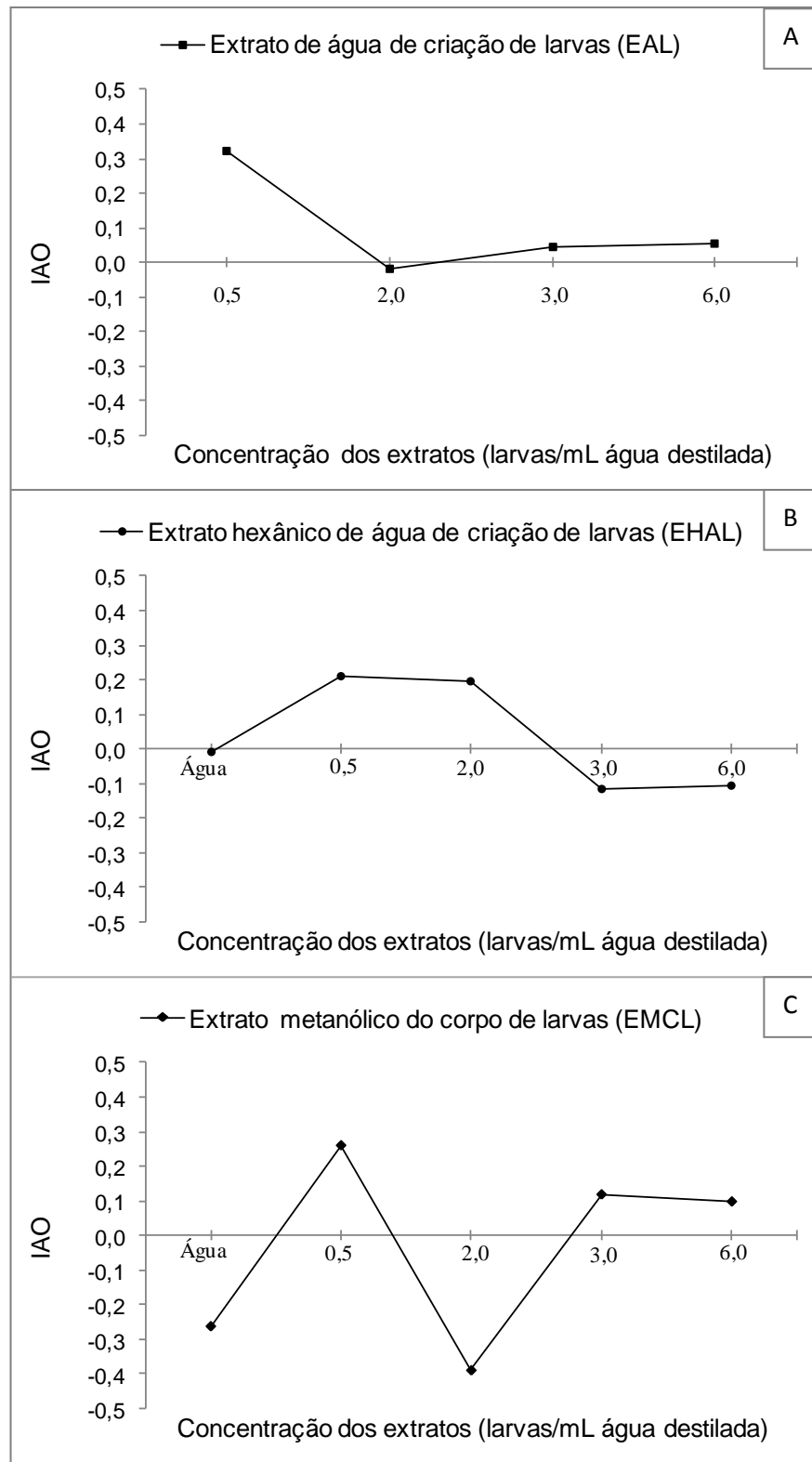


Figura 9. Índices de Atividade de Oviposição (IAO) obtidos na avaliação de diferentes extratos como estimulantes de oviposição no comportamento de fêmeas individualizadas de *Aedes aegypti* em laboratório. A) extrato de água de criação de larvas de 3° e 4° ínstaes (EAL), B) Extrato hexânico de água de criação de larvas de 3° e 4° ínstaes (EHAL), C) Extrato metanólico do corpo de larvas de 3° e 4° ínstaes (EMCL).

### I.3.3 Avaliação de extratos no cromatógrafo a gás

Foram constatados nos cromatogramas de extratos hexânicos (EHCLCG) e metanólicos (EMCLCG) do corpo de larvas, assim como em extratos hexânicos de água de criação de larvas (EHALCG), vários picos relacionados aos compostos químicos extraídos com solvente (Fig. 10, 11 e 12). Observou-se que os EHALCG e EHCLCG apresentaram perfis cromatográficos diferentes, pois nos cromatogramas do EHALCG os compostos (picos) eluíram de forma homogênea durante toda a corrida cromatográfica, enquanto que no EHCLCG a eluição dos compostos ficou concentrada ao início da corrida, antes dos 20 minutos (Fig. 10 e 11).

Foram identificados picos correspondentes ao *n*-heneicosano na sobreposição do cromatograma do padrão sintético com os cromatogramas dos extratos hexânicos (EHALCG e EHCLCG), porém não foram encontrados picos deste hidrocarboneto na sobreposição com os cromatogramas dos extratos metanólicos do corpo de larvas. A presença desse composto nos EHALCG e EHCLCG foi confirmada através da co-injeção dos extratos com o padrão sintético do *n*-heneicosano. Os demais compostos presentes nos EHALCG, EHCLCG e EMCLCG ainda não foram identificados (Fig. 10, 11 e 12).

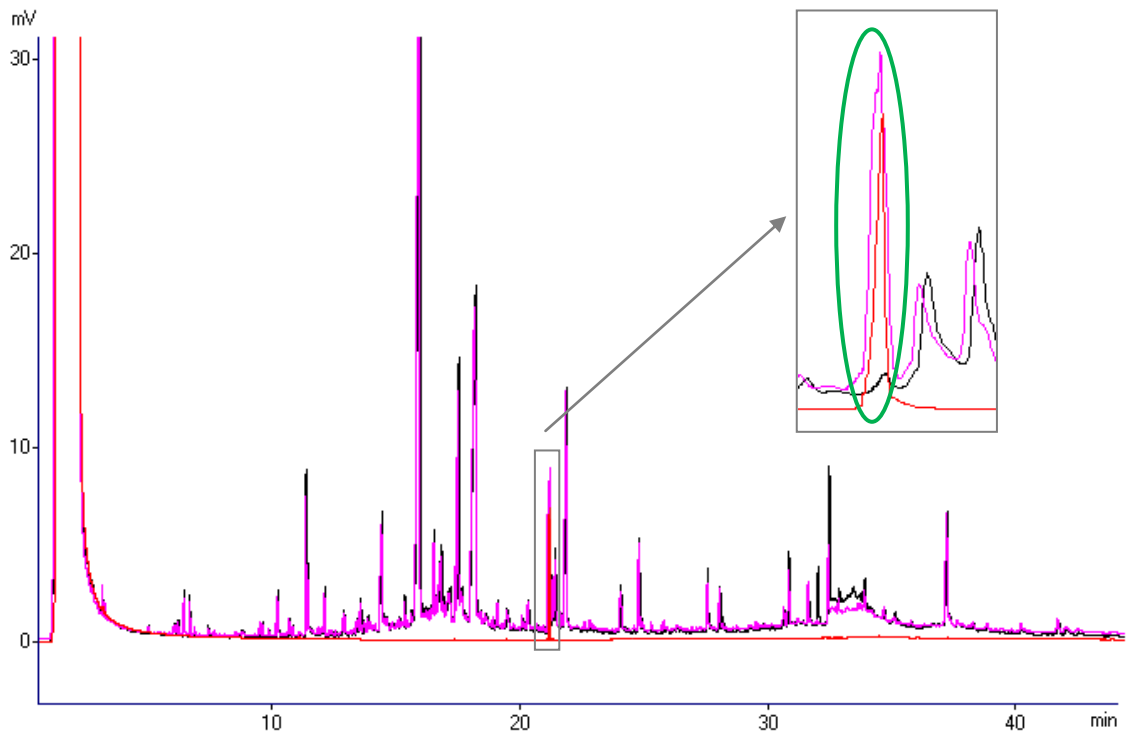


Figura 10. Cromatogramas sobrepostos do extrato hexânico da água de 1.200 larvas ( $L_3/L_4$ ) de *Aedes aegypti* (linha preta), padrão sintético do *n*-heneicosano a 0,1 mg/mL (linha vermelha) e co-injeção do extrato hexânico da água de 1.200 larvas de *Aedes aegypti* acrescido do padrão *n*-heneicosano (linha rosa). No detalhe, região ampliada do cromatograma em que a elipse verde indica os picos correspondentes ao *n*-heneicosano dos três cromatogramas.



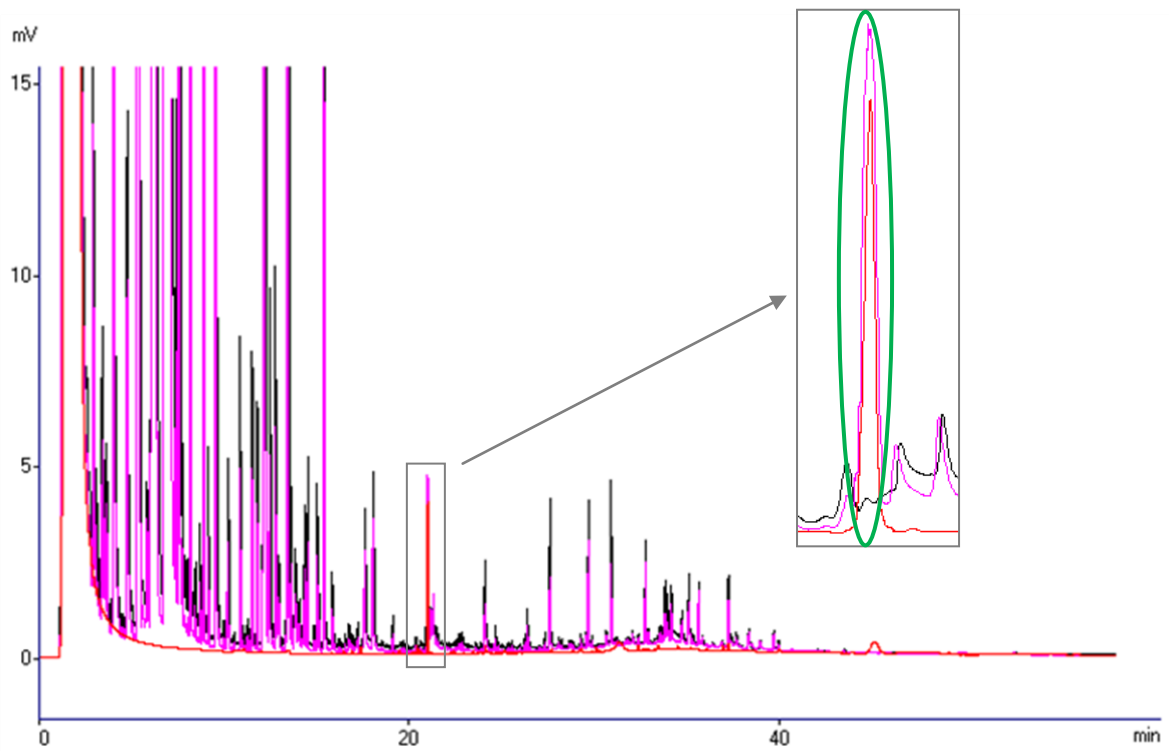


Figura 11. Cromatogramas sobrepostos do extrato hexânico do corpo de 1.200 larvas ( $L_3/L_4$ ) de *Aedes aegypti* (linha preta), padrão sintético do *n*-heneicosano a 0,1 mg/mL (linha vermelha) e co-injeção do extrato hexânico do corpo de 1.200 larvas de *Aedes aegypti* acrescido do padrão *n*-heneicosano (linha rosa). No detalhe, região ampliada do cromatograma em que a elipse verde indica os picos correspondentes ao *n*-heneicosano dos três cromatogramas.

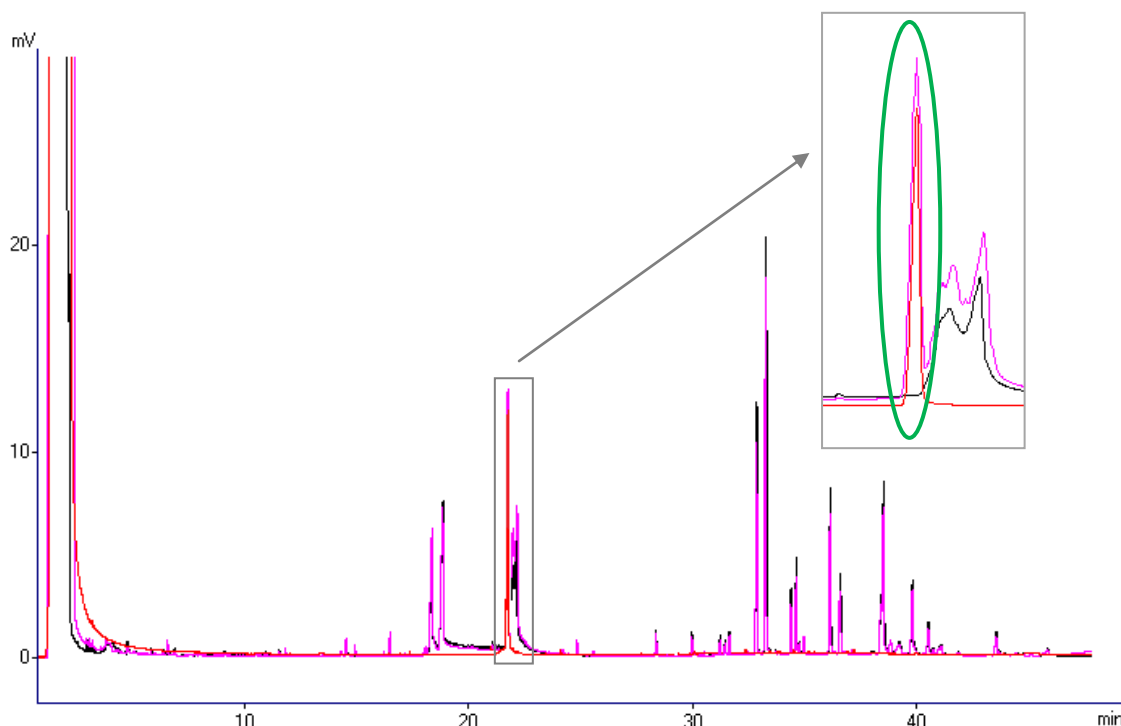


Figura 12: Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico do corpo de 1200 larvas ( $L_3/L_4$ ) de *Aedes aegypti* (linha preta), padrão sintético do *n*-heneicosano a 0,1 mg/mL (linha vermelha) e co-injeção do extrato metanólico do corpo de 1200 larvas de *Aedes aegypti* acrescido do padrão *n*-heneicosano (linha rosa). No detalhe, região ampliada do cromatograma em que a elipse verde indica os picos correspondentes ao *n*-heneicosano de dois cromatogramas.

#### I.3.4 Experimento II: Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* como atraentes de oviposição em campo

Nos experimentos em campo, utilizando diferentes estímulos na armadilha adesiva MosquiTRAP<sup>®</sup> foram capturadas 218 fêmeas de *A. aegypti*. Constatou-se que o número médio de fêmeas de *A. aegypti* capturadas em armadilhas contendo infusão de gramíneas ( $1,3 \pm 0,18$ ) foi significativamente maior do que nas armadilhas contendo ACA ( $0,6 \pm 0,12$ ) e EALCA ( $0,8 \pm 0,19$ ) (Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ ). Entretanto, a captura média de fêmeas de *A. aegypti* nas armadilhas contendo EALSA ( $0,9 \pm 0,17$ ) foi similar à média da armadilha com infusão e com água de torneira ( $p > 0,05$ ) (Fig. 13).

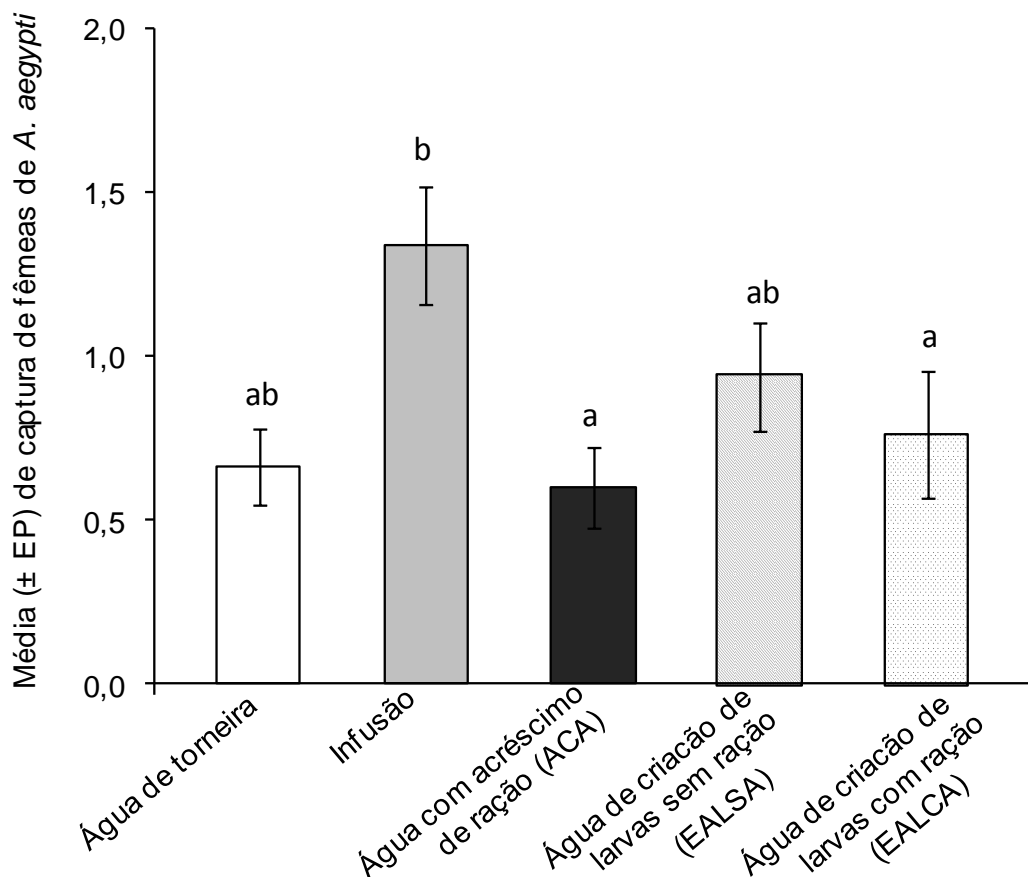


Figura 13. Média ( $\pm$  EP) de fêmeas capturadas em armadilhas adesivas MosquiTRAP<sup>®</sup> contendo diferentes estímulos em testes no *Campus* Pampulha da UFMG, março e abril de 2010 ( $n=50$ ) ( $24,1 \pm 0,25$  °C,  $50,9 \pm 1,07$  % URA) (Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ . Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa).

Durante os testes, nas armadilhas adesivas foram capturadas nove fêmeas de *Culex* sp., sendo cinco nas armadilhas contendo infusão de *P. maximum*, uma na armadilha com extrato de água de larvas acrescida de ração e uma na armadilha associada a água pura. Não foi capturado nenhum espécime de *A. albopictus*.

### I.3.5 Experimento III: Avaliação de extratos de larvas de *Aedes aegypti* associados à infusão de *Panicum maximum* como atraentes de oviposição em campo

Nos experimentos em campo, para a avaliação do efeito aditivo de EALSA com infusão observou-se uma pequena captura de fêmeas de *A. aegypti* (75 indivíduos). O número médio de fêmeas capturadas nas armadilhas com infusão de *P. maximum* ( $0,3 \pm 0,06$ ) foi

similar às iscadas com EALSA ( $0,2 \pm 0,06$ ) e EALSA em combinação com infusão ( $0,3 \pm 0,06$ ). Apesar de o número médio de fêmeas capturadas em armadilhas com água destilada (controle) ter sido menor que nos demais tratamentos ( $0,2 \pm 0,04$ ), não foi detectada diferença significativa (Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ ) (Fig. 14).

O número total de fêmeas de *A. aegypti* capturadas em armadilhas adesivas neste experimento distribuiu-se assim: 12 fêmeas (armadilhas adesivas com água), 24 (infusão), 18 (EALSA) e 21 (EALSA com infusão).

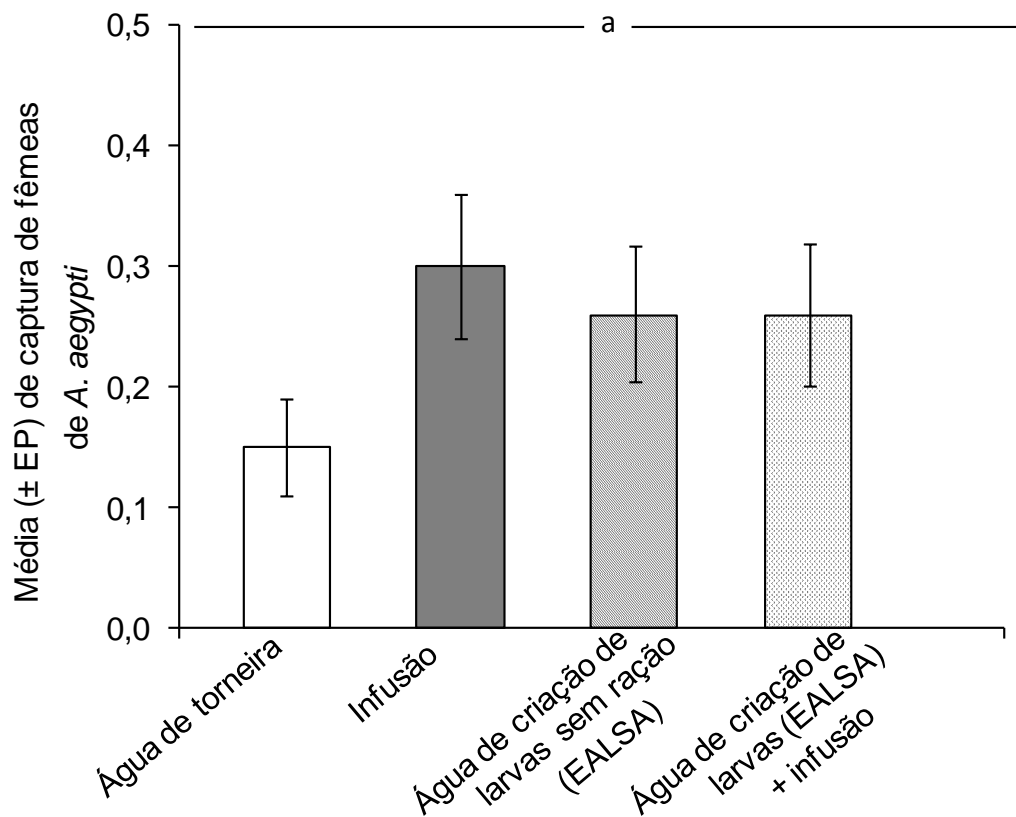


Figura 14. Média ( $\pm$  EP) de fêmeas capturadas em armadilhas adesivas MosquiTRAP<sup>®</sup> contendo diferentes estímulos em testes no *Campus Pampulha* da UFMG, setembro de 2010 ( $n=80$ ) ( $23,3 \pm 0,79$  °C;  $38,9 \pm 0,92\%$  URA) (Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ ).

Além das fêmeas de *A. aegypti*, foram capturadas 11 fêmeas de *Culex* sp.: nas armadilhas iscadas com água de torneira (duas fêmeas), com infusão (duas fêmeas), com EALSA (cinco fêmeas) e com EALSA combinada com infusão (duas fêmeas). Foram

capturados ainda cinco machos de *Culex* sp., sendo dois nas armadilhas com água de torneira e três nas associadas a infusão de *P. maximum*.

## I.4 DISCUSSÃO

Os comportamentos de pré-oviposição e oviposição consistem em uma seqüência de ações que se sobrepõem, resultantes de vários sinalizadores que induzem o início do vôo, o vôo orientado em resposta aos atraentes de oviposição, a localização dos criadouros, a exploração e aceitação dos criadouros mais adequados e, finalmente, a deposição de ovos. Como os comportamentos se sobrepõem, torna-se complicado elucidar o detalhado mecanismo de ação dos estímulos exógenos em cada fase que atuam. A atração para um potencial criadouro é mediada por sinais que podem ser detectados à distância, como odores voláteis e características visuais (ex.: cor, textura, etc.), enquanto que a exploração do criadouro e a oviposição parecem ser mais incitadas por contato, como com estimulantes de oviposição (Bentley & Day 1989, Isoe et al. 1995).

Os resultados de estudos que envolvem comportamentos de oviposição são difíceis de interpretar devido à dificuldade de distinção entre os comportamentos de atração e estimulação. Infoquímicos que interferem na atração devem ser voláteis para serem percebidos a longas distâncias, enquanto os que atuam na estimulação, com ação desencadeada por contato, normalmente não são voláteis. Em consequência do uso equivocado destes conceitos, muitas substâncias não voláteis algumas vezes são referidas erroneamente como atraentes de oviposição. Ambigüidade análoga ocorre com as definições de repelentes, voláteis que atuam à distância, e inibidores de oviposição, estímulos químicos não voláteis com ação desencadeada por contato (Isoe & Millar 1995, Isoe et al. 1995, Eiras & Mafra-Neto, 2001).

Freqüentemente, as classificações incluem as respostas com ação de curto e longo alcance de maneira relativamente arbitrária. Eiras e Mafra-Neto (2001) explicam que, geralmente, quando o estímulo é químico, a divisão entre respostas de curta e longa distância é correlacionada com o espaço onde as mudanças nas estruturas da pluma ou a dispersão de odores ocorrem. Quando se trata de difusão molecular dos compostos a ação evocada é de curta distância e quando o espaço onde a dispersão do odor ocorre é definida pela turbulência do ar, estamos diante de uma ação à longa distância.

A pluma de odor consiste de uma série de pacotes de odores dispersos no ar de forma intermitente e que variam de intensidade e duração de acordo com a distância da fonte (Murlis

& Jones 1981). Dois processos interferem na dispersão da pluma: difusão molecular e turbulência do ar. A difusão molecular ocorre de forma gradual e aleatória, sendo influenciada principalmente pelas características das moléculas de odores, enquanto na difusão por turbulência, as nuvens de moléculas são dispersas pela ação física das correntes de ar. Assim, as escalas temporais e espaciais dos dois processos são diferentes. Difusão molecular é um processo lento e de pequena escala enquanto a difusão por turbulência é vigorosa, abrangendo amplas escalas temporais e espaciais. A última predomina no desenvolvimento da estrutura da pluma de odor, determinando diferenças contrastantes desta estrutura em ambientes com movimentação de ar distintas (Murlis et al. 1992).

Os testes realizados no presente estudo forneceram informações sobre os extratos de água de criação de larvas bem como do corpo das larvas que exercem influência no comportamento de oviposição de grávidas de *A. aegypti*. Os resultados dos testes em ambientes confinados e sem movimentação de ar (ex.: gaiolas 30 x 30 x 30 cm) indicaram, principalmente, a ação estimulante dos infoquímicos nos extratos de larvas, uma vez que os insetos estão limitados a um pequeno espaço, não realizam longos deslocamentos até os recipientes, e podem entrar em contato direto com os compostos. Por outro lado, os experimentos de campo demonstraram o comportamento de longo alcance, onde o potencial atrativo dos extratos de água de criação de larvas pode ser bem definido. Os testes foram realizados ao ar livre, portanto os compostos presentes nos extratos estavam submetidos ao fluxo de ar, com conseqüente dispersão por turbulência dos mesmos. Nestas condições, as fêmeas que foram capturadas nas armadilhas adesivas MosquiTRAP<sup>®</sup> poderiam ser atraídas para os mais diversos criadouros disponíveis no ambiente. No entanto, foram atraídas para as armadilhas através de estímulos de longo alcance e foram capturadas. De acordo com Isoe e colaboradores (1995), a mensuração do número de fêmeas retidas no recipiente de oviposição fornece informações sobre a atratividade do mesmo. Tendo em vista o uso de metodologias diferentes, foi possível avaliar no presente trabalho fundamentalmente a ação estimulante dos extratos de larvas em condições de laboratório e a atratividade da água de criação de larvas em campo.

A pré-existência de imaturos co-específicos em um criadouro é um sinalizador importante para as fêmeas, uma vez que indica que o criadouro seja viável para a reprodução da espécie, já que apresenta alimento, condições ideais de oxigenação, temperatura e pH (Barbosa & Silva 2002). Por outro lado, a existência prévia de larvas submetidas a situações de estresse induzem em co-específicos um comportamento de repelência ou inibição de oviposição. Por exemplo, a presença de patógenos e restrição alimentar são fatores

estressantes para larvas de *A. aegypti* (Zahiri & Rau 1998). Esta comunicação é relevante na dinâmica populacional de culicídeos, uma vez que a escolha pelo sítio adequado é fundamental para garantir o sucesso da prole que não poderá se deslocar ativamente para outro sítio mais adequado (Bentley & Day 1989, Onyabe & Roitberg 1997, Spencer et al. 2002).

No presente estudo observou-se que, em laboratório, cerca de 2/3 dos ovos depositados pelas fêmeas foram colocados diretamente na água e apenas 1/3 foi deixado na superfície do criadouro (Tab. 3, 4 e 5). Os resultados se repetiram tanto nos recipientes tratamentos quanto nos controles, sendo que apenas os recipientes contendo EHAL nas concentrações de 3,0 e 6,0 larvas/mL apresentaram uma distribuição homogênea entre o número de ovos no papel de oviposição e na água (Tab. 4). Neste caso, provavelmente os extratos de larvas forneceram dicas químicas às grávidas de *A. aegypti* sinalizando criadouros com excesso de larvas. Possivelmente estas fêmeas distribuíram um pouco dos ovos no papel de oviposição, evitando a emergência imediata das larvas num ambiente com chances de competição intra-específica por recursos alimentares.

A observação do maior número de ovos depositados na água em detrimento da parede do criadouro neste trabalho, está em desacordo com outros autores que verificaram tanto em ovitrampas (Fay & Perry 1965, Nelson 1986, Chadee & Cobert 1987), assim como em recipientes de oviposição (frasco com água e papel) (Allan & Kline 1998, Gomes 2003, Santos et al. 2010), que a maioria dos ovos foi depositada nas palhetas (ovitrampas) ou no papel de oviposição revestindo internamente as paredes do recipiente (substrato de oviposição). De acordo com estes autores, uma quantidade insignificante de ovos pode ser deixada na água. No entanto, Ponnusamy e colaboradores (2008) verificaram que os ovos de *A. aegypti* foram depositados diretamente na superfície da água, não sendo relatada a presença de ovos nas paredes lisas dos copos plásticos. Esses autores realizaram testes em laboratório com recipientes de oviposição que consistiam apenas de copo de plástico e água destilada.

Observou-se no presente trabalho que cerca de metade das fêmeas que depositaram ovos exploraram os dois recipientes disponíveis realizando “skip oviposition” ou oviposição aos saltos. Abreu (2010) observou que fêmeas de *A. aegypti* distribuem seus ovos em vários criadouros quando estes estão disponíveis, no entanto o comportamento não é obrigatório e algumas vezes as fêmeas podem utilizar apenas um dos criadouros. Mesmo quando há o comportamento de oviposição aos saltos, observa-se a existência de um criadouro predileto, onde a maioria dos ovos é depositada. No presente trabalho, notou-se que entre as fêmeas que exploraram apenas um dos criadouros, cerca de metade depositou todos os ovos no recipiente

controle e metade realizou a oviposição apenas no tratamento. Observou-se assim que a estratégia de oviposição aos saltos não foi a única adotada pelo vetor nos experimentos de laboratório. A característica de fêmeas depositarem ovos num único criadouro também está descrita na literatura, tanto em campo (Harrington & Edman 2001), quanto em laboratório (Williams et al. 2008).

No presente trabalho, tendo em vista o grande número de extratos avaliados, optou-se por padronizar o número de larvas em cada um dos extratos pela estimativa do peso médio destes imaturos (Tab. 1 e 2). Uma vez que a criação foi realizada de forma homogênea e controlada, encontrou-se o peso médio de 30 grupos de 600 larvas ( $1,0 \pm 0,03$ ) e este foi aferido com a pesagem e posterior contagem de larvas ( $607,0 \pm 11,70$ ). Observou-se que a variação encontrada entre o número de larvas ideal (600) e o número de larvas real foi pequena. Diante da praticidade e agilidade na execução, além da concordância entre os números, optou-se por adotar a estimativa do número de larvas. A determinação do peso médio de larvas ocorreu a partir da contagem de cerca de 36.000 larvas no total. O trabalho inicial evitou que fossem contadas individualmente, cerca de 207.740 larvas para a execução dos testes de campo e de laboratório. Além disso, o número estabelecido no presente trabalho poderá ser utilizado em outros estudos que requisitem a contagem de um grande número de larvas, desde que os insetos sejam criados de maneira homogênea.

Nos bioensaios de laboratório foram analisados extratos de água de criação de larvas e do corpo das larvas mantidas em diferentes concentrações de larvas/mL de água destilada por 24 horas. Com isso, buscou-se avaliar a influência do número de larvas presentes num criadouro no comportamento de deposição de ovos por fêmeas de *A. aegypti*. Dois tipos destes extratos (extrato metanólico do corpo de larvas e extrato hexânico de água de criação de larvas) envolveram o uso de solventes orgânicos, metanol e hexano, respectivamente. A escolha do metanol e hexano como solventes foi baseada em estudos anteriores (Mendki et al. 2000, Ganesan et al. 2006, Ponnusamy et al. 2008, Seenivasagan et al. 2009) em que não foi relatada a interferência destas substâncias no comportamento de oviposição do *A. aegypti*.

No atual trabalho foi avaliado se os solventes estimularam ou inibiram o comportamento de oviposição de *A. aegypti*, quando foi comparado o número de ovos depositados em um recipiente contendo apenas água destilada (tratamento) e outro contendo água destilada e solvente (hexano ou metanol) como controle. Os valores do Índice de Atividade de Oviposição indicaram que o hexano não interferiu no comportamento de oviposição (IAO = - 0,01), enquanto que o metanol apresentou uma ação estimulante de oviposição em detrimento da água pura (IAO = - 0,26) (Fig. 9). Estes resultados refutam o



observado por Ganesan e colaboradores (2006) e Ponnusamy e colaboradores (2008), que trabalharam com o metanol em bioensaios semelhantes aos deste estudo e não observaram sua ação estimulante de oviposição para fêmeas de *A. aegypti*. Como os recipientes controle continham a mesma quantidade de metanol que os recipientes tratamento, esta estimulação interferiu de forma semelhante nos dois recipientes disponibilizados para a oviposição.

Em geral, os extratos provenientes de larvas mantidas nas concentrações de 0,5 larvas/mL estimularam a atividade de oviposição de fêmeas de *A. aegypti*, resultados que corroboram com os estudos de Zahiri & Rau (1998). Na avaliação de EAL, EHAL e EMCL na concentração de 0,5 larvas/mL observou-se uma maior deposição de ovos nos recipientes contendo os extratos do que nos respectivos controles. Apesar destas diferenças não serem significativas ( $p < 0,05$ ), os valores positivos de IAO (EAL = +0,32, EHAL = +0,21, EMCL = +0,26) sugerem que os extratos foram mais estimulantes à oviposição do que seus controles. Assim, infere-se que a presença de poucas larvas num recipiente de oviposição pode estimular a oviposição de *A. aegypti*, indicando um ambiente com condições propícias para o desenvolvimento de imaturos (Bentley & Day 1989, Zahiri & Rau 1998, Barbosa & Silva 2002). No campo, o reconhecimento rápido e eficiente de um criadouro adequado garante que as fêmeas tenham menor gasto energético e fiquem menos vulneráveis à predação ou fatores que possam levá-las à morte, aumentando as chances de sucesso reprodutivo (Bentley & Day 1989, Eiras 2001, Harrington & Edman 2001).

Os extratos provenientes de material em que larvas foram mantidas na concentração de 2,0 larvas/mL de água destilada apresentaram um efeito diferente no comportamento do vetor. Enquanto o EAL não influenciou na oviposição, o EHAL apresentou-se como um estimulante (IAO + 0,20) e o EMCL foi significativamente inibidor à deposição de ovos. De acordo com os valores de IAO os extratos de água de criação de larvas (EAL e EHAL) mantidos nas concentrações de 3,0 e 6,0 larvas/mL pouco interferiram no número médio de ovos depositados em cada recipiente, tendo apresentado algum efeito inibidor (EHAL) e estimulante (EMCL). Em cada um dos extratos avaliados (EAL, EHAL e EMCL), observou-se que extratos mantidos na concentração de 3,0 e 6,0 larvas/mL de água destilada desempenharam uma ação similar no comportamento de oviposição do vetor.

Observou-se que, nos EMCL, os valores de IAO foram positivos nas concentrações de 0,5 (+0,26), 3,0 (+0,12) e 6,0 (+0,10) larvas/mL de água destilada. Por outro lado, o extrato na concentração de 2,0 larvas/mL foi significativamente inibidor à oviposição. Como existem relatos na bibliografia (Consoli & Teixeira 1988, Zahiri & Rau 1998, Ivo & Eiras 1999) de que a concentração da criação de larvas num local influencia a deposição subsequente dos

ovos, diante dos resultados obtidos esperava-se que os extratos com concentrações superiores a 2,0 larvas/mL de água destilada apresentassem algum efeito inibidor à deposição de ovos, o que não foi verificado.

O efeito da água de criação de larvas em diferentes concentrações já foi abordado em outros trabalhos com culicídeos e os resultados foram divergentes. Consoli e Teixeira (1988) avaliaram o comportamento de oviposição de 200 fêmeas de *A. fluviatilis* mantidas com 200 machos co-específicos. Foram analisados extratos de água de criação de larvas nas concentrações de 3,0 e 10,0 larvas/mL de água e, em ambas as concentrações, os extratos foram mais estimulantes do que água pura. Zahiri e Rau (1998) analisaram o comportamento de 100 fêmeas mantidas com 100 machos em resposta a diferentes concentrações de extratos de água de criação de larvas de *A. aegypti* em bioensaios similares ao presente estudo. Verificaram que água de criação de larvas, tanto de terceiro quanto de quarto ínstares, mantidas na concentração de 0,5 larvas/mL interferiram na atividade de oviposição aumentando o número de ovos depositados. Por outro lado, extratos na concentração de 2,0 e 3,0 larvas/mL apresentaram-se como inibidores de oviposição, sendo esta influência proporcional ao aumento da concentração. Ivo e Eiras (1999) avaliaram ovitrampas contendo extratos de água de criação de larvas de quarto ínstar de *A. aegypti* em laboratório. A resposta de oviposição de 20 fêmeas co-específicas foi avaliada aos extratos nas concentrações de 0,5; 2,0; 3,0; 5,0; 6,0 e 7,0 larvas/mL de água destilada. Eles observaram que o extrato de 0,5 larvas/mL foi tão estimulante quanto o controle contendo apenas água destilada. No entanto, extratos na concentração de 3 larvas/mL foram os mais estimulantes à deposição de ovos e a partir desta concentração ocorreu uma redução no número de ovos depositados, sendo estes valores inferiores ao controle. Estas diferenças entre trabalhos de diversos autores decorrem das disparidades entre as metodologias utilizadas na produção dos extratos, às características da espécie envolvida e ao número de fêmeas avaliadas numa única repetição. Quando são avaliadas mais de uma fêmea simultaneamente num bioensaio, existe a possibilidade dos resultados serem duvidosos, devido aos efeitos de interações entre os insetos-teste (Ponnusamy 2008). Portanto, o presente trabalho avaliou o comportamento de apenas uma única grávida de *A. aegypti*, evitando assim o efeito de interações entre indivíduos.

O hidrocarboneto *n*-heneicosano, foi identificado como atraente e estimulante de oviposição para populações indianas de *A. aegypti* (Mendki et al. 2000). Na presente pesquisa, foi verificada pela primeira vez a presença deste alcano em extratos hexânicos de corpo de larvas e extratos hexânicos de água de criação de larvas de populações brasileiras de *A. aegypti*. Mendki e colaboradores (2000) identificaram cinco compostos que interferiram na

atividade de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*: quatro alcanos (octadecano, *n*-heneicosano, docosano e nonacosano) e um éster (miristato de isopropila). Estes foram identificados a partir de EHAL e extrato hexânico do corpo de larvas. Bioensaios foram realizados em gaiolas semelhantes às utilizadas no presente estudo com as substâncias identificadas e o *n*-heneicosano foi sinalizado como um estimulante de oviposição.

Seenivasagan e colaboradores (2009) verificaram através de testes em gaiolas de criação e em olfatômetro em Y, que o comportamento do inseto em resposta ao feromônio *n*-heneicosano é dose-dependente. Assim, as fêmeas foram repelidas no olfatômetro quando expostas a elevadas concentrações deste hidrocarboneto e evitaram depositar seus ovos em recipientes (testes de gaiolas) contendo o composto em grande quantidade ( $10^{-3}$  g). Nos testes em olfatômetro, quantidades intermediárias de *n*-heneicosano ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  g) atuaram como atraentes de oviposição, enquanto quantidades pequenas ( $10^{-7}$ ) foram responsáveis por ausência de atratividade, como nos controles. Desta forma evidenciou-se que *n*-heneicosano é um composto atraente de oviposição, porém, quando em elevadas concentrações pode atuar como um repelente. A redução observada na resposta de oviposição a estas elevadas doses sugere que as grávidas percebem o recipiente com elevadas concentrações do hidrocarboneto como um local com excesso de larvas, com possibilidade de competição intra-específica, e então evitam a oviposição como uma estratégia de cuidado parental (Seenivasagan 2009).

Ganesan e colaboradores (2006) relataram que alguns ácidos graxos provenientes de ovos de *A. aegypti* atuam como repelentes acima de determinadas concentrações. Sharma e colaboradores (2008) verificaram que ésteres de 21 carbonos em elevadas concentrações são repelentes de oviposição para *A. aegypti*, sendo muitas vezes a ação potencializada com o aumento da concentração. Portanto, apesar de no presente trabalho não ter sido realizada a identificação química de todos os compostos, os resultados sugerem que existem quantidades de infoquímicos presentes nos extratos de 0,5 larvas/mL de água destilada, que podem atuar como estimulantes de oviposição para fêmeas de *A. aegypti* em condições de laboratório. Entretanto, o excesso destes infoquímicos em um criadouro (EHAL na concentração de 3,0 larvas/mL e EMCL na concentração de 2,0 larvas/mL) pode indicar para fêmeas co-específicas a existência de um criadouro com elevado número de larvas, o que levaria a uma competição intra-específica por recursos. Conseqüentemente, as fêmeas tenderiam a evitar a deposição de ovos nestes locais (Ganesan et al. 2000, Seenivasagan et al. 2009).

No presente trabalho, em experimentos de campo, foram avaliados dois tipos de extratos de larvas na concentração de 8,0 larvas/mL de água destilada associados à armadilha adesiva MosquiTRAP<sup>®</sup>. Esta concentração foi escolhida porque Ivo e Eiras (1999)

determinaram em testes de campo que extratos de água de criação de larvas nesta concentração foram mais atraentes e/ ou estimulantes quando associados à ovitrampa (armadilha de oviposição) do que outras concentrações avaliadas (0,5; 2,0 e 6,0 larvas/mL). Segundo Ivo (2000), em campo, extratos apresentando elevadas concentrações de compostos químicos desempenham uma ação mais expressiva na atração e/ou estimulação para oviposição

No presente estudo, os resultados do primeiro teste de campo (Fig.13) demonstraram que as armadilhas MosquiTRAP<sup>®</sup> iscadas com infusão de *P. maximum* apresentaram a maior captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Provavelmente, esta maior captura nas armadilhas com infusão ocorreu devido aos microrganismos presentes que, em decorrência do seu metabolismo, produzem e liberam substâncias que atraem ou estimulam as fêmeas grávidas para a oviposição (Kramer & Mulla, 1979). Os estudos sobre a estimulação e atratividade dos compostos provenientes de infusão de gramíneas, como o *P. maximum* já estão bem consolidados, com muito trabalhos realizados pelo grupo do LabEQ. Infoquímicos provenientes destas infusões já foram identificados e avaliados em armadilhas de oviposição (ovitrampas) como atraentes e/ou estimulantes (Sant'Ana 2003, Sant'Ana et al. 2006), assim como atraentes em armadilhas adesivas (MosquiTRAP<sup>®</sup>) para a captura de fêmeas grávidas do vetor (Roque 2007). A partir destes estudos foi desenvolvido um atraente de oviposição sintético (AtrAedes<sup>®</sup>), além de outros estimulantes e/ou atraentes de oviposição para fêmeas de *A. aegypti* que estão sendo empregados na armadilha MosquiTRAP<sup>®</sup>.

As armadilhas adesivas iscadas com EALSA (extrato de água de criação de larvas sem acréscimo de alimento) na concentração de 8 larvas/mL capturaram um número maior de fêmeas do que as armadilhas contendo apenas água, porém menor do que nas iscadas com infusão (Fig. 13) Apesar de os dados serem estatisticamente iguais, a maior captura nas armadilhas com extratos de água de criação de larvas em relação às com água pura sugerem a presença de infoquímicos procedentes da água de criação de larvas que interferiram na atração de co-específicos. Verificou-se que a captura em armadilhas iscadas com o EALCA (extrato de água de criação de larvas com acréscimo de alimento, 8 larvas/mL) foi significativamente inferior à captura em MosquiTRAP<sup>®</sup> com infusão de gramínea, sugerindo que a combinação de infoquímicos liberados pelas larvas de *A. aegypti*, produtos do metabolismo bacteriano e excretas provenientes das larvas (Trimble & Wellington 1980) não foram atraentes para grávidas de *A. aegypti* em campo.

As capturas de fêmeas nas armadilhas iscadas com infusão foram significativamente maiores do que as capturas em armadilhas associadas ao extrato de água destilada com

acrécimo de alimento (ACA) e extrato de água previamente habitada por larvas com acréscimo de alimento (EALCA) (Fig. 13). A avaliação de ACA visou verificar a influência dos compostos emanados pela ração que, eventualmente, poderiam atrair fêmeas para oviposição, sinalizando presença de alimento naquele local. Observou-se que a captura de fêmeas de *A. aegypti* em armadilhas iscadas com este extrato foi semelhante à captura em armadilhas com água e significativamente inferior à da infusão, sugerindo que as substâncias emanadas pela água contendo ração não atraíram as fêmeas para aquela armadilha.

Diante destas observações foi realizado um novo experimento de campo com o objetivo de avaliar o efeito da associação de infusão de *P. maximum* e extrato de água de criação de larvas sem acréscimo de alimento (EALSA, 8,0 larvas/mL). O número total de fêmeas capturadas nas armadilhas foi reduzido, porém foi possível observar que não ocorreu um efeito aditivo ou sinérgico entre a infusão e o extrato de larvas (Fig. 14).

Ivo (2000) a partir de filmagens de fêmeas individualizadas, durante 12 horas (8 h às 20 h) sugeriu diferenças entre os números de ovos depositados em quatro ovitrampas em condições de laboratório. As armadilhas de oviposição foram colocadas simultaneamente na mesma gaiola (40 x 40 x 40 cm) de acrílico sendo que cada uma delas apresentava um substrato líquido diferente. Foi observado uma maior deposição de ovos em ovitrampas contendo infusão de gramínea ( $56,2 \pm 22,84$ ), quando comparado com o extrato de água de criação de larvas (3,0 larvas/mL de água destilada) ( $44,0 \pm 14,53$ ), infusão de gramínea com extrato de água de criação de larvas ( $40,6 \pm 20,57$ ) e água ( $35,7 \pm 15,63$ ). Estes resultados foram diferentes dos encontrados por Ivo & Eiras (1999) que observaram o comportamento de 20 fêmeas de *A. aegypti* em cada teste de laboratório e verificaram uma maior deposição de ovos quando há a presença simultânea do extrato de larvas e infusão de gramínea na ovitrampa. Segundo Ivo (2000), provavelmente houve uma interação entre as fêmeas no teste realizado por Ivo e Eiras (1999) que, de alguma forma, proporcionou a diferença nos comportamentos observados nos dois experimentos. Em nenhum dos trabalhos foram realizados bioensaios em campo para avaliar a combinação do extrato de água de criação de larvas com infusão em campo.

O atraente e/ou estimulante de oviposição que provavelmente está associado a larvas de 3º e 4º ínstar pode ser proveniente de (1) metabólitos produzidos por bactérias aderidas à superfície das larvas durante a incubação; (2) excreções larvais que mimetizam estimulantes naturais produzidos por matéria orgânica em decomposição e (3) químicos produzidos pelas larvas com a função específica de atuar como estimulantes de oviposição (Trimble & Wellington 1980). No entanto, existem evidências de que a água de criação de larvas, livre de

microrganismos e sem contaminação por excretas, também atua como estimulante de oviposição (Trimble & Wellington 1980, Maire 1985).

Com os resultados do presente trabalho não foi possível identificar a origem dos compostos que influenciaram no comportamento do vetor. No entanto, pode-se sugerir a presença de infoquímicos que atuaram como estimulantes de oviposição no extrato de água de criação de larvas e do corpo de larvas, como demonstrado em todos os extratos de larvas mantidas na concentração de 0,5 larvas/mL. Os cromatogramas demonstraram a existência de inúmeros picos correspondentes aos compostos isolados, que quando identificados, possivelmente poderão ser usados como atraentes sintéticos em armadilhas para a captura de fêmeas do vetor (Allan & Kline 1998, Navarro-Silva et al. 2009). A comprovação da produção do feromônio *n*-heneicosano, por larvas de *A. aegypti* com origem brasileira, indica que este hidrocarboneto também pode influenciar na oviposição de vetores brasileiros, sugerindo estudos mais detalhados com este feromônio.

## **I.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo demonstrou que a estimativa do número de larvas através do seu peso médio é uma alternativa viável quando é necessário trabalhar com a mensuração de uma quantidade elevada de larvas de *A. aegypti*.

Demonstrou evidências da existência de infoquímicos que atuam como atraentes e estimulantes de oviposição de *A. aegypti* em extratos de larvas de terceiro e quarto ínstares e extratos de água de criação de larvas co-específicas. Estes infoquímicos estão presentes em concentrações estimulantes de oviposição quando as larvas são mantidas na concentração de 0,5 larvas/mL em condições de laboratório.

Em condições de campo, armadilhas adesivas MosquiTRAP<sup>®</sup> iscadas com extratos de larvas de *A. aegypti* na concentração de 8 larvas/mL foram atraentes de oviposição para fêmeas co-específicas e tiveram uma performance semelhante à infusão de folhas de gramíneas *P. maximum*.

## **Capítulo II**

**Influência de ovos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de diferentes idades na oviposição de co-específicas em condições de laboratório**

## RESUMO

O processo de busca e seleção de sítios de oviposição por *Aedes (Stegomyia) aegypti* é mediado por diversos sinalizadores químicos e físicos, entre os quais se destacam os infoquímicos provenientes de ovos do vetor. O objetivo deste estudo foi avaliar como ovos de *A. aegypti*, com diferentes idades, influenciaram no comportamento de oviposição de co-específicos em condições de laboratório. Testes de dupla escolha foram conduzidos em gaiolas (30 x 30 x 30 cm) contendo dois recipientes de oviposição (copo de vidro contendo 100 mL de água destilada e papel cartão branco), posicionados equidistantes 10 cm, em condições controladas ( $27 \pm 2$  °C, 75 a 80% U.R. e 12 h de fotofase). Cada gaiola recebeu um recipiente de oviposição controle e um tratamento. Os tratamentos consistiram de recipientes de oviposição contendo 150 ovos de 0, 2, 7, 15, 30, 90 ou 180 dias. Para cada teste, apenas uma fêmea grávida de *A. aegypti*, três a quatro dias após o repasto sanguíneo, foi liberada em uma gaiola e após 22 horas de teste, quantificado o número de ovos depositados. Extratos metanólicos dos ovos com diferentes idades foram avaliados por cromatografia gasosa, sendo comparados com padrões sintéticos de compostos considerados estimulantes de oviposição para a espécie (ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico e *n*-heneicosano). Os resultados obtidos sugerem o efeito estimulante de oviposição dos ovos com dois, sete, 15 e 30 dias de idade (Qui Quadrado,  $p < 0,05$ ). Ovos com 90 dias não influenciaram na escolha por criadouros e ovos de 180 dias parecem inibir a oviposição. Análises cromatográficas de extratos metanólicos de ovos nas diferentes idades indicaram a presença dos ácidos dodecanóico e tetradecanóico e a ausência de *n*-heneicosano, além da existência de outros compostos ainda não identificados. Os ácidos carboxílicos apresentaram proporções relativas similares nos ovos com idades entre zero e 30 dias, enquanto foram detectados somente traços dos compostos em extratos de ovos mais velhos (90 e 180 dias). Conclui-se que 150 ovos de *A. aegypti*, com idade entre dois a 30 dias, foram significativamente estimulantes de oviposição para fêmeas co-específicas em condições de laboratório e que à medida que os ovos envelhecem, o perfil químico dos compostos provenientes desses ovos é alterado, modificando a influência na deposição de ovos no criadouro.



## II.1 INTRODUÇÃO

Para a sobrevivência e dinâmica populacional dos culicídeos é de crucial importância a seleção de sítios de oviposição adequados. A escolha por criadouros envolve uma complexa rede de percepção de estímulos químicos e físicos através de respostas visuais, táteis e olfatórias (Bentley & Day 1989, McCall & Cameron 1995). Apesar de cada um ter sua importância específica, são os infoquímicos os principais responsáveis pela comunicação entre insetos. Os infoquímicos são substâncias que, em contexto natural, fornecem informações em uma interação entre dois indivíduos, provocando no receptor um comportamento ou resposta fisiológica (Vilela & Della Lucia 2001, Corrêa & Sant'Ana 2007). Infoquímicos envolvidos no comportamento de oviposição de culicídeos são classificados como atraentes ou repelentes (com ação a longa distância) e estimulantes ou inibidores (ação a curta distância, desencadeada por contato) (Dethier et al. 1960, Osgood & Kempster 1971, Isoe & Millar 1995, Isoe et al. 1995).

Extração, separação, identificação e síntese dos compostos químicos que intermedeiam a comunicação entre insetos são processos essenciais nas pesquisas e aplicação dos conhecimentos em ecologia química (Zarbin 2001). Várias são as técnicas utilizadas nestes procedimentos, sendo a cromatografia gasosa um método físico-químico de separação muito empregado em ecologia química. Esta técnica é fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre as fases imiscíveis, fase móvel (gás inerte) e estacionária (um material, líquido ou sólido, que propicia a separação da mistura através de processos físicos e químicos) e às diferentes pressões de vapor dos constituintes da mistura, ou seja, quanto mais volátil a substância, mais rapidamente ela se desloca pela coluna. A cromatografia gasosa apresenta um grande poder de resolução o que permite que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas. A cromatografia gasosa também é de grande aplicabilidade podendo ser utilizada para a separação de componentes de uma mistura; para a identificação de compostos, pela comparação com padrões previamente existentes e para a purificação de compostos, apartando as substâncias indesejáveis (Degani et al. 1998, Millar & Haynes, 1998).

Para a realização da cromatografia gasosa uma pequena quantidade da amostra é injetada no cromatógrafo e, devido à elevada temperatura no injetor, é vaporizada. A mistura percorre toda coluna cromatográfica ao ser arrastada por um gás inerte. Os componentes da mistura são separados por causa das diferentes interações com a fase estacionária e volatilidades, chegando ao final da coluna em momentos diferentes. Ao concluírem o

percurso passam por um detector de ionização em chamas (FID) que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (Degani et al. 1998, Pereira & Aquino Neto 2000, Zarbin 2001, Ganesan et al. 2006, Sant'Ana & Stein 2007, Seenivasagan et al. 2009).

Fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) apresentam várias estratégias de oviposição quando um criadouro adequado é encontrado, sendo incluída a dispersão de ovos de um único lote em criadouros diferentes (Reiter 2007, Chadee 2009), comportamento denominado “skip oviposition” (ou oviposição aos saltos) (Mogi & Morky 1980 *apud* Chadee 2009). Fêmeas do vetor também podem depositar todos os ovos num único criadouro (Harrington & Edman 2001, Williams et al. 2008). Além disso, observa-se que a maioria dos ovos é depositada na parede do criadouro, sendo uma minoria deixada diretamente na água (Gadelha & Toda 1985, Clements 1999, Gomes et al. 2003).

Substâncias químicas provenientes de formas imaturas (ovos, larvas e pupas) tornam o ambiente aquático co-específico mais estimulante à deposição de ovos (Soman & Reuben 1970, Allan & Kline 1998, Serpa et al. 2008). No entanto, ainda pouco se sabe sobre a influência de ovos co-específicos pré-existentes nas oviposições subsequentes de *A. aegypti*. De acordo com Chadee e colaboradores (1990), fêmeas de *A. aegypti* evitam a oviposição em locais contendo ovos co-específicos. Apostol e colaboradores (1994) apresentaram evidências de que a densidade de ovos num criadouro pode afetar o número de ovos depositados por fêmeas de *A. aegypti*. Allan e Kline (1998) demonstraram que fêmeas de *A. aegypti* selecionam recipientes onde previamente foram depositados ovos da espécie ou de *A. albopictus*. Ganesan e colaboradores (2006) identificaram vários compostos originários de ovos de *A. aegypti*, observando que os ácidos dodecanóico, (Z)-9-hexadecenóico e tetradecanóico apresentaram-se como estimulantes de oviposição enquanto ésteres atuaram como repelentes ou inibidores de oviposição.

Segundo Chadee (2009) a idade dos ovos de *A. aegypti* influencia nos marcadores bioquímicos (ácidos graxos e ésteres) e/ou suas concentrações, indicando que ovos mais velhos podem ter um efeito diferente de ovos mais jovens na oviposição de co-específicos. Assim, a finalidade do estudo foi avaliar o comportamento de fêmeas grávidas de *A. aegypti* diante de sítios de oviposição com ovos pré-existentes de diferentes idades.

## II.2 METODOLOGIA

### II.2.1 Criação e manutenção da colônia de *Aedes aegypti* em laboratório

A criação de *A. aegypti* foi realizada no insetário do Laboratório de Ecologia Química (LaBEQ) conforme metodologia descrita no Capítulo I (vide: “Criação e manutenção da colônia de *Aedes aegypti* em laboratório”). A colônia, livre de todos os sorotipos do vírus da dengue, foi estabelecida em janeiro de 2007 e, desde então, foi mantida sob condições ambientais controladas ( $27 \pm 1$  °C, 75 a 80% U.R. e 12 horas de fotofase) (Eiras 1991). Os papéis de oviposição contendo ovos provenientes da criação foram armazenados em potes plásticos com tampa. As larvas foram criadas em cubas plásticas contendo 1.800 mL de água desclorada e como alimento, foi fornecido ração para peixes (Goldfish, Alcon<sup>®</sup>) ou para répteis aquáticos (Reptolife, Alcon<sup>®</sup>). Assim que as larvas se transformaram em pupas, foram transferidas para potes plásticos contendo água e deixadas em gaiolas de criação (Bugdorm-1, Mega View Science Education Services, Taiwan - 30x30x30 cm). Os adultos foram alimentados com solução açucarada (10 % sucrose). As fêmeas utilizadas nos testes e na manutenção da colônia receberam alimentação sanguínea em um alimentador artificial. Nos experimentos foram utilizadas fêmeas de três a quatro dias após o repasto sanguíneo e com idade entre 10 e 20 dias (Roque 2002, Gomes 2003, Roque 2007).

### II.2.2 Experimento I: Influência de ovos de *Aedes aegypti* de diferentes idades na oviposição de co-específicos em laboratório

A resposta de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* a criadouros contendo 150 ovos co-específicos de diferentes idades foi avaliada em testes de dupla escolha (controle x tratamento) em condições de laboratório. Foi utilizado o delineamento experimental de quadrado latino (7 x 7) com 28 repetições para cada tratamento avaliado. Os testes foram conduzidos em gaiolas de polipropileno teladas (Bugdorm-1, 30 x 30 x 30 cm) contendo dois recipientes para oviposição (Fig. 5) que consistiram de dois copos de vidro com capacidade de 150 mL, papel cartão branco revestindo internamente as bordas do copo (papel de oviposição, 21,0 x 7,5 cm), 100 mL de água destilada e um clipe de metal. Ao papel de oviposição do recipiente tratamento foi fixada, com o clipe, uma tira de papel de oviposição contendo 150 ovos de *A. aegypti* (Fig. 15 b) (Allan & Kline 1998). Os ovos utilizados como tratamentos apresentavam diferentes idades: 0, 2, 7, 15, 30, 90 e 180 dias após a oviposição. Os

recipientes para oviposição foram colocados no centro da gaiola, a 10 cm de distância um do outro e equidistantes da abertura da gaiola (Fig. 15 a).

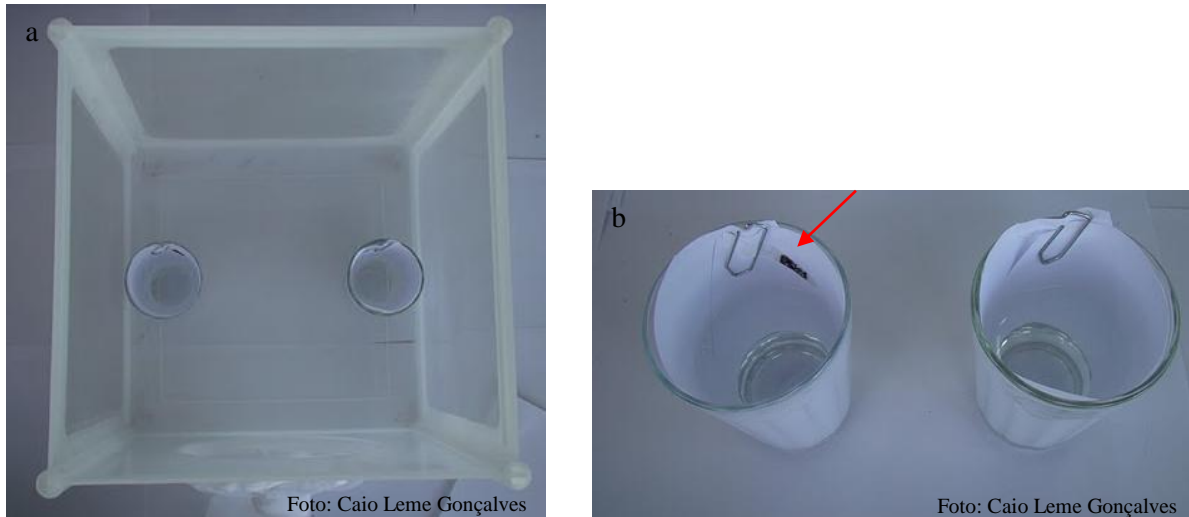


Figura 15. Bioensaio de avaliação da influência de ovos de *Aedes aegypti* na oviposição de co-específicos em laboratório. a) Gaiola de polipropileno (com a parte superior removida) em que foram realizados os testes contendo dois recipientes para oviposição; b) Recipientes para oviposição: à esquerda o recipiente tratamento contendo 150 ovos (indicados pela seta vermelha) e à direita, o controle (sem ovos).

Foi considerado “ovo de zero dia”, os ovos que estavam no interior dos ovários do inseto. Os ovos utilizados neste tratamento foram provenientes da dissecação dos ovários de fêmeas (Detinova 1962) no quarto dia após o repasto sanguíneo, sendo o seu número quantificado. Vinte fêmeas foram dissecadas e o número de ovos contabilizados sob estereomicroscópio para estimar o número médio de ovos presentes nos ovários. Ovos utilizados no tratamento “dois dias após a oviposição” foram obtidos a partir de papéis de oviposição deixados dentro das gaiolas de manutenção da colônia durante o dia que antecedeu o teste. Os ovos dos demais tratamentos foram provenientes do estoque de ovos do insetário. Como rotina, papéis de oviposição retirados das gaiolas de manutenção foram mantidos num pote plástico tampado contendo solução de KOH 10%, que mantém a umidade relativa adequada para a conservação dos ovos (Roque 2002, Gomes et al. 2006). Todos os papéis de oviposição foram datados antes de serem armazenados. A idade dos ovos (7, 15, 30, 90 e 180 dias) utilizados nos bioensaios variou em um dia a mais ou a menos do especificado.

Os testes foram realizados em condições controladas de laboratório, ( $27 \pm 2$  °C, 75 a 80 % URA e 12 horas de fotofase) (Eiras 1991). Cada experimento foi iniciado às 12 h e encerrado às 10 h da manhã do dia seguinte, com duração de 22 horas (Allan & Kline 1998, Gomes et al. 2003, Chadee 2010). Para cada teste foi usada apenas uma grávida de *A. aegypti* (geração F-56 a F-59 da criação estabelecida no LabEQ) três a quatro dias após o repasto sanguíneo, que foi liberada em uma gaiola contendo os dois recipientes de oviposição. O número de ovos depositados no papel e na água dos recipientes foi quantificado após 22 horas (Ponnusamy et al. 2008). Para eliminar a influência das posições dos recipientes nas gaiolas de teste, estes foram reorganizados diariamente de modo a passarem duas vezes por todas as posições em todas as gaiolas avaliadas. Após o final de cada teste, as fêmeas foram anestesiadas em freezer (-20° C) durante 10 min e dissecadas sob um estereomicroscópio. O número de ovos contidos no interior dos ovários foi contabilizado com auxílio de um contador manual (Detinova 1962, Sucharit & Tumrasvin 1981, Williams et al. 2008).

Após a realização dos testes, as tiras de papel contendo 150 ovos de *A. aegypti* utilizadas nos bioensaios foram colocadas em copos de plástico transparentes contendo 150 mL de água desclorada, para verificação da taxa de viabilidade destes ovos. Após cinco ou seis dias da eclosão das larvas, as larvas de 3° e 4° ínstaes foram contadas a olho nu com auxílio de contador manual.

### **II.2.3 Índice de Atividade de Oviposição**

A atividade de oviposição foi expressa através do Índice de Atividade de Oviposição (IAO) (Kramer & Mulla, 1979), que é dado pela fórmula:  $IAO = (Nt - Nc) / (Nt + Nc)$ , em que Nt corresponde ao número médio de ovos depositados no recipiente tratamento e Nc ao número médio de ovos depositados no controle (vide: Capítulo I “Índice de Atividade de Oviposição (IAO)”).

### **II.2.4 Extratos metanólicos de ovos de *Aedes aegypti***

Extratos metanólicos de ovos de *A. aegypti* com diferentes idades (0, 2, 7, 15, 30, 90, 180 dias) foram produzidos para avaliação no cromatógrafo a gás (N=5). Para cada extrato foram utilizados 1.000 ovos, sendo cada extrato realizado com ovos de diferentes papéis de oviposição. Os ovos foram retirados do papel com auxílio de pincel, transferidos para uma placa de Petri de vidro e contados sob estereomicroscópio. Em seguida foram transferidos

para um frasco de vidro com tampa (Supelco, capacidade de 2 mL), ao qual foram acrescentados 100 µL de metanol (Merck, grau HPLC). Ovos e solvente foram deixados por 30 minutos no freezer (-20°C) para extração dos compostos (Ganesan et al. 2006). Após este período, a solução foi transferida para outro recipiente de vidro e o material foi concentrado em gás nitrogênio até um volume de cerca de 30 µL. Em seguida, o extrato foi transferido para outro recipiente de vidro contendo um microcapilar de vidro (Micro insert Supelco, 100 µL); o solvente foi completamente evaporado em gás nitrogênio e posteriormente armazenado no freezer (-20°C) até o momento da injeção no cromatógrafo a gás.

### **II.2.5 Experimento II: Avaliação cromatográfica dos extratos de ovos com diferentes idades após a oviposição**

Os extratos metanólicos de ovos de *A. aegypti* com diferentes idades (0, 2, 7, 15, 30, 90 ou 180 dias) foram analisados pela técnica analítica de cromatografia gasosa. Foram produzidos extratos conforme descrito anteriormente (“Extratos metanólicos de ovos de *Aedes aegypti*”) para cada um dos sete tratamentos avaliados.

Para análise em cromatógrafo a gás (CG) os extratos de ovos de *A. aegypti* foram re-suspendidos em 10 µL de metanol (Merck, grau HPLC), dos quais 1 µL foi injetado no cromatógrafo utilizando uma seringa de vidro (Hamilton, 10 µl, Nevada). Os extratos foram analisados em CG Shimadzu 17A equipado com uma coluna DB-1 (100 % dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm de espessura do filme, J & W Scientific), utilizando hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi 300 °C e do detector 310°C. O programa de temperatura utilizado iniciou-se a 60 °C, com aquecimento de 10 °C/min até 180 °C, mantido por 2 min, um aquecimento numa taxa de 5 °C/min até 280 °C, mantidos por 25 min; injeção no modo Splitless. Tempo total de 59 min. Velocidade linear (31,757); pressão da coluna (110,0 KPa) e fluxo de gás (1,6 mL/min a 60 °C) (Ganesan et al. 2006).

#### II.2.5.1 Investigação da presença dos compostos: ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico e *n*-heneicosano nos extratos de ovos da população brasileira de *Aedes aegypti*

A investigação da presença de ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico (Ganesan et al 2006) e *n*-heneicosano (Mendki et al. 2000, Seenivasagan et al. 2009) nos extratos de ovos de insetos provenientes da população brasileira de *A. aegypti* foi realizada conforme a metodologia do item anterior. Foram realizadas injeções isoladas no CG de extratos

metanólicos de ovos de *A. aegypti*, correspondentes aos sete tratamentos dos bioensaios: ovos com 0, 2, 7, 15, 30, 90 e 180 dias. Inicialmente foi injetado o extrato, depois a mistura de padrões sintéticos (ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico e *n*-heneicosano a 0,1 mg/mL). Com os cromatogramas obtidos foram comparados os tempos de retenção dos picos dos extratos com os picos dos padrões. Posteriormente, foi realizada a co-injeção, ou seja, injeção simultânea do extrato de ovos com os padrões sintéticos. As áreas dos picos correspondentes aos compostos identificados nos extratos de ovos de sete idades diferentes (N=5) foram analisadas quantitativamente.

## II.2.6 Análises Estatísticas

Os percentuais de ovos depositados nos recipientes de oviposição foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors ( $\alpha = 0,05$ ) e não apresentaram distribuição normal. Os dados sofreram transformação arcoseno e novamente foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors. Verificou-se que eles não apresentaram distribuição normal. Assim, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste Dunn ( $\alpha = 5\%$ ) para verificar as diferenças entre o percentual de ovos depositados em cada tratamento. Para comparar as variações entre deposições de ovos no recipiente tratamento e respectivo controle foi utilizado o teste Qui Quadrado ( $\alpha = 5\%$ ). As análises foram realizadas com o programa Bioestat 5.0.

Algumas fêmeas não depositaram ovos em nenhum dos recipientes de oviposição, sendo assim, dados referentes a estas fêmeas foram omitidos das análises, porém apresentados integralmente no apêndice 4.

## II. 5 RESULTADOS

### II.5.1 Experimento I: Influência de ovos de *Aedes aegypti* de diferentes idades na oviposição de co-específicos em laboratório

Foram utilizadas 196 fêmeas de *A. aegypti* nos experimentos de avaliação da influência da idade dos ovos no comportamento de oviposição do vetor. Observou-se que das 196 fêmeas, 35 indivíduos (17,9 %) não depositaram ovos em nenhum dos recipientes de oviposição e nove destas 35 fêmeas (25,7 %) apresentaram ovos nos ovários após a dissecação. Entre as 161 fêmeas que realizaram a oviposição, 93 (57,8 %) utilizaram os dois

recipientes de oviposição para colocarem seus ovos, 16 (9,9 %) depositaram ovos apenas no recipiente controle e 52 (32,3 %) colocaram todos os ovos no recipiente tratamento. Das 161 fêmeas que realizaram oviposição 19 (11,8 %) não depositaram todos os ovos que possuíam, apresentando retenção de ovos nos ovários após as 22 horas de teste (Harrington & Edman 2001, Williams et al. 2008). Destas 19 fêmeas, notou-se que 12 utilizaram apenas um dos recipientes de oviposição disponíveis. O número médio de ovos depositados por fêmea foi de  $83,8 \pm 3,26$ .

A comparação entre o percentual médio de ovos depositados em cada um dos sete tratamentos não sugeriu diferença significativa entre eles (Kruskal Wallis,  $H = 8,68$ ,  $p = 0,19$ ).

Verificou-se que o percentual médio de ovos depositados por fêmeas de *A. aegypti* nos recipientes contendo ovos foi maior do que nos respectivos controles em todos os tratamentos, exceto nos recipientes contendo ovos de 90 dias (Fig. 16). A média percentual ( $57,3 \pm 9,19$  %) de ovos depositados no recipiente contendo o tratamento de “ovos com zero dia” foi maior que no seu controle ( $42,7 \pm 9,19$  %) (Qui Quadrado,  $p > 0,05$ ). As médias percentuais de ovos depositados em recipientes contendo ovos co-específicos de dois, sete, 15 e 30 dias de idade ( $77,9 \pm 6,50$ ;  $70,0 \pm 7,33$ ;  $73,9 \pm 6,42$ ;  $69,8 \pm 8,91$  %, respectivamente) foram significativamente maiores do que nos controles ( $22,0 \pm 6,50$ ;  $30,0 \pm 7,33$ ;  $26,2 \pm 6,42$ ;  $30,2 \pm 8,91$  %, respectivamente) (Fig. 16).



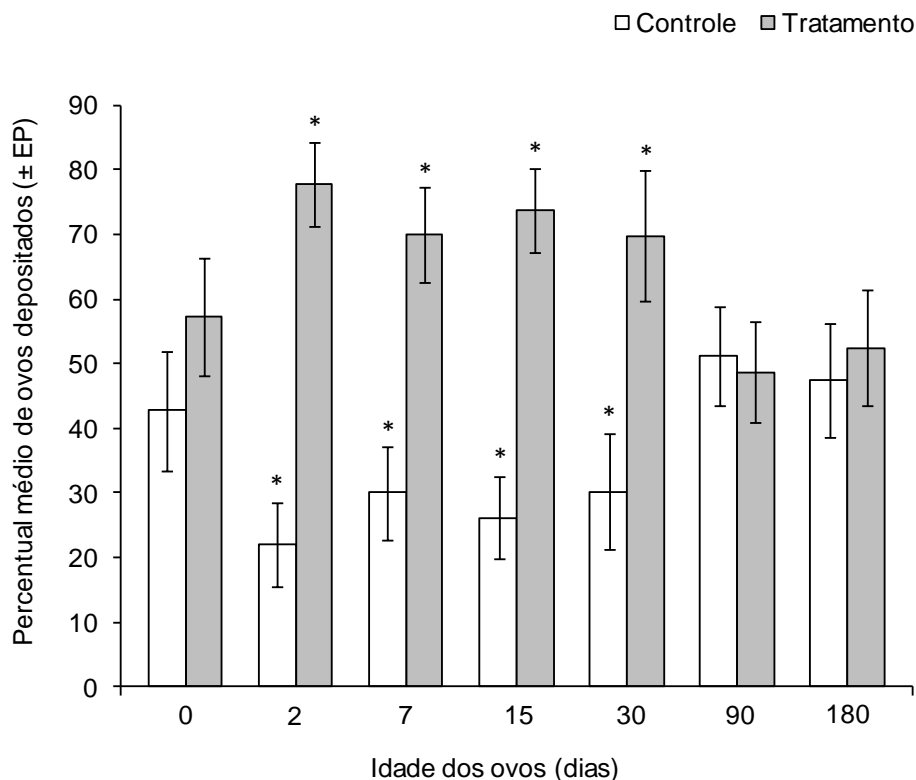


Figura 16. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmeas de *Aedes aegypti* em recipientes de oviposição contendo 150 ovos co-específicos de diferentes idades e respectivo controle (sem ovos), em condições de laboratório ( $25,4 \pm 0,21$  °C,  $62,7 \pm 1,28$  % URA, fotofase: 12 horas) (Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ . \* Indicam diferença estatística entre controle e respectivo tratamento).

Notou-se que a maioria dos 150 ovos utilizados como tratamento nos recipientes contendo ovos com 180 dias estavam inférteis, uma vez que apenas 1,6 % destes eclodiram. Os ovos utilizados como tratamento nos recipientes com 2, 7, 15, 30 e 90 dias, apresentaram uma porcentagem de eclosão similar, em que, respectivamente, 39,3; 22,3; 27,0; 39,5 e 38,5 % dos 150 ovos eclodiram.

Para estimar o número médio de ovos presentes nos ovários de fêmeas de *A. aegypti* quatro dias após o repasto sanguíneo foram dissecadas 20 fêmeas. A média de ovos encontrada foi de  $82,7 \pm 6,82$  ovos/fêmea. Diante desta estimativa, foram utilizados ovos provenientes dos ovários de 12 fêmeas dissecadas para a produção dos extratos metanólicos de “1.000 ovos com zero dia” para as análises cromatográficas, e ovos oriundos da dissecação de duas fêmeas para a avaliação comportamental dos insetos.

Os valores do Índice de Atividade de Oviposição foram positivos e indicaram a ação estimulante da presença de ovos com idades entre zero e 30 dias num recipiente de

oviposição. Por outro lado o valor do Índice calculado a partir de recipientes contendo ovos de 90 dias foi próximo de zero (-0,03) e o IAO foi negativo para ovos com 180 dias (Fig. 17).

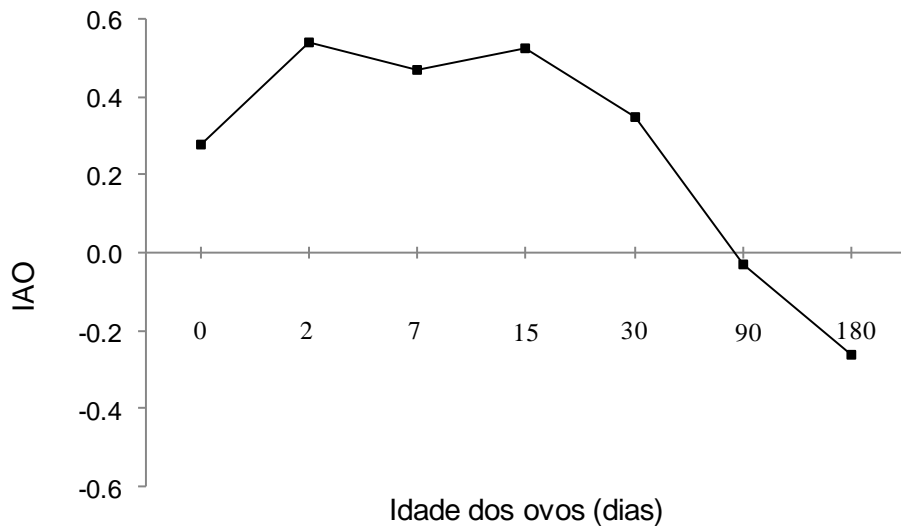


Figura 17. Índices de Atividade de Oviposição (IAO) obtidos na avaliação de ovos com diferentes idades como estimulantes de oviposição no comportamento de fêmeas individualizadas de *A. aegypti* em laboratório.

Foi depositado o total de 13.491 ovos, sendo que 9.801 (72,7 %) foram deixados diretamente na água, enquanto que 3.690 (27,3 %) foram colocados no papel de oviposição. Observou-se que em todos os recipientes de oviposição o percentual médio de ovos depositados na água foi maior do que no papel de oviposição (Tab. 6). Os recipientes contendo ovos de 7, 15, 30 e 90 dias apresentaram significativamente maior percentual médio de ovos na água do que no papel de oviposição (Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Percentual médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por *Aedes aegypti* na água ou no papel dos recipientes de oviposição contendo ovos co-específicos de diferentes idades e respectivo controle em laboratório ( $27,4 \pm 0,32$  °C,  $60,9 \pm 1,96$  % URA, fotofase: 12 horas).

| Recipiente de Oviposição | N  | Local de deposição dos ovos | Percentual médio de ovos ( $\pm$ EP) | Valor de p (Qui Quadrado) |
|--------------------------|----|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Controle                 | 24 | Água                        | $26,9 \pm 7,50$                      | 0,251                     |
|                          |    | Papel                       | $15,8 \pm 5,92$                      |                           |
| Ovos de 0 dia            |    | Água                        | $40,1 \pm 8,16^*$                    | 0,023                     |
|                          |    | Papel                       | $17,1 \pm 5,00^*$                    |                           |
| Controle                 | 22 | Água                        | $17,4 \pm 5,94$                      | 0,053                     |
|                          |    | Papel                       | $4,7 \pm 1,79$                       |                           |
| Ovos de 2 dias           |    | Água                        | $49,9 \pm 6,76$                      | 0,068                     |
|                          |    | Papel                       | $28,0 \pm 6,11$                      |                           |
| Controle                 | 24 | Água                        | $21,5 \pm 6,30$                      | 0,093                     |
|                          |    | Papel                       | $8,5 \pm 2,87$                       |                           |
| Ovos de 7 dias           |    | Água                        | $56,4 \pm 6,79^*$                    | < 0,0001                  |
|                          |    | Papel                       | $13,6 \pm 2,53^*$                    |                           |
| Controle                 | 25 | Água                        | $18,4 \pm 5,32$                      | 0,158                     |
|                          |    | Papel                       | $7,8 \pm 3,56$                       |                           |
| Ovos de 15 dias          |    | Água                        | $58,9 \pm 6,53^*$                    | < 0,0001                  |
|                          |    | Papel                       | $14,9 \pm 3,60^*$                    |                           |
| Controle                 | 20 | Água                        | $20,8 \pm 7,97$                      | 0,153                     |
|                          |    | Papel                       | $9,4 \pm 4,47$                       |                           |
| Ovos de 30 dias          |    | Água                        | $60,1 \pm 8,71^*$                    | < 0,0001                  |
|                          |    | Papel                       | $9,7 \pm 2,80^*$                     |                           |
| Controle                 | 21 | Água                        | $32,6 \pm 7,18$                      | 0,170                     |
|                          |    | Papel                       | $18,6 \pm 5,26$                      |                           |
| Ovos de 90 dias          |    | Água                        | $37,8 \pm 6,66^*$                    | 0,003                     |
|                          |    | Papel                       | $10,9 \pm 3,81^*$                    |                           |
| Controle                 | 25 | Água                        | $36,5 \pm 7,58^*$                    | 0,005                     |
|                          |    | Papel                       | $11,0 \pm 3,50^*$                    |                           |
| Ovos de 180 dias         |    | Água                        | $31,1 \pm 6,80$                      | 0,381                     |
|                          |    | Papel                       | $21,4 \pm 5,69$                      |                           |

\* Indica diferença significativa - Teste Qui Quadrado,  $p < 0,05$ .

## II.5.2 Experimento II: Avaliação cromatográfica dos extratos de ovos com diferentes idades após a oviposição

Foram constatados em todos os cromatogramas dos extratos metanólicos de ovos nas diferentes idades (0, 2, 7, 15, 30, 90 e 180 dias) vários picos relacionados aos compostos químicos extraídos em solvente. Foram encontrados picos correspondentes ao ácido dodecanóico (A) e ao ácido tetradecanóico (B), não sendo verificado o hidrocarboneto *n*-heneicosano (C) (Fig.18 a 25). A presença desses compostos, em todos os extratos, foi confirmada através da co-injeção dos extratos com seus respectivos padrões sintéticos, como exemplificado na Figura 19, referente ao extrato de ovos com “zero dia” de idade. Os outros compostos químicos presentes nos extratos ainda não foram identificados.

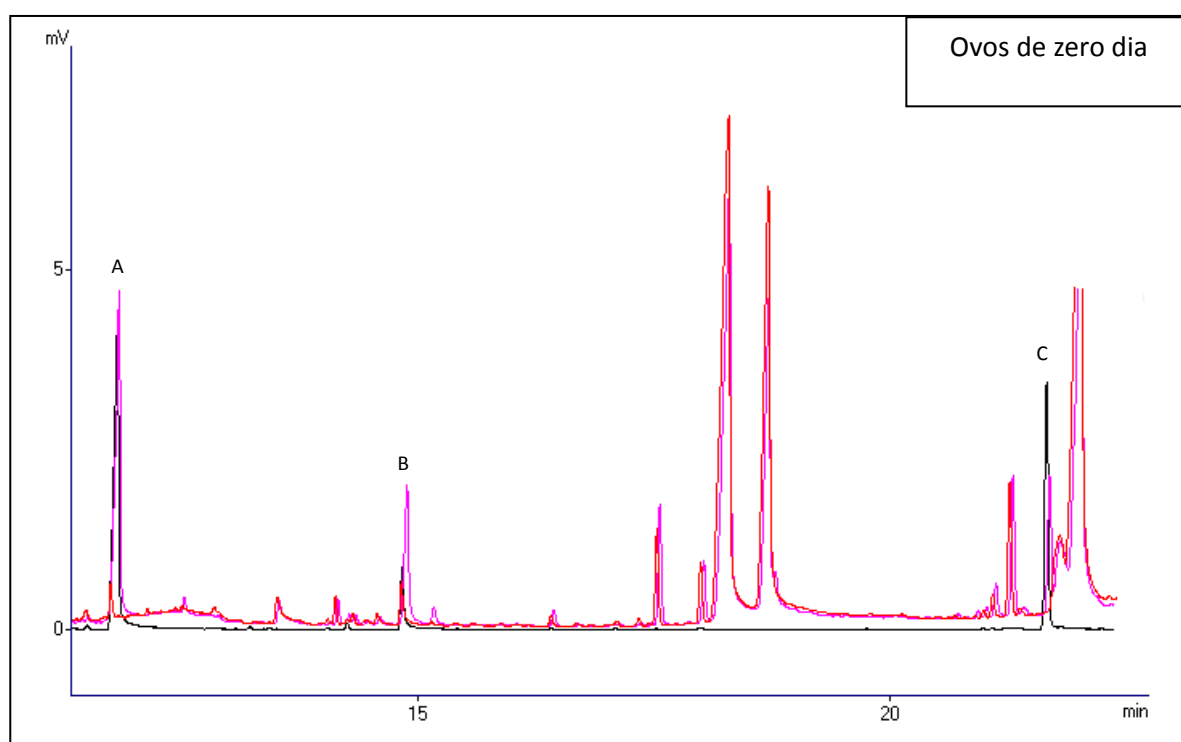


Figura 18. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com “zero dia” de idade (linha vermelha); mistura de padrões sintéticos (A - ácido dodecanóico, B - ácido tetradecanóico e C - *n*-heneicosano (linha preta); e co-injeção do extrato metanólico de 1.000 ovos acrescido da mistura com os três padrões sintéticos (linha rosa).

As figuras 19 a 25 representam os cromatogramas típicos de cada extrato, em que a linha preta corresponde a cada um dos extratos e a cor-de-rosa corresponde à mistura dos padrões sintéticos injetados (ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico e *n*-heneicosano).

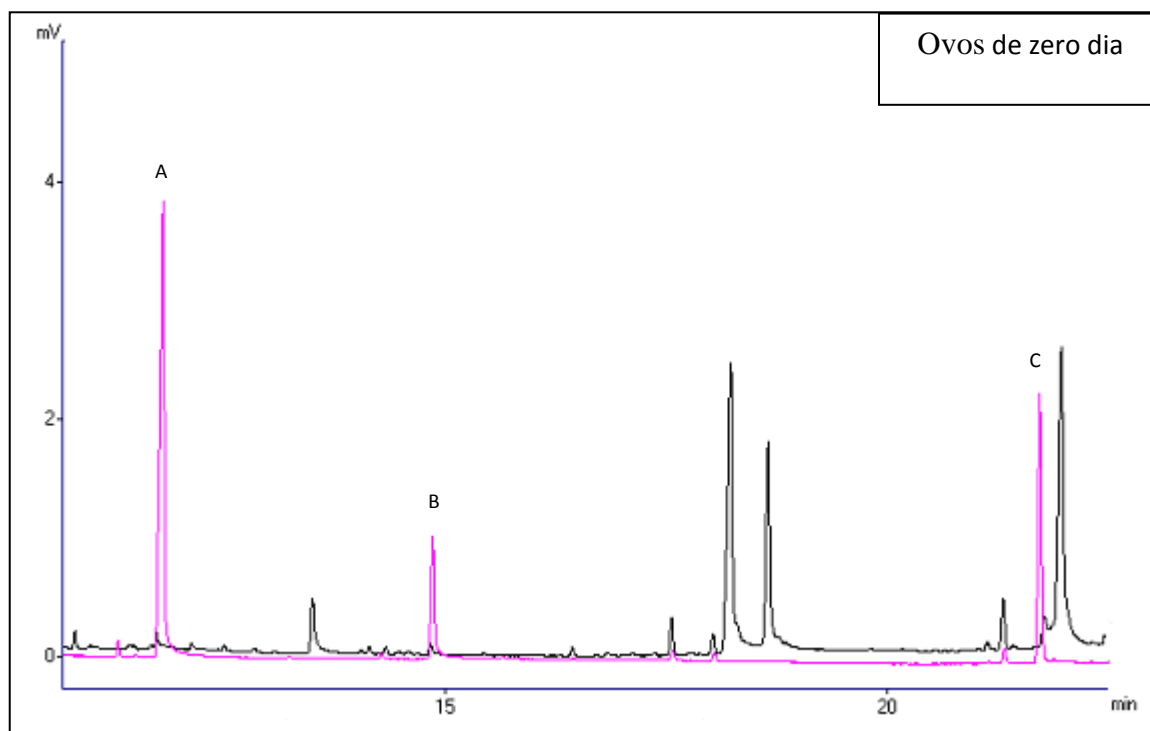


Figura 19. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com “zero dia” de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos a 0,1mg/mL (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano.

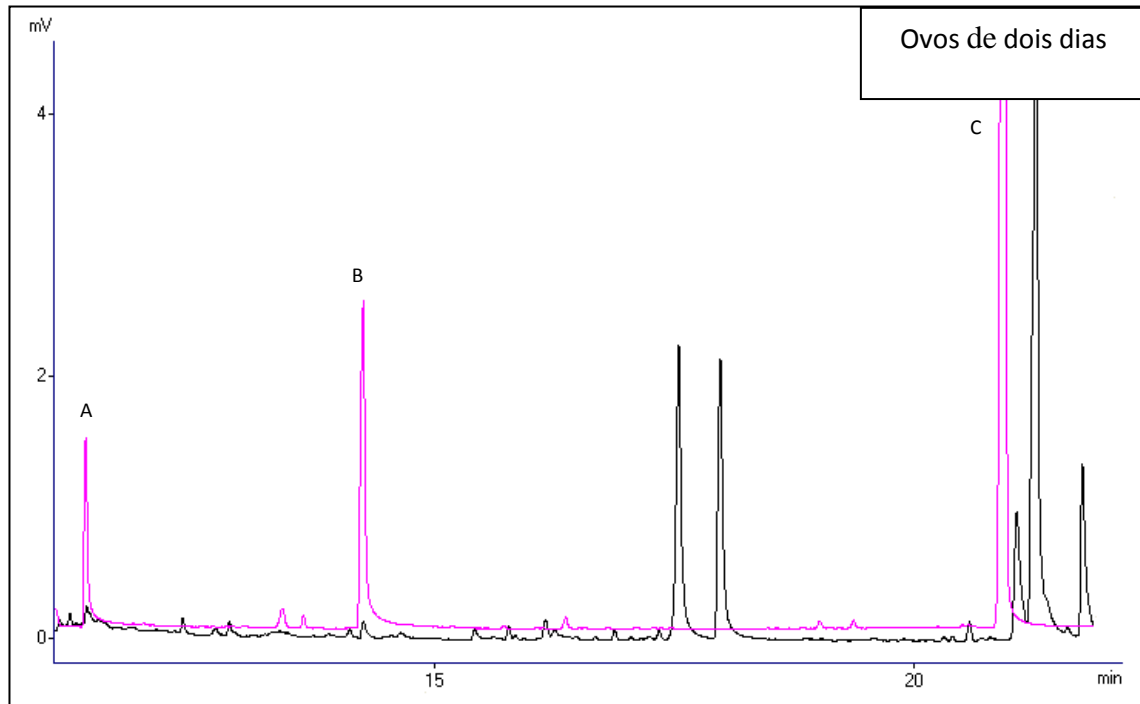


Figura 20. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com *dois dias* de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos a 0,1mg/mL (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano.

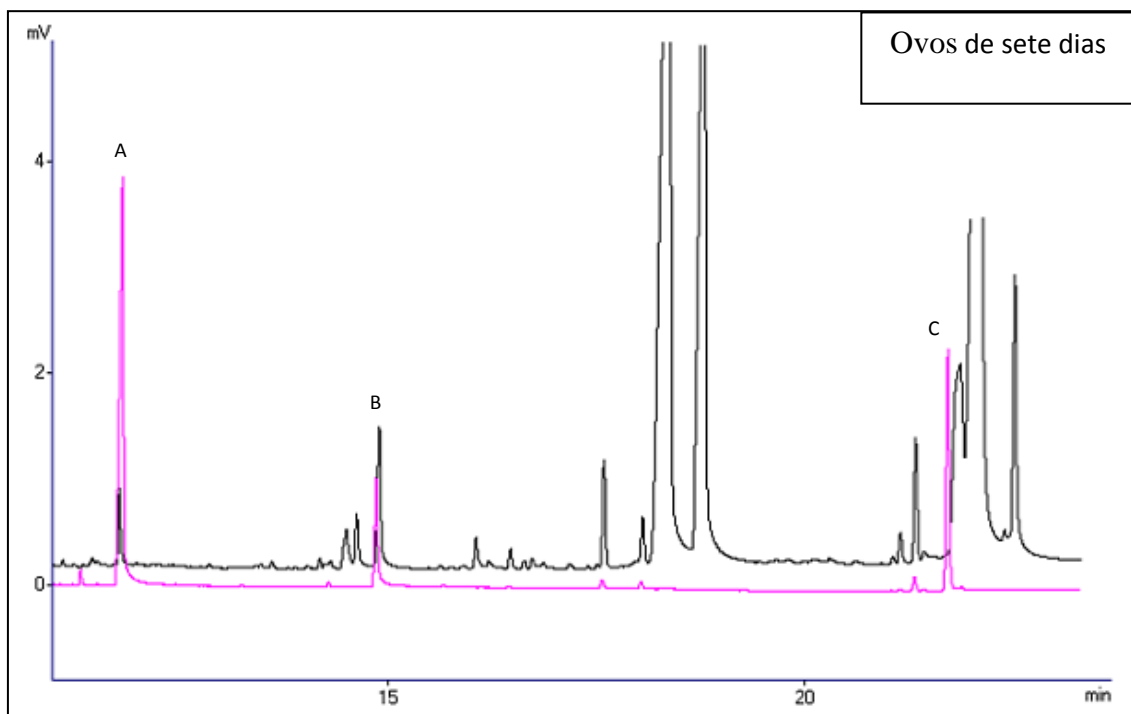


Figura 21. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com *sete dias* de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano.

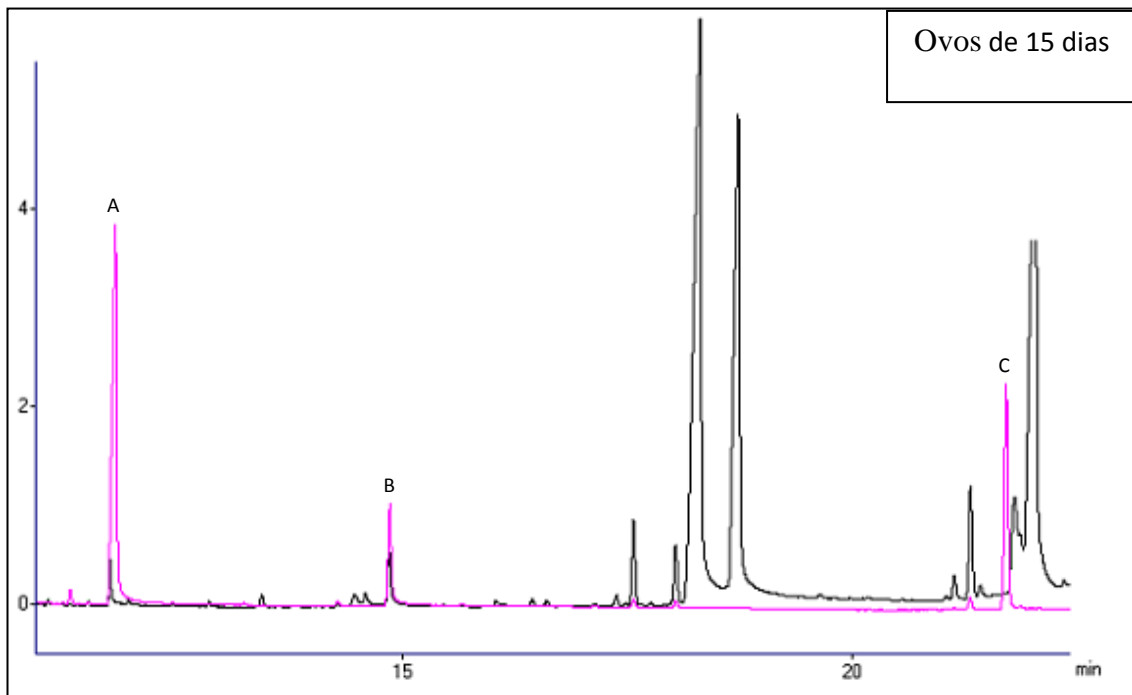


Figura 22. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com 15 dias de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano.

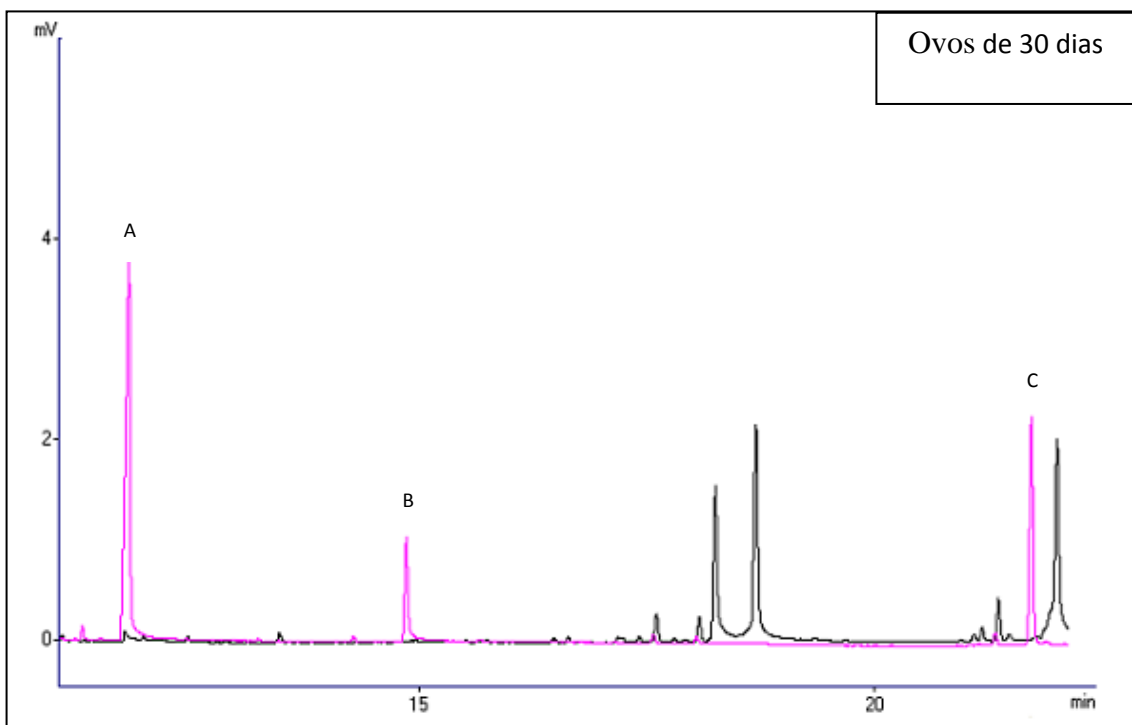


Figura 23. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com 30 dias de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano.

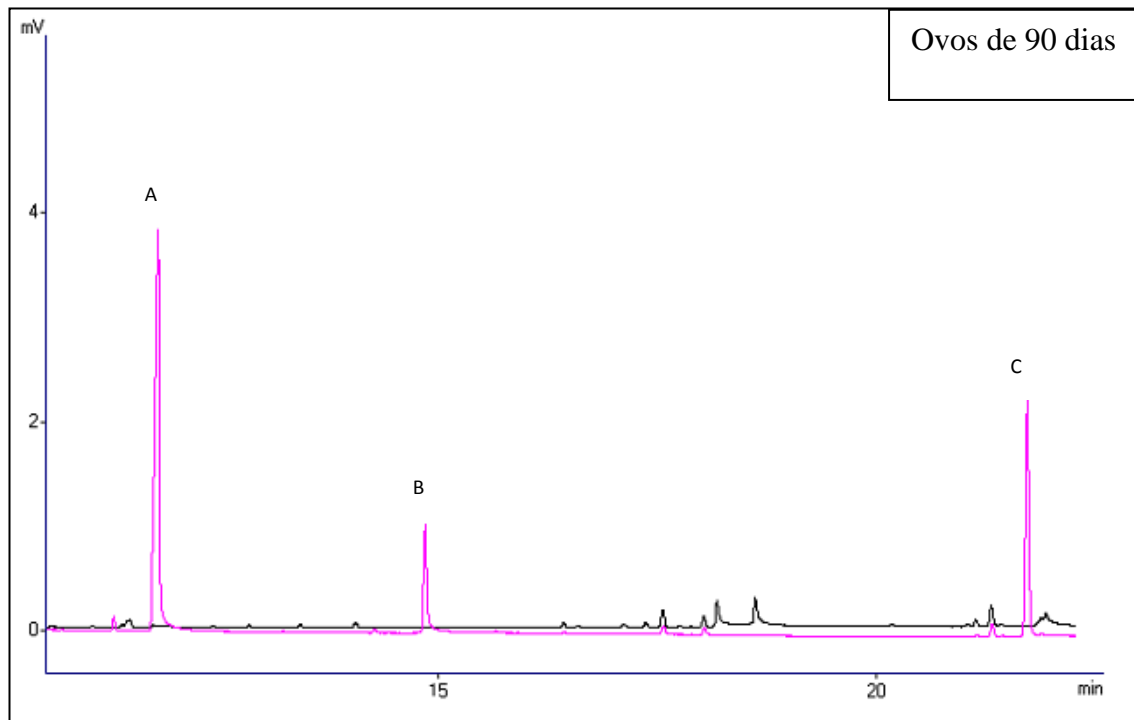


Figura 24. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com 90 dias de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano.

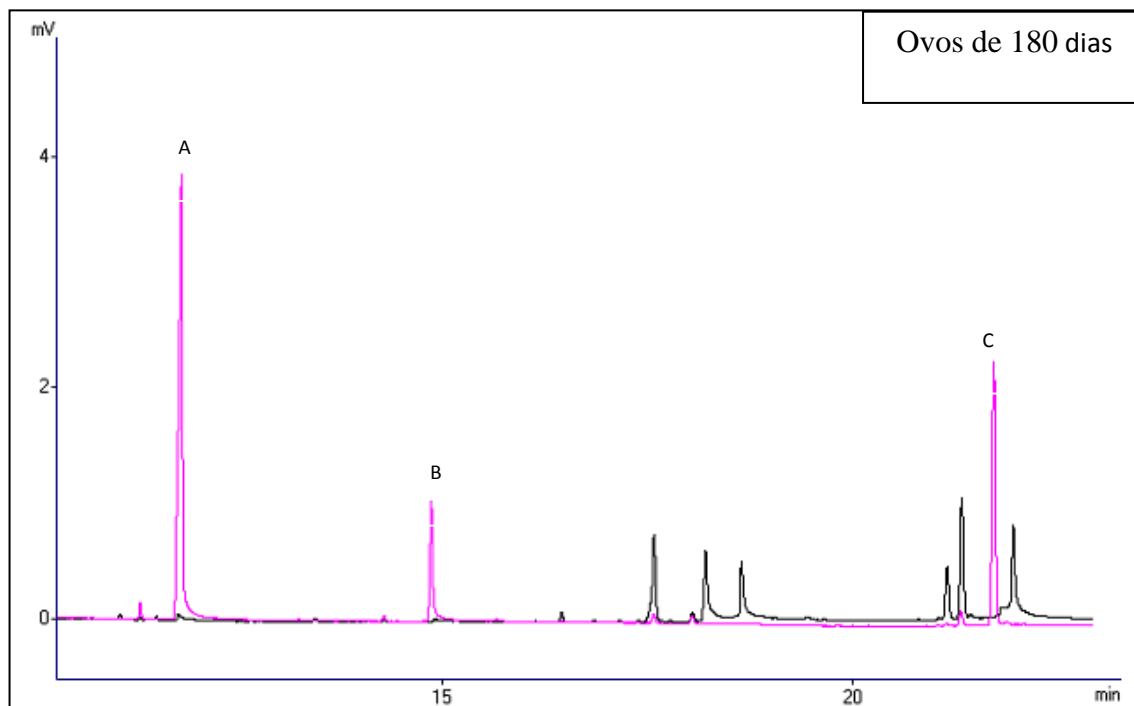


Figura 25. Cromatogramas sobrepostos do extrato metanólico de 1.000 ovos de *Aedes aegypti* com 180 dias de idade (linha preta) e da mistura dos três padrões sintéticos (linha rosa): (A) ácido dodecanóico, (B) ácido tetradecanóico e (C) *n*-heneicosano.



Nos cromatogramas analisados averiguou-se que a proporção relativa dos compostos ácido dodecanóico e ácido tetradecanóico foi semelhante para os extratos de zero, dois, sete, 15, 30 dias. Como estes compostos estavam presentes apenas em quantidades muito pequenas nos extratos de ovos com 90 e 180 dias não foi possível quantificá-los. Observou-se que a proporção relativa do ácido tetradecanóico nos extratos metanólicos de ovos de 0 a 30 dias de idade foi maior do que a do ácido dodecanóico (Tab. 7). Constatou-se que as quantidades absolutas de ambos os compostos aumentaram até os ovos atingirem 15 dias de idade, depois decresceram (30 dias) até serem registradas em quantidades muito pequenas (“traços”) nos extratos de ovos de 90 e 180 dias de idade (dados não registrados na tabela 7).

Tabela 7. Proporções relativas das quantidades (mV) de ácido dodecanóico e tetradecanóico presentes nos extratos metanólicos de ovos de diferentes idades (0, 2, 7, 15, 30, 90, e 180 dias) (N=5).

| Idade dos ovos<br>(dias) | Proporção relativa (mV) |                      |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|
|                          | Ácido dodecanóico       | Ácido tetradecanóico |
| 0                        | 37,6                    | 62,4                 |
| 2                        | 37,4                    | 62,6                 |
| 7                        | 36,4                    | 63,6                 |
| 15                       | 38,7                    | 61,7                 |
| 30                       | 33,2                    | 66,8                 |
| 90                       | Traços                  | Traços               |
| 180                      | Traços                  | Traços               |

## II. 6 DISCUSSÃO

Infoquímicos que atuam como atraentes ou estimulantes de oviposição algumas vezes são abordados como sinônimos. De fato, os atraentes de oviposição induzem os insetos a se locomoverem grandes distâncias em direção à fonte de odor. Por outro lado, os estimulantes desencadeiam o comportamento de oviposição após as fêmeas já terem localizado o criadouro, sendo a ação normalmente induzida por contato, por exemplo, com o estímulo. Os resultados apresentados neste estudo elucidam principalmente a função estimulante da presença de ovos co-específicos nas oviposições subseqüentes de *A. aegypti*, uma vez que os testes foram realizados em ambientes sem movimentação de ar, com insetos confinados num

pequeno espaço, onde realizaram deslocamentos curtos até os recipientes, com os quais poderiam entrar em contato direto (Dethier et al. 1960, Osgood & Kempster 1971, Isoe & Millar 1995, Isoe et al. 1995).

No atual estudo foi demonstrado que a presença de 150 ovos, com 2 a 30 dias de idade, estimulou significativamente a deposição de ovos por fêmeas co-específicas. Esses resultados corroboram Allan e Kline (1998), que relataram um maior número de ovos depositado por grávidas de *A. aegypti* em recipientes que continham quantidade similar de ovos co-específicos ou ovos de *A. albopictus*. Os pesquisadores utilizaram papéis de oviposição recolhidos das gaiolas de manutenção imediatamente antes do início dos testes, contendo ovos com idade aproximada de 1 dia. Williams e colaboradores (2008) também constataram que ovos co-específicos (3 a 10 dias de idade) estimularam a oviposição de *A. aegypti* em laboratório, apesar de o número de ovos considerado estimulante ter sido inferior ao do presente estudo. Estes autores demonstraram que um número intermediário de ovos (11 a 38) foi mais estimulante à oviposição do que recipientes contendo concentrações maiores (39 a 74) ou nenhum ovo pré-existente. Verificaram ainda que, quando disponibilizado apenas um recipiente contendo ovos (0 a 110) não foi observada inibição a oviposições subseqüentes.

Existem estudos, entretanto, que contestam o observado nesta pesquisa. Chadee e colaboradores (1990), por exemplo, analisaram o comportamento de fêmeas de *A. aegypti* individualmente em laboratório e verificaram que elas evitam depositar seus ovos em recipientes onde já existem ovos co-específicos. Em situações onde recipientes sem ovos não foram disponibilizados, as fêmeas optaram pela oviposição em recipientes contendo ovos de outras fêmeas em detrimento dos que continham seus próprios ovos. Os autores não citam, no entanto, a quantidade de ovos apresentada nos recipientes de oviposição, apesar de afirmarem que era baixa. Apostol e colaboradores (1994) endossaram o observado por Chadee e colaboradores (1990) ao analisarem a variabilidade genética de adultos provenientes de ovos coletados em ovitrampas, pela técnica de RAPD-PCR. Inferiram que fêmeas evitam depositar ovos em recipientes onde eles já estão presentes e exploram vários sítios depositando uma média de 11 ovos por criadouro. Verificaram que a variabilidade genética diminui à medida que o número de ovos na armadilha aumenta e então formularam duas hipóteses. Provavelmente a presença de ovos na armadilha podia desempenhar um efeito inibitório nas oviposições subseqüentes ou uma fêmea, ao visitar um criadouro sem ovos, depositaria apenas alguns ovos no local que, posteriormente, induziriam outras fêmeas a colocarem um grande número de ovos ali.

No presente trabalho notou-se que, fêmeas avaliadas individualmente em laboratório, exibem tanto o comportamento de oviposição aos saltos, quanto a deposição de ovos num único criadouro. Isto porque 42,2 % das fêmeas depositaram seus ovos em apenas um recipiente (controle ou tratamento), enquanto que 57,8% utilizaram os dois recipientes disponíveis. Já foi verificado em laboratório (Fay & Perry 1965, Chadee et al. 1990, Reiter 2007, Abreu 2010) e em campo (Apostol et al.1994) que fêmeas de *A. aegypti* exibem o comportamento de “skip oviposition”, ou oviposição aos saltos, ao depositarem seus ovos em vários criadouros, ao invés de realizarem a oviposição em apenas um local. Alguns pesquisadores (Chadee et al.1990, Apostol et al. 1994) defendem que a presença de ovos num criadouro seria um estímulo relevante para desencadear o “skip oviposition”.

A oviposição aos saltos, entretanto, não é a única maneira de fêmeas de *A. aegypti* dispersarem seus ovos. Elas podem depositar todos os ovos num único criadouro quando condições adequadas são encontradas, evitando o desgaste energético das fêmeas, assim como as possibilidades de predação ou morte por outras causas no processo de busca e seleção por criadouros diferentes (Harrington & Edman 2001). O mesmo é observado em situações onde apenas um recipiente de oviposição é disponibilizado para fêmeas de *A. aegypti* (Williams et al. 2008).

A retenção de ovos nos ovários é um fenômeno importante no processo de “skip oviposition”, pois permite que os insetos interrompam a oviposição num certo local e se desloquem em busca de outros criadouros (Harrington & Edman 2001, Williams et al. 2008). No presente estudo, observou-se que, das 17 fêmeas analisadas que retiveram seus ovos, 12 depositaram ovos em único recipiente. Baseando nos relatos de Harrington & Edman (2001) e Williams et al. (2008), sugere-se que por algum motivo, as fêmeas que depositaram todos os seus ovos num único criadouro, cessaram a oviposição naquele local e, possivelmente, iriam depositar o restante dos ovos no outro recipiente disponível. Como a duração dos testes foi de apenas 22 horas, talvez não tenha existido tempo suficiente para as fêmeas depositarem o restante dos ovos. Estas observações sugerem que ocorreria o “skip oviposition” também nestas fêmeas.

Abreu (2010) analisou o comportamento de oviposição aos saltos de *A. aegypti* individualizadas em laboratório e semi-campo. Observou que, mesmo quando os criadouros disponíveis foram idênticos e variaram em quantidades (2, 4, 8 e 16 criadouros), houve uma tendência das fêmeas depositarem a maioria dos ovos em apenas um criadouro e esta tendência foi acentuada quando foram oferecidos apenas dois criadouros, como no presente trabalho. No presente estudo, possivelmente, a presença de 150 ovos com idade entre 2 e 30

dias atuou como um estímulo que influenciou na escolha deste criadouro em laboratório, uma vez que os dois recipientes de oviposição foram idênticos, exceto pela presença de ovos no recipiente tratamento.

A presença de ovos co-específicos também interfere na oviposição de outras espécies de dípteros, e os resultados demonstram que os efeitos estimulantes e/ou atraentes decorrem de uma mistura de compostos. A pré existência de ovos em recipientes estimula a agregação de oviposição no borrachudo *Simulium damnosum*, devido a uma mistura de substâncias provenientes, tanto da extração de ovos após a oviposição quanto de ovários contendo ovos maduros (McCall et al. 1997). Alves e colaboradores (2003) verificaram que extratos hexânicos de 1.000 ovos do flebotomíneo *Lutzomyia (Lutzomyia) renei* foram atraentes para a oviposição de co-específicas. A análise dos extratos em CG-MS (cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas) indicou a presença de inúmeros ácidos graxos provenientes da superfície dos ovos, e os autores acreditam que a resposta comportamental observada seja decorrente da mistura de alguns destes. Outro flebotomíneo, o *L. (L.) longipalpis*, produz feromônio de oviposição nas glândulas acessórias que é secretado nos ovos durante a oviposição. A substância foi identificada como ácido dodecanóico. Apresentou resposta dose-dependente e forte interação aditiva com apneumônios já conhecidos como atraentes de oviposição para a espécie: hexanal e 2-metil-2-butanol (Dougherty & Hamilton 1997).

Enquanto o comportamento de *A. aegypti* é claramente influenciado por ovos pré-existentes num criadouro (Chadee et al. 1990, Apostol et al. 1994, Allan & Kline 1998, Williams et al. 2008), o comportamento de oviposição de *A. albopictus*, parece ser mais influenciado pela presença de compostos provenientes de larvas e pupas do que de ovos co-específicos (Marques & Miranda 1992). A presença de imaturos de *A. albopictus* estimula a oviposição de fêmeas co-específicas, sendo que a proporção de ovos depositados aumenta de acordo com o avanço do estágio evolutivo dos imaturos (Barbosa & Silva 2002).

O presente estudo indica que a idade dos ovos influenciou na escolha de recipientes de oviposição por fêmeas de *A. aegypti*. O efeito de estímulo de oviposição desencadeado por ovos foi observado em decorrência da presença de ovos de 2 a 30 dias de idade. Ovos mais velhos não estimularam a escolha por recipientes de oviposição em condições de laboratório.

Observou-se, em laboratório, que ovos com 90 dias parecem não interferir no comportamento de oviposição de *A. aegypti* uma vez que os percentuais de ovos depositados no controle foram similares aos do tratamento e o valor do IAO foi quase 0. Entretanto, apesar de recipientes contendo ovos de 180 dias terem recebido um percentual de ovos similar ao seu

controle, o valor de IAO, dado pelo número de ovos depositado nos recipientes e não pelo seu percentual, foi negativo, indicando inibição deste tratamento.

De acordo com Chadee (2009) os marcadores bioquímicos (ácidos graxos e ésteres) presentes em ovos de *A. aegypti* são modificados à medida que os ovos envelhecem. A partir das análises dos cromatogramas dos extratos de ovos com as sete diferentes idades testadas (0, 2, 7, 15, 30, 90 e 180 dias) realizados no presente estudo, constatou-se que as proporções relativas dos dois compostos identificados (ácido dodecanóico e ácido tetradecanóico) foram similares nos ovos entre zero e 30 dias, sendo que nos ovos de 90 e 180 dias estes compostos estavam presentes em quantidades ínfimas, ou seja, em “traços”. O *n*-heneicosano não foi encontrado em extratos metanólicos de ovos de *A. aegypti*. A ausência do hidrocarboneto provavelmente está relacionada à polaridade do solvente (metanol) usado na extração, uma vez que em extratos de ovos de *A. aegypti* realizados com hexano (solvente apolar) a presença desse composto foi constatada (Batista-Pereira, L. *comunicação pessoal*).

Os resultados dos testes comportamentais encontrados nesta pesquisa podem estar relacionados com a presença dos ácidos dodecanóico e tetradecanóico mensurados nos extratos de ovos de zero a 30 dias de idade. Notou-se que os recipientes contendo ovos que foram estimulantes de oviposição para fêmeas de *A. aegypti* coincidiram com os extratos metanólicos de ovos que apresentaram quantidades mensuráveis dos ácidos dodecanóico e tetradecanóico. Uma vez que ambos os ácidos já foram identificados como estimulantes de oviposição (Ganesan et al. 2006), sugere-se a influência deles no comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* neste estudo. No entanto, considera-se ainda que outros compostos não identificados (Fig. 19 a 26), ou até mesmo não extraídos pelo metanol, também possam ter influenciado no comportamento das fêmeas, assim como a combinação destas substâncias, uma vez que os testes comportamentais foram realizados com ovos inteiros.

Ganesan e colaboradores (2006) identificaram 13 das 25 substâncias extraídas a partir de extratos metanólicos de ovos de *A. aegypti*, com idade não especificada. Posteriormente, realizaram bioensaios com cada um dos compostos sintéticos em diferentes concentrações, sugerindo tanto a presença de estimulantes quanto de repelentes do oviposição para co-específicos. Observaram que o ácido dodecanóico atua como estimulantes de oviposição nas três concentrações avaliadas (1, 10 e 100 mg/L) e que a estimulação aumenta com o aumento da concentração. O ácido tetradecanóico, por outro lado, foi estimulante de oviposição apenas nas duas menores concentrações avaliadas (1, 10 mg/L). A maioria dos ésteres apresentou efeito de repelência à oviposição de *A. aegypti*, sendo a ação dose dependente verificada para

todos os compostos. Portanto, de acordo com os resultados do presente estudo, pode-se inferir que os ácidos dodecanóico e tetradecanóico possam também estimular o comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* da população brasileira, confirmando Ganesan et. al (2006). A confirmação de produção dos compostos pelas populações brasileiras, assim como as indianas, é relevante porque a composição feromonal pode ser alterada em decorrência do isolamento geográfico (Batista-Pereira et al. 2006). Para certificar tal inferência sugere-se a realização de bioensaios com os compostos individualizados. É importante ressaltar que existem compostos nos extratos da presente pesquisa que não foram identificados e que podem ter interferido no comportamento de oviposição da espécie em laboratório. Além disso, podem existir ainda compostos que não foram extraídos com eficiência pelo metanol, portanto não existem picos correspondentes a eles nos cromatogramas, mas que podem ter interferido no comportamento do vetor, devido à maneira como os estímulos foram apresentados (ovos inteiros). Um exemplo seria o *n*-heneicosano, constatado em extratos hexânicos de ovos, porém ausente em extratos metanólicos (Batista-Pereira, L. *comunicação pessoal*).

A influência do ácido tetradecanóico no comportamento de oviposição de fêmeas de *A. aegypti* também foi verificada por Ponnusamy e colaboradores (2008). Os pesquisadores identificaram o composto como estimulante de oviposição a partir de extratos metanólicos de bactérias de infusões de folhas de bambu (*Arundinaria giganteae*) e de carvalho branco (*Quercus alba*). Verificaram que o ácido tetradecanóico é um cairômonio, infoquímico com ação inter-específica, estimulante para oviposição em *A. aegypti* quando apresentado isoladamente (10 ng composto/30mL água destilada) ou em combinação com outras duas substâncias (ácido nonanóico e éster metilado de ácido tetradecanóico). No entanto, o ácido tetradecanóico é inibidor de oviposição quando apresentado em elevada concentração (100ng composto/30mL água destilada). O ácido dodecanóico, atraente de oviposição para *L. longipalpis* (Dougherty & Hamilton 1997), foi avaliado por Hwang e colaboradores (1982) como estimulante de oviposição para *A. aegypti*. Os pesquisadores verificaram que o composto não interferiu no comportamento de oviposição de *A. aegypti*, enquanto outros ácidos carboxílicos de cadeias carbônicas menores (C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>) foram inibidores de oviposição. O *n*-heneicosano, apesar de não ter sido identificado nos extratos metanólicos de ovos é estimulante (Mendki et al. 2000) e atraente (Seenivasagan et al. 2009) de oviposição para fêmeas de *A. aegypti*.

Como nos bioensaios foram utilizados ovos ao invés de extratos ou compostos sintéticos, pode-se associar o estímulo visual (presença de ovos) ao estímulo químico nos

resultados obtidos. A visualização de larvas co-específicas sem a presença do estímulo químico não influencia na escolha por sítios de oviposição por fêmeas de *A. aegypti*. Por outro lado, compostos químicos provenientes de larvas sem a influência do estímulo visual incitam a deposição de ovos (Soman & Reuben 1970). Bruno e Laurence (1979) avaliaram a influência de protótipos que imitavam jangadas e demonstraram que o estímulo visual não influenciou na escolha por sítios de oviposição em *Culex pipens*, sendo o estímulo químico proveniente de compostos da gotícula apical importante neste comportamento. Além disso, os resultados do presente estudo demonstraram que, aparentemente o estímulo visual é menos importante no comportamento de oviposição do que o químico, uma vez que ovos mais velhos não estimularam ou até mesmo inibiram a oviposição de co-específicos. Diante destas evidências, acredita-se que o estímulo visual tenha sido pouco importante ou até mesmo irrelevante nos resultados destes bioensaios.

É importante ressaltar que os ovos apresentados no tratamento de 180 dias não estavam viáveis (larvas de 1,61% deles eclodiram). Provavelmente a inibição à deposição por co-específicos, demonstrada pelo IAO, ocorreu devido à composição química dos ovos mais velhos que inibiu à deposição dos ovos e/ou a percepção de inviabilidade dos ovos que pode ter sinalizado o criadouro como um ambiente desfavorável ao desenvolvimento da espécie.

Os resultados correspondentes às 35 fêmeas de *A. aegypti* que não depositaram ovos em nenhum dos substratos de oviposição foram retirados das análises. A maioria das fêmeas (26 indivíduos) não apresentou ovos nos ovários após a dissecação, portanto, inferiu-se que estas fêmeas não colocaram ovos porque não tinham como fazê-lo. Apenas nove fêmeas que não realizaram a oviposição apresentaram ovos nos ovários. Como estes ovos poderiam estar em fase de desenvolvimento, convencionou retirar estes resultados das análises. Os insetos que não realizaram a oviposição podem não ter copulado, não ter realizado o repasto sanguíneo adequadamente ou, por variações intrínsecas do indivíduo, podem ter demorado mais do que três dias para completarem a maturação dos ovos (no caso das fêmeas com ovos nos ovários). Diante destas considerações sobre a biologia do vetor, foi mais coerente, que os dados fossem omitidos das análises.

No presente trabalho verificou-se que a maioria dos ovos foi depositada diretamente na água e apenas 1/3 destes foram colocados nas paredes dos criadouros (papel de oviposição). Estas observações não corroboram com outros trabalhos, uma vez que sempre é relatada a preferência da parede do criadouro para oviposição (Gadelha & Toda 1985, Nelson 1986, Clements 1999). Gomes e colaboradores (2003) verificaram em laboratório que fêmeas de *A. aegypti* depositaram ovos tanto nas bordas dos recipientes de oviposição quanto

diretamente na superfície da água, sendo o maior número de ovos depositados diretamente no papel de postura. Em experimentos similares, avaliando a influência de ovos pré-existentes na deposição de co-específicos registrou-se que a maioria dos ovos foi depositada diretamente na parede do criadouro (Allan & Kline 1998, Williams et al. 2008). Ponnusamy e colaboradores (2008), por outro lado, verificaram que todos os ovos foram depositados na água, em bioensaio similar, com recipientes de oviposição que consistiam apenas de copos plásticos.

Ovos depositados diretamente na água apresentam rápida capacidade de eclosão (30 horas no máximo). No meio ambiente, esta característica pode assegurar rápida colonização dos criadouros disponíveis. Além disso, os ovos depositados diretamente na água possivelmente apresentam um efeito de predação menor no ambiente em relação àqueles que aguardam as épocas de chuva e menor comprometimento da viabilidade. Dados como estes se tornam relevantes nos programas de monitoramento e controle de *A. aegypti* quanto à remoção de criadouros remanescentes presentes no ambiente (Gomes et al. 2003, Madeira et al. 2002).

Diante do exposto, infere-se que, em um criadouro, ovos co-específicos em pequenas densidades e em idades de 2 a 30 dias fornecem um estímulo para fêmeas grávidas de *A. aegypti* depositarem seus ovos, uma vez que eles sinalizam indiretamente um local adequado para reprodução, representando ausência de predadores no ambiente (Williams et al. 2008).

## II.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ovos pré-existentes de *A. aegypti* num criadouro interferem no comportamento de oviposição de co-específicos em condições de laboratório.

A oviposição é estimulada diante da presença de ovos com idades entre 2 a 30 dias. Ovos com 90 dias após oviposição não estimulam as grávidas de *A. aegypti* a depositarem seus ovos no criadouro.

À medida que os ovos envelhecem, o perfil químico dos ácidos dodecanóico e tetradecanóico proveniente de ovos é alterado, minimizando a influência na deposição de ovos no criadouro.

Existem outros compostos ainda não identificados que podem interferir no comportamento de oviposição, ou até mesmo a mistura deles.

Compostos químicos provenientes de ovos apresentam um potencial para serem utilizados como estimulantes/atraentes de oviposição em armadilhas para a captura de adultos ou pelo uso de substâncias repelentes/inibidoras de oviposição em coleções de água.



Sugere-se a continuação dos estudos para identificação e avaliação individualizada dos outros compostos presentes nos extratos de ovos como estimulantes e atraentes de oviposição.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os bioensaios que envolvem atração, estimulação, inibição e repulsão à oviposição precisam ser bem estabelecidos para diferenciar a interferência dos infoquímicos no comportamento de grávidas de *A. aegypti*. De modo geral, alguns autores se referem de forma equivocada a estes conceitos, dificultando a interpretação dos resultados das pesquisas. Mendki e colaboradores (2000), por exemplo, relataram o *n*-heneicosano como atraente de oviposição a partir de bioensaios em pequenas gaiolas, como as utilizadas no presente trabalho. A atratividade deste hidrocarboneto, entretanto, só foi determinada por Seenivasagan e colaboradores (2009) ao avaliarem este composto em bioensaios que envolviam longos deslocamentos até a fonte de estímulo, por meio de testes em olfatômetro em “Y”. Embora muitos compostos provenientes de ovos e larvas tenham sido identificados e avaliados isoladamente em pequenas gaiolas de criação, estes compostos ainda não foram testados em campo.

No presente trabalho, a pré-existência de imaturos de *A. aegypti* num recipiente, em condições de laboratório, interferiu no comportamento de oviposição de grávidas co-específicas, seja pela percepção de infoquímicos de origem larval ou de ovos inteiros, corroborando com estudos anteriores (Soman & Reuben 1970, Chadee et al. 1990, Apostol et al. 1994, Allan & Kline 1998, Zahiri & Rau 1998, Ivo & Eiras 1999, Ivo 2000, Mendki et al. 2000, Ganesan et al. 2006, Serpa et al. 2008, Williams et al. 2008, Seenivasagan et al. 2009)

Os testes com diferentes concentrações de larvas em cada recipiente de oviposição visavam determinar uma concentração ideal de larvas estimulante em condições de laboratório. Observou-se que extratos (EAL, EHAL, EMCL) de água e de corpo de larvas, mantidos por 24 horas na concentração de 0,5 larvas/mL, estimularam a oviposição de co-específicos. Esta concentração de manutenção de larvas não é considerada alta (Gama et al. 2005, Serpa et al. 2008) e pode sinalizar a presença de um recipiente de oviposição adequado, previamente selecionado por outras fêmeas, indicando ser um ambiente ideal para o desenvolvimento de imaturos co-específicos. Observou-se que a concentração de larvas influencia no comportamento de oviposição, ora estimulando, ora inibindo a oviposição sendo, portanto, dose-dependente. Demonstrou-se a existência de vários compostos químicos provenientes de larvas e de água de criação de larvas, entre estes o hidrocarboneto *n*-heneicosano, considerado atraente e estimulante de oviposição para populações de *A. aegypti* da Índia (Mendki et al. 2000, Seenivasagan et al. 2009).

O presente trabalho demonstrou que ovos pré-existentes de co-específicos de diferentes idades interferiram de forma desigual no comportamento de oviposição de *A. aegypti* em condições de laboratório. A deposição de ovos foi significativamente estimulada quando ovos co-específicos de dois, sete, 15 e 30 dias foram colocados nos recipientes de oviposição. Entretanto, ovos com 90 dias não interferiram neste comportamento enquanto que ovos de 180 dias inibiram a oviposição de co-específicos em laboratório.

Os ácidos dodecanóico e tetradecanóico, considerados estimulantes de oviposição para populações de *A. aegypti* da Índia (Ganesan et al. 2006) foram identificados no presente trabalho em extratos metanólicos de ovos de *A. aegypti*. As proporções relativas dos dois ácidos carboxílicos foram similares nos extratos de ovos que estimularam a oviposição nos bioensaios (0, 2, 7, 15 e 30 dias). Provavelmente, os ácidos dodecanóico e tetradecanóico estimularam a oviposição em recipientes contendo ovos com até 30 dias. Contudo, para certificar esta inferência, seriam necessários bioensaios com os compostos sintéticos individualizados e/ou misturados. Deve-se ressaltar que os outros infoquímicos presentes nos ovos também podem ter interferido neste comportamento. Os ácidos dodecanóico e tetradecanóico foram verificados em concentrações ínfimas nos extratos correspondentes aos ovos com idades que não influenciaram a oviposição (90 dias) ou a inibiram (180 dias). Provavelmente, a perda de compostos e/ou a presença de compostos podem ter inibido o comportamento de oviposição. Somente futuros trabalhos de identificação de compostos presentes nos ovos de 90 e 180 dias poderão elucidar este comportamento.

Assim, a observação de que infoquímicos presentes nos extratos de larvas e de ovos são capazes de estimular ou inibir a deposição de ovos em condições de laboratório, bem como o registro de inúmeros picos nos cromatogramas destes extratos fornecem evidências para futuras pesquisas de identificação destes compostos como estimulantes de oviposição. Futuros estudos comportamentais devem ser realizados com extratos de imaturos co-específicos, concomitantemente com a identificação dos compostos biologicamente ativos para *A. aegypti*.

Os testes de campo indicaram uma atratividade de grávidas de *A. aegypti* similar entre armadilhas iscadas com infusão de *P. maximum* a 10% e extratos de água de criação de larvas mantidas na concentração de 8 larvas/mL de água destilada. No entanto, não foi verificado efeito sinérgico ou aditivo da associação de ambos. Como na comparação da associação destas soluções foram capturados poucos mosquitos em todas as armadilhas, sugere-se a repetição destes experimentos em um futuro estudo. Recomenda-se também avaliações futuras em campo ou semi-campo, dos extratos larvais (metanólicos e hexânicos) e dos

extratos de ovos, para verificação das suas atratividades em armadilhas adesivas MosquiTRAP®.

O *n*-heneicosano, infoquímico proveniente de larvas de *A. aegypti*, foi avaliado mais intensivamente do que os outros compostos identificados a partir de imaturos co-específicos por ser considerado tanto estimulante quanto atraente de oviposição para grávidas de *A. aegypti* da Índia (Mendki et al. 2000, Seenivasagan et al. 2009). Assim, é possível que outros compostos provenientes de ovos e larvas também possam atuar como estimulantes e atraentes.

Se os infoquímicos provenientes de ovos e de larvas apresentarem ação a longas distâncias, ou seja, se forem atraentes de oviposição, fornecerão subsídios para serem usados também como iscas em armadilhas de captura de adultos à procura de sítios de oviposição. Portanto, sugere-se também avaliações futuras em armadilhas adesivas, dos infoquímicos avaliados no presente trabalho, em combinação com o *AtrAedes*®, atraente sintético de oviposição para *A. aegypti* identificado a partir de infusões do capim *P. maximum* (Eiras 2002). Estes testes teriam como finalidade verificar os efeitos sinérgicos ou aditivos da mistura de compostos de origem dos imaturos e da degradação de matéria orgânica (Dougherty & Hamilton 1997, Braks et al. 2007).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu FVS 2010. *Estudo do comportamento de “oviposição em saltos” por fêmeas de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) em diferentes densidades de criadouros e a influência da armadilha MosquiTRAP® na redução de ovos e criadouros positivos.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 121 pp.
- Allan SA, Kline DL 1998. Larval rearing water and preexisting eggs influence oviposition by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 35: 943-947.
- Alves JCM, Hamilton JCG, Brazil RP 2003. Oviposition response of *Lutzomyia (Lutzomyia) renei* (Martins, Falcão & Silva) (Diptera: Psychodidae) to extracts of conspecific eggs in laboratory bioassays. *Entomotrop* 18: 121-126.
- Apostol BL, Black IV WC, Reiter P, Miller BR 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* 51: 89-97.
- Barata EAMF, Costa AIP, Chiaravalloti-Neto F, Glasser CM, Barata JMS, Natal D 2001. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública* 35: 237-242.
- Barbosa AA, Silva MAN 2002. Preferência por local de oviposição de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae), em relação à presença de imaturos da própria espécie, sob condições de laboratório. *Rev Bras Zool* 19: 1147 - 1152.
- Barnett ED 2007. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Clin Infect Dis* 44: 850-856.
- Batista-Pereira LG, Stein K, Paula AF, Moreira JA, Cruz I, Perri JrJ, Figueiredo MLC, Corrêa AG 2006. Isolation, identification and field evaluation of the sex pheromone of the Brazilian population of the *Spodoptera frugiperda*. *J Chem Ecol* 32: 1085-1099.
- Bentley MD, Day JF 1989. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Ann Rev Entomol* 34: 401-421.
- Bentley MD, McDaniel IN, Lee H-P, Stiehl B, Yatagai M 1976. Studies onof *Aedes triseriatus* oviposition attractants produced by larvae of *Aedes triseriatus* and *Aedes atropalpus* (Diptera: CuliCidae). *J Med Ent* 13: 112-115.
- Braga IA, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 295-302.
- Braks MAH, Leal WS, Cardé RT 2007. Oviposition responses of gravid female *Culex quinquefasciatus* to egg rafts and low doses of oviposition pheromone under semifield conditions. *J Chem Ecol* 33: 567-578.
- Bruno DW, Laurence BR (1979). The influence of the apical droplet of *Culex* egg rafts on oviposition of *Culex pipiens fatigans* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 16: 300-305.

- Chadee DD 2009. Oviposition strategies adopted by gravid *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies (2002–2006). *Acta Trop* 111: 279-283.
- Chadee DD 2010. The diel oviposition periodicity of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies: effects of forced egg retention. *Bull Entomol Res* 24: 1-5.
- Chadee DD, Corbet PS 1987. Seasonal incidence and diel patterns of oviposition in the field of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera Culicidae) in Trinidad, West Indies: a preliminary study. *Ann Trop Med Parasitol* 81: 151–161.
- Chadee DD, Corbet P, Greenwood J 1990. Egg-laying Yellow Fever mosquitoes avoid sites containing eggs laid by themselves or by conspecifics. *Entomol Exp Appl* 57: 295-298.
- Clements AN 1999. *The biology of mosquitoes: Sensory reception and behavior*, Vol II, CABI Publishing, Nova York, 740 pp.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 228 pp.
- Consoli RAGB, Teixeira MA 1988. Influence of larval and pupal products on the oviposition behaviour of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera:Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 213-218.
- Corkum LD, Belanger RM 2007. Use of chemical communication in the management of freshwater aquatic species that are vectors of human diseases or are invasive. *Gen Comp Endocrinol* 153: 401-417.
- Corrêa AG, Sant’Ana J 2007. Ecologia química de insetos. In: AG Corrêa, PC Vieira, *Produtos Naturais no Controle de Insetos*, 2 ed ,EDUFSCar, São Carlos, p. 9-17.
- Davis EE 1976. A receptor sensitive to oviposition site attractants on the antennae of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 22: 1371-1376.
- Degani ALG, Cass QB, Vieira PC 1998. Cromatografia, um breve ensaio. *QNEsc* 7: 21-25.
- Dethier VG, Browne LB, Smith CN 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J Econ Entomol* 53: 134-136.
- Detinova TS 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monogr Ser World Health Organ.* 47: 13-191.
- Donalísio MR, Glasser CM 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. *Rev Bras Epidemiol* 5: 259-272.
- Dougherty M, Hamilton G 1997. Dodecanoic acid is the oviposition pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. *J Chem Ecol* 23: 2357-2671.
- Eiras AE 1991. *The role of human odours in host location behaviour by female Aedes aegypti (Diptera:Culicidae)*. PhD Thesis, University of Southampton, Southampton, 122 pp.

- Eiras AE 2001. Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos vetores de doenças médico-veterinárias. In: EF Vilela & TMC Della Lucia, *Feromônios de Insetos - Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas*, Holos, Ribeirão Preto, p. 99-112.
- Eiras AE. *Armadilha para a captura de insetos*. Depósito de patente no Brasil: PI0203907-9, 05 de setembro de 2002.
- Eiras AE, Kovaleski A, Vilela EF, Chambon JP, Unelius CR., Borg-Karlson A, Liblikas I, Mozuraitis R, Bengtsson M, Witzgall P 1999. Sex Pheromone of the Brazilian Apple Leafroller, *Bonagota cranaodes* Meyrick (Lepidoptera, Tortricidae). *Z. Naturforsch* 54: 595 -601.
- Eiras AE, Mafra-Neto A 2001. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos In: EF Vilela & TMC Della Lucia, *Feromônios de Insetos - Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas*, Holos, Ribeirão Preto, p. 27-39.
- Eiras AE, Resende MC 2009. Preliminary evaluation of the "Dengue-MI" technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Cad Saúde Pública* 25: 45-58.
- Favaro EA, Dibo MR, Mondini A, Ferreira AC, Barbosa AAC, Eiras AE, Barata EAMF, Chiaravalloti-Neto F 2006. Physiological state of *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs® in Mirrasol, São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol* 31: 285-291.
- Fay RW, Eliason DA 1966. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq News* 26: 531-535.
- Fay RW, Perry AS 1965. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosq News* 25: 276-281.
- Fay RW, Prince WH 1970. A modified visual trap for *Aedes aegypti*. *Mosq News* 30: 20-23.
- Figueiredo LTM 2007. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 224-229.
- Forattini OP 2002. *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia*, Vol. II, Edusp, São Paulo, 864 pp.
- Funasa 2001. *Dengue. Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Manual de Normas Técnicas*, 3ª ed., Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Funasa 2002. *Plano Nacional de Controle da Dengue*, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Funasa 2009. *Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue*. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Gadelha DP, Toda AT 1985. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev Bras Malariol D Trop* 37: 29-36.

- Gama RA 2005. *Avaliação da armadilha MosquiTRAP como uma nova ferramenta no monitoramento do mosquito Aedes aegypti (Diptera:Culicidae) em campo*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 121pp.
- Gama RA, Alves KC, Martins RF, Eiras AE, Resende MC 2005. Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 64-66.
- Gama RA, Silva EM, Silva IM, Resende MC, Eiras AE 2007. Evaluation of the sticky MosquiTRAP<sup>®</sup> for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera:Culicidae) the dry season in the district of Itapõa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Neotrop Entomol* 36: 294-302.
- Ganesan K, Mendki MJ, Suryanarayana MVS, Prakash S, Malhotra RC 2006. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. *Aust J Entomol* 45: 75-80.
- Gomes AC 1998. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. *Inf Epidemiol Sus* 7: 49-57.
- Gomes AS 2003. *Comportamento de oviposição e exploração de criadouros, por fêmeas grávidas do mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório e campo*. Dissertação de Mestrado, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 97 pp.
- Gomes AS, Sciavico CJS, Eiras AE 2006. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 327-332.
- Harrington LC, Edman JD 2001. Indirect evidence against delayed "skip oviposition" behavior by *Aedes aegypti* in Thailand. *J Med Entomol* 38: 641-645.
- Hudson A, McIntock J 1967. A chemical factor that stimulates oviposition by *Culex tarsalis* Coquillet (Diptera:Culicidae). *Anim Behav* 15: 336-341.
- Hwang Y-S, Schultz GW, Axelrod H, Kramer ML, Mulla MS 1982. Ovipositional repellency of fatty acids and their derivatives against *Culex* and *Aedes* mosquitoes. *Environ Entomol* 11: 223-226.
- Isoe J, Millar JG 1995. Characterization of factors mediating oviposition site choice by *Culex tarsalis*. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 21-28.
- Isoe J, Millar JG, Beehler JW 1995. Bioassays for *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquito oviposition attractants and stimulants. *J Med Entomol* 32: 475-83.
- Ivo ES 2000. *Comportamento de oviposição de Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em armadilhas contendo extratos de larvas e infusão de gramíneas*. Monografia de Bacharelado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 42 pp.



- Ivo ES, Eiras, AE 1999. Avaliação de extratos de feromônio de oviposição de *Aedes (Stegomyia) Aegypti Linnaeus*, 1792 (Diptera: Culicidae) em ovitrampas em laboratório e em campo. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 16, Poços de Caldas.
- Joshi V, Mourya DT, Sharma RC 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 67: 158-161.
- Kline DL 1999. Comparison of two american biophysics mosquito traps: the professional and a new counterflow geometry trap. *J Am Mosq Control Assoc* 15: 276-282.
- Kramer WL, Mulla MS 1979. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes. Oviposition responses of *Culex* mosquitoes to organic infusions. *Envir Entomol* 8: 1111-1117.
- Krockel U, Rose A, Eiras AE, Geier M 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 229-238.
- Lima CA 2005. *Desenvolvimento de armadilha e atraentes de oviposição sintético para captura de fêmeas grávidas do mosquito Culex quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae)*. Tese Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 170 pp.
- Lounibos LP 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomo* 47: 233-266.
- Lozovei, AL 2001. Culicídeos (Mosquitos). In: CB Marcondes, *Entomologia Médica e Veterinária*, Atheneu, São Paulo, p. 59-103.
- Madeira NG, Macharelli CA, Carvalho LR 2002. Variation of the oviposition preferences of *Aedes aegypti* in function of substratum and humidity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 415-420.
- Maire A 1985. Effect of axenic larvae on the oviposition site selection by *Aedes atropalpus*. *J Am Mosq Control Assoc* 1: 320-323.
- Marques CCA, Miranda C 1992. Influência de extratos de formas evolutivas sobre atividades de oviposição de fêmeas de *Aedes (S) albopictus* (Skuse). *Rev Saúde Pública* 26: 269-271.
- McCall PJ, Cameron MM 1995. Oviposition pheromones in insect vectors. *Parasitol Today* 11: 352-355.
- McCall PJ, Heath RR, Dueben BD, Wilson MD 1997. Oviposition pheromone in the *Simulium damnosum* complex: biological activity of chemical fractions from gravid ovaries. *Physiol Entomol* 22: 224-230.
- McDaniel IN, Bentley MD, Lee HP, Yatagai M 1979. Studies of *Aedes triseriatus* (Diptera:Culicidae) oviposition attractants. Evidence for attractant production by kaolin-treated larvae. *Can Ent* 111: 143-147.

- Mclver SB 1982. Sensilla of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 19: 489-535.
- Mendki MJ, Ganesan K, Prakash S, Suryanarayana MVS, Malhotra RC, Rao KM, Vaidyanathaswamy R 2000. Heneicosane: an oviposition-attractant pheromone of larval origin in *Aedes aegypti* mosquito. *Curr Sci* 78: 1295-1296.
- Millar JG, Chaney JD, Mulla MS 1992. Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented bermuda grass infusions. *J Am Mosq Control Assoc* 8:11-17.
- Millar JG, Haynes KF 1998. *Methods in chemical ecology: Chemical methods*. Kluwer Academic Publishers, Norwell. 390pp.
- Ministério da Saúde [dados de internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Semanas de 1 a 52 de 2009. 2009a - [citado em 8 Jul 2010]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_epidemiologico\\_semana\\_1a52\\_09\\_revisado.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf)
- Ministério da Saúde [dados de internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Emergências em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) de Febre Amarela Silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a Situação Epidemiológica Atual no Brasil (2008/2009). 2009b - [citado em 8 Jul 2010]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_febre\\_amarela\\_09\\_12\\_09.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf)
- Ministério da Saúde [dados de internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências – 2010. 2010a - [citado em 8 Jul 2010]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_se\\_13\\_completo\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_13_completo_final.pdf)
- Ministério da Saúde [dados de internet]. Ministério da Saúde detecta casos suspeitos de dengue do tipo 4 em Roraima. 2010b - [citado em 14 Ago 2010]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=11595](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11595)
- Mokany A, Shine R 2003. Oviposition site selection by mosquitoes is affected by cues from conspecific larvae and anuran tadpoles. *Aust Ecol* 28: 33-37.
- Monath TP 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 1:11-20.
- Mourya DT, Gokhale MD, Basu A, Barde PV, Sapkal GN, Padbidri VS, Gore MM 2001. Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virol* 45: 67-71.
- Murlis J, Elkinton JS, Cardé RT 1992. Odor plumes and how insects use them. *Annu Rev Entomol* 37: 505-532.
- Murlis J, Jones CD 1981. Fine-scale structure of odour plumes in relation to insect orientation to distant pheromone and other attractant sources. *Physiol Ent* 6: 71-86.

- Navarro-Silva MA, Marques FA, Jonny E, Duque L 2009. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. *Rev Bras Entomol* 53: 1-6.
- Nelson MJ 1986. *Aedes aegypti: Biology and Ecology*. PAHO, Washington, DC, 59 pp.
- Nelson MJ 1994. The role of sampling in vector control. *Am J Trop Med Hyg* 50: 154-150.
- Onyabe DY, Roitberg BD 1997. The effect of conspecifics on oviposition site selection and oviposition behaviour in *Aedes togoi* (Theobald) (Diptera: Culicidae). *Can Entomol* 129: 1173-1176.
- Osgood CE 1971. An oviposition pheromone associated with the egg rafts of *Culex tarsalis*. *J Econ Entomol* 64: 1038-1041.
- Osgood CE 1971. An oviposition pheromone associated with the egg rafts of *Culex tarsalis*. *J Econ Entomol* 64: 1038-1041.
- PAHO 1995. *Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su Prevención y Control*, Pan American Health Organization, Pub Cient Washington, 548 pp.
- Pereira AS, Aquino Neto FR 2000. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. *Quím Nova* 23: 300-379.
- Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319-327.
- Ponnusamy L, Xu N, Nojima S, Wesson DM, Schal C, Apperson CS 2008. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9262-9267.
- Powers AM, Logue CH 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 88: 2363-2377.
- Reiter P 2007. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne Zoon Dis* 7: 261-273.
- Reiter P, Fontenille D, Paupy C 2006. *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Infect Dis* 6: 463-464.
- Roque RA 2002. *Avaliação de armadilhas iscadas com infusões de gramíneas como atraentes e/ou estimulantes de oviposição do mosquito Aedes (Stegomyia) sp. (Diptera: Culicidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 83 pp.
- Roque RA 2007. *Avaliação de atraentes de oviposição, identificados em infusões de capim colônia (Panicum maximum) para fêmeas de Aedes aegypti (L. 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de semicampo e campo*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 113 pp.

- Roque RA, Eiras AE 2008. Calibration and evaluation of field cage for oviposition study with *Aedes (Stegomyia) aegypti* female (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 37: 478-485.
- Sant'Ana AL 2003. *Avaliação, extração e estudos eletrofisiológicos dos voláteis presentes em infusões de Panicum maximum que estimulam e/ou atraem fêmeas de Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) para oviposição*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 105 pp.
- Sant'Ana AL, Roque RA, Eiras AE 2006. Characteristics of grass infusion as oviposition attractants to *Aedes (Stegomyia)* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 43: 214-220.
- Sant'Ana J, Stein K 2007. Extração de infoquímicos e bioensaios comportamentais. In: AG Corrêa, PC Vieira, Produtos Naturais no Controle de Insetos, 2 ed, EDUFSCar, São Carlos, p. 41-67.
- Santos E, Correia J, Muniz L, Meiado M, Albuquerque C 2010. Oviposition activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in response to different organic infusions. *Neotrop Entomol* 39: 299-302.
- Seenivasagan T, Sharma KR, Sekhar K, Ganesan K, Prakash S, Vijayaraghavan R 2009. Electroantennogram, flight orientation, and oviposition responses of *Aedes aegypti* to the oviposition pheromone n-heneicosane. *Parasitol Res* 104: 827-833.
- Serpa LLN, Monteiro SD'CB, Voltolini JC 2008. Efeito da água de criação larval na oviposição de *Aedes aegypti* em laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 515-517.
- Sharma KR, Seenivasagan T, Rao AN, Ganesan K, Agarwal OP, Malhotra RC, Prakash S 2008. Oviposition responses of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to certain fatty acid esters. *Parasitol Res* 103: 1065-1073.
- Soman RS, Reuben R 1970. Studies on the preference shown by ovipositing females of *Aedes aegypti* for water containing immature stages of the same species. *J Med Entomol* 7: 485-489.
- Soumahoro MK, Gérardin P, Boëlle PY, Perrau J, Fianu A, Pouchot J, Malvy D, Flahault A, Favier F, Hanslik T 2009. Impact of chikungunya virus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. *PLoS ONE* 4: 1-6.
- Spencer M, Blaustein L, Cohen JE 2002. Oviposition habitat selection by mosquitoes (*Culiseta longiareolata*) and consequences for population size. *Ecology* 83: 669 - 679.
- Starratt AN, & Osgood CE 1972. An oviposition pheromone of the mosquito *Culex tarsalis*: diglyceride composition of the active fraction. *Bioch Bioph Acta* 280: 187 - 193.
- Subchev M, Jurenka RA 2001. Sex Pheromone Levels in Pheromone Glands and Identification of the Pheromone and Hydrocarbons in the Hemolymph of the Moth *Scoliopteryx libatrix* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 35- 43.

- Sucharit S, Tumrasvin W 1981. Ovipositional attractancy of waters containing larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Jap J Sanit Zool* 32: 261 - 264.
- Sudia WD, Chamberlain RW 1962. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosq News* 22: 126-129.
- Taípe-Lagos CB, Natal D 2003. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. *Rev Saúde Pública* 37: 275-279.
- Teo D, Ng LC, Lam S 2009. Is dengue a threat to the blood supply? *Transf Med* 19: 66-77.
- Tilston N, Skelly C, Weinstein P 2009. Pan-European Chikungunya surveillance: designing risk stratified surveillance zones. *Int J Health Geogr* 8: 61 -69.
- Trimble RM, Wellington WG 1980. Oviposition stimulant associated with fourth-instar larvae of *Aedes togoi* (Diptera: Culicidae). *J Med Ent* 17: 509-514.
- Van der Goes van Naters, WM, Carlson JR 2006. Insects as chemosensors of humans and crops. *Nature* 444: 302- 307.
- Vasconcelos PFC 2002. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Rev Bras Epidemiol* 5: 244-258.
- Vasconcelos PFC 2003. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 275-293.
- Vilela EF, Della Lucia TMC 2001. Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: EF Vilela, TMC Della Lucia, *Feromônios de Insetos - Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas*, Holos, Ribeirão Preto, p. 9-12.
- WHO 1997. *Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance*, World Health Organization, Geneva.
- WHO 2006. *Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue*, World Health Organization, Geneva, 160 pp.
- Williams CR, Leach KJ, Wilson NJ, Swart VR 2008. The Allee effect in site choice behaviour of egg-laying dengue vector mosquitoes. *Trop Biomed* 25: 140-144.
- Zahiri N, Rau ME 1998. Oviposition Attraction and repellency of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to waters from conspecific larvae subjected to crowding, confinement, starvation, or infection. *J Med Entomol* 35: 782-787.
- Zahiri N, Rau ME, Lewwis JD 1997. Oviposition responses of *Aedes aegypti* and *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae) females to waters from conspecific and heterospecific normal larvae and from larvae infected with *Plagiorchis elegans* (Trematoda: Plangiorchiidae). *J Med Entomol* 34:565-568.
- Zarbin PHG 2001. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: EF Vilela, TMC Della Lucia, *Feromônios de Insetos - Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas*, Holos, Ribeirão Preto, p. 45-50.

**APÊNDICE 1:** Avaliação de extratos de água de criação de larvas (EAL) de *Aedes aegypti* como estimulantes de oviposição - Dados integrais

**Quadro 1:** EAL na concentração 0,5 larvas/ mL água destilada

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 2          | 84             | 25    | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 0              | 0     | 76         | 25    | 0       |
| 4          | 0              | 0     | 100        | 0     | 0       |
| 5          | 47             | 1     | 43         | 5     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 16         | 67    | 0       |
| 7          | 0              | 0     | 33         | 91    | 0       |
| 8          | 19             | 4     | 45         | 0     | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 5              | 0     | 67         | 20    | 0       |
| 11         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 12         | 25             | 62    | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 14         | 12             | 14    | 29         | 44    | 0       |
| 115        | 27             | 4     | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 17         | 14             | 6     | 0          | 0     | 0       |
| 18         | 0              | 0     | 118        | 20    | 0       |
| 19         | 4              | 0     | 117        | 2     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 9          | 15    | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 121        | 16    | 0       |
| 22         | 12             | 0     | 112        | 0     | 0       |
| 23         | 7              | 74    | 0          | 5     | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 24         | 4     | 0       |
| 25         | 98             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 51             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 13             | 20    | 64         | 0     | 0       |
| 28         | 0              | 0     | 76         | 8     | 8       |
| 29         | 4              | 3     | 30         | 11    | 0       |
| 30         | 41             | 0     | 65         | 15    | 0       |
| 31         | 3              | 2     | 7          | 16    | 17      |
| 32         | 74             | 22    | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 2:** EAL na concentração 2,0 larvas/ mL água destilada

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 2          | 114            | 4     | 10         | 2     | 0       |
| 3          | 0              | 0     | 3          | 21    | 0       |
| 4          | 26             | 71    | 0          | 1     | 0       |
| 5          | 97             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 2              | 0     | 81         | 12    | 0       |
| 7          | 28             | 58    | 33         | 36    | 0       |
| 8          | 9              | 2     | 76         | 15    | 0       |
| 9          | 76             | 37    | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 8              | 7     | 21         | 19    | 0       |
| 11         | 13             | 25    | 38         | 17    | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 14         | 9              | 2     | 28         | 26    | 0       |
| 15         | 20             | 5     | 23         | 5     | 0       |
| 16         | 14             | 48    | 0          | 0     | 0       |
| 17         | 3              | 3     | 3          | 0     | 0       |
| 18         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 19         | 1              | 3     | 91         | 2     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 94             | 11    | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 69             | 2     | 48         | 10    | 0       |
| 23         | 34             | 47    | 6          | 23    | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 25         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 20             | 12    | 8          | 0     | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 91         | 7     | 0       |
| 28         | 0              | 0     | 85         | 21    | 0       |
| 29         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 30         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 31         | 19             | 2     | 83         | 7     | 0       |
| 32         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 3: EAL na concentração 3,0 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 2          | 122            | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 109            | 32    | 0          | 0     | 0       |
| 4          | 105            | 3     | 0          | 0     | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 68         | 0     | 0       |
| 6          | 84             | 29    | 0          | 7     | 0       |
| 7          | 4              | 18    | 106        | 0     | 0       |
| 8          | 16             | 15    | 48         | 46    | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 45         | 17    | 0       |
| 10         | 89             | 37    | 0          | 0     | 0       |
| 11         | 13             | 3     | 37         | 3     | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 14             | 6     | 50         | 35    | 0       |
| 14         | 27             | 34    | 19         | 24    | 0       |
| 15         | 53             | 1     | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 13             | 0     | 64         | 3     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 103        | 15    | 0       |
| 18         | 2              | 0     | 96         | 4     | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 0     | 47      |
| 20         | 13             | 0     | 64         | 3     | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 2          | 29    | 0       |
| 22         | 6              | 0     | 81         | 17    | 0       |
| 23         | 52             | 3     | 60         | 9     | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 25         | 52             | 1     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 0              | 0     | 89         | 4     | 0       |
| 27         | 16             | 3     | 66         | 5     | 0       |
| 28         | 16             | 40    | 27         | 36    | 0       |
| 29         | 52             | 7     | 0          | 0     | 0       |
| 30         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 31         | 23             | 36    | 47         | 12    | 0       |
| 32         | 79             | 3     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 4: EAL na concentração 6,0 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 2          | 25             | 7     | 22         | 16    | 0       |
| 3          | 0              | 0     | 59         | 0     | 4       |
| 4          | 0              | 0     | 77         | 56    | 0       |
| 5          | 0              | 14    | 24         | 61    | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 88         | 7     | 0       |
| 7          | 11             | 65    | 7          | 8     | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 53         | 19    | 0       |
| 9          | 51             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 65             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 11         | 39             | 5     | 51         | 9     | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 14         | 33             | 7     | 0          | 1     | 0       |
| 15         | 68             | 22    | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 82             | 9     | 2          | 2     | 0       |
| 17         | 9              | 13    | 55         | 44    | 0       |
| 18         | 0              | 0     | 2          | 21    | 0       |
| 19         | 55             | 0     | 69         | 0     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 41         | 31    | 0       |
| 22         | 84             | 17    | 0          | 0     | 0       |
| 23         | 0              | 0     | 38         | 70    | 0       |
| 24         | 16             | 7     | 38         | 8     | 0       |
| 25         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 34             | 1     | 15         | 6     | 0       |
| 27         | 4              | 18    | 51         | 46    | 4       |
| 28         | 7              | 59    | 0          | 24    | 0       |
| 29         | 4              | 10    | 10         | 12    | 0       |
| 30         | 57             | 8     | 0          | 0     | 0       |
| 31         | 16             | 49    | 0          | 19    | 0       |
| 32         | 25             | 50    | 0          | 0     | 0       |

**APÊNDICE 2:** Avaliação de extratos hexânicos de água de criação de larvas (EHAL) de *Aedes aegypti* como estimulantes de oviposição - Dados integrais

**Quadro 5:** EHAL na concentração 0,5 larvas/ mL água destilada

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 64         | 4     | 0       |
| 2          | 60             | 36    | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 22             | 17    | 52         | 14    | 0       |
| 4          | 0              | 0     | 0          | 1     | 0       |
| 5          | 72             | 1     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 78         | 2     | 0       |
| 7          | 4              | 2     | 32         | 12    | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 40         | 97    | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 27             | 5     | 61         | 2     | 0       |
| 11         | 20             | 26    | 12         | 3     | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 14         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 15         | 54             | 13    | 7          | 39    | 0       |
| 16         | 19             | 11    | 0          | 0     | 39      |
| 17         | 23             | 7     | 82         | 0     | 0       |
| 18         | 0              | 0     | 95         | 0     | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 62         | 50    | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 90             | 0     | 1          | 0     | 0       |
| 23         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 25         | 0              | 0     | 82         | 1     | 0       |
| 26         | 27             | 12    | 22         | 73    | 0       |
| 27         | 99             | 7     | 16         | 20    | 0       |
| 28         | 0              | 0     | 50         | 10    | 0       |
| 29         | 28             | 32    | 8          | 6     | 0       |
| 30         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 6:** EHAL na concentração 2,0 larvas/ mL água destilada

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 18             | 60    | 13         | 6     | 12      |
| 2          | 48             | 5     | 43         | 29    | 0       |
| 3          | 60             | 3     | 47         | 1     | 0       |
| 4          | 10             | 2     | 78         | 19    | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 0          | 0     | 29      |
| 6          | 0              | 0     | 86         | 7     | 0       |
| 7          | 1              | 6     | 0          | 0     | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 68         | 7     | 0       |
| 9          | 41             | 3     | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 13             | 7     | 29         | 6     | 0       |
| 11         | 6              | 41    | 6          | 22    | 0       |
| 12         | 80             | 7     | 11         | 10    | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 14         | 50             | 7     | 37         | 7     | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 29             | 18    | 36         | 23    | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 6          | 128   | 0       |
| 18         | 57             | 5     | 45         | 0     | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 58         | 9     | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 154        | 2     | 0       |
| 22         | 17             | 9     | 111        | 2     | 0       |
| 23         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 24         | 37             | 9     | 11         | 5     | 0       |
| 25         | 29             | 1     | 11         | 8     | 0       |
| 26         | 27             | 62    | 16         | 51    | 0       |
| 27         | 1              | 46    | 3          | 70    | 0       |
| 28         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 29         | 21             | 6     | 51         | 7     | 0       |
| 30         | 72             | 4     | 12         | 14    | 0       |



**Quadro 7: EHAL na concentração 3,0 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 115            | 19    | 0          | 0     | 20      |
| 2          | 27             | 23    | 36         | 30    | 0       |
| 3          | 41             | 3     | 0          | 0     | 0       |
| 4          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 7          | 61             | 18    | 0          | 0     | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 66             | 2     | 14         | 0     | 0       |
| 11         | 0              | 0     | 69         | 8     | 0       |
| 12         | 56             | 33    | 11         | 39    | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 12         | 44    | 0       |
| 14         | 2              | 26    | 12         | 16    | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 80             | 12    | 2          | 6     | 0       |
| 17         | 1              | 1     | 0          | 0     | 38      |
| 18         | 78             | 16    | 0          | 0     | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 9              | 1     | 23         | 95    | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 0              | 0     | 161        | 2     | 0       |
| 23         | 31             | 46    | 7          | 32    | 0       |
| 24         | 73             | 7     | 24         | 14    | 0       |
| 25         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 9              | 25    | 13         | 72    | 0       |
| 27         | 47             | 45    | 0          | 23    | 0       |
| 28         | 7              | 84    | 0          | 0     | 0       |
| 29         | 0              | 0     | 43         | 37    | 0       |
| 30         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 8: EHAL na concentração 6,0 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 28             | 3     | 89         | 3     | 0       |
| 2          | 58             | 71    | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 4          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 5          | 111            | 0     | 17         | 2     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 7          | 4              | 0     | 10         | 0     | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 0          | 23    | 0       |
| 9          | 7              | 1     | 0          | 16    | 11      |
| 10         | 52             | 1     | 0          | 0     | 0       |
| 11         | 57             | 19    | 8          | 38    | 0       |
| 12         | 3              | 12    | 2          | 73    | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 14         | 3              | 0     | 23         | 0     | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 2              | 0     | 57         | 17    | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 0          | 0     | 15      |
| 18         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 19         | 13             | 10    | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 82             | 11    | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 12             | 8     | 98         | 4     | 0       |
| 23         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 25         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 34             | 3     | 0          | 75    | 0       |
| 27         | 63             | 4     | 8          | 26    | 0       |
| 28         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 29         | 49             | 33    | 18         | 15    | 0       |
| 30         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 9: Hexano + água destilada (controle) x água destilada (tratamento)**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 3              | 35    | 0          | 0     | 0       |
| 2          | 129            | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 0              | 0     | 64         | 0     | 0       |
| 4          | 73             | 7     | 42         | 0     | 0       |
| 5          | 24             | 0     | 93         | 0     | 0       |
| 6          | 46             | 5     | 0          | 0     | 0       |
| 7          | 1              | 22    | 7          | 66    | 0       |
| 8          | 25             | 23    | 22         | 4     | 0       |
| 9          | 46             | 0     | 0          | 0     | 27      |
| 10         | 39             | 3     | 69         | 5     | 0       |
| 11         | 95             | 1     | 0          | 0     | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 98         | 0     | 0       |
| 13         | 2              | 26    | 4          | 93    | 0       |
| 14         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 1              | 7     | 98         | 81    | 0       |
| 17         | 67             | 25    | 25         | 4     | 0       |
| 18         | 58             | 11    | 27         | 2     | 0       |
| 19         | 35             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 13             | 76    | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 90             | 3     | 32         | 1     | 0       |
| 23         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 25         | 17             | 0     | 39         | 1     | 0       |
| 26         | 0              | 0     | 46         | 57    | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 42         | 5     | 0       |
| 28         | 7              | 0     | 59         | 3     | 0       |
| 29         | 58             | 47    | 0          | 0     | 0       |
| 30         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |

**APÊNDICE 3:** Avaliação de extratos metanólicos dos corpos de larvas (EMCL) de *Aedes aegypti* como estimulantes de oviposição - Dados integrais

**Quadro 10: EMCL na concentração 0,5 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 16             | 4     | 47         | 8     | 0       |
| 2          | 16             | 14    | 50         | 4     | 0       |
| 3          | 92             | 5     | 9          | 3     | 0       |
| 4          | 3              | 7     | 35         | 50    | 0       |
| 5          | 9              | 6     | 82         | 0     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 75         | 3     | 0       |
| 7          | 0              | 0     | 84         | 19    | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 121        | 31    | 0       |
| 9          | 14             | 24    | 2          | 4     | 0       |
| 10         | 70             | 1     | 55         | 2     | 0       |
| 11         | 77             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 12         | 23             | 9     | 64         | 3     | 0       |
| 13         | 8              | 7     | 36         | 54    | 0       |
| 14         | 0              | 0     | 25         | 68    | 0       |
| 15         | 63             | 0     | 48         | 0     | 0       |
| 16         | 0              | 0     | 0          | 0     | 25      |
| 17         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 18         | 109            | 6     | 2          | 0     | 0       |
| 19         | 0              | 1     | 93         | 21    | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 18             | 27    | 15         | 64    | 0       |
| 22         | 0              | 0     | 27         | 77    | 0       |
| 23         | 23             | 63    | 1          | 2     | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 42         | 46    | 0       |
| 25         | 69             | 40    | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 0              | 26    | 72         | 46    | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 95         | 3     | 0       |
| 28         | 74             | 8     | 21         | 23    | 0       |
| 29         | 0              | 0     | 84         | 23    | 0       |
| 30         | 26             | 71    | 0          | 2     | 0       |

**Quadro 11: EMCL na concentração 2,0 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 2          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 84             | 2     | 0          | 0     | 0       |
| 4          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 29         | 31    | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 0          | 0     | 42      |
| 7          | 1              | 14    | 12         | 40    | 0       |
| 8          | 102            | 18    | 0          | 0     | 0       |
| 9          | 52             | 1     | 37         | 7     | 0       |
| 10         | 0              | 0     | 0          | 0     | 8       |
| 11         | 49             | 4     | 57         | 7     | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 12             | 7     | 69         | 6     | 0       |
| 14         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 15         | 81             | 20    | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 34             | 5     | 12         | 6     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 18         | 79             | 52    | 0          | 0     | 0       |
| 19         | 133            | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 65             | 0     | 8          | 11    | 0       |
| 22         | 3              | 8     | 100        | 6     | 0       |
| 23         | 79             | 22    | 2          | 0     | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 0          | 0     | 4       |
| 25         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 52             | 0     | 50         | 1     | 0       |
| 27         | 108            | 44    | 0          | 3     | 0       |
| 28         | 6              | 30    | 32         | 58    | 0       |
| 29         | 39             | 22    | 0          | 0     | 0       |
| 30         | 99             | 2     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 12: EMCL na concentração 3,0 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       | Ovários |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       |         |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 0          | 0     | 56      |
| 2          | 2              | 1     | 65         | 16    | 0       |
| 3          | 0              | 0     | 0          | 0     | 83      |
| 4          | 39             | 48    | 7          | 14    | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 57             | 23    | 2          | 3     | 0       |
| 7          | 56             | 1     | 34         | 0     | 0       |
| 8          | 44             | 12    | 16         | 77    | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 5          | 31    | 0       |
| 10         | 0              | 0     | 102        | 31    | 0       |
| 11         | 4              | 1     | 109        | 0     | 0       |
| 12         | 2              | 13    | 62         | 11    | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 70         | 30    | 0       |
| 14         | 19             | 84    | 0          | 8     | 0       |
| 15         | 59             | 0     | 17         | 0     | 0       |
| 16         | 39             | 2     | 20         | 4     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 18         | 14             | 2     | 88         | 8     | 0       |
| 19         | 83             | 8     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 94             | 19    | 4          | 0     | 0       |
| 21         | 66             | 4     | 26         | 1     | 0       |
| 22         | 12             | 6     | 96         | 17    | 0       |
| 23         | 3              | 6     | 41         | 15    | 0       |
| 24         | 0              | 0     | 0          | 0     | 38      |
| 25         | 93             | 14    | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 0              | 3     | 98         | 1     | 0       |
| 27         | 8              | 12    | 3          | 17    | 0       |
| 28         | 39             | 2     | 73         | 4     | 0       |
| 29         | 0              | 0     | 56         | 5     | 0       |
| 30         | 47             | 17    | 55         | 0     | 0       |

**Quadro 13: EMCL na concentração 6,0 larvas/ mL água destilada**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       | Ovários |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       |         |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 93         | 3     | 0       |
| 2          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 44             | 25    | 7          | 13    | 0       |
| 4          | 0              | 0     | 115        | 0     | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 0          | 0     | 61      |
| 6          | 4              | 68    | 82         | 43    | 0       |
| 7          | 12             | 13    | 14         | 10    | 0       |
| 8          | 35             | 1     | 6          | 10    | 0       |
| 9          | 47             | 1     | 51         | 7     | 0       |
| 10         | 22             | 0     | 46         | 0     | 0       |
| 11         | 0              | 0     | 88         | 22    | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 35             | 1     | 83         | 2     | 0       |
| 14         | 0              | 0     | 0          | 0     | 2       |
| 15         | 116            | 6     | 5          | 2     | 0       |
| 16         | 0              | 1     | 92         | 20    | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 18         | 5              | 11    | 0          | 0     | 19      |
| 19         | 85             | 12    | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 106        | 2     | 0       |
| 21         | 38             | 12    | 33         | 32    | 0       |
| 22         | 16             | 25    | 18         | 51    | 0       |
| 23         | 37             | 4     | 13         | 0     | 0       |
| 24         | 6              | 1     | 28         | 67    | 0       |
| 25         | 3              | 4     | 87         | 9     | 0       |
| 26         | 16             | 59    | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 0              | 30    | 0          | 0     | 0       |
| 28         | 124            | 22    | 1          | 1     | 0       |
| 29         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 30         | 92             | 4     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 14: Metanol + água destilada (controle) x água destilada (tratamento)**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 2          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 3          | 28             | 0     | 64         | 5     | 0       |
| 4          | 122            | 11    | 2          | 0     | 0       |
| 5          | 41             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 73         | 23    | 0       |
| 7          | 22             | 3     | 44         | 4     | 0       |
| 8          | 56             | 3     | 59         | 3     | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 36             | 18    | 17         | 20    | 0       |
| 11         | 46             | 2     | 51         | 2     | 0       |
| 12         | 53             | 0     | 5          | 0     | 0       |
| 13         | 66             | 1     | 48         | 0     | 0       |
| 14         | 72             | 11    | 0          | 0     | 0       |
| 15         | 44             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 16         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 18         | 95             | 8     | 0          | 0     | 0       |
| 19         | 1              | 0     | 81         | 9     | 0       |
| 20         | 93             | 31    | 2          | 6     | 0       |
| 21         | 54             | 10    | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 48             | 9     | 24         | 7     | 0       |
| 23         | 57             | 18    | 1          | 0     | 0       |
| 24         | 57             | 13    | 11         | 3     | 0       |
| 25         | 79             | 5     | 13         | 2     | 0       |
| 26         | 0              | 0     | 57         | 33    | 0       |
| 27         | 6              | 18    | 89         | 1     | 0       |
| 28         | 1              | 14    | 3          | 8     | 20      |
| 29         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 30         | 66             | 3     | 2          | 0     | 0       |

**APÊNDICE 4:** Influência de ovos de *Aedes aegypti* de diferentes idades na oviposição de co-específicos em laboratório – Dados Integrais

**Quadro 15: Ovos com zero dia**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 63         | 79    | 0       |
| 2          | 5              | 11    | 5          | 18    | 0       |
| 3          | 38             | 20    | 11         | 16    | 0       |
| 4          | 0              | 0     | 88         | 10    | 95      |
| 5          | 28             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 0              | 11    | 0          | 0     | 72      |
| 7          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 9          | 5              | 0     | 97         | 8     | 0       |
| 10         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 11         | 2              | 0     | 70         | 0     | 0       |
| 12         | 1              | 6     | 69         | 2     | 0       |
| 13         | 43             | 58    | 0          | 0     | 0       |
| 14         | 24             | 14    | 31         | 21    | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 57         | 48    | 0       |
| 16         | 0              | 0     | 126        | 12    | 0       |
| 17         | 1              | 1     | 10         | 81    | 0       |
| 18         | 0              | 0     | 26         | 45    | 0       |
| 19         | 11             | 6     | 0          | 0     | 56      |
| 20         | 108            | 11    | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 83         | 3     | 0       |
| 22         | 0              | 0     | 66         | 16    | 0       |
| 23         | 69             | 0     | 12         | 0     | 0       |
| 24         | 55             | 6     | 9          | 17    | 0       |
| 25         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 26         | 62             | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 4              | 75    | 0          | 0     | 0       |
| 28         | 0              | 0     | 1          | 0     | 0       |

**Quadro 16: Ovos com dois dias**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 18         | 113   | 0       |
| 2          | 0              | 0     | 22         | 85    | 0       |
| 3          | 19             | 12    | 73         | 12    | 0       |
| 4          | 3              | 0     | 72         | 25    | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 8              | 1     | 25         | 14    | 0       |
| 7          | 0              | 0     | 0          | 0     | 39      |
| 8          | 0              | 0     | 8          | 1     | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 55         | 21    | 0       |
| 10         | 27             | 12    | 62         | 30    | 0       |
| 11         | 18             | 6     | 128        | 18    | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 75         | 0     | 0       |
| 13         | 81             | 9     | 14         | 1     | 0       |
| 14         | 3              | 0     | 84         | 22    | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 89         | 21    | 0       |
| 16         | 109            | 8     | 8          | 1     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 10         | 59    | 37      |
| 18         | 0              | 0     | 87         | 6     | 11      |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 7              | 4     | 53         | 10    | 0       |
| 22         | 7              | 1     | 16         | 8     | 11      |
| 23         | 54             | 1     | 8          | 0     | 0       |
| 24         | 14             | 42    | 2          | 56    | 0       |
| 25         | 1              | 0     | 22         | 81    | 0       |
| 26         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 28         | 10             | 8     | 26         | 8     | 0       |

**Quadro 17: Ovos com sete dias**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 0              | 0     | 46         | 26    | 0       |
| 2          | 31             | 0     | 82         | 24    | 0       |
| 3          | 60             | 64    | 7          | 2     | 0       |
| 4          | 3              | 1     | 34         | 19    | 0       |
| 5          | 2              | 18    | 34         | 13    | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 0          | 0     | 35      |
| 7          | 0              | 0     | 0          | 0     | 23      |
| 8          | 0              | 0     | 1          | 0     | 52      |
| 9          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 0              | 0     | 76         | 27    | 0       |
| 11         | 17             | 1     | 57         | 11    | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 68         | 0     | 0       |
| 13         | 18             | 5     | 46         | 18    | 0       |
| 14         | 1              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 15         | 1              | 0     | 78         | 48    | 0       |
| 16         | 0              | 0     | 89         | 5     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 35         | 1     | 42      |
| 18         | 0              | 0     | 144        | 6     | 5       |
| 19         | 6              | 1     | 67         | 11    | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 15             | 12    | 21         | 7     | 0       |
| 22         | 11             | 1     | 59         | 5     | 0       |
| 23         | 1              | 1     | 75         | 24    | 0       |
| 24         | 20             | 12    | 58         | 8     | 0       |
| 25         | 119            | 0     | 1          | 0     | 0       |
| 26         | 18             | 3     | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 26             | 29    | 35         | 16    | 0       |
| 28         | 2              | 4     | 1          | 3     | 12      |

**Quadro 18: Ovos com 15 dias**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 2              | 1     | 37         | 14    | 0       |
| 2          | 0              | 0     | 49         | 35    | 2       |
| 3          | 17             | 11    | 85         | 10    | 0       |
| 4          | 7              | 3     | 94         | 15    | 0       |
| 5          | 85             | 1     | 7          | 0     | 0       |
| 6          | 36             | 24    | 8          | 31    | 0       |
| 7          | 0              | 0     | 0          | 0     | 67      |
| 8          | 8              | 0     | 51         | 6     | 0       |
| 9          | 28             | 3     | 83         | 4     | 0       |
| 10         | 4              | 45    | 104        | 7     | 0       |
| 11         | 0              | 0     | 107        | 41    | 0       |
| 12         | 9              | 4     | 32         | 4     | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 39         | 1     | 0       |
| 14         | 0              | 0     | 82         | 13    | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 39         | 5     | 10      |
| 16         | 5              | 10    | 15         | 98    | 0       |
| 17         | 2              | 2     | 103        | 0     | 19      |
| 18         | 43             | 9     | 37         | 5     | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 20         | 22             | 0     | 101        | 1     | 0       |
| 21         | 17             | 2     | 79         | 9     | 43      |
| 22         | 0              | 0     | 45         | 27    | 0       |
| 23         | 0              | 0     | 54         | 2     | 0       |
| 24         | 61             | 10    | 5          | 34    | 0       |
| 25         | 5              | 1     | 97         | 11    | 0       |
| 26         | 58             | 0     | 5          | 0     | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 0          | 0     | 15      |
| 28         | 1              | 6     | 0          | 0     | 0       |

**Quadro 19: Ovos com 30 dias**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 37             | 28    | 41         | 41    | 0       |
| 2          | 0              | 0     | 23         | 4     | 0       |
| 3          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 4          | 2              | 0     | 97         | 0     | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 7          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 8          | 0              | 0     | 145        | 1     | 0       |
| 9          | 0              | 0     | 137        | 71    | 0       |
| 10         | 108            | 8     | 0          | 0     | 0       |
| 11         | 6              | 66    | 29         | 54    | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 31         | 1     | 0       |
| 13         | 5              | 20    | 29         | 2     | 0       |
| 14         | 13             | 68    | 2          | 6     | 0       |
| 15         | 0              | 0     | 86         | 11    | 0       |
| 16         | 105            | 1     | 26         | 2     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 2          | 0     | 27      |
| 18         | 0              | 0     | 66         | 10    | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 62         | 6     | 0       |
| 20         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 21         | 61             | 1     | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 4              | 2     | 62         | 0     | 0       |
| 23         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 24         | 54             | 1     | 8          | 0     | 0       |
| 25         | 0              | 0     | 42         | 20    | 0       |
| 26         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 0          | 0     | 21      |
| 28         | 0              | 0     | 98         | 2     | 0       |

**Quadro 20: Ovos com 90 dias**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       |         |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       | Ovários |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 7              | 12    | 40         | 1     | 0       |
| 2          | 5              | 9     | 44         | 0     | 0       |
| 3          | 109            | 3     | 0          | 0     | 0       |
| 4          | 10             | 11    | 1          | 0     | 0       |
| 5          | 29             | 8     | 9          | 2     | 56      |
| 6          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 7          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 8          | 80             | 3     | 3          | 0     | 0       |
| 9          | 12             | 58    | 29         | 27    | 0       |
| 10         | 0              | 0     | 121        | 5     | 0       |
| 11         | 17             | 30    | 30         | 14    | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 13         | 15             | 5     | 75         | 1     | 0       |
| 14         | 12             | 21    | 48         | 26    | 0       |
| 15         | 78             | 1     | 32         | 1     | 0       |
| 16         | 3              | 116   | 3          | 1     | 0       |
| 17         | 48             | 64    | 35         | 0     | 0       |
| 18         | 26             | 20    | 5          | 12    | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 0     | 42      |
| 20         | 0              | 0     | 79         | 23    | 0       |
| 21         | 0              | 0     | 0          | 0     | 55      |
| 22         | 0              | 0     | 51         | 32    | 0       |
| 23         | 73             | 0     | 31         | 1     | 0       |
| 24         | 22             | 2     | 93         | 1     | 0       |
| 25         | 67             | 0     | 14         | 3     | 0       |
| 26         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 28         | 0              | 2     | 7          | 21    | 39      |



**Quadro 21: Ovos com 180 dias**

| Amostragem | Número de ovos |       |            |       | Ovários |
|------------|----------------|-------|------------|-------|---------|
|            | Controle       |       | Tratamento |       |         |
|            | Água           | Papel | Água       | Papel |         |
| 1          | 2              | 0     | 31         | 48    | 0       |
| 2          | 0              | 0     | 124        | 5     | 0       |
| 3          | 72             | 2     | 58         | 3     | 0       |
| 4          | 136            | 3     | 2          | 1     | 0       |
| 5          | 0              | 0     | 6          | 2     | 0       |
| 6          | 0              | 0     | 0          | 0     | 59      |
| 7          | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 8          | 2              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 9          | 79             | 40    | 0          | 0     | 0       |
| 10         | 5              | 61    | 6          | 20    | 0       |
| 11         | 0              | 0     | 35         | 24    | 0       |
| 12         | 0              | 0     | 1          | 0     | 0       |
| 13         | 0              | 0     | 3          | 2     | 0       |
| 14         | 63             | 59    | 4          | 2     | 0       |
| 15         | 34             | 17    | 22         | 13    | 0       |
| 16         | 60             | 22    | 7          | 4     | 0       |
| 17         | 0              | 0     | 2          | 1     | 0       |
| 18         | 35             | 10    | 32         | 12    | 0       |
| 19         | 0              | 0     | 0          | 4     | 0       |
| 20         | 119            | 4     | 1          | 0     | 3       |
| 21         | 42             | 21    | 0          | 0     | 0       |
| 22         | 0              | 0     | 0          | 0     | 0       |
| 23         | 4              | 2     | 26         | 57    | 0       |
| 24         | 72             | 22    | 0          | 22    | 0       |
| 25         | 93             | 1     | 23         | 0     | 0       |
| 26         | 8              | 1     | 0          | 0     | 0       |
| 27         | 0              | 0     | 13         | 1     | 44      |
| 28         | 0              | 0     | 4          | 20    | 0       |