

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

Tese de Doutorado

**Avaliação de atraentes de oviposição, identificados em
infusões de capim colonião (*Panicum maximum*) para fêmeas
de *Aedes aegypti* (L. 1762) (Diptera: Culicidae) em condições
de semicampo e campo.**

Orientada: **Rosemary Aparecida Roque**

Orientador: Prof. Álvaro Eduardo Eiras

Belo Horizonte – Minas Gerais

Abril – 2007

Rosemary Aparecida Roque

Avaliação de atraentes de oviposição, identificados em infusões de capim colonião (*Panicum maximum*) para fêmeas de *Aedes aegypti* (L. 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de semicampo e campo.

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Álvaro Eduardo Eiras

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS

ABRIL - 2007

Trabalho realizado no Laboratório de Culicídeos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), sob a orientação do Prof. Dr. Álvaro Eduardo Eiras, com auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo N° 350313-1999/7) e Ministério da Saúde.

Agradeço à Coordenação de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, na pessoa do Prof. Dr. Pedro Marcos Linardi, pela oportunidade de complementar meu conhecimento através da experimentação, de permitir meu desenvolvimento em aspectos inerentes à personalidade, intuição e valores humanos, e não apenas no lado profissional, mas nos campos da ética e da moral, por compartilhar comigo o saber e ativar minha capacidade de percepção e equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao meu orientador Prof. Álvaro E. Eiras, pela orientação, apoio e incentivo.

Ao Prof. Ivan Sampaio (Depto de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG) pela ajuda com a estatística.

À Dra. Vanny Ferraz (Depto de Química, Instituto de Ciências Exatas da UFMG) pela ajuda na interpretação dos resultados e revisão dos manuscritos.

À técnica de nível superior Célia José de Sá Sciavicco, pela ajuda na realização das análises cromatográficas.

Ao bolsista Jivago Leite Proti, pelo fornecimento dos insetos utilizados nos experimentos.

Aos estagiários de iniciação científica Felipe Vieira, Liliane Ramos e Isabela Matosinhos pela ajuda na realização dos experimentos em condição de semicampo.

Ao bolsista João Manoel Peixinho de Souza, pelo auxílio durante a instalação das armadilhas em campo e pela ajuda com o Excel.

Ao meu marido Sérgio pelo apoio, incentivo e companheirismo.

À minha filha Laura que renovou as minhas esperanças.

Aos amigos do Laboratório de Culicídeos: Adriana (in memoriam), Andrey, Carla, Claudia, Felipe, Jordana, Kelly, Laila, Madson, Márcia, Maria Cristina, Mateus, Renata e Tatiana pela amizade, carinho, apoio e incentivo.

Muito Obrigada

| SUMÁRIO | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1- INTRODUÇÃO GERAL | 01 |
| 1.1 <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)..... | 01 |
| 1.2 Uso de armadilhas no monitoramento de mosquitos em áreas urbanas..... | 06 |
| 1.2.1 Larvitampas ou pneus-armadilhas | 06 |
| 1.2.2 Armadilha de oviposição (Ovitampa)..... | 07 |
| 1.2.3 Armadilha para captura de adultos (MosquiTRAP®)..... | 08 |
| 1.3 Atraente de oviposição sintético (<i>AtrAedes</i> ®)..... | 12 |
| 2- JUSTIFICATIVA DO PROJETO | 13 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| Capítulo I: Desenvolvimento de metodologia de semicampo: avaliação e calibração de área experimental para testes comportamentais com o mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)..... | 18 |
| I. 1 RESUMO | 19 |
| I. 2 INTRODUÇÃO | 20 |
| I. 3 MATERIAL & MÉTODOS | 22 |
| I.3.1 Criação e manutenção do mosquito <i>Aedes aegypti</i> em laboratório..... | 22 |
| I.3.2 Armadilha para coleta de adultos (MosquiTRAP®)..... | 23 |
| I.3.3 Área Experimental (Semicampo)..... | 24 |
| I.3.4 Experimento 1: Comportamento da pluma de odor..... | 26 |
| I.3.5 Experimento 2: Duração dos experimentos..... | 27 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I.3.6 Experimento 3: Número de fêmeas liberadas por tratamento..... | 29 |
| I.3.7 Experimento 4: Resposta de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> frente as diferentes distribuições das armadilhas MosquiTRAP® no interior gaiolas de teste..... | 30 |
| I.3.8 Análise estatística..... | 31 |
| I. 4 RESULTADOS..... | 31 |
| I.4.1 Dados climáticos..... | 31 |
| I.4.2 Deslocamento da pluma de odor | 33 |
| I.4.3 Duração dos experimentos..... | 34 |
| I.4.4 Número de fêmeas liberadas por tratamento..... | 35 |
| I.4.5 Resposta das fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> frente às diferentes distribuições das armadilhas no interior das gaiolas de teste..... | 37 |
| I. 5 DISCUSSÃO..... | 38 |
| I. 6 CONCLUSÃO..... | 44 |
| | |
| Capítulo II: Comparação da eficiência do AtrAedes® e infusões do capim colonião (<i>Panicum maximum</i>) de diferentes períodos de fermentação, na captura de fêmeas grávidas do mosquito <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de semicampo..... | 45 |
| II. 1 RESUMO..... | 46 |
| II. 2 INTRODUÇÃO..... | 47 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| II. 3 MATERIAL & MÉTODOS | 49 |
| II.3.1 Criação e manutenção de colônia do mosquito <i>Aedes aegypti</i> em laboratório..... | 49 |
| II.3.2 Área experimental..... | 49 |
| II.3.3 Delineamento experimental..... | 49 |
| II.3.4 Fermentação de gramíneas..... | 50 |
| II.3.5 Experimento 1: Avaliação da atratividade da armadilha MosquiTRAP [®] iscadas com atraente de oviposição sintético..... | 51 |
| II.3.6 Experimento 2: Avaliação da atratividade do <i>AtrAedes</i> [®] e infusões de capim colonião de diferentes períodos de fermentação na captura de fêmeas grávidas de <i>A. aegypti</i> | 52 |
| II.3.7 Análise estatística..... | 53 |
| II. 4 RESULTADOS | 53 |
| II.4.1 Avaliação da atratividade da armadilha MosquiTRAP [®] iscadas com atraente de oviposição sintético..... | 54 |
| II.4.2 Avaliação da atratividade do <i>AtrAedes</i> [®] e infusões de capim colonião de diferentes períodos de fermentação na captura de fêmeas grávidas de <i>A. aegypti</i> | 55 |
| II. 5 DISCUSSÃO | 56 |
| II. 6 CONCLUSÕES | 58 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Capítulo III: Formulação e avaliação de atraentes sintéticos de oviposição, identificados em infusões do capim colônia (<i>Panicum maximum</i>) para fêmeas grávidas do mosquito <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Diptera: Culicidae) em condições de campo e semicampo..... | 59 |
| III. 1 RESUMO | 60 |
| III. 2 INTRODUÇÃO | 62 |
| III. 3 MATERIAL & MÉTODOS | 65 |
| III.3.1 Criação e manutenção de colônia do mosquito <i>Aedes aegypti</i> em laboratório..... | 65 |
| III.3.2 Área experimental..... | 65 |
| III.3.2.1 Semicampo..... | 68 |
| III.3.2.2 Área urbana (campo)..... | 65 |
| III.3.3 Delineamento experimental..... | 66 |
| III.3.4 Atraentes sintéticos de oviposição..... | 67 |
| III.3.5 Experimento 1: Resposta das fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> à diferentes concentrações dos atraentes sintéticos de oviposição em condições de semicampo..... | 67 |
| III.3.6 Experimento 2: Comparação da atratividade dos candidatos a atraentes de oviposição para fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo..... | 68 |
| III.3.7 Experimento 3: Desenvolvimento de formulações binárias utilizando atraentes sintéticos de oviposição para o mosquito <i>Aedes aegypti</i> em condições semicampo..... | 69 |
| III.3.8 Experimento 4: Desenvolvimento de formulações terciárias utilizando atraentes sintéticos de oviposição para fêmeas grávidas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> | 70 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.3.9 Experimento 5: Avaliação de compostos sintéticos candidatos à atraente de oviposição de fêmeas grávidas do mosquito <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> em campo..... | 71 |
| III.3.10 Análise estatística..... | 71 |
| III.4 RESULTADOS..... | 72 |
| III.5 DISCUSSÃO..... | 80 |
| III.6 CONCLUSÃO..... | 84 |
| 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 85 |
| 4- PERSPECTIVAS..... | 89 |
| 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 90 |

Introdução geral

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Fêmea adulta do mosquito <i>Aedes aegypti</i> realizando repasto sanguíneo)..... | 01 |
| Figura 2. Armadilha para coleta de larvas (Pneu-armadilha ou Larvitrapa). Depósitos feitos de pneus utilizados no monitoramento do <i>Aedes aegypti</i> em áreas urbanas..... | 07 |
| Figura 3. Armadilha para coleta de ovos (Ovitrapa), utilizada no monitoramento do mosquito <i>Aedes aegypti</i> em áreas urbanas..... | 08 |
| Figura 4. Armadilha para captura de adultos (MosquiTRAP [®]) utilizada nos experimentos de comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo e campo. | 09 |
| Figura 5. Atraente de oviposição sintético utilizado nos experimentos de comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> , em condições de campo e semicampo..... | 12 |
| Figura 6. Fluxograma do projeto de tese..... | 17 |

Capítulo I

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Vista externa da área experimental (semicampo) onde foram realizados os testes de comportamento de oviposição das fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> | 25 |
| Figura 2. Vista interna da área experimental (semicampo). Detalhe das gaiolas de teste onde as fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> foram avaliadas..... | 26 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3. Esquema da área experimental (semicampo) mostrando a disposição das gaiolas de teste e anexos (sala de gravação/ teste e bancada)..... | 26 |
| Figura 4. Comportamento da pluma de odor, ao nível do solo e a 30 cm de altura, em quatro diferentes posições no interior das gaiolas de teste, em condições de semicampo. | 27 |
| Figura 5. Distribuição das armadilhas MosquiTRAP [®] , no interior das gaiolas de teste, durante a realização do experimento para determinação do tempo mínimo de duração dos experimentos..... | 28 |
| Figura 6. Posição das armadilhas para captura de adultos, no interior das gaiolas de teste, durante a realização do experimento de determinação do número de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> liberadas por tratamento..... | 29 |
| Figura 7. Posições longitudinais e transversais de instalação das armadilhas MosquiTRAP [®] no interior das gaiolas de teste (semicampo)..... | 30 |
| Figura 8: Efeito da temperatura e da umidade na captura de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo..... | 32 |
| Figura 9. Deslocamento da pluma de odor, gerada ao nível do solo, em quatro diferentes posições, no interior das gaiolas de teste (semicampo)..... | 34 |
| Figura 10. Avaliação do tempo de captura de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> nas armadilhas MosquiTRAP [®] em condição de semicampo..... | 35 |
| Figura 11. Variação na percentagem de captura de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> nas armadilhas MosquiTRAP [®] , de acordo com o número de fêmeas liberadas, em condições de semicampo..... | 36 |

Capítulo II

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Galões (5L) contendo infusão de capim colonião (<i>Panicum maximum</i>)..... | 50 |
| Figura 2. Distribuição das armadilhas MosquiTRAP® no interior das gaiolas de teste, durante a realização dos experimentos de eficiência do AtrAedes® na captura de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> em condições de semicampo..... | 51 |
| Figura 3. Disposição das armadilhas MosquiTRAP® no interior das gaiolas de teste (semicampo), durante a realização dos experimentos de comparação do AtrAedes® e infusões de capim colonião de diferentes períodos de fermentação na captura de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> | 53 |
| Figura 4. Resposta comportamental das fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> , a MosquiTRAP® iscada com atraente de oviposição sintético, em condições de semicampo..... | 54 |
| Figura 5. Resposta comportamental das fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> a MosquiTRAP® iscadas com infusão de gramínea (<i>Panicum maximum</i>) de diferentes períodos de fermentação em condições de semicampo..... | 55 |

Capítulo III

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Distribuição das armadilhas MosquiTRAP [®] , no interior das gaiolas de teste, durante a realização dos experimentos de resposta comportamental das fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> à diferentes concentrações dos atraentes sintéticos de oviposição em condições de semicampo..... | 66 |
| Figura 2. Resposta comportamental das fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> à diferentes concentrações de atraente de oviposição sintético em condições de semicampo..... | 74 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Percentagem (\pm E.P) de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> capturadas nas armadilhas MosquiTRAP [®] , instaladas em quatro diferentes posições, no interior das gaiolas de teste..... | 38 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

Capítulo III

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Combinações binárias utilizadas nos experimentos de respostas de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> à atraentes sintéticos de oviposição, em condições de semicampo..... | 69 |
| Tabela 2. Combinações terciárias utilizadas nos experimentos de respostas de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> à atraentes sintéticos de oviposição em condições de semicampo..... | 70 |
| Tabela 3. Percentagem de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> , capturadas nas armadilhas MosquiTRAP [®] , iscadas com diferentes concentrações dos atraentes sintéticos de oviposição, em condições de semicampo..... | 73 |
| Tabela 4. Índice de atividade de oviposição, calculado segundo Kramer & Mulla (1979) para as diferentes concentrações dos seis atraentes sintéticos avaliados..... | 76 |
| Tabela 5. Percentagem de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> , capturadas nas armadilhas MosquiTRAP [®] , iscadas com diferentes combinações binárias de atraentes sintéticos de oviposição, em condições de semicampo..... | 77 |
| Tabela 6. Percentagem de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> , capturadas nas armadilhas MosquiTRAP [®] , iscadas com diferentes combinações terciárias de atraentes sintéticos de oviposição, em condições de semicampo | 78 |
| Tabela 7. Média de fêmeas grávidas de <i>Aedes aegypti</i> , capturadas em armadilhas nas armadilhas MosquiTRAP [®] , iscadas com diferentes combinações terciárias de atraentes sintéticos de oviposição, em área urbana | 79 |

1- INTRODUÇÃO GERAL

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

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é um mosquito oriundo do velho mundo, provavelmente da região etiópica (nordeste África), tendo sido originalmente descrito no Egito (Pessoa & Martins 1982, OMS 1987). A espécie foi introduzida no Brasil durante o período colonial, provavelmente durante o tráfico negreiro, por via marítima (OPAS 1992, Consoli & de-Oliveira, 1994). É considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas áreas tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, está sempre associado ao domicílio e peridomicílio humano, embora possa ser encontrado longe dos aglomerados urbanos no velho mundo (Ministério da Saúde, 2007).

Os adultos de *A. aegypti*, apresentam tórax enegrecido, freqüentemente ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateada (Consoli & de-Oliveira, 1994). A principal característica da espécie é uma nítida faixa curva, branco-prateada de cada lado do tórax (mesonoto) e outra mais fina, reta, longitudinal, central, as quais formam a figura de uma lira (OPAS, 1986) (Fig. 1).



Figura 1. Fêmea adulta do mosquito *Aedes aegypti* realizando hematofagia (repasto sangüíneo).

Ambos, machos e fêmeas, se alimentam de solução que contém açúcar ou outras substâncias (néctar de plantas) como fonte de nutrientes. No entanto, as fêmeas desta espécie necessitam das proteínas presentes no sangue do hospedeiro para que ocorra a maturação dos ovos. A digestão do sangue fornecerá os aminoácidos que serão transportados para os ovários e incorporados nos oocistos (Clements, 2000). O repasto sangüíneo ocorre quase sempre durante o dia, nas primeiras horas do período matutino (7:00 e 10:00h) e vespertino (16:00 e 19:00h) (Eiras, 2005; Ministério da Saúde, 2007). Constitui fonte de repasto para as fêmeas de *A. aegypti* a maior parte dos vertebrados, inclusive o homem. No entanto, mostram marcada antropofilia, picando o homem preferencialmente nos pés e nas partes inferiores das pernas (Eiras, 2005). Após a ingestão do sangue, é formada no intestino médio do inseto uma estrutura chamada membrana peritrófica, que é permeável às enzimas proteolíticas secretadas pelas células estomacais e aos produtos da digestão que devem ser absorvidos (Consoli & de-Oliveira, 1994).

Geralmente, a fêmea faz uma postura de ovos após cada repasto sangüíneo. Em cada postura são liberados cerca de 50 a 70 ovos, distribuídos aos poucos em diferentes criadouros. Este tipo de comportamento irá aumentar as chances de sobrevivência dos seus descendentes, garantindo o sucesso reprodutivo e a dispersão do *Aedes* spp (Bentley & Day, 1989). O intervalo médio entre a alimentação sangüínea e a postura é de três dias, em condições adequadas de temperatura (25° C) e umidade relativa (75%) (Eiras, 2005). A oviposição ocorre entre a 9ª a 12ª hora da fotofase e 1ª e 2ª hora da escotofase (Gomes, 2003). A fêmea grávida é atraída por recipientes escuros e sombreados, com superfície áspera (Consoli e de-Oliveira, 1994). A oviposição não é feita diretamente na água, os ovos são depositados isoladamente na superfície (parede) do recipiente, cerca de 1 a 2 cm acima do nível da água (Roberts & Hsi, 1977).

As respostas comportamentais das fêmeas e os processos fisiológicos seguem um padrão, o ciclo gonotrófico (período compreendido entre o repasto sanguíneo e a oviposição) que se inicia com a resposta ao odor do hospedeiro, a alimentação sangüínea, a digestão do sangue ingerido, a formação do lote de oócitos maduros e termina com a oviposição. Dentro de uma hora após ter sido completado o ciclo gonotrófico a fêmea pode iniciar outro (Clements, 2000).

A dispersão do mosquito ocorre, principalmente, de maneira passiva, por via terrestre (rodoviária) e/ou aérea, através de ovos depositados em pneus usados e através de adultos que se abrigam dentro de veículos (ônibus, caminhões, trens, aviões, etc.) que ao saírem de uma região positiva, levam as formas aladas para novas paragens (Eiras, 2005). A capacidade de dispersão do *A. aegypti* pelo vôo (dispersão ativa) é variável, sendo guiada pela busca de sítios de oviposição apropriado (Ministério da Saúde, 2007). Reiter et al. (1995) realizaram um estudo em San Juan, Porto Rico e demonstraram que uma fêmea grávida de *A. aegypti* pode voar até 3 km em busca de local adequado para a oviposição, quando não há recipientes apropriados nas proximidades. Honório et al. (2003) realizaram um estudo de marcação-liberação-recaptura, na cidade de Nova Iguaçu (RJ), em uma área de 1600 metros de diâmetro, para avaliar a capacidade de dispersão do mosquito *A. aegypti* e *Aedes albopictus*. Os autores detectaram ovos marcados com rubídio a mais de 800 metros de distância do local de liberação, também foram encontrados ovos positivamente marcados nas áreas limítrofes da área de estudo, sugerindo que a oviposição também ocorreu além destes limites. Russel et al. (2005) também conduziram um estudo de marcação-liberação-captura para avaliar a dispersão das fêmeas de *A. aegypti* em Cairns (Austrália) e verificaram que 23,1% do total de fêmeas recapturadas estavam a uma distância maior que 100 m do ponto de liberação.

Os criadouros preferenciais das fêmeas de *A. aegypti* são os utensílios artificiais, utilizados pelo homem, como pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos e

vasos de cemitério, além de caixas de água, tonéis, latões e cisternas destampadas ou mal tampadas, ou mesmo os lagos artificiais, piscinas e aquários abandonados. A proliferação do *A. aegypti* ocorre nestes recipientes quando a água acumulada nos mesmos estiver limpa (não turva) e pobre em matéria orgânica em decomposição e em sais, acumulada em locais sombreados com fundo ou paredes escuras (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Quando a fêmea é perturbada, mesmo que suavemente, durante o repasto sanguíneo, ela foge, voltando a atacar o mesmo ou outro hospedeiro até que fique completamente ingurgitada. Dentro de poucos minutos, a fêmea pode ingerir até quatro vezes o seu próprio peso em sangue, adquirindo a quantidade necessária de proteína para a produção de ovos (Clements, 2000). Este comportamento tem grande implicação epidemiológica, uma vez que uma fêmea infectada com o vírus do dengue ou da febre amarela pode ter várias alimentações sanguíneas curtas em diferentes hospedeiros, disseminando desta forma os patógenos (Eiras, 2005).

Outro fator determinante na epidemiologia destas doenças é a resistência dos ovos à dessecação, uma vez que os mesmos podem permanecer viáveis no campo, por mais de um ano (Ministério da Saúde, 2007). Esta resistência é um dos principais obstáculos para o seu controle, pois esta condição permite que o ovo seja transportado por grandes distâncias em ambiente seco. O principal estímulo para a eclosão é o contato com a água ou a submersão nela. Este é o principal motivo da alta população de *A. aegypti* durante o período de chuvas (Eiras, 2005).

O mosquito *A. aegypti* é o principal vetor do vírus da febre amarela urbana e da dengue no Brasil e no mundo (Cheng et al., 1982; OPAS, 1992; Edman et al., 1998). A febre amarela é uma doença febril aguda, de curta duração, com gravidade variável, causada por um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que encontra-se disseminado em países da África e das Américas Central e do Sul. A doença é encontrada sob duas formas: febre amarela silvestre e febre amarela

urbana. A primeira é veiculada em florestas por mosquitos silvestres, dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, que picam animais silvestres susceptíveis, sendo o homem um hospedeiro acidental. A segunda é veiculada nas cidades e vilas de homem para homem, pelo *A. aegypti* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994, Ministério da Saúde, 2007).

A Dengue é uma doença febril aguda de evolução benigna, na maioria dos casos, que se desenvolve em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições do ambiente favorecem o desenvolvimento dos vetores (Ministério da Saúde, 2007). As infecções pelo vírus do dengue causam desde a forma clássica da doença (sintomática ou assintomática), caracterizada por febre alta, dores de cabeça, dor atrás dos olhos, dores musculares e articulares intensas e manchas na pele, até a forma hemorrágica (febre hemorrágica do dengue/FHD), que é mais severa, pois além dos sintomas já citados, é possível ocorrer manifestações hemorrágicas, hepatomegalia, insuficiência cardíaca e ocasionalmente choque, podendo levar à morte. A doença tem como agente etiológico um arbovírus do gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, do qual existem quatro sorotipos: DEN-1; DEN-2; DEN-3 e DEN-4. No Brasil são encontrados três sorotipos, DEN-1, DEN-2 e DEN-3. A infecção por um deles confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros tipos (Ministério da Saúde, 2007). A transmissão do hospedeiro vertebrado para o vetor ocorre quando a fêmea da espécie vetora se contamina ao picar um indivíduo infectado que se encontra na fase virêmica da doença, tornando-se, após um período de 10 a 14 dias, capaz de transmitir o vírus por toda a sua vida, durante a hematofagia, por meio da saliva contaminada.

Atualmente o mosquito transmissor é encontrado nas Américas em uma larga faixa do continente, que se estende desde o Uruguai até o sul dos Estados Unidos, com registros de surtos importantes em vários países como Venezuela, Cuba, Paraguai e Brasil (Ministério da Saúde, 2007).

No Brasil, as condições sócio-ambientais favoráveis à proliferação do *A. aegypti* possibilitaram a dispersão do vetor, desde a sua reintrodução em 1976, bem como o avanço da doença. Essa reinvasão não pode ser controlada com os métodos tradicionalmente empregados (controle químico) no combate às doenças transmitidas por vetores em nosso país e no continente. Estes programas mostraram-se incapazes de conter um vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada e pelos novos hábitos da população (Ministério da Saúde, 2007).

Em 1996, o Ministério da Saúde decidiu rever sua estratégia e propôs o Programa de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa). A implantação do PEAa resultou em um fortalecimento das ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades e ações de prevenção centradas, quase que exclusivamente, nas atividades de combate ao *A. aegypti* com o uso de inseticidas. No entanto, ao longo do processo de implantação desse programa observou-se a inviabilidade técnica de erradicação do mosquito a curto e médio prazo.

1.2) Uso de armadilhas no monitoramento de mosquitos em áreas urbanas

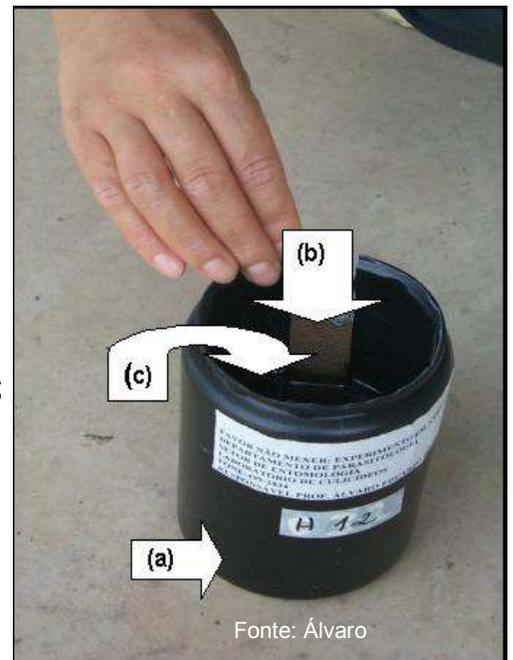
1.2.1) Larvitampas ou pneus-armadilhas: são depósitos feitos de pneus usados, contendo 2/3 de sua capacidade ocupada por água (Fig. 2). Estas armadilhas são instaladas a uma altura aproximada de 80 cm do solo, em locais considerados porta de entrada do vetor adulto, tais como portos fluviais ou marítimos, aeroportos, terminais rodoviários, ferroviários, de cargas etc. A finalidade básica das larvitampas é a detecção precoce de infestações importadas (FUNASA, 2001).



Figura 2. Armadilha para coleta de larvas (Pneu-armadilha ou Larvitampa). Depósitos feitos de pneus utilizados no monitoramento do *Aedes aegypti* em áreas urbanas.

1.2.2) Armadilha de oviposição (Ovitampa): foi inicialmente desenvolvida como uma ferramenta de vigilância epidemiológica nos Estados Unidos, descrita por Fay & Perry (1965) e aperfeiçoada por Fay & Eliason (1966). A armadilha é constituída de um recipiente de cor preta e fosca, com volume variável. Em seu interior é fixado verticalmente um substrato de oviposição (palheta de madeira), com superfície rugosa exposta, para facilitar a postura dos ovos. Água de torneira ou infusão de gramínea (cerca de 300 ml) também é adicionada no interior da armadilha (Fig. 3). A sensibilidade das ovitrampas é determinada pelo número de ovos depositados nas palhetas. Estas armadilhas são extensivamente utilizadas em aeroportos e portos internacionais e rotineiramente usadas em países desenvolvidos. As armadilhas de oviposição fornecem um método mais sensível e econômico para detectar a presença de *A. aegypti*, em situações onde a densidade populacional é baixa (OPAS, 1986, Rawlins et al., 1998; Braga et al., 2000). As ovitrampas também podem ser usadas para monitorar populações de *A. aegypti* em períodos longos, especialmente em estudos epidemiológicos (Marques et al., 1993).

Figura 3. Armadilha para coleta de ovos (Ovitampa), utilizada no monitoramento do mosquito *Aedes aegypti* em áreas urbanas. (a) Armadilha; (b) substrato de oviposição; (c) atraente de oviposição (água ou infusão de gramínea).



1.2.3) Armadilha para captura de adultos (MosquiTRAP®): é uma armadilha específica para a captura de fêmeas grávidas de *Aedes* spp, foi desenvolvida pelo Laboratório de Culicídeos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Eiras, 2002; Favaro et al., 2006; Gomes et al., 2006) (Fig. 4). A MosquiTRAP® possui em seu interior uma cartão adesivo que captura as fêmeas em busca de sítios de oviposição após entrarem em contato com a superfície interna da armadilha. Um atraente sintético de oviposição foi colocado preso ao cartão adesivo, visando aumentar a atratividade da armadilha. Uma das vantagens da armadilha MosquiTRAP® sobre a ovitampa é que a primeira possibilita a identificação do mosquito ainda no campo, agilizando assim, a análise e obtenção dos resultados, uma vez que exclui as etapas de contagem e eclosão dos ovos e posterior identificação das larvas de terceiro e quarto estágio.

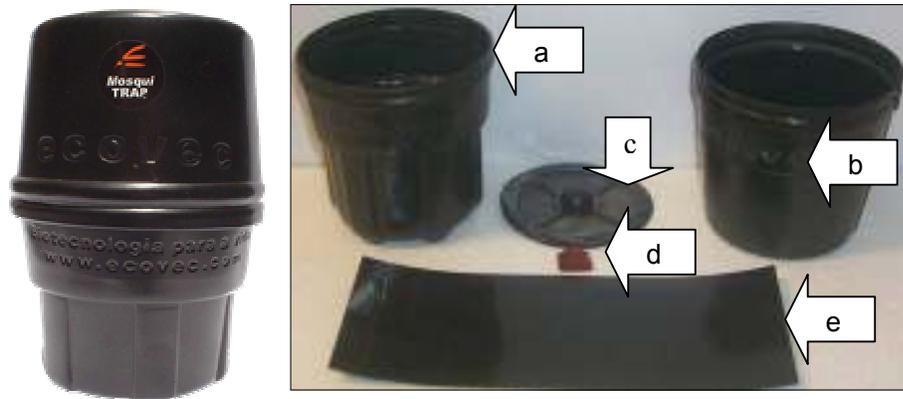


Figura 4. Armadilha para captura de adultos (MosquiTRAP[®]), utilizada nos experimentos de comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em condições de semicampo e campo. (a) parte inferior (bojo); (b) parte superior (tampa); (c) tela de proteção (d) AtrAedes[®] (Atraente de oviposição sintético) e (e) cartão adesivo.

A eficiência desta armadilha na captura de fêmeas grávidas de *Aedes* spp foi avaliada em testes de campo realizados no bairro Itapoã, região da Pampulha, município de Belo Horizonte, no ano de 2002 (Gama, 2005). Verificou-se que apesar da ovitrampa mostrar-se mais sensível na detecção da presença do mosquito *A. aegypti* na área avaliada, a MosquiTRAP[®] mostrou-se mais prática e rápida nas vistorias e na obtenção dos dados, mostrando-se válida para o uso no monitoramento vetorial.

Eiras et al. (2003) também compararam em campo a eficiência da MosquiTRAP[®], da ovitrampa e da pesquisa larvária na detecção de mosquitos *A. aegypti* no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Os autores observaram uma variação de 21,4 a 72,4% e 52,8 a 92,9% nos índices de positividade da MosquiTRAP[®] e da ovitrampa, respectivamente. Também foi observada uma elevada correlação (positiva) entre os índices das duas armadilhas, sugerindo que a armadilha para a captura de adultos também pode ser utilizada como uma ferramenta para detecção de mosquitos *Aedes* spp em programas de monitoramento.

Recentemente, a MosquiTRAP[®] foi comparada com a ovitrampa e o método da pesquisa larvária nas 5 regiões brasileiras, onde dois municípios de cada região foram selecionados, totalizando dez cidades (Manaus, Boa Vista, Fortaleza, Teresina, Natal, Goiânia, Rio de Janeiro, Santos, Foz do Iguaçu e Blumenau) (Eiras, 2006). Um dos objetivos do estudo foi comparar a eficiência da armadilha em diferentes condições de temperatura, precipitação e umidade relativa. O monitoramento foi realizado pela equipe do Laboratório de Culicídeos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais e teve apoio financeiro da Secretária de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde (SVS-MS).

Nos dez municípios avaliados, a MosquiTRAP[®] foi mais sensível (índice de positividade) do que a pesquisa larvária na detecção do vetor *A. aegypti* e menos sensível do que ovitrampa. A ovitrampa apresentou índices de positividade superiores a 75%, sugerindo que esta armadilha é muito sensível e que o seu uso é mais indicado para detectar baixas populações do vetor e não quando a população do vetor já está estabelecida em uma área. No entanto, a MosquiTRAP[®] apresentou vantagens em relação a ovitrampa, uma vez que foi possível obter índices de positividade para diferentes espécies de mosquitos no momento da vistoria da armadilha no campo. Também foi verificado que os índices fornecidos pela MosquiTRAP[®] (índice de densidade de *A. aegypti* e *A. albopictus*) indicavam que a população de fêmeas de *A. aegypti* estava elevada e que se houvesse circulação viral, poderia haver transmissão da doença. Os índices mostrados pela ovitrampa e MosquiTRAP[®] foram diferentes da pesquisa larvária, sugerindo que as duas armadilhas são ferramentas mais sensíveis na detecção do mosquito na fase adulta. Também foi verificado que a precipitação não influenciou a captura de fêmeas na MosquiTRAP[®], porém temperaturas inferiores a 22°C e superiores a 28°C influenciaram negativamente a captura de fêmeas de *A. aegypti*.

Os resultados do estudo multicêntrico, realizado nos 10 municípios mencionados, geraram um relatório técnico à SVS-MS para a validação da tecnologia no Programa Nacional de Controle de Dengue (PNCD) (Eiras et al., 2004; Eiras et al., 2006). O relatório foi avaliado por um comitê técnico-científico que forneceu um parecer favorável à tecnologia MI-Dengue.

Favaro et al. (2006) utilizaram armadilhas MosquiTRAP[®] associadas ao AtrAedes[®] em Mirrassol, São Paulo, para verificar qual o melhor local de instalação da armadilha nas residências (peridomicílio ou domicílio) e verificaram que a armadilha tem a capacidade de capturar um grande número de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, reforçando o seu potencial como uma ferramenta de monitoramento em programas de controle da dengue.

Os municípios de Congonhas (MG), Frutal (MG), Presidente Epitácio (SP) e Vitória (ES) adotaram o uso da MosquiTRAP[®] e do AtrAedes[®] no programa de monitoramento da dengue em área urbana. O município de Vitória (ES) já apresenta queda no número de notificações em relação ao ano de 2006, período em que a metodologia ainda não era utilizada (Ecovec, 2007). A tecnologia de monitoramento do *A. aegypti* utilizando a MosquiTRAP[®] e o AtrAedes[®] será implementada em todas as regionais da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. O teste piloto está sendo realizado na regional oeste, onde a tecnologia já foi implantada (Ecovec, 2007).

1.3) Atraente de oviposição sintético (AtrAedes®)

O AtrAedes® é um atraente de oviposição sintético específico para fêmeas grávidas de *A. aegypti* (Eiras & Sant'Ana, 2001) que estão em busca de sítios de oviposição. Este atraente é constituído pelo nonanal, um dos compostos biologicamente ativos identificados por Sant'Ana (2003) em infusão de capim colônia (*Panicum maximum*) de 15 e 20 dias de período de fermentação. O AtrAedes® é constituído por um polímero que permite a liberação constante e contínua do composto sintético associado (nonanal) (Fig. 5).



Figura 5. Dispositivo de emissão do atraente de oviposição sintético utilizado nos experimentos de comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, em condições de campo e semicampo.

2- JUSTIFICATIVA DO PROJETO

A eficiência da infusão de capim colônia como atraente e/ou estimulante de oviposição para fêmeas grávidas do mosquito *Aedes* spp foi confirmada por Sant'Ana (2003). O autor avaliou em campo a resposta de oviposição do *Aedes* spp em ovitrampas iscadas com infusões de quatro diferentes tipos de gramíneas (*Panicum maximum*, *Cynadon plectosa*, *Cynadon dactylon* e *Pennisetum purpureum*). O autor verificou que as armadilhas de oviposição iscadas com infusões de *P. maximum* capturaram significativamente maior número de ovos quando comparadas com as demais espécies de gramíneas avaliadas. Posteriormente, Sant'Ana (2003) avaliou diferentes períodos de fermentação (1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 30 dias) das infusões de *P. maximum* em e observou que as infusões com período de fermentação de 15 e 20 dias coletaram significativamente maior número de ovos quando comparadas com o controle.

Apesar da eficiência da infusão de *P. maximum* como atraente e/ou estimulante de oviposição para fêmeas grávidas de *A. aegypti*, o seu preparo trazia alguns transtornos como: (a) necessidade de espaço físico para acondicionamento dos galões de fermentação dentro do laboratório, (b) produção de odores desagradáveis no ambiente de trabalho e (c) necessidade de muita mão-de-obra para o monitoramento e troca das infusões das armadilhas no campo.

Visando achar uma solução para os problemas encontrados com o uso de infusões como atraente e/ou estimulante de oviposição do mosquito *Aedes* spp, Sant'Ana (2003) identificou através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/MS) e ao detector eletroantegráfico (CG/EAG) sete compostos (nonanal, decanal, benzotiazol, 3-metil indol, p-cresol, limoneno e indol) provenientes de infusões de 15 e 20 dias de período de fermentação do capim colônia (*P. maximum*). Posteriormente, cada um destes compostos, na sua forma sintética, foi avaliado separadamente em diferentes concentrações, no laboratório por

meio da técnica de eletroantenografia (EAG) e em campo utilizando armadilhas de oviposição (ovitrampas).

A resposta das fêmeas de *Aedes* spp, no campo, para os sete compostos identificados, foi medida pelo número de ovos encontrado no substrato de oviposição (palheta de madeira). No entanto, o uso de armadilhas de oviposição não permite distinguir se um composto é um atraente (resposta à longa distância) ou um estimulante (resposta por contato) de oviposição. Experimentos onde a resposta de oviposição é medida apenas por meio da comparação do número de ovos depositados nas armadilhas avaliam apenas o resultado final (número de ovos depositados) do comportamento de oviposição e não fornece informações sobre os mecanismos de percepção do inseto ou ação do semioquímico avaliado (Isoe et al., 1995). Outra desvantagem deste método é a incapacidade de determinar o número de fêmeas que fizeram a oviposição, já que as fêmeas de *Aedes* spp distribuem seus ovos em mais de um criadouro (Bentley & Day, 1989; Reiter et al., 1995). Devido as fatores acima mencionados, todos os experimentos do presente estudo foram realizados utilizando a armadilha para captura de adultos MosquiTRAP®.

No campo, Sant'Ana (2003) verificou que as armadilhas iscadas com água de torneira e solução de nonanal, indol, 3-metil indol em todas as concentrações avaliadas (10^2 a 10^6 ng/50 μ l solvente) e benzotiazol (10^2 a 10^4 e 10^6 ng/50 μ l solvente) aumentaram significativamente a deposição de ovos de fêmeas *Aedes* spp quando comparadas com o controle (apenas água de torneira). Entretanto, não foi avaliada a resposta das fêmeas grávidas a misturas (combinações) desses compostos candidatos. Esta avaliação é extremamente importante uma vez que Sant'Ana (2003) verificou que as fêmeas de *A. aegypti* detectou a presença destes sete compostos sintéticos em corrente de ar (EAG), sugerindo que eles podem ser atraentes e/ou estimulantes de oviposição. É provável que estes compostos estejam presentes na infusão de *P. maximum* em diferentes concentrações, inclusive podendo atuar em sinergismo entre si, fato que potencializaria a eficiência da isca e conseqüentemente,

o da armadilha. A avaliação destes compostos apresentados em diferentes combinações binárias (dois compostos simultaneamente) e terciárias (três compostos simultaneamente) poderá fornecer informações para a elucidação destas questões e promover um melhor aproveitamento do potencial da armadilha.

O nonanal, um dos sete compostos identificados por Sant'Ana (2003) na infusão do capim colônia, está sendo utilizado na forma sintética (AtrAedes[®]), como atraente de oviposição em armadilhas para captura de fêmeas adultas (MosquiTRAP[®]), em substituição a infusão de gramínea, no monitoramento inteligente do mosquito *A. aegypti*, em áreas urbanas. O desenvolvimento de uma mistura (binária e/ou terciária) contendo os compostos identificados na infusão de *P. maximum* poderá aumentar a eficiência da armadilha e provavelmente contribuir para o sucesso dos programas de monitoramento do inseto vetor em áreas urbanas (Bentley et al., 1979; Millar et al., 1992; Beelher et al., 1994; Alan & Kline, 1995; Du & Millar, 1999).

A tese foi dividida em três capítulos: (1) avaliação da área experimental (semicampo); (2) avaliação do atraente sintético (AtrAedes[®]) e (3) desenvolvimento de nova formulação de atraente sintético. Os resultados obtidos nos capítulos 1 e 2 foram utilizados na execução dos demais testes e serviu de base para o objetivo principal da tese, o desenvolvimento da nova formulação. Um fluxograma foi construído para demonstrar as etapas e os experimentos que foram realizados durante a execução da tese (Fig. 6).

2.1) OBJETIVO GERAL

- Desenvolver uma mistura de atraente de oviposição para fêmeas grávidas de *A. aegypti* utilizando compostos sintéticos identificados na infusão de *P. maximum*, através de combinações binárias e terciárias, visando aumentar a atratividade do AtrAedes[®] e da armadilha para coleta de adultos (MosquiTRAP[®]).

2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar uma área experimental (semicampo), contendo oito gaiolas, para a realização dos testes de comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti*.
- Comparar a eficiência do AtrAedes[®] com infusões de capim colônia de diferentes períodos de fermentação, na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti* em condições de semicampo.
- Avaliar a resposta das fêmeas grávidas de *A. aegypti*, à diferentes concentrações dos atraentes sintéticos (nonanal, decanal, p-cresol, 3-metil indol e indol) de oviposição, em condições de semicampo.
- Desenvolver e avaliar misturas binárias e terciárias dos candidatos a atraentes de oviposição em armadilhas para captura de adultos em condições de campo e semicampo.

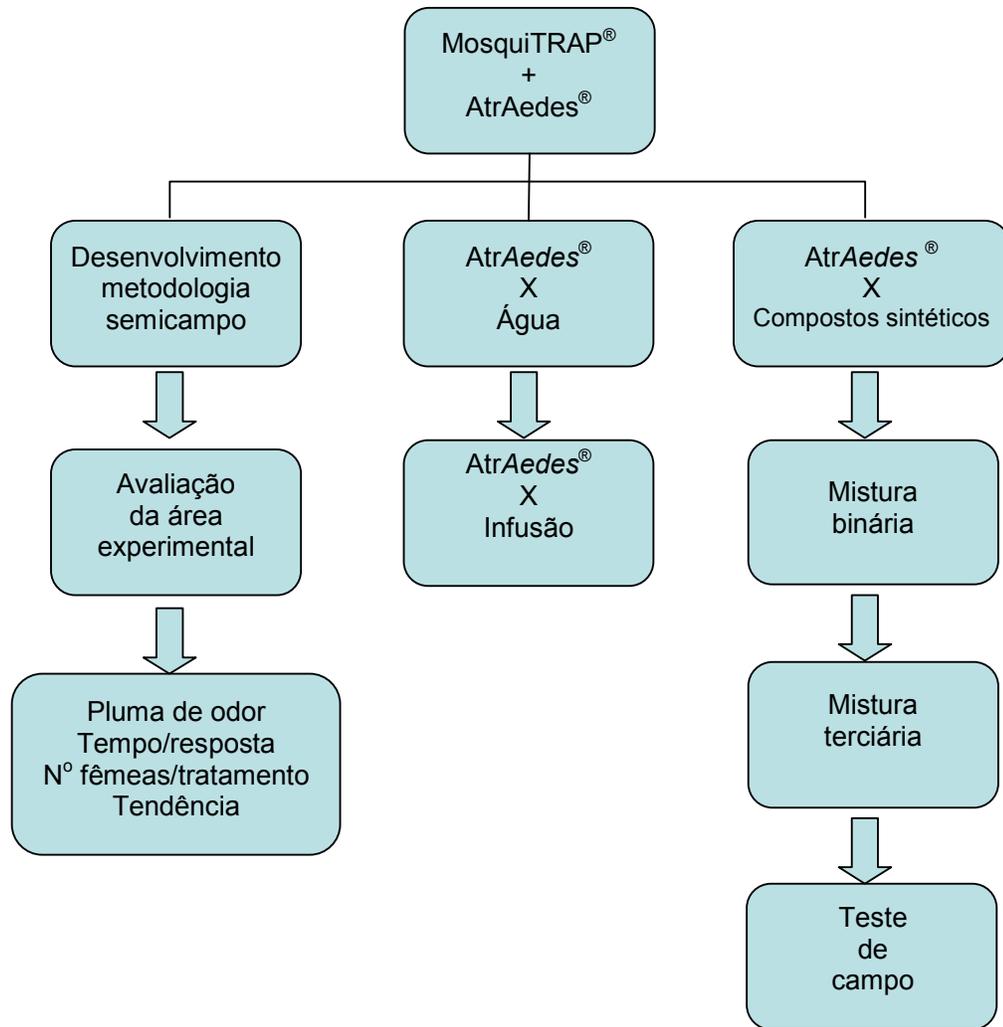


Figura 6. Fluxograma do projeto de tese.

Capítulo I

**Desenvolvimento de metodologia de semicampo: avaliação de área experimental
para testes comportamentais com o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti*
(Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).**

I-1 RESUMO

O mosquito *A. aegypti* não está disponível durante o ano todo em campo para testes comportamentais. Outras dificuldades são verificadas quando os estudos comportamentais para o mosquito *A. aegypti* são realizados em campo: (1) densidade populacional desconhecida; (2) estado fisiológico variável; (3) risco de se contrair o vírus da dengue durante a realização dos experimentos, (4) dificuldades operacionais como excessiva mão-de-obra, transporte, aceitação dos moradores e aprovação do comitê de ética. Devido a estas limitações surgiu a necessidade de desenvolver uma metodologia de semicampo, para a realização de estudos comportamentais do mosquito *A. aegypti*. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma área experimental (14 x 7 x 3,5m), contendo oito gaiolas (2,5 x 2,5 x 2,0m), construídas para a realização de testes comportamentais de oviposição com fêmeas de *Aedes aegypti*. A avaliação consistiu na (1) no estudo do deslocamento da pluma de odor, (2) determinação do tempo de realização dos experimentos, (3) definição do número de fêmeas liberadas em cada repetição e (4) avaliação da resposta das fêmeas frente a quatro diferentes distribuições das armadilhas no interior das gaiolas de teste. Utilizou-se nos testes fêmeas de 3 a 4 dias após repasto sangüíneo e armadilhas para captura de adultos (MosquiTRAP®). Os resultados demonstraram que a direção da pluma de odor variou de acordo com a gaiola avaliada e a posição em que era gerada. Foi verificado que $92,4 \pm 1,52\%$ das fêmeas de *A. aegypti* foram capturadas após duas horas de início dos experimentos, permitindo assim a realização na área experimental de até 32 repetições/dia. A amostragem mínima de fêmeas liberadas por experimento para a realização de análises estatísticas foi limitada a 20 fêmeas por armadilha. Com exceção das gaiolas t3 e 7, não foi observada diferença significativa na resposta comportamental das fêmeas grávidas em relação as diferentes posições de instalação das armadilhas nas gaiolas de teste. O conhecimento destes parâmetros permitiu a padronização dos experimentos e reprodutibilidade dos resultados para estudos de avaliação de atraentes sintéticos de oviposição e desenvolvimento de armadilhas.

I. 2 INTRODUÇÃO

O mosquito *A. aegypti* não está disponível durante o ano todo em campo para testes comportamentais. A sua presença é detectada principalmente na estação chuvosa (verão), durante os meses mais quentes do ano, quando é verificado um aumento populacional. Outras dificuldades são verificadas quando os estudos comportamentais para o mosquito *A. aegypti* são realizados em campo: (1) a população do inseto em estudo é desconhecida; (2) o estado fisiológico dos insetos é bastante variável; (3) há risco de se contrair o vírus da dengue durante a realização dos experimentos, principalmente quando os testes são realizados durante surtos epidêmicos ou em área de risco, onde a densidade populacional do inseto é alta; (4) dificuldades operacionais como excessiva mão-de-obra, necessidade de veículos para deslocamento para as áreas de estudo, aceitação dos moradores e mobilização da comunidade. Devido a estes problemas surgiu a necessidade de desenvolvimento de uma metodologia de experimentação em condições de semicampo, que consiste na utilização de uma área experimental, com características mais próximas às encontradas no ambiente natural, construída ao ar livre (área externa), ou seja, exposta às pequenas variações de temperatura, velocidade do vento e umidade relativa, para a realização dos testes comportamentais para o mosquito *A. aegypti*.

A metodologia de semicampo foi utilizada no oeste do Kenya para estudar a ecologia comportamental do mosquito *Anopheles gambiae*, principal vetor da malária na África. Knols et al. (2002) construíram uma área experimental (semicampo) simulando o ambiente natural do mosquito *A. gambiae*, visando conhecer o comportamento e a ecologia do inseto vetor. Os autores verificaram que é possível fechar o ciclo biológico do vetor (acasalamento, alimentação de açúcar, oviposição e procura do hospedeiro) no interior desta área experimental e que a metodologia de semicampo representa um meio promissor para aumentar a compreensão da ecologia evolutiva e comportamental dos vetores da malária na África, bem como para desenvolver e avaliar novas estratégias de controle.

Seyoum et al. (2002a) utilizaram esta mesma área experimental para avaliar a eficiência de oito diferentes plantas tradicionalmente utilizadas pela comunidade como repelentes do mosquito *A. gambiae*. Os autores verificaram que a metodologia de semicampo é uma alternativa promissora para os testes realizados no campo, uma vez que é possível avaliar um grande número de candidatos a repelentes, em condições muito parecidas com as encontradas no ambiente natural, sem o risco de exposição à doença. Posteriormente, Seyoum et al. (2002b) utilizaram a metodologia de semicampo para avaliar a repelência de nove diferentes espécies de plantas e duas combinações, na forma de pasta, contra o vetor da malária, *A. gambiae*. Estes estudos foram concluídos em menos de um ano enquanto que, em campo, levariam vários anos e estariam limitados a períodos quando a densidade de mosquitos estaria suficientemente alta para garantir resultados significativos.

Okanda et al. (2002) utilizaram a metodologia de semicampo para quantificar determinantes do acasalamento e sucesso reprodutivo de *A. gambiae* criados sob condições seminaturais (expostos ao ar do meio ambiente e às condições meteorológicas, em “screen-walled greenhouse”) e verificaram que os resultados obtidos foram totalmente consistentes com a atual teoria de seleção sexual dos insetos.

Okech et al. (2003) avaliaram a influência da disponibilidade de açúcar e do microclima no interior da área experimental (semicampo) na sobrevivência de *A. gambiae* e observaram resultados similares aos obtidos sob condições de laboratório por outros pesquisadores. Impoinvil et al. (2004) estudaram, em condições de semicampo, a alimentação e sobrevivência do mosquito *A. gambiae* em oito diferentes espécies de plantas que geralmente são cultivadas e/ou crescem na região do Kenya, na ausência de repasto sangüíneo.

Mathenge et al. (2002), em apenas um ano de estudo, modificaram um cortinado em uma armadilha que captura até 70% das fêmeas liberadas. Isto foi possível porque a contínua experimentação garantiu rápido progresso em direção ao

desenvolvimento da armadilha. Njiru et al. (2006) avaliaram a resposta das fêmeas de *A. gambiae* as armadilhas “Counterflow Geometry” (CFG) iscadas com diferentes odores em condições seminaturais (semicampo) no Kenya e verificaram que a metodologia de semicampo oferece a possibilidade de avaliar uma grande variedade de candidatos a caimônios.

Este trabalho teve como objetivo avaliar uma área experimental, contendo oito gaiolas de teste, construída para a realização de testes comportamentais com o mosquito *A. aegypti*. A avaliação consistiu (1) no estudo do deslocamento da pluma de odor geradas em no interior das gaiolas, (2) determinação da duração dos experimentos, (3) determinação do número mínimo de fêmeas liberadas por armadilha para a realização de análise estatística (4) verificar se as fêmeas de *A. aegypti* exibe preferência por alguma das posições de instalação das MosquiTRAP[®] no interior das gaiolas de teste.

I. 3 MATERIAL & MÉTODOS

I.3.1) Criação e manutenção de mosquito *Aedes aegypti* em laboratório:

A colônia de mosquitos *A. aegypti* utilizada nos experimentos é mantida no Laboratório de Culicídeos, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), desde o ano de 2000 e a geração utilizada nos testes foi a F9. Os ovos que deram origem à colônia foram coletados no Campus Pampulha da UFMG (Belo Horizonte, MG), por meio de armadilhas de oviposição (ovitampa). Testes preliminares (RT-PCR) foram realizados pelo Laboratório de Vírus do Depto de Microbiologia da UFMG, para verificar a presença do vírus da dengue nos ovos coletados. Para os testes foi utilizada uma amostra (“pool”) de 50 larvas do 3º e 4º estádios. Utilizou-se em todos os testes insetos pertencentes a nova geração.

A sala de criação foi mantida a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 75 a 80% de umidade relativa (U.R) e 12L:12E de fotoperíodo (Eiras, 1991). Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas (30x30x30cm) com tela fina e alimentados com solução açucarada (10% sacarose). Ratos (*Rattus norvegicus*) anestesiados com 0,6 a 0,8 ml de Tiopental sódico na concentração de 50 mg/ml (1,0 g em 20 ml solução salina isotônica), via peritoneal foram utilizados para o repasto sangüíneo. As larvas foram mantidas em cubas plásticas com água (aproximadamente 5 cm de profundidade) e alimentadas com ração para peixes ornamentais (Goldfish®) até atingirem o estágio de pupa. As pupas coletadas diariamente e transferidas para a gaiola de criação (adultos). Somente fêmeas adultas de 10 a 20 dias de idade cronológica e 3 a 4 dias após repasto sangüíneo (período necessário para a maturação dos ovos) foram utilizadas nos experimentos.

1.3.2) Armadilha para coleta de adultos (MosquiTRAP®):

A armadilha consiste de um recipiente de cor preta e fosca com capacidade aproximada de 1L, 24 cm de profundidade e 14 cm de diâmetro. No interior da armadilha foi colocado (a) um cartão adesivo (38 x 19 cm) preto, onde as fêmeas grávidas de *A. aegypti* ficam aderidas, após contato com a superfície interna da armadilha, (b) uma tela de proteção (12 cm diâmetro) que evita a oviposição da fêmea do mosquito diretamente na água, (c) um atraente sintético de oviposição (AtrAedes®) e (d) água de torneira (500 mL) (Eiras, 2002; Favaro et al., 2006; Gama et al., 2007) (Fig.4, Introdução geral).

1.3.3) Área Experimental (Semicampo):

Uma área de 14 x 7 x 3,5 m foi construída ao ar livre próximo ao prédio do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Campus Pampulha) para a realização dos testes comportamentais do mosquito *A. aegypti* (Figs. 1, 2 e 3). A área experimental possui toda a sua extensão lateral protegida por tela fina (malha 72; 1mm) para evitar a entrada de insetos e/ou impedir que os mosquitos que estão sendo avaliados escapem para a área externa. A tela foi instalada acima do nível do solo, sobre uma parede de alvenaria (37 cm altura) construída ao redor da área experimental. O teto foi coberto com plástico transparente, permitindo o acesso de luz natural no ambiente e evitando assim a entrada de água nos dias de chuva. Um plástico transparente (1 m altura) foi colocado internamente, nas paredes da área experimental, com o objetivo de diminuir a influência das correntes de ar. O piso foi coberto por brita e um termohigrômetro foi colocado no centro da área experimental para que a temperatura e U.R fossem monitoradas continuamente. Uma bancada com prateleiras foi instalada para preparação de material para teste e armazenamento das armadilhas utilizadas nos experimentos. Uma sala contendo, gaiolas de teste, computador, armários e prateleiras, onde é guardado todo o material de gravação, utilizado nos experimentos, também foi construída no interior da área experimental. Três armadilhas BG-TRAP (Maciel-de-Freitas et al., 2006; Kröckel et al., 2006) foram mantidas em diferentes locais no interior da área experimental para capturar os mosquitos que eventualmente escapavam do interior das gaiolas de teste.

Oito gaiolas (2,5 x 2,5 x 2,0 m, cada) foram instaladas no interior da área experimental, permitindo assim a realização de oito experimentos simultaneamente (Figs. 2 e 3). As gaiolas (paredes e teto) foram confeccionadas de tecido (voal) branco. Um zíper foi instalado para facilitar a entrada e saída do experimentador, bem como para impedir que os insetos escapassem. Um vaso de planta (*Spathiphyllum* spp) foi colocado no centro de cada gaiola servindo como local de repouso para os mosquitos

avaliados (Fig. 5, 6 e 7). A área de cada gaiola de teste pode ser aumentada para 5,0 x 2,5 x 2,0 m, isto era possível porque em uma das paredes de cada gaiola foram colocados dois zíperes (um de cada lado) lateralmente. A abertura dos zíperes e o acondicionamento desta parede permitiam o acesso entre as duas gaiolas adjacentes e conseqüentemente a ampliação da área de teste.

Os experimentos foram realizados no período da tarde (13:00 as 15:00h) e foram iniciados sempre que a temperatura no interior da área experimental atingisse no mínimo 25°C e no máximo 38°C e umidade relativa entre 50 a 80% (Knols et al., 2002). Quando a temperatura assumia valores acima de 32°C ou a umidade relativa estava abaixo de 60% o piso era molhado até que as condições de temperatura e U.R atingissem os valores desejados.



Figura 1. Vista externa da área experimental (semicampo), onde foram realizados os testes de comportamento de oviposição das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*.



Figura 2. Vista interna da área experimental (Semicampo). Detalhe das gaiolas de teste onde as fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* foram avaliadas.

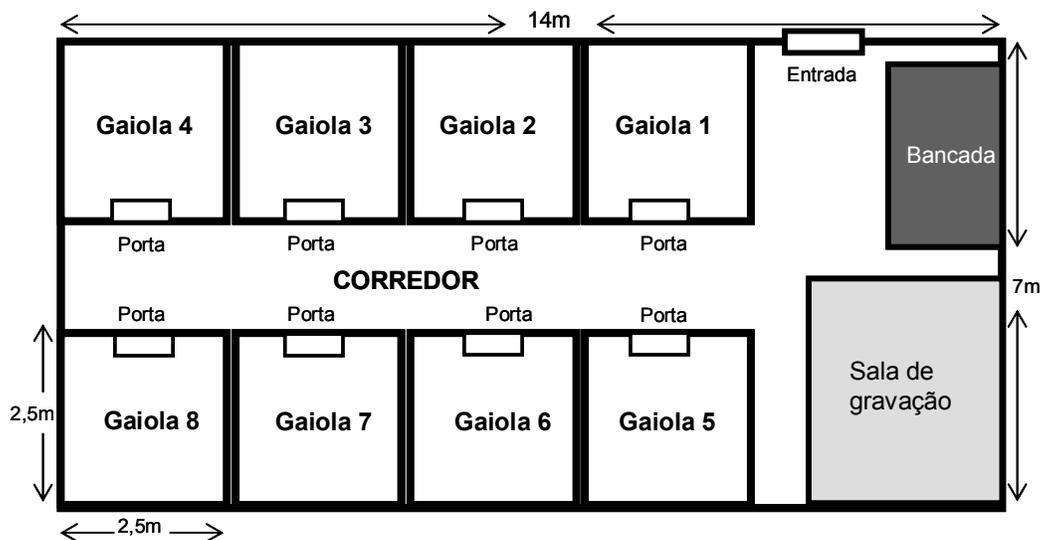


Figura 3. Esquema da área experimental (semicampo) mostrando a disposição das gaiolas de teste e anexos (sala de gravação e bancada).

1.3.4) Experimento 1: Deslocamento da pluma de odor no interior das gaiolas.

Quatro posições (**A**, **B**, **C** e **D**) foram previamente determinadas no interior de cada gaiola de teste para a realização dos experimentos (Fig. 4a e 4b). As plumas de odor formadas foram avaliadas ao nível do solo (Fig. 4a) e a 30 cm de altura, com auxílio de um suporte (Fig. 4b). Recipientes de cor preta e fosca (capacidade 1L, 10 cm diâmetro e 12 cm profundidade) foram colocados em cada posição. A simulação da pluma de odor foi gerada utilizando um chumaço de algodão (5 cm diâmetro)

umedecido em 3-4 gotas de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de amônio (NH₄OH), colocados no interior dos recipientes de cor preta e fosca (Eiras & Jepson, 1991). Cada posição foi avaliada individualmente, sendo que a direção assumida pelas plumas geradas nas diferentes posições foi desenhada em planilha de papel e posteriormente analisada.

A direção do vento no interior da área experimental também foi avaliada. Tiras de papel de seda (2 x 10 cm) foram presas no teto de cada gaiola de teste com auxílio de linha de costura. Portanto, a direção do vento foi determinada pelo deslocamento das tiras quando atingidas pela corrente de ar.

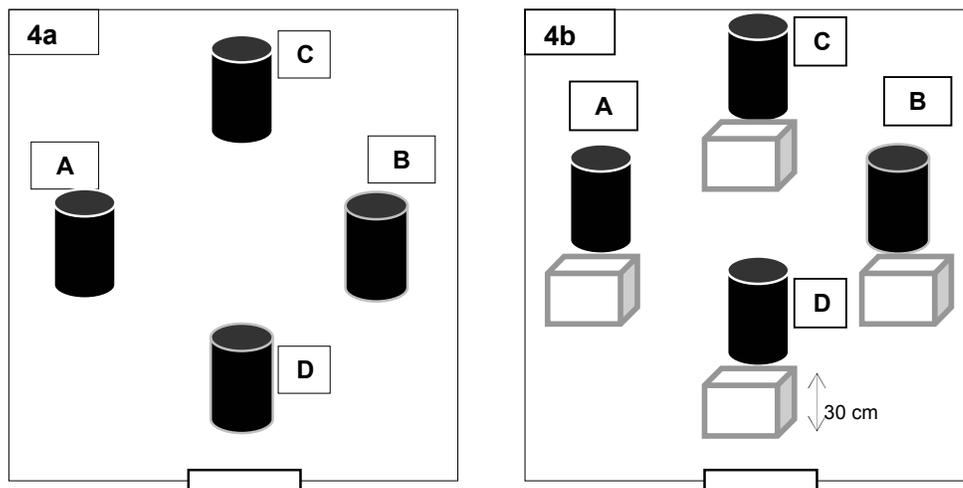


Figura 4. Avaliação da pluma de odor, ao nível do solo (4a) e a 30 cm de altura (4b), em quatro diferentes posições (A, B, C e D) no interior das gaiolas de teste, em condições de semicampo.

I.3.5) Experimento 2: Duração dos experimentos:

Duas armadilhas do tipo MosquiTRAP[®] e dois recipientes de cor preta e fosca (capacidade 1 L, 10 cm diâmetro e 12 cm profundidade) foram colocados ao nível do solo, equidistantes cerca de 1 metro no interior de cada gaiola de teste (Fig. 5). As armadilhas foram iscadas com água de torneira (500 ml) e atraente de oviposição

sintético (AtrAedes®), enquanto que os recipientes de cor preta foram utilizados vazios, considerados apenas como local de repouso. Dez fêmeas grávidas de *A. aegypti* por armadilha foram liberadas em cada repetição. As fêmeas foram mantidas em potes plásticos (250 ml) com tampa telada. Os potes foram colocados ao nível do solo, no centro da gaiola de teste, a tampa foi aberta após a saída do experimentador, com auxílio de um bastão de madeira contendo fita adesiva em uma das extremidades. Após cada período avaliado (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) o experimentador entrava na gaiola e substituía os cartões das duas armadilhas. O número de fêmeas capturadas (presas no cartão adesivo) nas duas armadilhas após cada período foi quantificado e a percentagem de captura (número de fêmeas capturadas/ total de fêmeas liberadas*100) foi calculada para cada tratamento. Foram realizadas. Oito repetições

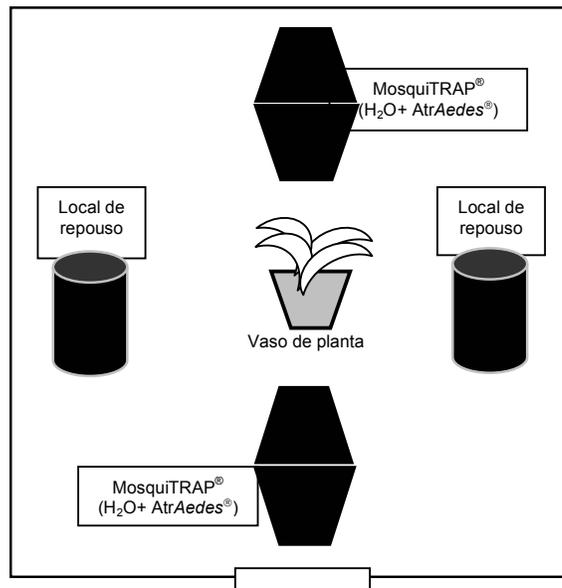


Figura 5. Distribuição das armadilhas MosquiTRAP®, no interior das gaiolas de teste, durante a realização do experimento para determinação do tempo mínimo de duração dos experimentos (N=8).

I.3.6) Experimento 3: Número de fêmeas liberadas por armadilha

O tratamento (tempo de duração) que capturou a maior porcentagem de fêmeas grávidas de *A. aegypti* no experimento 2 foi utilizado neste teste. Quatro armadilhas contendo apenas água de torneira (500 ml) foram colocadas no interior de cada gaiola de teste. Neste experimento, o atraente de oviposição sintético (AtrAedes®) não foi utilizado para evitar saturação (alta concentração do volátil) no interior da gaiola de teste, uma vez que quatro armadilhas foram utilizadas. As armadilhas foram instaladas ao nível do solo, equidistantes cerca de 1m (Fig. 6). O número de fêmeas liberadas/armadilha variou de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 em cada repetição. O local e o modo de liberação das fêmeas foi análogo ao utilizado no experimento 2. Dezesesseis repetições foram realizadas para cada tratamento. O delineamento estatístico utilizado foi blocos inteiramente casualizados.

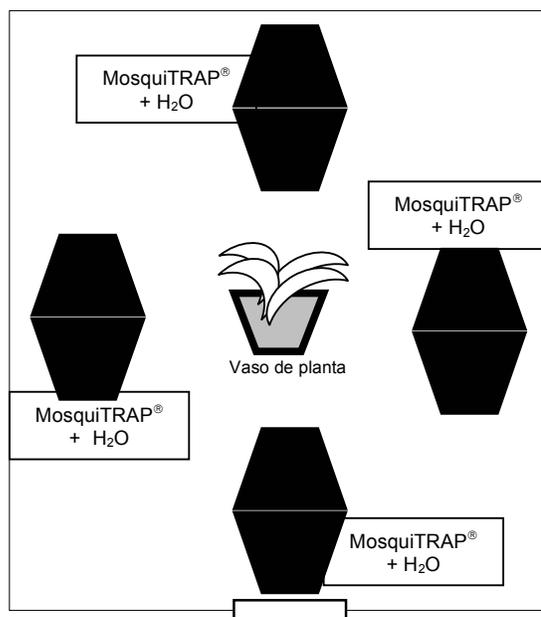


Figura 6. Posição das armadilhas para captura de adultos, no interior das gaiolas de teste, durante a realização do experimento de determinação do número de fêmeas de *Aedes aegypti* liberadas por armadilha (N=16).

1.3.7) Experimento 4: Resposta de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* frente as diferentes distribuições das armadilhas MosquiTRAP® no interior da gaiola de teste.

O número de fêmeas liberadas neste teste foi aquele que obteve melhor resposta no experimento anterior. Quatro posições (duas longitudinais e duas transversais) foram avaliadas separadamente, no interior de cada gaiola de teste. As posições transversais foram chamadas de **A** e **B** (Fig. 7a) e as longitudinais de **C** e **D** (Fig. 7b). Armadilhas MosquiTRAP® iscadas com AtrAedes® e 500 ml de água de torneira foram utilizadas em todas as repetições e foram instaladas ao nível do solo, equidistantes cerca de 1 m. Recipientes de cor preta e fosca também foram utilizados como local de repouso. O local e o modo de liberação das fêmeas foi análogo ao utilizado no experimento 2. Cinco repetições foram realizadas para cada tratamento (posição **A** e **B** / **C** e **D**) (Fig. 7).

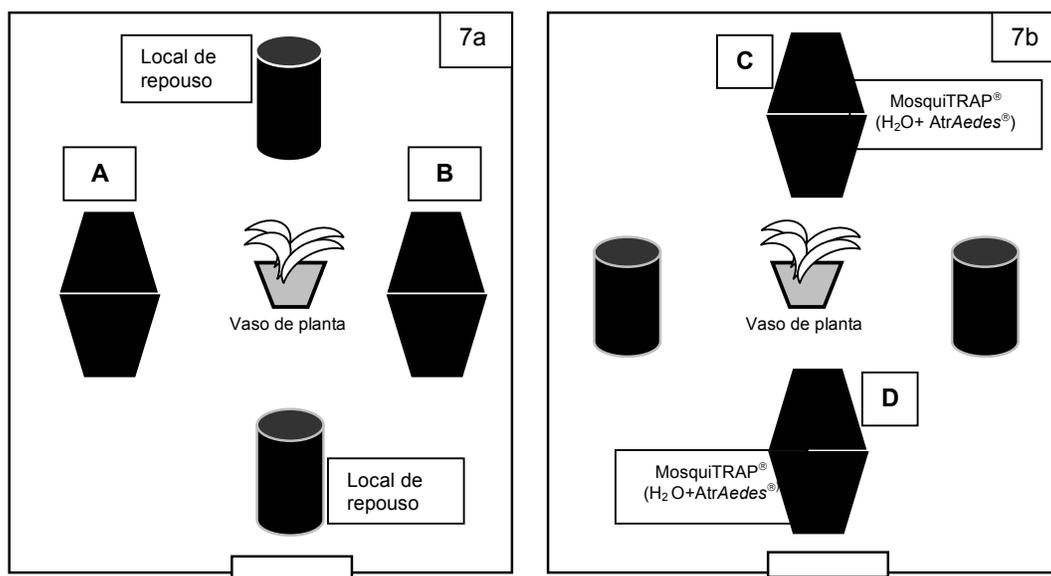


Figura 7. Posições transversais (7a) e longitudinais (7b) de instalação das armadilhas MosquiTRAP® no interior das gaiolas de teste (semicampo) (N=5).

I.3.8) Análise estatística

Os dados (percentagem de fêmeas capturadas) sofreram transformação (arcoseno) e foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov a 5% de probabilidade. Os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas a posteriori pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Foi utilizado Teste t de Student para comparação de médias, quando apenas dois tratamentos foram avaliados. Dados cuja distribuição não era normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis, sendo as médias comparadas utilizando-se o teste de Mann Whitney ($\alpha= 5\%$). A influência da temperatura e da U.R foi calculada na captura das fêmeas grávidas de *A. aegypti* por meio de regressão linear.

I. 4 RESULTADOS

I.4.1 Dados climáticos

A temperatura e a U.R no interior da área experimental foram registradas no início e no término dos experimentos. A influência da umidade relativa e da temperatura na percentagem de fêmeas grávidas capturadas foi avaliada. A média de fêmeas capturadas foi de 91,3% (34,3% mínima e 100% máxima). Não foi observada correlação significativa entre a temperatura ou a U.R na captura de fêmeas grávidas no interior da área experimental, ($r^2= 0,083$ e $r^2= 0,060$ respectivamente) (Fig. 8a e 8b). No entanto, correlação negativa foi verificada entre a temperatura e a umidade relativa ($r^2= 0,624$) (Fig. 8c). Foram analisados 969 dados (valores) de temperatura e umidade relativa. A temperatura mínima observada foi de 20°C e a máxima 38,5° C (média 29,38° C). O valor mínimo para U.R foi 49% e o máximo 100% (média 70,71%).

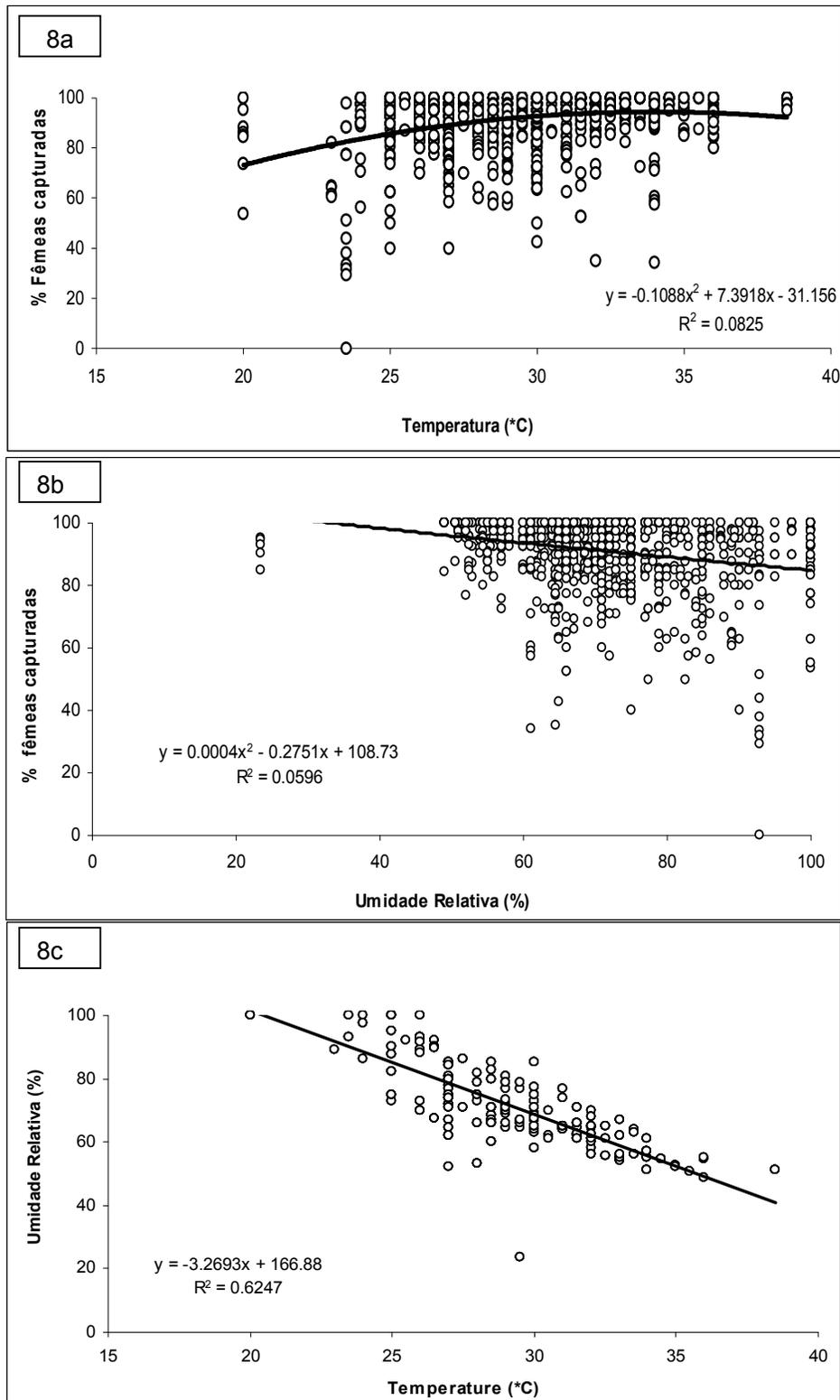


Figura 8: Efeito da temperatura e da umidade relativa na captura de fêmeas grávidas de *Aedes aegyti* em condições de semicampo.

1.4.2) Avaliação da pluma de odor

A direção assumida pelas plumas geradas nas quatro posições, no interior das gaiolas de teste, estão representadas na Figura 9.

Observou-se que na área experimental havia três correntes de ar: (1) entrava pela parede lateral da área (lado da porta) para o interior das gaiolas de 1 a 4; (2) entrava pela parede lateral da área (lado oposto à entrada) para o interior das gaiolas de 5 a 8 e (3) lateralmente, percorria no sentido da bancada para as gaiolas 1 a 4. As gaiolas de 5 a 8 não estavam expostas a terceira corrente de ar porque havia uma barreira física (parede da sala de gravação) protegendo estas gaiolas. Estas três correntes de ar, observadas na área experimental, provavelmente foram as responsáveis pelo deslocamento das plumas formadas nas diferentes posições no interior das gaiolas de teste. A influência das correntes de ar no deslocamento das plumas de odor foi confirmada pela observação das tiras de papel de seda, presas ao teto das gaiolas de teste, que se moviam na mesma direção da corrente de ar.

Quando as armadilhas foram colocadas no solo, os testes de fumaça demonstraram que existem pequenas oscilações nos formatos e direções das plumas de odor entre as gaiolas de teste. No geral, as plumas se movimentaram no interior das gaiolas e em algumas as plumas se direcionam para o centro da gaiola, local onde os mosquitos são liberados para os testes comportamentais. Por exemplo, plumas geradas nas quatro posições avaliadas (**A**, **B**, **C** e **D**) na gaiola 8 mantiveram-se no interior da gaiola de teste e se dirigiram para o local de liberação das fêmeas (centro da gaiola) (fig. 9). As exceções foram as gaiolas 3 e 7 onde as plumas se comportaram de maneira diferentes das demais gaiolas. Por exemplo, a pluma produzida na posição **A** dirigia-se para a gaiola ao lado (gaiola 4) enquanto que pluma da posição **C** deslocava-se para fora da área experimental (fig. 9).

Quando as plumas foram avaliadas a 30 cm de altura, verificou-se um comportamento bastante similar ao observado no solo em relação à direção de

deslocamento da pluma. No entanto, a dispersão foi mais rápida e atingiu distâncias maiores das que foram observadas quando a pluma era formada ao nível do solo. Baseado nestas observações decidiu-se que o local de colocação das armadilhas nos experimentos seria no solo.

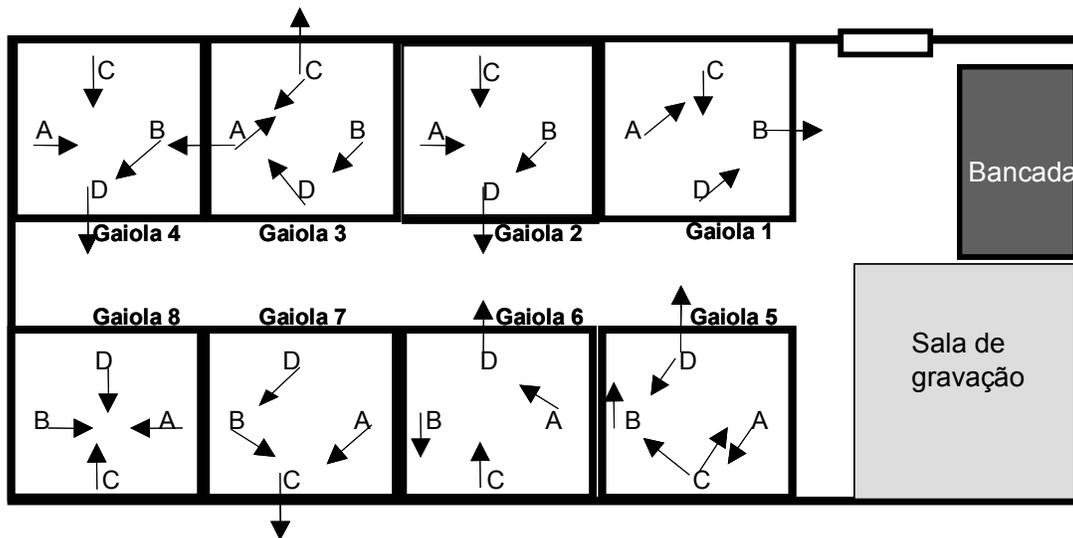


Figura 9. Deslocamento da pluma de odor, gerada ao nível do solo, em quatro diferentes posições (A, B, C e D) no interior das gaiolas de teste. As setas indicam a direção assumida pela pluma de odor gerada em cada posição.

1.4.3) Duração dos experimentos

Foi verificada influência do tempo de realização do experimento na proporção de captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, ou seja, aumentando o tempo de duração do experimento, aumentava-se também a percentagem de fêmeas presas no interior das armadilhas. (Fig. 10).

Diferença significativa foi observada para os seguintes tempos de duração: (1) 30 minutos quando comparado com os demais tratamentos ($p=0,001$, Mann Whitney, $gl=7$), (2) 60 e 90 minutos quando comparados com 30, 120, 150 e 180 minutos ($p=0,018$, Mann Whitney, $gl=7$). Não foram observadas variações significativas na percentagem de fêmeas capturadas quando o tempo de duração dos experimentos foi

superior a duas horas, não havendo diferenças nas capturas entre os tempos 120, 150 e 180 minutos ($p>0,05$) (Fig. 10). Baseado nestes resultados foi fixado em duas horas o tempo mínimo de duração dos experimentos subseqüentes. A temperatura e a umidade relativa observada neste experimento foram $28,5 \pm 0,19$ °C e $70 \pm 0,00\%$ respectivamente.

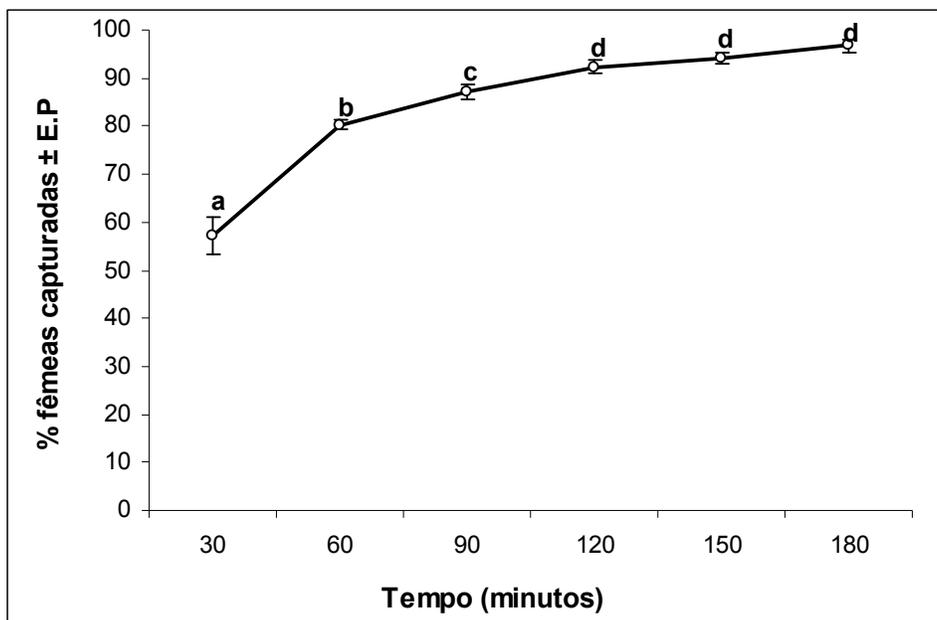


Figura 10. Avaliação do tempo de captura de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* nas armadilhas para captura de adulto, em condição de semicampo (N=8). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$, Mann Whitney).

1.4.4) Número de fêmeas liberadas por armadilha

Os resultados demonstraram que o número de fêmeas liberadas possui influência na variação (desvio padrão) da porcentagem de fêmeas grávidas capturadas pelas quatro armadilhas. Foi verificado que o aumento do número de fêmeas liberadas levou a uma diminuição da variação da porcentagem de fêmeas capturadas entre as armadilhas, o que fornece maior confiabilidade aos resultados. Não foi observada diferença significativa quando 5, 10 e 15 fêmeas/armadilha foram utilizadas. No

entanto, diferença significativa foi verificada quando 20 fêmeas/armadilha foram liberadas, quando comparado com 5 e 10 fêmeas/armadilha. Uma vez que não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) quando 20, 25 e 30 fêmeas foram liberadas (Fig.11), ficou determinado utilizar 20 fêmeas/armadilha nos experimentos subseqüentes. A variação da temperatura e da umidade relativa observada neste experimento foram $28,0 \pm 0,24$ °C e $67,1 \pm 1,91\%$, respectivamente.

Os Coeficientes de Variação (CV) (desvio padrão/média*100) obtidos para 5, 10, 15, 20, 25 e 30 fêmeas liberadas por armadilha foram 78,38, 42,56, 18,26, 12,13, 9,37 e 6,73%, respectivamente. O mesmo perfil observado para os desvios padrão também foi verificado para os CV, que tiveram os seus valores diminuídos à medida que o número de fêmeas/armadilha foi aumentado (Fig.11).

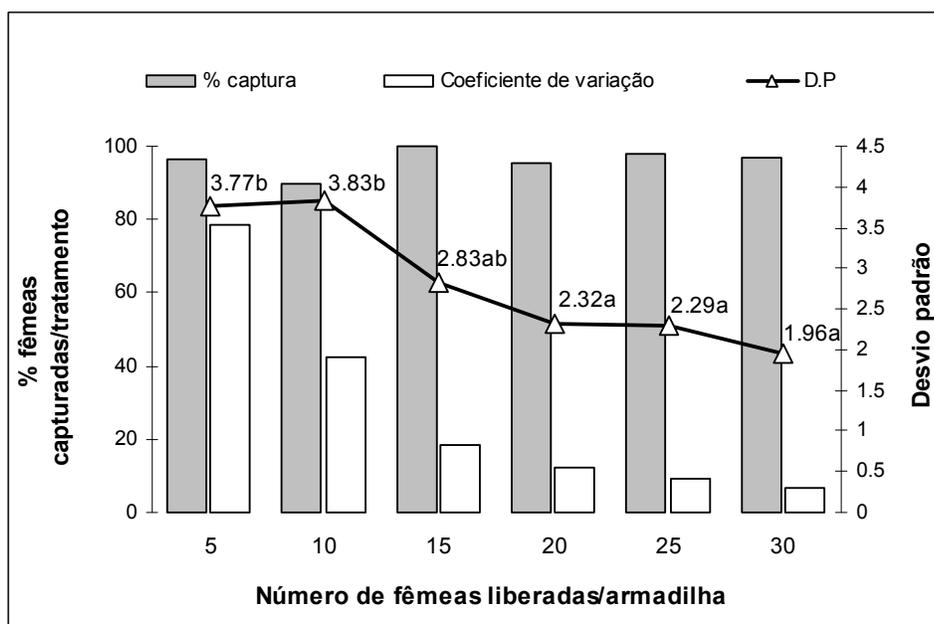


Figura 11. Variação na porcentagem de captura de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* na armadilha MosquiTRAP® de acordo com o número de fêmeas liberadas, em condições de semicampo. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$, Anova).

I.4.5) Resposta das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* frente às diferentes distribuições das armadilhas no interior das gaiolas de teste.

Não foram observadas tendências variáveis na resposta das fêmeas grávidas de *A. aegypti* nas quatro posições avaliadas nas gaiolas N° 1, 2, 4, 5, 6 e 8. As MosquiTRAPs® instaladas nas quatro diferentes posições capturaram percentagens semelhantes de fêmeas grávidas ($p > 0,05$, teste t de Student) (Tab.1). No entanto, nas gaiolas N° 3 e 7 foi verificado que a armadilha colocada na posição **C** capturou significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas quando comparado com a MosquiTRAP® da posição **D** ($p = 0,049$ e $P = 0,016$, respectivamente). Não foram observadas mudanças significativas nas repostas das fêmeas de *A. aegypti*, nestas duas gaiolas, quando as posições transversais (**A** e **B**) foram comparadas (Tab. 1).

Devido aos resultados obtidos neste experimento ficou estabelecido que nas gaiolas 3 e 7 seriam utilizadas apenas as posições **A** e **B**, uma vez que diferenças nas repostas das fêmeas de *A. aegypti* não foram verificadas nestas posições.

A temperatura e a umidade observada no interior da área experimental (semicampo) durante a realização destes experimentos foi $25,9 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e $68,86 \pm 0,87\%$, respectivamente.

Tabela 1. Percentagem (\pm E.P) de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* capturadas nas armadilhas MosquiTRAP[®], instaladas em quatro diferentes posições, no interior das gaiolas de teste (N=5).

| GAIOLAS No. | POSIÇÕES AVALIADAS | | | | | |
|----------------|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|---|----------|
| | <u>A</u> | X | <u>B</u> | <u>C</u> | X | <u>D</u> |
| 1 | 41,6 \pm 4,52 | 39,0 \pm 4,26 | 46,5 \pm 5,70 | 34,6 \pm 5,12 | | |
| 2 | 38,5 \pm 4,26 | 41,9 \pm 4,60 | 52,7 \pm 5,73 | 36,8 \pm 5,23 | | |
| 3 | 48,2 \pm 6,05 | 29,3 \pm 5,50 | 51,8 \pm 5,86 | 24,1 \pm 4,18 * | | |
| 4 | 41,6 \pm 3,52 | 32,0 \pm 5,72 | 40,4 \pm 3,36 | 37,7 \pm 3,31 | | |
| 5 | 42,0 \pm 3,33 | 45,5 \pm 6,01 | 43,8 \pm 3,28 | 41,7 \pm 5,12 | | |
| 6 | 41,1 \pm 4,23 | 42,1 \pm 4,22 | 35,5 \pm 0,94 | 42,0 \pm 1,66 | | |
| 7 | 33,6 \pm 5,36 | 46,7 \pm 7,80 | 52,7 \pm 4,68 | 34,5 \pm 3,63* | | |
| 8 | 38,0 \pm 4,66 | 38,4 \pm 4,85 | 46,6 \pm 1,74 | 34,3 \pm 3,43 | | |

* indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste t de Student).

I. 5 DISCUSSÃO

Fatores ambientais como temperatura, umidade relativa, luminosidade e vento, podem influenciar o comportamento de oviposição dos mosquitos (Bentley & Day, 1989; Consoli & De-Oliveira, 1994; Clements, 2000). A variação destes fatores pode acarretar uma interpretação errada dos resultados, onde o que está sendo avaliado não é apenas o tratamento em questão e sim a soma do tratamento e das condições a que o inseto está submetido. Assegurar homogeneidade de condições durante a realização de experimentos é essencial porque permite que todos os tratamentos sejam submetidos às mesmas variáveis e garante que outros fatores não interfiram na resposta do inseto avaliado.

Knols et al. (2002) monitoraram a temperatura e a umidade relativa em três diferentes alturas (0,5, 1,5 e 2,5 m) no interior de uma área experimental (condições de semicampo), construída no oeste do Kenya, para avaliação de testes comportamentais do mosquito *A. gambiae*, durante dois períodos distintos (estação seca fria e quente). Os autores encontraram valores médios de temperatura e U.R similares aos obtidos no presente trabalho. A temperatura média foi de 22,5°C (19,0 - 24,3°C) durante a estação seca/fria e 24,0°C (20,0 - 29,8°C) na estação seca/quente. Enquanto que para a U.R os valores médios foram 63,5 e 69,3% a 1,5 e 2,5 metros de altura, respectivamente. Impoinvil et al. (2004) também registraram em condições de semicampo, valores médios de temperatura ($24,6 \pm 3,1^{\circ}\text{C}$) e de U.R.A ($64,1 \pm 8,8\%$) muito similares aos utilizados no presente trabalho. Okech et al. (2003) compararam durante um período de uma semana, as condições climáticas em condições de semicampo com as obtidas no ambiente natural e não encontraram diferenças significativas entre os valores médios de temperatura e U.R obtidos nos dois ambientes.

A turbulência do ar tem grande influência na dispersão de plumas de odor formada a partir de uma fonte (Geier et al., 1999, Eiras & Mafra-Neto, 2001). O conhecimento do deslocamento da pluma de odor na área de teste assegurará que o inseto analisado seja exposto ao estímulo avaliado e consiga localizar a fonte de odor atrativo. Se o odor avaliado é disperso para fora da área de teste, o inseto não será capaz de localizar a fonte de odor, uma vez que o mesmo encontra-se em área confinada e não detectará o estímulo. Esta ausência de resposta pode ser interpretada de modo errado, levando o pesquisador a deduzir que o estímulo não é atrativo para a espécie avaliada. Por outro lado o deslocamento da pluma para determinada direção poderá favorecer um dos tratamentos avaliados em detrimento do(s) outro(s), gerando erros na interpretação da resposta do inseto.

No presente estudo verificou-se que a área experimental estava exposta basicamente a três diferentes correntes de ar. Duas delas atingiam a área experimental lateralmente (uma à direita e a outra à esquerda) e a terceira frontalmente, em direção às gaiolas 1 a 4. As gaiolas 5 a 8 não estavam expostas a esta terceira corrente de ar porque havia uma barreira física (parede da sala de gravação/teste) protegendo-as. Estas três correntes de ar, observadas na área experimental, provavelmente foram as responsáveis pelo deslocamento das plumas formadas nas diferentes posições no interior das gaiolas de teste. Outra evidência da influência da ação das correntes de ar no deslocamento das plumas de odor foi verificada pela observação das tiras de papel de seda presas ao teto das gaiolas de teste. Foi verificado que nas gaiolas 1 a 4 as tiras suspensas deslocavam para a esquerda (direção oposta à entrada da área experimental) enquanto que nas gaiolas 5 a 8 o deslocamento era para a direita (mesma direção da porta), evidenciando desta forma, a influência das correntes de ar no deslocamento das plumas formadas no interior das gaiolas que se moviam na mesma direção da corrente de ar.

A influência das correntes de ar e da posição de instalação das armadilhas na resposta de fêmeas grávidas de *A. aegypti* também foi avaliada neste trabalho. Verificou-se que o deslocamento da pluma gerada nas posições **B** (gaiola 1), **D** (gaiola 2, 4, 5 e 6) e **A** (gaiola 3) para o exterior da gaiola avaliada aparentemente não interferiu na atratividade para as fêmeas de *A. aegypti*, uma vez que não foi observada diferença significativa entre a percentagem de fêmeas capturadas nestas armadilhas e nos seus pares (posição **A**, **C** e **B**, respectivamente). No entanto, para as gaiolas 3 e 7, onde foi verificado deslocamento da pluma gerada na posição **C** para a área externa (fora da área experimental) observou-se que a pluma de odor provavelmente possui influência sobre a atratividade da armadilha, já que as armadilhas MosquiTRAP® instaladas nesta posição capturaram significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas, quando comparadas com aquelas instaladas na

posição **D**. Este aumento de atratividade das armadilhas pode ter ocorrido devido ao deslocamento da pluma gerada na posição **A** para esta direção, fazendo com que a armadilha instalada na posição **C** tivesse seu efeito atrativo potencializado. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que nas gaiolas 3 e 7 as posições **C** e **D** não devem ser usadas para avaliação das respostas comportamentais das fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Apenas as posições **A** e **B** podem ser utilizadas, já que respostas significativamente diferentes não foram observadas nestas posições. Para as demais gaiolas avaliadas (1, 2, 4, 5, 6, e 8) as quatro posições poderiam ser utilizadas, já que não foi observada diferença significativa entre a percentagem de fêmeas capturadas nas diferentes posições.

Conhecer o tempo necessário para que a fêmea grávida responda a um tratamento em condições de semicampo é uma informação valiosa porque (1) reduz o período de duração dos experimentos (2) permite determinar o número de repetições que podem ser realizadas diariamente, sem correr o risco de perda da reprodutibilidade e significância dos resultados. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que as fêmeas avaliadas necessitam de tempos diferentes para localizar e se deslocarem até a fonte de odor atrativo, uma vez que percentagens de capturas bastante distintas foram observadas entre os tempos de 30, 60 e 120 minutos. Os resultados também demonstraram que, após duas horas de experimento, mais de 90% das fêmeas foram capturadas no interior das armadilhas. Uma vez que não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de 120, 150 e 180 minutos, foi determinado que duas horas seria o tempo adequado para a realização dos testes de comportamento no interior da área experimental. Estes resultados são muito importantes, visto que torna possível a realização de até quatro experimentos por dia/gaiola, totalizando 32 repetições/dia, (nas condições de temperatura e U.R avaliadas) além de garantir maior agilidade na realização dos experimentos e rapidez na obtenção dos resultados.

Seyoum et al. (2002a) conduziram experimentos em condições de semicampo para avaliar a capacidade repelente de diferentes espécies de plantas locais contra o mosquito *A. gambiae* e para determinar o melhor método de aplicação (expulsão térmica ou queima direta). O período de realização destes experimentos foi de quatro horas (20:00 até 24:00hs). Nestes experimentos, um voluntário era mantido no interior da área experimental, servindo como isca humana. Testes preliminares poderiam ter sido conduzidos para determinar o tempo necessário para que os mosquitos avaliados respondessem ao tratamento, evitando desta forma transtornos para o voluntário que ficou sentado no escuro, durante longo período até o término dos experimentos. Mathengue et al. (2002) desenvolveram, em condições de semicampo, uma armadilha específica para o mosquito *A. gambiae*. Os experimentos foram realizados durante um período de cerca de oito horas (22:00 às 06:15h e 20:00 às 4:00h) exigindo que os voluntários permanecessem a noite inteira no interior da área experimental.

Quando se avaliou a proporção ideal de fêmeas liberadas por armadilha, verificou-se uma relação de dependência inversamente proporcional, onde o aumento do número de fêmeas liberadas levou a diminuição do desvio padrão da percentagem de captura. Os CVs calculados também demonstraram redução no percentual de variação a medida que o número de fêmeas liberadas era aumentado. O CV mede o percentual de variação de uma resposta, ou seja, a diferença entre a percentagem de fêmeas capturadas em cada tratamento. O percentual de variação das respostas em mosquitos é bastante alto, atingindo até 60% (Ivan Sampaio, comunicação pessoal). Quando cinco fêmeas por armadilha foram liberadas, observou-se um desvio padrão bastante alto e um CV acima da média (3,77 e 78,38%, respectivamente), indicando que houve uma variação de cerca de 78% na percentagem de fêmeas capturadas entre as quatro armadilhas avaliadas. Liberando este número de fêmeas, dificilmente seria detectada diferença significativa entre os tratamentos, uma vez que os altos valores dos desvios iriam mascarar a resposta (preferência por determinado

tratamento) das fêmeas grávidas avaliadas. Neste caso, comete-se um erro tipo II, onde existe diferença significativa entre os tratamentos, porém esta diferença não foi detectada pelo teste estatístico. No entanto, à medida que o número de fêmeas liberadas foi aumentado, ocorreu uma redução no valor do desvio padrão e do CV, diminuindo desta forma a variação entre as respostas obtidas e conseqüentemente possibilitando a identificação de diferença significativa entre os tratamentos avaliados, quando esta diferença realmente existir.

A metodologia de semicampo oferece condições intermediárias entre laboratório e campo, uma vez que os testes comportamentais são realizados utilizando insetos criados e mantidos em laboratório, portanto, com idade e estado fisiológico conhecido. No entanto, são avaliados em condições mais próximas das encontradas no ambiente natural, uma vez que a temperatura, a U.R e outras variáveis não são controladas. Utilizando esta metodologia é possível a realização de até quatro repetições/dia por gaiola, visto que a execução dos experimentos não está condicionada a curtos períodos de tempo, onde a densidade populacional é alta, como ocorre nos testes realizados no campo. O emprego da metodologia de semicampo possibilita agilidade, praticidade e rapidez na obtenção dos resultados. Estes ambientes estão expostos à influência da direção e velocidade do vento, garantindo a dispersão dos odores avaliados. A circulação de ar no ambiente dissipa os voláteis, portanto evita a impregnação do local com o cheiro das substâncias avaliadas, eliminando a etapa de ventilação e/ou exaustão, como ocorre em bioensaios realizados em laboratório.

O uso de um número conhecido de insetos em cada repetição e o conhecimento do estado fisiológico (idade cronológica, período pós-repasto), diminui a variação na resposta dos mosquitos e permite avaliação de grupos mais homogêneos. Os insetos usados nos experimentos são criados em laboratório, portanto estão livres de infecção, excluindo desta forma, o risco de contrair doença quando insetos vetores

são utilizados. A metodologia de semicampo também oferece economia com mão-de-obra e pode ser utilizada para diferentes finalidades, como avaliação de armadilhas e desenvolvimento de atraentes.

I. 6 CONCLUSÃO

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, temperatura 25 a 32°C e umidade relativa 50 a 80%, concluiu-se que:

- A metodologia de semicampo pode ser utilizada para avaliação de protótipos de armadilhas, desenvolvimento de atraentes (oviposição e/ou para fêmeas de *A. aegypti* em busca de hospedeiro para o repasto sanguíneo) bem como na avaliação de liberadores de odor.
- O semicampo permite a realização de até 32 repetições/dia, garantindo maior rapidez na obtenção dos resultados e a possibilidade de realização de experimentos durante quase todo o ano.
- No mínimo, vinte fêmeas de *A. aegypti* por armadilhas devem ser liberadas em cada repetição para que possa ser detectada diferença significativa pelo teste estatístico, quando existir.
- O tempo mínimo para realização dos experimentos foi estabelecido em duas horas, período necessário para que cerca de 90% das fêmeas liberadas sejam capturadas.
- As quatro posições (**A**, **B**, **C** e **D**) de instalação das armadilhas podem ser utilizadas nas gaiolas 1, 2, 4, 5, 6 e 8.
- Nas gaiolas 3 e 7 apenas duas posições (**A** e **B**) podem ser utilizadas, devido à variações significativas na resposta das fêmeas grávidas observada nestas posições.

Capítulo II

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO *AtrAedes*[®] E DE INFUSÕES DO CAPIM COLONIÃO (*Panicum maximum*) DE DIFERENTES PERÍODOS DE FERMENTAÇÃO, NA CAPTURA DE FÊMEAS GRÁVIDAS DO MOSQUITO *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)(DIPTERA: CULICIDAE) EM CONDIÇÕES DE SEMICAMPO.

II.1 RESUMO

A armadilha para captura de adultos, MosquiTRAP[®], é uma nova ferramenta que está sendo utilizada associada a um sistema de monitoramento informatizado, denominado Monitoramento Inteligente da Dengue (MI-Dengue). A adição de um atraente sintético de oviposição (AtrAedes[®]), potencializa o efeito da mesma, aumentando a atratividade das armadilhas e conseqüentemente a captura de maior número de insetos. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência do AtrAedes[®] e infusões do capim colônia (*Panicum maximum*) (Jacq.) de diferentes períodos de fermentação (5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias) na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti* em condições de semicampo. Os experimentos foram realizados em uma área experimental (14 x 7 x 3,5m) contendo oito gaiolas de teste (2,5 x 2,5 x 2,0m). Vinte fêmeas por tratamento, com idade cronológica de 10 a 20 dias e 3 a 4 dias após repasto sanguíneo foram liberadas no interior de cada gaiola. Os resultados demonstraram que o AtrAedes[®] capturou significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas do que o controle (água de torneira) ($p=0,007$). Quando comparado com armadilhas iscadas com infusões de capim colônia de 10, 15, 20, 30 e 45 dias de período de fermentação, verificou-se que as armadilhas contendo AtrAedes[®] capturaram percentagem semelhante de fêmeas grávidas ($p>0,05$). O atraente sintético de oviposição demonstrou ser significativamente mais eficiente na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti* do que a água e infusões de capim colônia de cinco e 60 dias de período de fermentação ($p<0,05$). O AtrAedes[®] mostrou-se tão e/ou mais atrativo que as infusões de capim colônia de diferentes períodos de fermentação, portanto poderá ser utilizado como isca nas armadilhas de oviposição, em substituição ao atraente natural (infusões de capim colônia), reduzindo assim a mão-de-obra no preparo das infusões.

II. 2 INTRODUÇÃO

Os fatores responsáveis pela atração de fêmeas grávidas à longa distância são constituídos por estímulos visuais (cor), físicos (temperatura, umidade) e químicos (odores) que auxiliam as fêmeas na localização dos sítios de oviposição. Os atraentes químicos orientam as fêmeas grávidas em direção à fonte de odor (Clements, 2000). Os estimulantes de oviposição são substâncias que induzem a oviposição, sendo responsáveis pela resposta à curta distância (resposta por contato) (Isoe et al., 1995).

Infusões de diferentes matérias orgânicas como película de arroz (Ikeshoji et al., 1963), folhas de carvalho (Trexler et al., 1998), gramíneas (Gjullin et al., 1965; Reiter et al., 1991; Chadee et al., 1993; Allan & Kline, 1995; Isoe et al., 1995; Rawlins et al., 1998; Roque, 2002; Sant'Ana, 2003; Sant'Ana et al., 2006) e esterco (Krammer & Mulla, 1979), têm sido utilizadas como atraentes e/ou estimulantes de oviposição para diferentes espécies de mosquitos.

A atratividade destas infusões é devida à atividade dos microorganismos nelas presentes (Kramer & Mulla, 1979). O metabolismo destes microorganismos produz e libera voláteis que atraem e/ou estimulam fêmeas grávidas para a oviposição. Estas infusões são utilizadas como iscas, em armadilhas de oviposição, aumentando a atratividade das mesmas (Rawlins et al., 1998; Trexler et al., 1998; Mboera et al., 2000; Roque, 2002; Sant'Ana, 2003; Sant'Ana et al., 2006).

Sant'Ana et al. (2006) avaliaram em campo a resposta de fêmeas grávidas de *A. aegypti* em ovitrampas iscadas com infusões de quatro tipos de gramíneas (*Panicum maximum*, *Cynadon dactylon*, *Cynadon plectosa* e *Pennissetum purpureum*). Os autores verificaram que as armadilhas iscadas com infusão de *P. maximum* coletaram significativamente maior número de ovos quando comparado com as demais infusões (*C. dactylon*, *C. plectosa* e *P. purpureum*), demonstrando a eficácia de infusões desta espécie de gramínea na atratividade de fêmeas em busca de sítios de oviposição. Posteriormente os autores avaliaram a resposta das fêmeas grávidas

de *A. aegypti* a infusões de capim colonião de diferentes períodos de fermentação. Foi verificado que as armadilhas iscadas com infusões com 15 e 20 dias de período de fermentação coletaram significativamente maior número de ovos quando comparado com os demais tratamentos. Por meio da técnica de cromatografia gasosa (CG) acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e ao detector eletroantenografico (CG-EAG), bem como testes de campo, sete compostos biologicamente ativos para fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram identificados nas infusões de 15 e 20 dias de período de fermentação. Testes comportamentais demonstraram atividade atraente para o nonanal, um dos compostos sintéticos avaliados (Eiras & Sant'Ana, 2001). A atratividade deste composto para fêmeas grávidas de *A. aegypti* foi comprovada em testes de campo utilizando-se armadilhas de oviposição (ovitampa) (Sant'Ana, 2003). No referido trabalho foi verificado que a adição do composto sintético à água presente no interior da ovitampa aumentava a deposição de ovos por fêmeas de *A. aegypti*. A atratividade, no entanto, foi inferior àquela observada em ovitampas iscadas com infusão de capim colonião de 15 e 20 dias de período de fermentação (Sant'Ana, 2003). Experimentos posteriores conduziram à produção de um liberador adequado para o atraente sintético que foi então denominado AtrAedes®.

Posteriormente ao AtrAedes®, foi desenvolvida uma nova armadilha específica para a captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, denominada MosquiTRAP® (descrita no capítulo I). A armadilha foi desenvolvida a partir de testes de comportamento de oviposição realizados em laboratório por Gomes (2003). Filmagens foram realizadas para observar o comportamento das fêmeas grávidas de *A. aegypti* no momento em que entravam no criadouro. Gomes (2003) verificou que 91% fêmeas que visitaram o criadouro pousavam na superfície interna (parede) do recipiente. Baseado nestas observações foi colocado um cartão adesivo no interior da armadilha, onde as fêmeas grávidas de *A. aegypti* ficam aderidas após contato com a superfície interna da armadilha.

Neste trabalho objetivou-se comparar a eficiência do AtrAedes® e infusões de capim coloniã de diferentes períodos de fermentação, na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, em condições de semicampo.

II.3 MATERIAL & MÉTODOS

II.3.1) Criação e manutenção do mosquito *Aedes aegypti* em laboratório.

As fêmeas grávidas de *A. aegypti* utilizadas neste estudo foram criadas e mantidas no insetário do Laboratório de Culicídeos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A metodologia de criação e manutenção destes insetos em laboratório está descrita no capítulo I.

II.3.2) Área experimental.

Os experimentos de comportamento de oviposição das fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram conduzidos em condições de semicampo, sob condições naturais de temperatura e umidade relativa em uma área experimental (14 x 7 x 3,5m) contendo oito gaiolas (2,5 x 2,5 x 2,0m) de teste (descrita no capítulo I).

II.3.3) Delineamento experimental.

Vinte fêmeas grávidas de *A. aegypti* por armadilha foram liberadas no interior de cada gaiola de teste. As fêmeas foram mantidas em potes (250 ml) plásticos com tampa telada. Os potes foram colocados ao nível do solo, no centro da gaiola de teste, a tampa do pote foi aberta após a saída do experimentador da gaiola, com auxílio de bastão de madeira contendo fita adesiva em uma de suas extremidades. Duas armadilhas (tratamento e controle) para captura de adultos (MosquiTRAP®) e dois recipientes de cor preto fosco (capacidade 1 L, 10 cm diâmetro e 12 cm profundidade) foram instalados ao nível do solo, equidistantes cerca de 1,0 m, permanecendo no

interior da gaiola durante um período de duas horas. Os recipientes de cor preta estavam vazios e foram utilizados apenas como local de repouso. Um vaso de planta (*Spathiphyllum* sp) foi colocado no centro da gaiola de teste, servindo também como local de repouso (Fig. 2 e 3). A resposta de oviposição das fêmeas grávidas de *A. aegypti* foi avaliada através da comparação direta entre o grupo tratado, contendo água ou infusão de capim colonião de diferentes períodos de fermentação versus o grupo controle (AtrAedes®).

II.3.4) Fermentação de gramíneas.

Amostras de 42,5 g de folhas frescas do capim colonião (*P. maximum*) foram cortadas em pedaços de aproximadamente cinco centímetros e colocadas para fermentar em galões plásticos individuais hermeticamente fechados, contendo 5 litros de água de torneira, em sala climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Sant'Ana, 2003; Sant'Ana et al., 2006; Roque, 2002) (Fig. 1).



Fonte: Álvaro Eiras

Figura 1. Galões (5L) contendo infusão de capim colonião (*Panicum maximum*).

II.3.5) Experimento 1: Avaliação da atratividade da armadilha MosquiTRAP®

iscada com atraente de oviposição sintético.

A atratividade das armadilhas MosquiTRAP® iscadas com atraente de oviposição sintético AtrAedes® foram comparadas com aquelas contendo apenas 500 ml de água de torneira (controle). Sete repetições foram realizadas. Em cada repetição foram liberadas 20 fêmeas/armadilha grávidas de *A. aegypti*, totalizando 280 fêmeas. Após duas horas de início dos testes as fêmeas capturadas nas armadilhas foram contadas e a porcentagem de fêmeas capturadas em cada armadilha foi calculada. Para estes testes foram utilizadas as gaiolas de N° 1 a 7 e as posições utilizadas foram **A** e **B** (gaiolas 1, 3, 5 e 7) e **C** e **D** (gaiolas 2, 4 e 6). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. (Fig. 2).

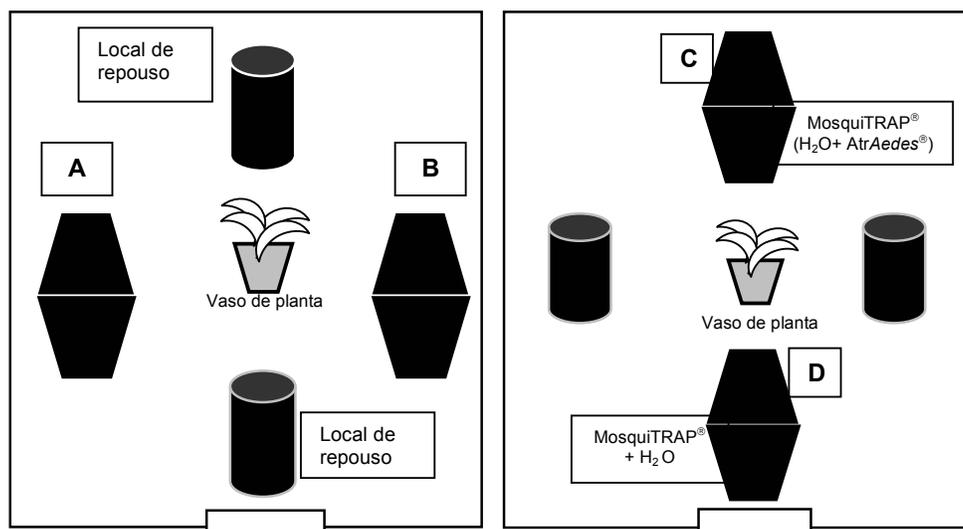


Figura 2. Distribuição das armadilhas MosquiTRAP® no interior das gaiolas de teste, durante a realização dos experimentos de eficiência do AtrAedes® na captura de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em condições de semicampo (N=7).

II.3.6) Experimento 2: Avaliação da atratividade do AtrAedes® e infusões de capim colonião de diferentes períodos de fermentação na captura de fêmeas grávidas de Aedes aegypti.

Folhas frescas do capim *P. maximum*, colhidas na véspera do preparo das infusões, foram colocadas para fermentar em diferentes datas, resultando em diferentes períodos de fermentação (5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias), possibilitando que os diferentes tratamentos fossem testados simultaneamente. As infusões foram coadas, diluídas a 10% v/v (Roque, 2002; Sant'Ana, 2003; Sant'Ana et al., 2006) e colocadas no interior das MosquiTRAP®.

Duas armadilhas (teste e controle) por gaiola foram utilizadas em cada repetição. Para o controle foi utilizado uma armadilha MosquiTRAP® contendo 500 ml de água de torneira e AtrAedes®, enquanto que as armadilhas teste receberam 500 ml de infusão de diferentes períodos de fermentação (Fig. 3). Os experimentos foram do tipo dupla escolha, sendo a resposta das fêmeas medida pela porcentagem de fêmeas grávidas capturadas em cada armadilha. Foram realizadas seis réplicas para cada período de fermentação testado. Em cada repetição foram liberadas 20 fêmeas grávidas de *A. aegypti*, por armadilha, totalizando 280 fêmeas. Para estes testes foram utilizadas as gaiolas de N°1 a 7, as posições utilizadas foram **A** e **B** (gaiolas 1, 3, 5 e 7) e **C** e **D** (gaiolas 2, 4 e 6). A posição de instalação das armadilhas teste e controle foi alternada em cada repetição. O delineamento experimental foi blocos inteiramente casualizados.

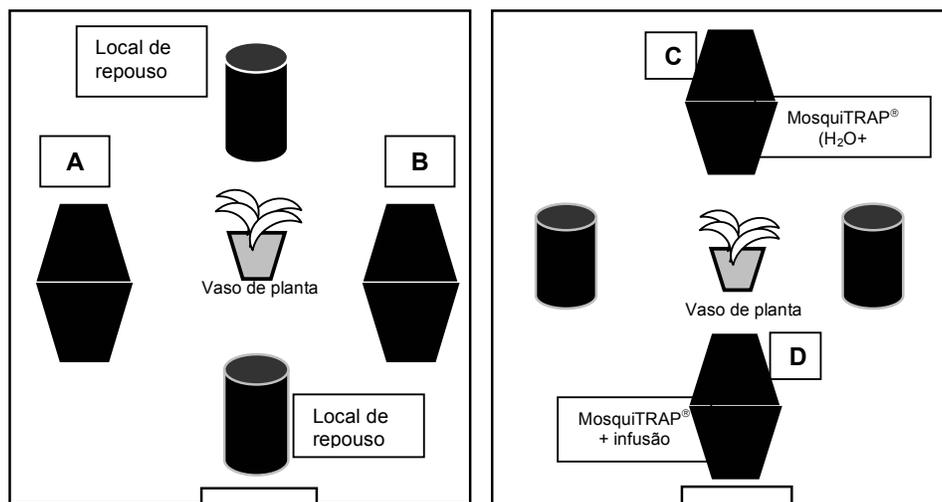


Figura 3. Disposição das armadilhas MosquiTRAP® no interior das gaiolas de teste (semicampo), durante a realização dos experimentos de comparação do *AtrAedes*® e infusões de capim colonião de diferentes períodos de fermentação na captura de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* (N=6).

II.3.7) Análise estatística.

Os dados (percentagem de fêmeas capturadas) passaram por tratamento estatístico (transformação arcoseno) e foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Quando a sua distribuição foi normal, as médias foram comparadas utilizando o teste t de Student, ao nível de significância de 5%. Quando a distribuição não foi normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney.

II. 4 RESULTADOS

II. 4 .1) Avaliação da atratividade da armadilha MosquiTRAP® iscadas com atraente de oviposição sintético (AtrAedes®).

Os resultados demonstraram que as armadilhas iscadas com o atraente de oviposição sintético capturaram significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas de *A. aegypti* quando comparadas com as controle (água de torneira) ($P=0,007$), sugerindo que o atraente sintético de oviposição aumenta a atratividade das armadilhas MosquiTRAP® para fêmeas em busca de sítio de oviposição (Fig. 4).

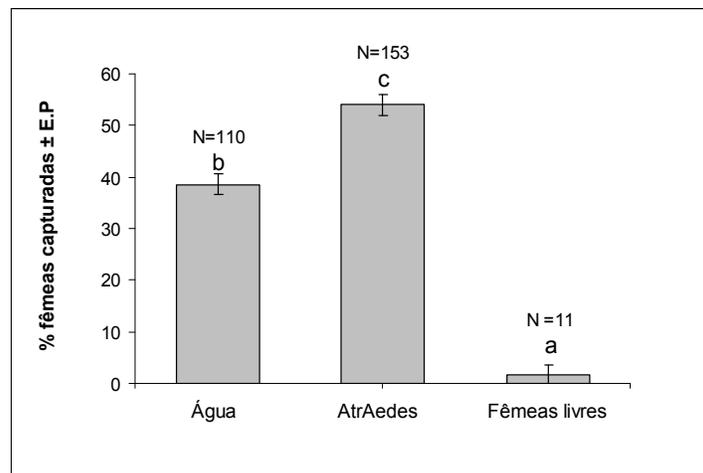


Figura 4. Resposta comportamental das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, às armadilhas MosquiTRAP® iscadas com atraente de oviposição sintético em condições de semicampo (N=7). Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey, $p=0,007$).

II. 4. 2) Avaliação da atratividade do AtrAedes® e infusões de capim colônia de diferentes períodos de fermentação na captura de fêmeas grávidas de A. aegypti.

Para os experimentos de avaliação da atratividade de infusões de capim colônia de diferentes períodos de fermentação, não foi verificada diferença significativa entre a percentagem de fêmeas grávidas capturadas nas armadilhas iscadas com infusões de 10, 15, 20, 30 e 45 dias de período de fermentação e naquelas iscadas com atraente sintético de oviposição ($P>0,05$) (Fig. 5). No entanto, as armadilhas MosquiTRAP® iscadas com infusão de 5 e 60 dias de período de fermentação, capturaram significativamente menor percentagem de fêmeas grávidas do que o seu respectivo controle (AtrAedes®) ($p=0,010$ e $p=0,009$, respectivamente) (Fig. 5).

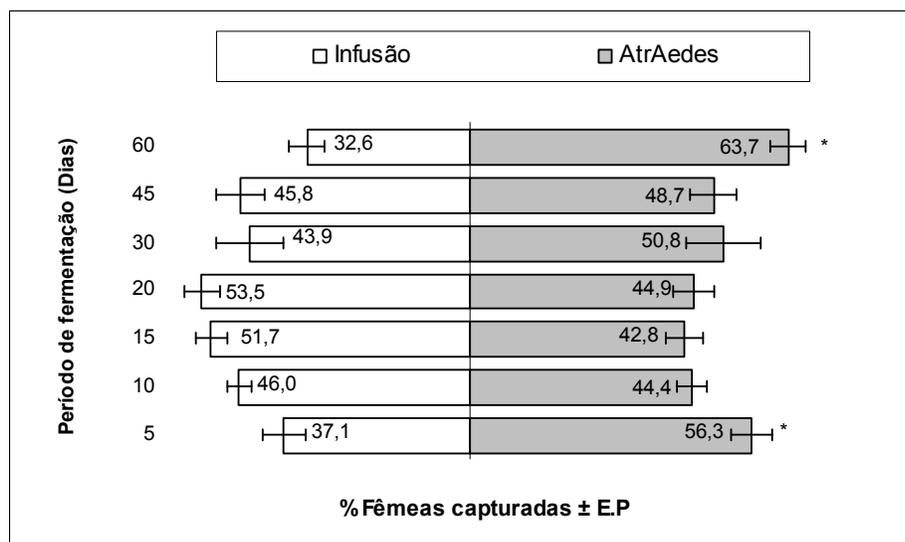


Figura 5. Resposta comportamental das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* às armadilhas MosquiTRAP® iscadas com infusão de gramínea (*Panicum maximum*) de diferentes períodos de fermentação em condições de semicampo (N=6). * indica diferença significativa (Teste t de Student, $p<0,05$).

II. 5 – DISCUSSÃO

O *AtrAedes*[®] mostrou-se mais eficiente na captura das fêmeas grávidas de *A. aegypti* do que água de torneira e infusões de 5 e 60 dias. Vários estudos já demonstraram que a adição de matéria orgânica à água acarreta um aumento na atratividade das armadilhas para as fêmeas em busca de sítio de oviposição (Rawlins et al., 1998; Trexler et al., 1998; Mboera et al., 2000; Roque, 2002; Sant’Ana, 2003; Sant’Ana et al., 2006). Os voláteis liberados das infusões de matéria orgânica são resultantes do processo de fermentação anaeróbica produzida por microorganismos presentes no local. A baixa atratividade das infusões de cinco dias, provavelmente é devida a ausência ou a pequena produção destes compostos no período. Sant’Ana et al. (2006) verificaram atratividade das infusões *P. maximum* de 15 e 20 dias de período de fermentação para fêmeas grávidas de *A. aegypti*. No entanto, as infusões mais jovens (1, 3, 5, 7 e 10 dias de período de fermentação) não foram significativamente mais atrativas do que o controle (água de torneira), coletando quantidades semelhantes de ovos de *A. aegypti*. Portanto, a quantidade e a concentração dos voláteis produzidos parecem variar entre os diferentes períodos de fermentação da infusão e ainda determinar a eficiência destas na atratividade das fêmeas grávidas.

Sant’Ana et al. (2006) também observaram em testes de campo, utilizando ovitrampas, que infusões de 30 dias de período de fermentação coletaram número reduzido de ovos. Esta redução pode ser devida ao aumento da concentração dos voláteis liberados da infusão. Infusões de maior período de fermentação, provavelmente, possuem maior número de microorganismos. O metabolismo dos mesmos pode levar a uma maior produção e liberação de voláteis, aumentando, portanto, a concentração dos compostos liberados e conseqüentemente diminuindo a atratividade da armadilha. No entanto, novos estudos, como a identificação e a

quantificação dos microorganismos presentes nas infusões de diferentes períodos de fermentação, devem ser realizados para a confirmação destas suposições.

Estudos em campo e em laboratório têm demonstrado que a atratividade das infusões de matéria orgânica pode ser devida à ação de vários voláteis associados em diferentes concentrações. Provavelmente, ocorre um sinergismo quando estes compostos estão associados, acarretando aumento da atratividade das armadilhas (Millar et al., 1992; Beehler et al., 1994; Allan & Kline 1995; Du & Millar 1999, Trexler et al., 2003). O atraente de oviposição sintético utilizado no presente estudo é constituído apenas por um dos sete compostos biologicamente ativos identificados por Sant'Ana, (2003) na infusão de capim colômbio de 15 e 20 dias de período de fermentação. Uma vez que o *AtrAedes*[®] mostrou-se significativamente mais atrativo para as fêmeas grávidas do que as infusões de capim colômbio de 5 e 60 dias e tão eficiente quanto as infusões de 10, 15, 20, 30 e 45 dias de período de fermentação, capturando quantidades semelhantes de fêmeas de *A. aegypti*, pode-se inferir que este composto tem um importante papel na atratividade para fêmeas grávidas e que seu uso nas armadilhas, em substituição ao atraente natural (infusão de capim colômbio) é altamente viável. O uso do *AtrAedes*[®] em programas de monitoramento do mosquito em área urbana, apresenta algumas vantagens (1) facilita o manuseio das armadilhas; (2) o transporte e o (3) armazenamento, além de (4) poder ficar maior período de tempo no campo, reduzindo o período de troca e o custo com mão-de-obra.

Os resultados obtidos neste estudo não coincidem com os de Sant'Ana (2003). O autor verificou que as ovitrampas iscadas com infusão de capim colômbio coletaram significativamente maior número médio de ovos que as armadilhas contendo solução de atraente sintético em diferentes concentrações. Estes resultados diferentes, provavelmente são devidas às propriedades físico-químicas do atraente sintético avaliado, que é um composto orgânico do grupo aldeído, sendo, portanto muito volátil (P.E= 93°C, pressão de vapor 0,26 mmHg). Sant'Ana (2003) avaliou o composto sintético em solução, misturado à água e não associado a um liberador, que permitiria

uma liberação contínua e controlada do atraente. Uma vez que a taxa de evaporação não foi controlada, durante o período de realização dos experimentos (24 horas), este volátil, provavelmente, evaporou completamente nas primeiras horas de início do teste, o que fez com que a armadilha iscada com o composto sintético, em diferentes concentrações, perdesse a sua atratividade. Du & Millar (1999) verificaram que a concentração do composto e a taxa de evaporação são fatores críticos na determinação da resposta das fêmeas grávidas, que pode ser positiva (atraente e/ou estimulante) ou negativa (repelente e/ou deterrente).

Os diferentes resultados obtidos no presente estudo e no trabalho de Sant'Ana (2003) também podem ser justificados pelo tipo de armadilha utilizado nos dois experimentos. Todas as fêmeas que entram em contato com a superfície interna da armadilha MosquiTRAP são capturadas, sendo portanto quantificado toda visita, enquanto que nas armadilhas de oviposição as visitas não são quantificadas, sendo considerado positiva apenas as armadilhas que contém ovos. No entanto, ovitrampa negativa (sem ovos na palheta) também podem ter sido visitadas.

II. 6 CONCLUSÕES

- O *AtrAedes*[®] potencializa a atratividade da MosquiTRAP[®] na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*.
- O atraente de oviposição sintético é mais atrativo para as fêmeas grávidas de *A. aegypti* do que infusão de *P. maximum* de 5 e 60 dias de período de fermentação.
- O *AtrAedes*[®] é tão eficiente na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, quanto infusões de capim colônia de 10, 15, 20, 30 e 45 dias de período de fermentação.
- O atraente de oviposição sintético (*AtrAedes*[®]) pode ser utilizado como isca em armadilhas MosquiTRAP[®] em substituição ao atraente natural (infusão de capim colônia).

Capítulo III

Formulação e avaliação de atraentes sintéticos de oviposição, identificados em infusões do capim colonião (*Panicum maximum*) para fêmeas grávidas do mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) em condições de campo e semicampo.

III.1 RESUMO

Infusões de capim colônia (*Panicum maximum*) liberam voláteis que atraem fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* para armadilhas de oviposição. Os voláteis da infusão foram previamente identificados pelas técnicas de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG/EAG) e espectrometria de massas (CG/MS) e avaliados em testes de campo em ovitrampa por Sant'Ana (2003). Posteriormente, estes atraentes sintéticos foram avaliados isoladamente, como iscas em armadilhas de oviposição e apresentaram um potencial para substituir o atraente natural (infusão de capim). No entanto, a associação de dois ou mais compostos sintéticos ainda não foi avaliada, o que poderia aumentar a eficiência destas armadilhas. Este trabalho teve como objetivos (1) avaliar a resposta das fêmeas grávidas de *A. aegypti* a diferentes concentrações dos atraentes sintéticos nonanal, decanal, p-cresol, 3-metil indol, benzotizol e indol, em condições de semicampo e (2) desenvolver e avaliar formulações binárias e terciárias dos compostos sintéticos, em condições de semicampo e campo. Os testes foram realizados em uma área experimental (14 x 7 x 3,5m) contendo oito gaiolas (2,5 x 2,5 x 2,0m) de teste. Duas armadilhas para captura de adultos (MosquiTRAP[®]) foram instaladas ao nível do solo, no interior das gaiolas, equidistantes cerca de 1m. Quarenta fêmeas com 3 a 4 dias após repasto sangüíneo foram utilizadas em cada repetição. Cinco doses logarítmicas (10^2 a 10^6 ng/50 μ l hexano) foram avaliadas para cada composto sintético. Atraente sintético de oviposição (AtrAedes[®]) foi utilizado como controle. Os testes de campo foram realizados em três áreas do Campus Pampulha da UFMG. As armadilhas também foram instaladas ao nível do solo, porém equidistantes três metros, em área protegida da chuva e de animais domésticos. As vistorias foram realizadas 24h após a instalação das armadilhas. Os resultados demonstraram que as fêmeas grávidas responderam para todos os compostos sintéticos e para todas as concentrações avaliadas. No entanto, não foi observada diferença significativa entre as cinco

concentrações testadas dos diferentes compostos. Quando cada concentração foi comparada com o seu respectivo controle (*AtrAedes*[®]) verificou-se diferença significativa apenas para o decanal e benzotiazol na concentração de 10⁵ ng/50µl solvente, que capturaram significativamente menor percentagem de fêmeas grávidas do que o controle. A mistura binária contendo *AtrAedes*[®] e decanal capturou significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas do que o controle. Duas formulações terciárias foram significativamente mais atrativas para as fêmeas de *A. aegypti*, em condições de semicampo, aquelas contendo *AtrAedes*[®], decanal e 3-metil indol (mistura 1) e as constituídas por *AtrAedes*[®], decanal e P-cresol (mistura 2). Em campo, estas duas formulações também foram significativamente mais atrativas que o controle. No entanto, a mistura 1 capturou maior percentagem de fêmeas grávidas nas áreas onde a presença humana era predominante, enquanto que a mistura 2 foi mais atrativa na área onde havia grande quantidade de animais. Os resultados demonstraram efeito aditivo na associação do *AtrAedes*[®] com outros compostos sintéticos identificados na infusão de *P. maximum*. Mistura binária (decanal) e terciárias (3-metil indol ou P-cresol) aumentaram significativamente a captura das fêmeas grávidas de *A. aegypti* e conseqüentemente a eficiência da armadilha MosquiTRAP[®] na captura de adultos.

III. 2 INTRODUÇÃO

Os insetos estão entre os seres vivos que mais utilizam os odores para desempenhar suas atividades durante sua existência (Vilela & Della Lucia, 2001). Desse modo, o olfato bem os diversos odores são fundamentais, para a localização das presas, defesa, como sinal de agressividade, seleção de plantas hospedeiras, escolha de locais para oviposição, corte e acasalamento, organização das atividades sociais e em diversos outros comportamentos (Vilela & Della Lucia, 2001). As substâncias químicas que mediam a comunicação química são denominadas semioquímicos (feromônios, cairomônios, sinomônios, alomônios e apneumônios) (Nordland 1981). Os semioquímicos são capazes de modificar o comportamento dos insetos, dependendo do estado fisiológico destes. Quando usados como atraentes são capazes de atrair insetos em armadilhas ou mantê-los em áreas confinadas (Eiras & Mafra-Neto, 2001). A possibilidade de utilizar semioquímicos como método alternativo no monitoramento de mosquitos para substituir os métodos convencionais esta sendo avaliada, uma vez que estas substâncias são facilmente degradáveis no meio ambiente (Eiras, 2001).

Millar et al. (1992) isolaram e identificaram cinco compostos (indol, 3-metil-indol, fenol, p-cresol e 4-etil fenol), provenientes da infusão da gramínea “bermuda” (*Cynadon dactylon*) fermentada, que estimula fortemente a oviposição de *Culex quinquefasciatus*. A resposta de oviposição de três diferentes espécies de mosquitos (*C. quinquefasciatus*, *Culex tarsalis* Coquillett e *Culex stigmatosoma* Dyar) frente aos cinco compostos identificados, foi avaliada em campo, por Beehler et al. (1994). Os resultados demonstraram que o 3-metil indol foi capaz de promover a oviposição em *C. quinquefasciatus*, *C. tarsalis* e *C. stigmatosoma*. Estes mesmos compostos também foram avaliados por Allan & Kline (1995) na mediação da oviposição de *Aedes albopictus* e *A. aegypti* em laboratório e campo. Os resultados demonstraram que a maior oviposição de *A. albopictus* ocorreu em água contendo somente o 3-metil

indol e o 4-etil fenol, enquanto que para *A. aegypti* somente o fenol e o p-cresol estimularam a oviposição.

Usando métodos cromatográficos e eletrofisiológicos (CG-EAD), Du & Millar (1999) identificaram na infusão da gramínea “bermuda” fermentada quatro diferentes compostos (nonanal, 2-undecanone, 2-tridecanone e naftaleno) daqueles descritos em Millar et al. (1992). Os resultados demonstraram que vários dos compostos, em concentrações apropriadas foram fracamente atrativos para as fêmeas grávidas em testes de laboratório e/ou estimularam mais a oviposição do que o controle (água).

Trexler et al. (2003) avaliaram em campo e em laboratório, cinco atraentes sintéticos (dimetil disulfeto, indol, p-cresol, 3-metil indol e trimetilamina) como potenciais atraentes de oviposição do mosquito *A. albopictus*. Os autores verificaram que o *A. albopictus* não exibiu atração, aumento de oviposição ou resposta eletrofisiológica para nenhum dos compostos testados e concluíram que estes compostos não parecem ser iscas eficazes para as ovitrampas, no monitoramento ou controle desta espécie de mosquito.

Sant’Ana (2003) identificou através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/MS) e ao detector eletroantegráfico (CG/EAG) sete diferentes compostos (nonanal, decanal, benzotiazol, 3-metil indol, p-cresol, limoneno e indol) provenientes de infusões de 15 e 20 dias de período de fermentação do capim colônia (*P. maximum*). Os sete compostos, em sua forma sintética, foram avaliados individualmente em cinco diferentes concentrações (10^2 a 10^6 ng/50 μ l solvente) em testes eletroantegráficos (EAD), bem como em armadilhas de oviposição no campo. Foi observada resposta eletroantegráfica aos sete compostos sintéticos avaliados, demonstrando que as fêmeas de *A. aegypti* detectam a presença destes em corrente de ar, sugerindo que estes semioquímicos podem atuar como atraentes e/ou estimulantes de oviposição para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*. No campo, foi verificado que as ovitrampas iscadas com água de torneira e solução de nonanal, indol, 3-metil indol em todas as concentrações avaliadas e

benzotiazol (10^2 a 10^4 e 10^6 ng/50 μ l solvente) aumentaram significativamente a deposição de ovos de *Aedes* spp quando comparadas com o controle (apenas água de torneira). Posteriormente foi desenvolvido um atraente de oviposição sintético (AtrAedes[®]), constituído pelo aldeído nonanal, um dos sete compostos biologicamente ativos identificados na infusão de *P. maximum* (Eiras & Sant'ana, 2001).

Os compostos sintéticos podem ser avaliados isoladamente ou em misturas, quando se deseja verificar a ocorrência de efeito aditivo ou sinérgico em consequência da associação. As misturas podem ser (1) binária (associação de um composto principal, normalmente atrativo para o inseto em estudo, a um composto secundário) (2) terciária quando dois compostos atrativos são associados a um terceiro ou (4) quaternária. associação de quatro compostos simultaneamente.

Os objetivos deste trabalho foram (1) avaliar a resposta das fêmeas grávidas de *A. aegypti* a diferentes concentrações dos atraentes de oviposição sintéticos (nonanal, decanal, p-cresol, 3-metil indol, benzotiazol e indol) identificados por Sant'Ana (2003), na infusão de *P. maximum*, em condições de semicampo e (2) desenvolver e avaliar formulações binárias e terciárias dos candidatos a atraentes de oviposição, em condições de semicampo e campo, visando aumentar a atratividade do AtrAedes[®] para as fêmeas de *A. aegypti*.

III. 3 MATERIAL & MÉTODOS

III.3.1) Criação e manutenção de colônia do mosquito *Aedes aegypti* em laboratório.

As fêmeas grávidas de *A. aegypti* utilizadas neste estudo foram criadas e mantidas no insetário do Laboratório de Culicídeos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A metodologia de criação e manutenção destes insetos em laboratório está descrita no capítulo I.

III.3.2) Área experimental.

III.3.2.1) Semicampo: Os experimentos comportamentais de respostas das fêmeas grávidas de *A. aegypti* a diferentes concentrações dos atraentes sintéticos de oviposição, bem como a avaliação da atratividade das formulações binárias e terciárias foram realizados em condições de semicampo, sob condições naturais de temperatura e umidade relativa na área experimental (14 x 7 x 3,5m) contendo oito gaiolas (2,5 x 2,5 x 2,0m) de teste descrita no capítulo I. Os experimentos foram conduzidos no período da tarde (13:as 15:00hs) a uma temperatura de 25 a 32°C e umidade relativa entre 50 a 80%.

III.3.2.2) Área urbana (campo): Os experimentos de avaliação da mistura terciária dos atraentes sintéticos de oviposição também foram conduzidos em área urbana. Os testes de campo foram realizados no Campus Pampulha da UFMG em três áreas previamente selecionadas para a realização dos experimentos. O critério utilizado na escolha foi, principalmente, a presença de grande quantidade de mosquitos. A identificação destas áreas foi realizada através de entrevista com os funcionários das unidades. Nas áreas 1 e 2 há predomínio de população humana, enquanto que na área 3 ha predominância de animais. As áreas 1 e 2 são bastante similares, uma vez que existe grande circulação de pessoas, são áreas sombreadas e com bastante vegetação (pequenos arbustos, gramíneas e principalmente vasos de

plantas). Na área três a vegetação é escassa (apenas alguns canteiros cobertos por gramíneas), no entanto neste local é encontrada uma grande variedade de potenciais criadouros artificiais de mosquitos (bebedouros e alimentadores de animais).

III.3.3) Delineamento experimental.

Para os experimentos em condições de semicampo foi utilizada a mesma metodologia descrita no capítulo II (Fig.1). O período de teste foi pré-estabelecido para duas horas, de acordo com os resultados obtidos no capítulo 1.

Para os experimentos realizados no campo, as armadilhas MosquiTRAP[®] (Eiras, 2002; Favaro et al., 2006; Gama et al., 2007) foram dispostas ao nível do solo, distantes cerca de três metros, em área externa, porém protegida da chuva e de animais domésticos. A instalação foi feita no período da manhã (8:00 às 10:00h) sendo a leitura realizada 24h após a instalação das armadilhas (Gomes et al., 2006). A troca da água e da solução foi feita diariamente durante a leitura dos experimentos.

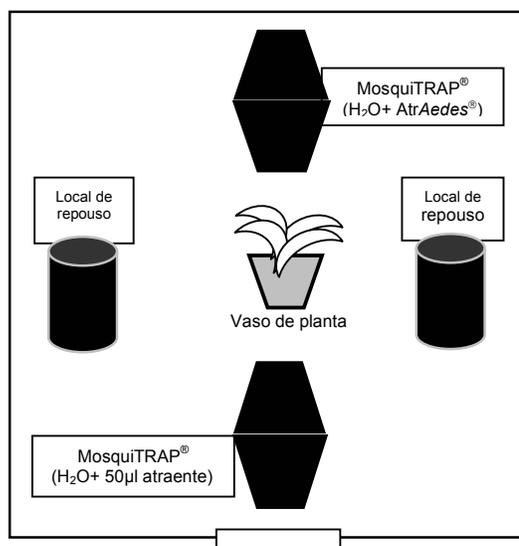


Figura 1. Distribuição das armadilhas MosquiTRAP[®], no interior das gaiolas de teste, durante a realização dos experimentos de resposta comportamental de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* à diferentes concentrações dos atraiantes sintéticos de oviposição em condições de semicampo (N=6).

III.3.4) Atraentes sintéticos de oviposição.

Os compostos sintéticos (nonanal, decanal, 3-metil indol, indol, p-cresol, benzotiazol) avaliados neste trabalho foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e o solvente (n-hexano) foi adquirido da Merck. Com exceção do benzotiazol (97%), nonanal (95%) e decanal (95%) foram utilizados compostos com alto grau de pureza ($\geq 99\%$).

III.3.5) Experimento 1: Resposta das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* à diferentes concentrações dos atraentes sintéticos de oviposição em condições de semicampo.

Testes preliminares foram realizados para avaliar o efeito do solvente utilizado no preparo das soluções na atratividade das fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Armadilhas contendo 500 ml de água de torneira e 50 μ l de hexano foram utilizadas como teste enquanto que armadilhas MosquiTRAP[®] contendo apenas água de torneira (500 ml) foram utilizadas como controle. Quarenta fêmeas foram liberadas em cada repetição, totalizando 320 fêmeas avaliadas. Oito repetições foram realizadas. Todas as gaiolas foram utilizadas para a realização deste experimento, sendo que nas gaiolas N° 1, 3, 5, e 7 as armadilhas foram colocadas nas posições **A** e **B** enquanto que nas gaiolas N° 2, 4, 6 e 8 as posições **C** e **D** foram utilizadas.

As armadilhas controle, iscadas com atraente de oviposição sintético foram comparadas com as continham diferentes concentrações dos atraentes sintéticos de oviposição (nonanal, decanal, p-cresol, 3-metil indol, benzotiazol e indol) (Teste de dupla escolha). Os seis candidatos a atraentes foram avaliados individualmente para se conhecer a concentração mais atrativa de cada composto para as fêmeas grávidas. As diferentes concentrações de cada composto sintético foram comparadas com o controle (AtrAedes[®]) para se conhecer a eficiência relativa das concentrações testadas. Cinco diferentes concentrações (10^2 a 10^6 ng/50 μ l hexano) foram utilizadas.

Cada armadilha recebeu 500 ml de água de torneira e 50µl da solução de cada concentração avaliada. MosquiTRAP® contendo apenas água de torneira e AtrAedes® foram utilizadas como controle. Seis réplicas foram realizadas, totalizando 60 MosquiTRAPs® instaladas (cinco tratamentos e cinco controles). Foram liberadas quarenta fêmeas grávidas por gaiola totalizando 200 fêmeas em cada réplica. As gaiolas de N° 1 a 5 foram utilizadas, sendo que as armadilhas foram instaladas nas posições **A** e **B** (gaiola 1, 3 e 5) e **C** e **D** (gaiola 2 e 4). A posição de instalação das armadilhas (teste e controle) foi alternada ao final de cada repetição. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados.

III.3.6) Experimento 2: Comparação da atratividade dos candidatos à atraentes de oviposição para fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em condições de semicampo.

A concentração de cada composto sintético candidato a atraente que obteve a melhor resposta no experimento anterior foi comparada ao AtrAedes® neste experimento para se conhecer a eficiência relativa de atratividade dos seis compostos sintéticos para as fêmeas de *A. aegypti*. Cada MosquiTRAP® recebeu 500ml de água de torneira e 50µl da solução da concentração mais atrativa para as fêmeas grávidas. Uma armadilha contendo apenas água de torneira e AtrAedes® foi utilizada como controle. Seis réplicas foram realizadas, totalizando 72 armadilhas MosquiTRAP® instaladas (seis tratamentos e seis controles). Quarenta fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram liberadas, totalizando 240 fêmeas em cada repetição. Neste experimento as gaiolas N° 1 a 6 foram utilizadas, as armadilhas foram instaladas nas posições **A** e **B** (gaiola 1, 3 e 5) e **C** e **D** (gaiola 2, 4 e 6), sendo que a posição da armadilha teste e controle foi alterada em cada réplica. A distribuição dos tratamentos foi em blocos inteiramente casualizados.

III.3.7) Experimento 3: Desenvolvimento de formulações binárias utilizando atraentes sintéticos de oviposição para o *Aedes aegypti* em condições de semicampo.

O composto sintético que se mostrou mais atrativo para as fêmeas grávidas de *A.aegypti* no experimento 2 foi utilizado neste teste como composto principal. Combinações binárias foram realizadas entre o candidato principal (mais atrativo) e os demais compostos avaliados (compostos secundários) conforme a tabela abaixo:

Tabela 1. Combinações binárias utilizadas nos experimentos de respostas de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* à atraentes sintéticos de oviposição em condições de semicampo.

| | Composto principal | Atraente sintético 1 | Atraente sintético 2 | Atraente sintético 3 | Atraente sintético 4 | Atraente sintético 5 |
|-----------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| T1 | X | X | | | | |
| T2 | X | | X | | | |
| T3 | X | | | X | | |
| T4 | X | | | | X | |
| T5 | X | | | | | X |

Uma armadilha contendo apenas água de torneira e AtrAedes® foi utilizada como controle e foi comparada com aquelas iscadas com a mistura binária (Teste de dupla escolha). Dez réplicas foram realizadas, totalizando 100 MosquiTRAPs® instaladas (cinco tratamentos e cinco controles). Quarenta fêmeas grávidas foram liberadas em cada gaiola, totalizando 200 fêmeas por réplica. As gaiolas de N° 1 a 5 foram utilizadas, sendo que as armadilhas foram instaladas nas posições **A** e **B** (gaiola 1, 3 e 5) e **C** e **D** (gaiola 2 e 4). A posição de instalação das armadilhas teste e controle foram alternadas ao final de cada repetição. O delineamento experimental foi em quadrado latino (5 x 5).

III.3.8) Experimento 4: Desenvolvimento de formulações terciárias utilizando atraentes sintéticos de oviposição para fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*.

A mistura binária mais atrativa para as fêmeas de *A. aegypti* no experimento 3 foi utilizada como composto principal neste experimento e formaram combinações terciárias com os demais candidatos a atraentes (compostos terciários) conforme tabela abaixo:

Tabela 2. Combinações terciárias utilizadas nos experimentos de respostas de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* à atraentes sintéticos de oviposição em condições de semicampo.

| | Composto principal 1 | Composto principal 2 | Atraente sintético 1 | Atraente sintético 2 | Atraente sintético 3 | Atraente sintético 4 |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| T6 | X | X | X | | | |
| T7 | X | X | | X | | |
| T8 | X | X | | | X | |
| T9 | X | X | | | | X |

Armadilhas MosquiTRAPs[®] iscadas com a mistura terciária foram comparadas com as armadilhas controle, contendo apenas água de torneira e AtrAedes[®] (Teste de dupla escolha). Oito réplicas foram realizadas, totalizando 64 MosquiTRAPs[®] instaladas (quatro tratamentos e quatro controles). Quarenta fêmeas grávidas foram liberadas em cada gaiola, totalizando 160 fêmeas por réplica. Para a realização destes experimentos as gaiolas de N^o 1 a 4 foram utilizadas, sendo que as armadilhas foram instaladas nas posições **A** e **B** (gaiola 1 e 3) e **C** e **D** (gaiola 2 e 4). As posições de instalação das armadilhas (teste e controle) foram alternadas em cada repetição. A distribuição dos tratamentos foi feita em quadrado latino (4 x 4).

III. 3. 9) Experimento 5: Avaliação de compostos sintéticos candidatos a atraente de oviposição de fêmeas grávidas do mosquito *Aedes aegypti* em campo.

As misturas terciárias que se mostraram mais atrativas para as fêmeas grávidas de *A. aegypti* na área experimental, também foram avaliadas em campo para a validação dos resultados e para verificar a possibilidade de utilização da combinação em programas de monitoramento do mosquito *A. aegypti* em áreas urbanas. Armadilhas MosquiTRAP[®] contendo apenas água de torneira e AtrAedes[®] foi utilizada como controle. Foram realizadas 181 réplicas por tratamento, sendo 88 na área 1, 45 na área 2 e 48 na área 3, totalizando 543 armadilhas instaladas.

III.3.10) Análise estatística.

Os dados (percentagem e/ou número de fêmeas capturadas) passaram por tratamento estatístico, transformação arcoseno (área experimental) e logarítmica (teste de campo) e foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Quando a distribuição foi normal, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Teste t de Student também foi utilizado, quando apenas dois tratamentos foram avaliados. Quando a distribuição não foi normal, os dados foram analisados mediante o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e as médias foram comparadas utilizando o teste de Mann-Whitney ao nível de significância de 5%.

O índice de atividade de oviposição (IAO) (IAO= % fêmeas nas armadilhas teste – % fêmeas nas armadilhas controle / % fêmeas nas armadilhas teste + % fêmeas nas armadilhas controle) para cada concentração avaliada foi calculado segundo Kramer & Mulla (1979) para os seis atraentes sintéticos. Os valores máximos que podem ser obtidos são (+1) quando o composto avaliado é 100% atrativo e/ou arrestante ou estimulante e (–1) quando é 100% repelente ou deterrente (Clements, 2000).

III. 4 RESULTADOS

Quando foi avaliado o efeito do solvente utilizado no preparo das soluções, na captura das fêmeas grávidas verificou-se que $45,0\% \pm 2,83$ das fêmeas liberadas foram capturadas nas armadilhas teste (iscadas com hexano), enquanto que a percentagem de captura observada nas armadilhas controle (água de torneira) foi igual a $47,5\% \pm 2,00$. As duas armadilhas (teste e controle) capturaram $92,5\% \pm 2,42$ das fêmeas liberadas. A percentagem de fêmeas livres no interior das gaiolas de teste foi igual a $7,5\% \pm 2,42$. Não foi observada diferença significativa entre as armadilhas teste e as armadilhas controle ($p=0,508$, $t=-0,697$, $gl=7$, Teste t de Student).

Os resultados demonstraram para todos os compostos sintéticos (nonanal, decanal, p-cresol, benzotizol, indol e 3-metil indol) testados, que as cinco concentrações avaliadas foram atrativas para as fêmeas de *A. aegypti*. No entanto, não foi observada, uma relação do tipo dose-resposta entre a concentração utilizada e a percentagem de fêmeas capturadas nas armadilhas para nenhum dos compostos avaliados. Quando as cinco concentrações de cada atraente sintético foram comparadas, observou-se que a percentagem de fêmeas grávidas de *A. aegypti* capturadas foi semelhante para todos os tratamentos (concentrações) ($p>0,05$) (Tab. 3).

A percentagem de fêmeas grávidas de *A. aegypti* capturadas em cada tratamento também foi comparada com o seu respectivo controle (AtrAedes®) (Fig. 2). Foi observada diferença significativa, ao nível de 5%, apenas para o decanal e benzotiazol na concentração de $10^5\text{ng}/50\mu\text{l}$ solvente, que capturaram significativamente menor percentagem de fêmeas grávidas de *A. aegypti* do que os controles ($p=0,015$, $p=0,029$, respectivamente) (Fig. 2a e 2b).

Tabela 3. Percentagem de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, capturadas em armadilhas MosquiTRAP®, iscadas com diferentes concentrações dos atraentes sintéticos de oviposição, em condições de semicampo (N=6).

| Compostos sintéticos avaliados | 10 ² ng | 10 ³ ng | 10 ⁴ ng | 10 ⁵ ng | 10 ⁶ ng |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | % ± E.P |
| Nonanal | 49,3 ± 5,99 | 43,8 ± 3,12 | 40,3 ± 2,80 | 45,4 ± 2,98 | 47,9 ± 4,88 |
| Decanal | 45,5 ± 4,42 | 40,4 ± 7,38 | 51,9 ± 7,38 | 34,7 ± 3,33 | 45,7 ± 2,45 |
| Benzotiazol | 47,5 ± 3,58 | 52,4 ± 5,82 | 42,5 ± 5,41 | 40,1 ± 2,40 | 38,9 ± 5,95 |
| P-cresol | 52,7 ± 5,94 | 46,4 ± 2,94 | 46,1 ± 5,17 | 42,3 ± 6,75 | 50,1 ± 7,67 |
| Indol | 53,8 ± 6,86 | 45,8 ± 6,75 | 44,5 ± 6,79 | 47,0 ± 2,99 | 43,4 ± 6,92 |
| 3-Metil indol | 51,9 ± 1,47 | 53,1 ± 4,61 | 45,0 ± 3,59 | 48,3 ± 5,98 | 42,1 ± 5,86 |

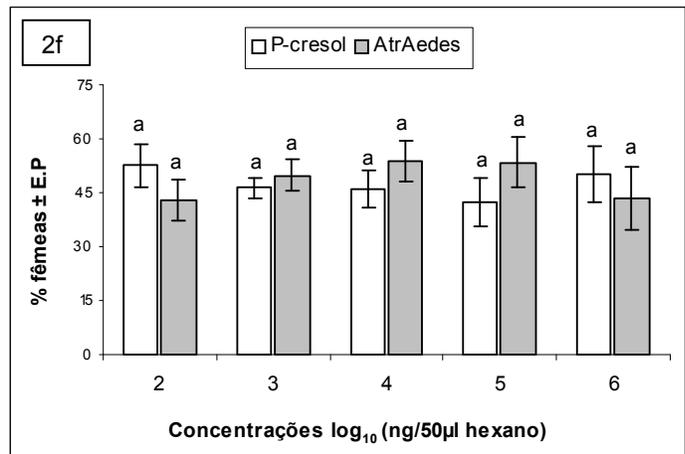
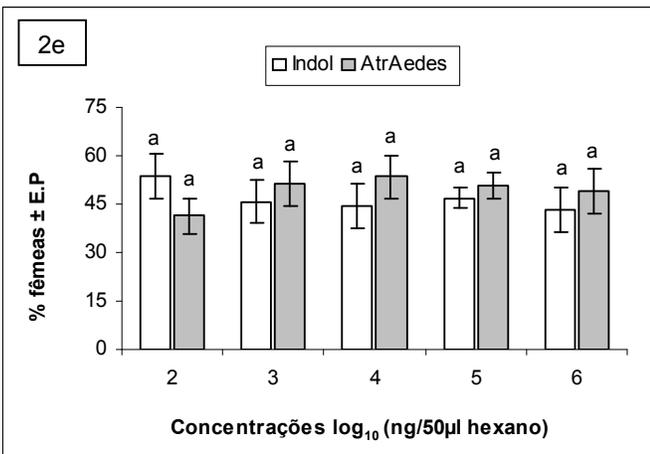
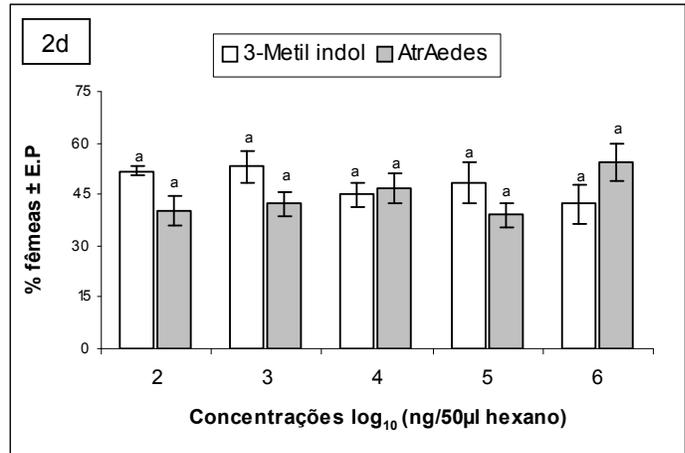
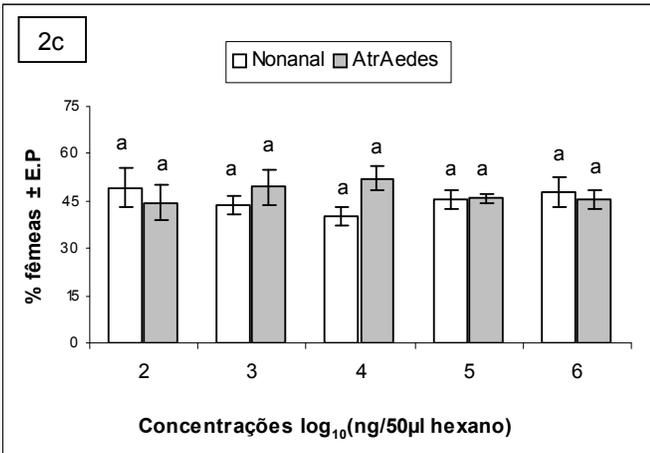
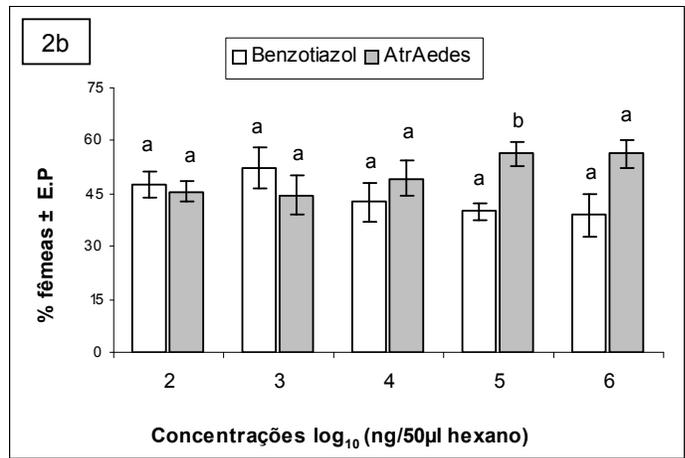
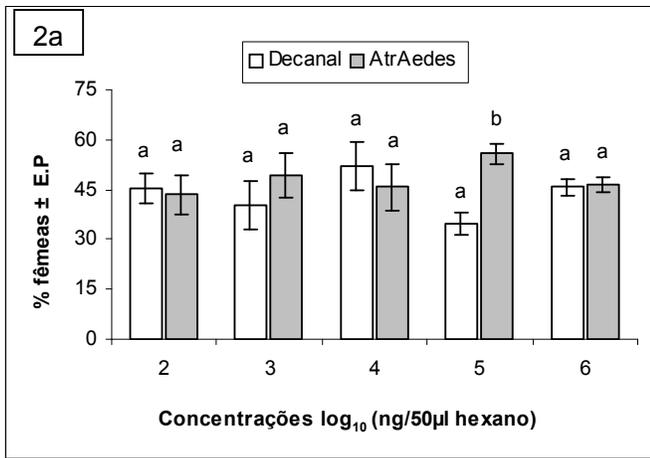


Figura 2. Resposta comportamental das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* a diferentes concentrações de atraentes sintéticos de oviposição em condições de semicampo (N=6).

Valores de índice de atividade de oviposição (IAO) positivos e negativos foram observados para as diferentes concentrações avaliadas (Tab.4). Foi verificado que o benzotiazol exibiu IAO negativo para três das cinco concentrações avaliadas (10^4 a 10^6 ng). Uma relação diretamente proporcional entre as concentrações avaliadas e o IAO também foi observada para este composto, que apresentou os maiores índices para as concentrações mais altas (10^5 e 10^6 ng), sugerindo que as concentrações maiores são menos atrativas para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*, uma vez que estas apresentaram valores negativos. O p-cresol exibiu IAO negativo para as concentrações de 10^3 a 10^5 ng, enquanto que índices negativos foram observados para 4 das 5 concentrações avaliadas do indol (10^3 a 10^6 ng). Para os demais compostos avaliados (nonanal, decanal e 3-metil indol) não foi verificado um padrão nos valores dos índices obtidos para as cinco concentrações avaliadas que exibiram valores bastante distintos (Tab.4).

Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre as cinco concentrações avaliadas quando os atraentes sintéticos foram testados, foi verificado que as concentrações menores (10^2 e 10^3 ng/50 μ l hexano), apresentaram as maiores percentagens de fêmeas grávidas capturadas (Tab. 3). Também foi observado que os seis compostos testados, exibiram valores positivos de IAO quando estas concentrações foram utilizadas (Tab. 4). Baseado nestes resultados foi definido que a solução de concentração de 10^2 ng/50 μ l hexano seria utilizada nos próximos experimentos (mistura binária e terciária).

Tabela 4. Índice de atividade de oviposição (IAO), calculado segundo Kramer & Mulla, (1979) para as diferentes concentrações dos seis atraentes sintéticos avaliados.

| Compostos sintéticos avaliados | 10 ² ng | 10 ³ ng | 10 ⁴ ng | 10 ⁵ ng | 10 ⁶ ng |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Nonanal | 0,05 | -0,05 | -0,13 | -0,01 | 0,02 |
| Decanal | 0,10 | -0,06 | 0,08 | -0,10 | 0,03 |
| Benzotiazol | 0,02 | 0,08 | -0,08 | -0,17 | -0,20 |
| P-cresol | 0,10 | -0,03 | -0,08 | -0,12 | 0,08 |
| Indol | 0,12 | -0,06 | -0,09 | -0,04 | -0,06 |
| 3-Metil indol | 0,14 | 0,11 | -0,02 | 0,10 | -0,13 |

Uma vez que não foi observada diferença significativa entre as cinco concentrações avaliadas ($p > 0,05$) e devido aos resultados observados para o *AtrAedes*[®], que mostrou-se significativamente mais atrativo para as fêmeas grávidas de *A. aegypti* quando comparado com o decanal e benzotiazol (10⁵ng/50µl solvente), além de ter apresentando percentagens semelhantes de captura quando comparado com os demais tratamentos (concentrações), ficou determinado que o atraente de oviposição sintético (*AtrAedes*[®]) seria utilizado como composto principal nos próximos experimentos (mistura binária e terciária) e seria associado aos demais compostos sintético avaliados (decanal, benzotiazol, p-cresol, indol e 3-metil indol), formando misturas binárias e terciárias.

Os resultados demonstraram que todas as misturas binárias avaliadas foram atrativas para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*. No entanto, não foi observada diferença significativa entre as formulações contendo *AtrAedes*[®] associado ao benzotiazol, p-cresol, indol e 3- metil indol quando comparado ao controle ($p > 0,05$). A única mistura que capturou significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas do que o controle foi aquela contendo solução de decanal associado ao *AtrAedes*[®] ($p = 0,009$) (Tab 5).

Tabela 5. Percentagem de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, capturadas nas armadilhas MosquiTRAP[®], iscadas com diferentes combinações binárias de atraentes sintéticos de oviposição, em condições de semi-campo (N=10).

| Combinações avaliadas | Combinação binária (Média ± E.P) | AtrAedes [®] (controle) (Média ± E.P) |
|----------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------|
| AtrAedes [®] Benzotiazol | 44,7 ± 3,77a | 47,2 ± 5,01 a |
| AtrAedes [®] P-cresol | 46,8 ± 3,60 a | 45,8 ± 3,96 a |
| AtrAedes [®] Decanal | 55,6 ± 3,28 b | 33,4 ± 4,07 a |
| AtrAedes [®] Indol | 41,6 ± 3,82 a | 52,2 ± 3,79 a |
| AtrAedes [®] 3-Metil indol | 52,2 ± 4,77 a | 42,9 ± 5,07 a |

Médias na mesma linha, seguidas da mesma letra, não são significativamente diferentes (Teste t Student, $p > 0,05$).

Para os experimentos de combinação terciária foi utilizada a mistura binária (AtrAedes[®] e solução de decanal na concentração de 10^2 ng/50 μ l hexano) que se mostrou significativamente mais atrativa para as fêmeas grávidas, associada aos demais compostos sintéticos avaliados (benzotiazol, p-cresol, indol e 3-metil indol). Foi verificado que as quatro misturas terciárias avaliadas foram atrativas para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*. No entanto, diferença significativa não foi observada entre o controle (AtrAedes[®]) e a mistura terciária contendo AtrAedes[®] e solução de decanal associada ao benzotiazol ou indol ($p > 0,05$). Duas misturas terciárias mostraram-se significativamente mais atrativas para as fêmeas de *A. aegypti*. Aquelas contendo a mistura binária (AtrAedes[®] e decanal) associada ao p-cresol e ao 3-metil indol capturaram significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas do que o controle ($p = 0,04$ e $p = 0,003$, respectivamente) (Tab. 6).

Tabela 6. Percentagem de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, capturadas nas armadilhas MosquiTRAP[®], iscadas com diferentes combinações terciárias de atraentes sintéticos de oviposição, em condições de semicampo (N=8).

| Combinações avaliadas | Combinação terciária (Média ± E.P) | AtrAedes [®] (controle) (Média ± E.P) |
|---------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| AtrAedes [®] Decanal Benzotiazol | 51,1 ± 3,62 a | 45,0 ± 3,12 a |
| AtrAedes [®] Decanal P-cresol | 61,9 ± 6,20 b | 32,2 ± 5,62 a |
| AtrAedes [®] Decanal Indol | 49,7 ± 3,75 a | 46,5 ± 3,76 a |
| AtrAedes [®] Decanal 3-Metil Indol | 57,7 ± 3,26 b | 34,5 ± 2,97a |

Médias na mesma linha, seguidas da mesma letra, não são significativamente diferentes (Teste t Student, $p > 0,05$).

As misturas terciárias avaliadas (AtrAedes[®], decanal + 3-metil indol ou p-cresol) em campo, mostraram-se significativamente mais atrativas para as fêmeas grávidas de *A. aegypti* do que o controle, independente da área utilizada para a instalação das armadilhas (área 1, 2 ou 3) ($p < 0,05$). No entanto, foi observada uma variação na atratividade de cada mistura de acordo com a área de instalação das armadilhas. Foi verificado que nas áreas 1 e 2 a mistura terciária contendo 3-metil indol foi significativamente mais atrativa para as fêmeas de *A. aegypti* quando comparada com controle ($p < 0,05$), enquanto que na área 3, os resultados demonstraram que as MosquiTRAPs[®] iscadas com a mistura terciária contendo p-cresol capturaram significativamente maior média de fêmeas grávidas do que o controle ($p < 0,05$) (Tab. 7).

Não foi observada diferença significativa entre as duas misturas terciárias (3-metil indol e p-cresol) avaliadas nas áreas 1 e 2 ($p > 0,05$). No entanto, foi verificado

que na área 3 a mistura terciária contendo p-cresol capturou significativamente maior média de fêmeas grávidas quando comparado com as área 1 e 2, enquanto que aquela contendo 3-metil indol foi significativamente mais atrativa para as fêmeas de *A. aegypti* quando comparada apenas com a área 1 ($p < 0,05$). (Tab. 7).

Os resultados também demonstraram que na área 3 havia a maior população de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, uma vez que as maiores médias de captura foram observadas nas armadilhas instaladas neste local (Tab. 7).

Tabela 7. Média de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*, capturadas nas armadilhas MosquiTRAP[®], iscadas com diferentes combinações terciárias de atraentes sintéticos de oviposição, em área urbana (N=181).

| Combinações avaliadas | Área I (Média ± E.P) (N=88) | Área II (Média ± E.P) (N=45) | Área III (Média ± E.P) (N=48) |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| AtrAedes [®] Decanal P-cresol | 5,0 ± 1,18ab | 7,0 ± 1,34ab | 14,3 ± 1,85b |
| AtrAedes [®] Decanal 3-Metil Indol | 7,3 ± 1,22b | 9,3 ± 2,5b | 13,0 ± 2,60ab |
| AtrAedes [®] (Controle) | 3,3 ± 0,56a | 6,3 ± 1,75a | 10,1 ± 3,10a |

Médias na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não são significativamente diferentes (Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

III. 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o solvente utilizado no preparo das soluções não interferiu no comportamento das fêmeas grávidas de *A. aegypti*, quando as diferentes concentrações dos atraentes sintéticos foram avaliadas, uma vez que as armadilhas MosquiTRAP[®] iscadas com solvente e as armadilhas controle (água de torneira) capturaram percentagens semelhantes de insetos.

Os resultados também demonstraram que os seis atraentes sintéticos avaliados foram atrativos para as fêmeas de *A. aegypti*, independente da concentração utilizada. Estes resultados coincidem com aqueles obtidos por Sant'Ana (2003) que verificou por meio de estudos eletrofisiológicos (EAG) que as fêmeas grávidas de *A. aegypti*, detectam a presença dos atraentes sintéticos (avaliados no presente estudo) em corrente de ar e sugerem que estes compostos podem atuar como atraentes e/ou estimulantes de para fêmeas grávidas. Sant'Ana (2003) também observou um aumento da deposição de ovos nas ovitrampas quando soluções dos atraentes sintéticos, em diferentes concentrações, foram adicionadas à água de torneira contida no interior da armadilha.

O AtrAedes[®] é um atraente de oviposição sintético, específico para as fêmeas grávidas de *Aedes* spp (Eiras & Sant'Ana, 2001). Este atraente é utilizado como isca em armadilhas para captura de fêmeas adultas (MosquiTRAP[®]) em programas de monitoramento do mosquito *A. aegypti* em áreas urbanas (Ecovec, 2007). Quando as cinco concentrações dos compostos sintéticos foram comparadas ao AtrAedes[®], verificou-se que apenas o decanal e benzotiazol mostraram-se significativamente menos atrativos quando a concentração de 10⁵ng/50µl solvente foi utilizada. As demais concentrações avaliadas destes dois compostos sintéticos, bem como as cinco concentrações dos outros atraentes testados (3-metil indol, p-cresol, nonanal e indol), foram tão atrativas para as fêmeas grávidas quanto o controle, evidenciando desta

maneira, a eficiência destes compostos sintéticos como atraentes de oviposição para as fêmeas de *A. aegypti*. Estes atraentes sintéticos podem ser utilizados como iscas em armadilhas em substituição ao atraente natural, associados ou não a outros compostos sintéticos.

Lima, (2005) também verificou em estudos realizados no campo, que o 3-metil indol e o p-cresol foram tão atrativos para as fêmeas grávidas de *C. quinquefasciatus* quanto o controle (infusão de *Panicum maximum*, de 10 e 21 dias de período de fermentação, concentração (75%). Os resultados obtidos por Lima (2005) também demonstraram que o 3-metil indol capturou um percentual significativamente (64,91%) maior de fêmeas grávidas quando comparado com o seu respectivo controle (54,66%). Trexler et al. (2003), observaram efeitos repelentes em um bioensaio comportamental com o mosquito *A. albopictus*, quando soluções de p-cresol (0,083; 0,83 e 8,3 mg/litro) e 3-metil indol (8,3 mg/litro) foram utilizadas. Os resultados obtidos por Trexler et al. (2003) não coincidem com os do presente estudo, uma vez que os autores observaram efeito repelente para o p-cresol e 3-metil indol, enquanto que no presente estudo, estes compostos mostraram-se atrativos para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Estes diferentes resultados, provavelmente são devidos à concentração utilizada no bioensaio comportamental. Neste trabalho a concentração utilizada (10^2 a 10^6 ng/50µl hexano em 500 ml de água de torneira) foi muito menor que a testada pelos referidos autores. Du & Millar (1999) verificaram que a concentração do composto e a taxa de evaporação são fatores críticos na determinação da resposta das fêmeas grávidas, que pode ser positiva (atraente e/ou estimulante) ou negativa (repelentes e/ou deterrentes). Alan & Kline (1995) também observaram que o p-cresol e 3-metil indol estimularam a oviposição de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente.

Vários estudos têm demonstrado a importância da associação de dois ou mais compostos (atraentes sintéticos) no aumento da atratividade dos sítios de oviposição de diferentes espécies de mosquitos (Millar et al., 1992; Beehler et al., 1994; Allan &

Kline, 1995; Du & Millar, 1999; Mboera et al., 2000; Olagbemiro et al., 2004). Concentrações apropriadas de diferentes compostos sintéticos associados podem aumentar a resposta de oviposição das fêmeas grávidas (Du & Millar, 1999). Um atraente sintético sozinho pode ter a sua atratividade aumentada quando associado a um segundo ou a mistura de vários compostos. Isto ocorre devido ao sinergismo entre os compostos envolvidos que tem a sua eficiência aumentada em decorrência desta associação. Um composto pode não ser atrativo sozinho, mas pode aumentar fortemente a atratividade de um segundo (Cabrera et al., 2001, Dekker et al., 2002).

No presente estudo, verificou-se que a associação do decanal ao *AtrAedes*[®] (formando a mistura binária) aumentou significativamente a captura de fêmeas grávidas. Quando este composto foi avaliado sozinho, em diferentes concentrações, não foi observada diferença significativa na percentagem de captura quando comparado com o controle. Este aumento de atratividade, provavelmente, foi devido ao efeito aditivo entre os compostos envolvidos que tiveram a sua eficiência aumentada em função da associação.

Outra evidência do aumento de atratividade em função da adição de compostos pôde ser observada quando o *AtrAedes*[®] e o decanal (mistura binária) foram associados ao 3-metil indol ou p-cresol, formando duas misturas terciárias. Quando estes dois compostos (3-metil indol ou p-cresol) foram avaliados juntamente com o *AtrAedes*[®] formando uma mistura binária, não foi observado aumento da atratividade das armadilhas iscadas com esta mistura para as fêmeas de *A. aegypti*. No entanto, quando os três atraentes sintéticos (*AtrAedes*[®], decanal + 3-metil indol ou p-cresol) foram adicionados à armadilha, diferença significativa foi observada entre a mistura terciária e o controle.

O aumento da atratividade em decorrência da associação de compostos, também foi observado em outros estudos de avaliação de atraentes sintéticos, identificados em infusão de matéria orgânica. Millar et al. (1992) verificaram que a mistura de 4 ou 5 compostos (indol, 3-metil-indol, fenol, p-cresol e 4-etil fenol)

estimulou fortemente a oviposição das fêmeas grávidas de *C. quinquefasciatus*. Beehler et al. (1994) também verificaram que a mistura destes cinco compostos foi mais efetiva para fêmeas de *C. quinquefasciatus* do que o controle (água de torneira). Du & Millar (1999) demonstraram que as fêmeas grávidas de *C. quinquefasciatus* e *C. tarsalis* são significativamente mais atraídas para sítios de oviposição contendo combinação de compostos do que apenas um composto isolado. Mboera et al. (2000) observaram um efeito aditivo, quando uma combinação de feromônio de oviposição sintético (5R, 6S) (6-acetoxy-5-hexadecanolide) e 3-metil indol foram utilizadas para atrair fêmeas grávidas de *C. quinquefasciatus* para os sítios de oviposição. Olagbemiro et al. (2004) observaram efeitos sinérgicos para *C. quinquefasciatus*, quando uma combinação de feromônio de oviposição (6-acetoxy-5-hexadecanolide), produzido a partir de *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae) e combinações de 3-metil indol foram utilizadas em laboratório e em campo.

No presente trabalho, as formulações terciárias mais atrativas para as fêmeas grávidas, em condições de semicampo, também foram avaliadas em área urbana. O objetivo foi a validação dos resultados e verificação da viabilidade de uso destas formulações como iscas em armadilhas para captura de adultos, em programas de monitoramento do vetor em área urbana. Os resultados obtidos no campo estão de acordo com os obtidos na área experimental. As formulações terciárias também foram mais atrativas que o controle em condições de campo. Depois de avaliados os custos/benefícios desta associação, as duas combinações terciárias, podem ser utilizadas como iscas em armadilhas MosquiTRAP[®], aumentando desta forma a atratividade das mesmas para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*.

Diferente do que ocorreu nas áreas 1 e 2, onde a mistura que capturou maior porcentagem de fêmeas de *A. aegypti* foi aquela contendo 3-metil indol, na área 3 a mistura mais atrativa para as fêmeas grávidas foi aquela contendo p-cresol. Os diferentes resultados obtidos nesta área podem ser devido ao local de instalação das armadilhas, que teve o experimento realizado na entrada de baias, local onde animais

ficam confinados. O 3-metil indol é um composto que está presente nas fezes (Miller & Woodburry, 2006), uma vez que a concentração utilizada nas armadilhas era muito baixa (10^2 ng/50 μ l solvente), quando comparada com a quantidade do composto presente no local de instalação das armadilhas (bacias), provavelmente, as fêmeas grávidas não conseguiram distinguir a presença do composto nas armadilhas MosquiTRAP[®] devido a saturação do ambiente, fazendo que as armadilhas iscadas com a mistura de p-cresol fossem as mais atrativas.

III. 6 CONCLUSÃO

- O solvente utilizado no preparo das soluções não interfere na atratividade das armadilhas MosquiTRAP[®].
- As diferentes concentrações avaliadas dos atraentes sintéticos de oviposição (nonanal, decanal, indol, benzotiazol, 3-metil indol e p-cresol) testados são atrativas para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*, em condições de semicampo.
- As concentrações mais baixas (10^2 e 10^3 ng/ 50 μ l solvente) parecem ser mais atrativas para as fêmeas de *A. aegypti*.
- O decanal e o benzotiazol na concentração de 10^5 ng/50 μ l solvente, foram menos atrativos para as fêmeas grávidas quando comparado com o controle (AtrAedes[®]).
- A utilização do AtrAedes[®] associado ao decanal, como isca nas armadilhas para captura de adultos, potencializou a atratividade das armadilhas MosquiTRAP[®], aumentando a sua eficiência na captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti*.
- A adição do 3-metil indol ou p-cresol à mistura binária (AtrAedes[®]+ decanal) aumentou a captura de fêmeas de *A. aegypti*, em condições de semicampo.e campo.

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Dengue tornou-se um dos principais problemas de saúde pública do Brasil. As medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde, baseadas principalmente na utilização de inseticidas e levantamento de índice (pesquisa larvária) não foram capazes de impedir a disseminação de um novo sorotipo do vírus (Den-3) e evitar o aparecimento de novos casos. Medidas alternativas de monitoramento e/ou controle, que sejam eficientes, operacionalmente simples e viáveis (baixo custo) são extremamente necessárias. O uso de armadilhas iscadas com atraentes de oviposição específico para o vetor, tem se mostrado uma ferramenta muito promissora no monitoramento do mosquito *A. aegypti*. Estas armadilhas capturam o mosquito adulto, evitando assim que as fêmeas grávidas visitem outros criadouros e dispersem os seus ovos, diminuindo, portanto, o risco de disseminação da doença. A leitura das armadilhas é feita semanalmente, o que reduz muito o custo com a mão-de-obra. A identificação do mosquito, preso na superfície interna da armadilha, é feita ainda em campo, agilizando muito o processo de informação e tomada de decisões (implementação de medidas de controle). A atratividade destas armadilhas é devida à soma de alguns fatores como cor, textura, formato e tamanho associado ao uso de um atraente sintético de oviposição, específico para o inseto vetor. O atraente sintético utilizado nas armadilhas é constituído por um dos voláteis identificados na infusão de capim colônia (*P. maximum*). A atratividade destas infusões para fêmeas de *A. aegypti* em busca de sítios de oviposição foi observada por Sant'Ana et al. (2006). Apesar da comprovada eficiência das infusões de capim colônia na captura de fêmeas grávidas de *Aedes* spp, o seu uso tornou-se inviável na rotina dos programas de monitoramento do vetor em áreas urbanas, devido a algumas dificuldades encontradas durante o preparo destas infusões: i) necessita de excessiva mão-de-obra; ii) libera odores desagradáveis; iii) necessidade de espaço físico nos laboratório para acondicionamento dos galões de fermentação e iv) dificuldade de transporte de

grandes volumes de infusão para os locais de utilização (campo). O *AtrAedes*[®], apesar de ser constituído por apenas um dos voláteis presentes na infusão de capim colônião, demonstrou ser mais atrativo que a água e infusões de cinco e 60 dias e tão atrativo quanto as infusões de 10, 15, 20, 30 e 45 dias de período de fermentação. Portanto poderá ser utilizado como isca nas armadilhas MosquiTRAP[®], em substituição ao atraente natural (infusão de *P. maximum*). O *AtrAedes*[®] está sendo utilizado nos programas de monitoramento do mosquito *A. aegypti* em áreas urbanas, associado a armadilha MosquiTRAP[®] em diferentes municípios e tem demonstrado ser uma ferramenta eficiente na captura de fêmeas grávidas em busca de sítios de oviposição.

Sant'Ana (2003) utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e eletroantenografia (CG/EAG) identificou sete compostos (nonanal, decanal, p-cresol, 3-metil indol, limoneno, indol e benzotiazol) nas infusões de capim colônião de 15 e 20 dias de período de fermentação. Os ensaios eletroantenográficos demonstraram que as fêmeas grávidas detectam a presença destes compostos no ar, sugerindo que estes semioquímicos podem atuar como atraentes e/ou estimulantes de oviposição para fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Estes compostos também foram avaliados em campo por Sant'Ana (2003), como iscas em armadilhas para coletar ovos (ovitampa). Os autores verificaram que a adição dos compostos sintéticos na água contida no interior da armadilha aumentou a deposição de ovos de *Aedes* sp, quando comparado com o controle (água de torneira). No entanto, as armadilhas iscadas com infusão de capim colônião capturaram significativamente maior média de ovos do que aquelas iscadas com as soluções de atraentes sintéticos. Vários estudos têm demonstrado que a atratividade das infusões de matéria orgânica para fêmeas de diferentes espécies de mosquitos, provavelmente não é devida a um único composto e sim a associação de alguns deles, e que a concentração do composto e a taxa de evaporação são fatores críticos na determinação da resposta das fêmeas grávidas, que pode ser positiva (atraente e/ou

estimulante) ou negativa (repelentes e/ou deterrentes). Uma vez que as fêmeas de *A. aegypti* responderam aos compostos identificados por Sant'Ana (2003) em correntes de ar e aumentaram a deposição de ovos nas ovitrampas quando estes compostos foram adicionados a água, há um forte indicio de que os mesmos podem ser utilizados como iscas em armadilhas, potencializando o efeito das mesmas. Os compostos sintéticos, candidatos a atraentes, têm sido utilizados associados, formando misturas binárias e terciárias. Os resultados destes trabalhos têm demonstrado que a mistura é mais atrativa que cada composto sozinho, em diferentes concentrações. Este aumento de atratividade, provavelmente é decorrente do sinergismo entre os compostos envolvidos que tem a sua eficiência aumentada em decorrência desta associação. Os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com os obtidos por Sant'Ana (2003) em campo, utilizando ovitrampas. Foi verificado em condições de semicampo, que todas as concentrações dos compostos sintéticos avaliados (nonanal, decanal, p-cresol, indol, 3-metil indol, benzotiazol) foram atrativos para as fêmeas grávidas de *A. aegypti*. No entanto, nenhuma concentração avaliada mostrou-se mais atrativa que o controle (AtrAedes[®]), evidenciando a importância deste composto na atratividade das fêmeas grávidas. Também foi verificado que o atraente sintético de oviposição foi significativamente mais atrativo para as fêmeas de *A. aegypti* do que o decanal e benzotiazol na concentração de 10⁵ ng/50µl hexano. Baseado nestes resultados misturas binárias e terciárias foram avaliadas utilizando o AtrAedes[®] como composto principal associado aos demais atraentes sintéticos avaliados. Foi verificado efeito aditivo quando o decanal foi associado ao AtrAedes[®] formando uma mistura binária. A adição do decanal aumentou a atratividade da mistura que capturou significativamente maior percentagem de fêmeas grávidas do que o AtrAedes[®] sozinho (controle). O acréscimo de um terceiro composto (3-metil indol ou p-cresol) a mistura binária também aumentou a eficiência da mistura, que se tornou significativamente mais atrativa para as fêmeas de *A. aegypti* quando comparado com o controle. A mistura terciária foi

avaliada tanto em condições de semicampo (área experimental), bem como em campo. Os resultados foram iguais nos dois ambientes, ou seja, as duas formulações terciárias (AtrAedes[®], decanal e 3- metil indol ou p-cresol) avaliadas, foram significativamente mais atrativas para as fêmeas grávidas do que o AtrAedes[®] sozinho. O uso das formulações (misturas binárias e/ou terciárias) utilizando o AtrAedes[®] associado aos compostos sintéticos identificados por Sant'Ana (2003) na infusão de capim colônia, como iscas nas armadilhas para captura de adultos, contribuíram para o aumento da atratividade das mesmas, tornando-as mais eficientes e viabilizará o seu uso em programas de monitoramento do vetor em áreas urbanas.

A metodologia de semicampo, desenvolvida no presente estudo, é uma nova ferramenta para o estudo comportamental do mosquito *A. aegypti*, oferecendo condições de realização de experimentos mesmo em épocas onde a densidade populacional do mosquito é baixa. Esta metodologia oferece resultados rápidos, reprodutíveis e confiáveis, podendo ser empregada na avaliação de protótipos de armadilhas, desenvolvimento de atraentes e de liberadores de odor. Os insetos avaliados são criados e mantidos em laboratório, portanto estão livres de contaminação, evitando assim o risco de contrair a dengue durante a realização dos experimentos. Outro benéfico do uso de insetos de laboratório é o controle sobre o seu estado fisiológico (idade, alimentação, sexo). Estes insetos são submetidos a condições experimentais bastante homogêneas permitindo o controle de algumas variáveis encontradas quando os experimentos são realizados em campo. A metodologia de semicampo é segura, uma vez que os insetos são mantidos em área confinada, protegida por tela fina, impedindo que os insetos que estão sendo avaliados escapem para fora da área experimental e impede a entrada dos mosquitos que estão no ambiente natural. A metodologia de semicampo foi utilizada na avaliação da atratividade de formulações terciária de atraentes sintéticos de oviposição, identificados na infusão de capim colônia, bem como na avaliação de liberadores de odor para os compostos sintéticos testados. A validação dos resultados destes

experimentos foi feita em área urbana, os resultados obtidos no campo foram semelhantes aos da área experimental, evidenciando assim a eficiência da metodologia de semicampo na avaliação de respostas comportamentais de fêmeas grávidas de *A. aegypti*.

4- PERSPECTIVAS

A eficiência do *AtrAedes*[®] na captura de fêmeas grávidas foi confirmada em estudos de campo e semicampo. Também foi observado no presente estudo, efeito aditivo quando o atraente sintético de oviposição foi associado ao decanal e p-cresol ou 3-metil indol formando uma mistura terciária. No entanto, liberadores de odor não foram utilizados nestes experimentos, os testes foram realizados utilizando compostos sintéticos em solução, o que acarreta maior instabilidade, uma vez que estes compostos são muito voláteis. A utilização de liberadores de odor permite a liberação contínua e constante do composto avaliado, diminuindo a influência da temperatura e da umidade relativa na liberação do odor atrativo. Talvez efeito sinérgico possa ser observado quando estes compostos sintéticos forem avaliados associados a liberadores em ensaios futuros.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan, S.A. & Kline, D.L. 1995.** Evaluation of organic infusions and synthetic compounds mediating oviposition in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *J. Chem. Ecol.* 21: 1847-1860.
- Beehler, J.W., Millar, J.G. & Mulla, M.S. 1994.** Field evaluation of synthetic compounds mediating oviposition in *Culex* mosquitoes (Diptera:Culicidae). *J. Chem. Ecol.* 20:281-291.
- Bentley, M. D. & Day, J. F. 1989.** Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 401-421.
- Bentley, M. D., McDaniel, I. N., Yatagai, M., Lee, H. & Maynard, R. 1979.** *p*-Cresol: an oviposition attractant of *Aedes triseriatus*. *Environ. Entomol.* 8: 206-209.
- Braga, I.A., Gomes A.D., Nelson, M., Mello, R.D., Bergamaschi, D.P. & J.M. De Sousa. 2000.** Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor population of *Aedes aegypti*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33: 347-53.
- Cabrera, A., Eiras, A.E., Gries, G., Gries, R., Urdaneta, N., Miras, B., Badji, C. & Jaffe, K. 2001.** Sex pheromone of tomato fruit borer, *Neoleucinodes elegantalis*. *J. Chem. Ecol.* 27:2097-2107.
- Chadee, D.D., Lakkan, A., W.R. Ramdath & Persad, R.C. 1993.** Oviposition response of *Aedes aegypti* mosquitoes to different concentrations of hay infusion in Trinidad, West Indies. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 9: 346-348.
- Cheng, M.L., Ho, B.C., Bartnett, R.E. & Goodwin, N. 1982.** Role of a modified ovitrap in the control of *Aedes aegypti* in Houston, Texas, USA. *Bulletin of the World Health Organization* 60:291-296.
- Clements, A.N. 2000.** The biology of mosquitoes. Sensory reception and behavior. (2nd Edition). 740 pp. CABI Publishing, New York.
- Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994.** Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p.

- Dekker, T., Steib, B., Cardé, R.T., Geier, M. 2002.** L-lactic acid: a human-signifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.* 16:91-98.
- Du, Y.J. & Millar, J.G.. 1999.** Electroantennogram and oviposition bioassay responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera:Culicidae) to chemicals in odors from bermuda grass infusions. *J. Med. Entomol.* 36: 158-166.
- Ecovec. 2007.** Disponível em <[http:// www. Ecovec.com.br](http://www.Ecovec.com.br)>. Cited: 15 Març. 2007.
- Edman, J.D., Scott, T.W., Costero, A., Morrison, A.C., Harrington, L.C. & Clark, G.G. 1998.** *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. *J. Med. Entomol.* 35: 578-583.
- Eiras, A.E. 1991.** The role of human odours in host location behaviour by female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). Tese Ph.D., University of Southampton, Inglaterra, 122 p.
- Eiras, A.E. 2001.** Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos vetores de doenças médico-veterinárias, cap 12. p. 99-122. In E.F. Vilela & M.T.D. Lúcia (eds) *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. Editora Holos, 206p.
- Eiras, A.E. 2002.** Armadilha para a captura de insetos. Depósito de patente no Brasil: PI0203907-9. Data 05/09/2002.
- Eiras, A.E. 2004.** Avaliação da MosquiTRAP® e de um programa de monitoramento informatizado: validação de uma nova tecnologia para o monitoramento e geração de novos índices de vigilância entomológica para o *Aedes aegypti*. Relatório técnico de pesquisa submetido a FNS. 84p.
- Eiras, A.E. 2005. Culicídeos. pp. 355-367 In:** *Parasitologia Humana*. Eds. D.P. Neves, A.L. de Melo, O. Genaro & P.M. Linardi. 11th Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, Brazil. 494p.
- Eiras, A.E. & Jepson, P.C. 1991.** Host location by *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bull. Entomol Res.* 81: 151-160.

- Eiras, A.E. & Mafra-Neto, A. 2001.** Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos cap 3. p. 27-39. In E.F. Vilela & M.T.Della Lúcia (eds) Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Editora Holos, 206p.
- Eiras, A.E, Resende, M.C & Silva, I.M. 2006.** Proposta de validação da MosquiTRAP® e do Sistema de Monitoramento Inteligente (MI-Dengue): uma nova tecnologia para o monitoramento e geração de índices de vigilância entomológica para o Programa Nacional de Controle da Dengue. Relatório técnico submetido à SVS-MS, 177p.
- Eiras, A.E. & Sant’Ana, A.L. 2001.** Atraentes de oviposição para mosquitos. Depósito de patente no Brasil: PI0106701-0. Data 20/12/2001.
- Eiras, A. E., Silva, I. M., Resende, M. C. 2003.** Proposta de novo método de monitoramento e de novos índices de vigilância entomológica usando MosquiTRAP, uma nova armadilha para a captura de adultos do mosquito *Aedes aegypti*. Relatório técnico de pesquisa submetido a FNS. 36p.
- Favaro, E. A., Dibo, M. R., Mondini, A., Ferreira, A. C., Barbosa, A. A. C., Eiras, A. E., Barata, E.A.M.F. & 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, R.W. & Perry, A.S. 1965.** Laboratory studies of oviposition preferences of *Aedes aegypti*. Mosq. News 25:276-281.
- Fay, R.W. & Eliason, D.A. 1966.** A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. Mosq. News 26: 531-535.
- Fundação Nacional de Saúde. 2001. Dengue – Instrução para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. – 3ª ed., rev. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional da Saúde. 84p.**

- Gama, R.A. 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, 121p.
- Gama, R. A., Silva, E. M., Silva, I. M., Resende, M. C. & Eiras, A. E. 2007.** Evaluation of the sticky MosquiTRAP[®] for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera:Culicidae) in the dry season in the district of Itapõa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Neotrop. entomol. 36:294-302.
- Geier, M., Bosch, O. J. & Boeckh, J. 1999.** Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. J. Exp. Biol. 202:1639-1648.
- Gjullin, C. M., Johnsen, J.O. & Plapp Jr, F.W. 1965.** The effect of odors released by various waters on the oviposition sites selected by two species of *Culex*. Mosq. News. 25: 268-271.
- Gomes, A.S. 2003.** Comportamento de oviposição e exploração de criadouros, por fêmeas grávidas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidea), em condições de laboratório e campo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 97p.
- Gomes A. S., de Sá Sciavicco, C.J. Eiras, A. E. 2006.** Periodicity of oviposition of females of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culicidae) in laboratory and field. Rev. Bras. Med. Trop. 39:327-332.
- Honório, N. A., Silva, W. da C., Leite, P. J., Gonçalves, J. M., Lounibos, L. P. & Lourenço-de-Oliveira, R. 2003.** Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidea) in the urban endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98:191-198.
- Ikeshoji, T., Ichimoto, I., Konishi, J., Naoshima, Y. & Ueda, H., 1963.** 7-11-Dimethyloctadecane: an ovipositional attractant for *A. aegypti* produced by *Pseudomonas aeruginosa* on capric acid substrate. J. Pest. Sci. 4:187-194.

- Impoinvil, D. E., Kongere, J. O., Foster, W. A., Nijiru, B. N., Killeen, G. F., Githure, J. I., Beier, J. C., Hassanali, A. & Knols, B. G. J. 2004.** Feeding and survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* on plants growing in Kenya. *Med. Vet. Entomol.* 18:108-115.
- Isoe, J., Beehler, J. W., Millar, J. G. & Mulla M. S. 1995.** Oviposition responses of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* to aged Bermuda grass infusions. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11: 39-44.
- Knols, B.G.J., Njiru, B. N., Mathenge E. M., Mukabana, W. R., Beier, J. C. & Killeen, G. F. 2002.** MalariaSphere: a greenhouse-enclosed simulation of a natural *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) ecosystem in western Kenya. *Malaria J.* 1: 1-13.
- Kramer, W.L. & Mulla, M.S. 1979.** Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: oviposition responses of *Culex quinquefasciatus* to organic infusions. *Environ. Entomol.* 8: 1111-1117.
- Kröckel, U., Rose, A., Eiras, A. E. & 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, C. A. 2005.** Desenvolvimento de armadilha e atraente de oviposição sintético para captura de fêmeas grávidas de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera:Culicidae). Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 170p.
- Maciel-de-Freitas, R., Eiras, A.E. & Lourenço-de-Oliveira, R. 2006.** Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 321-325.
- Marques, C.C.A., Marques, G.R.A.M., Brito, M., Santos-Neto, L.G., Ishibaschi, V.C. & Gomes, F.A. 1993.** Comparative study of the efficiency of larval and ovitraps for surveillance of dengue and yellow fever vectors. *Rev. Saúde. Pública.* 27: 237-41.

- Mathenge E. M., Killeen, G. F., Oulo, D.O., Irungu, L. W., Ndegwa, P.N. & Knols, B.G.J. 2002.** Development of an exposure-free bednet trap for sampling Afrotropical malaria vectors. *Med. Vet. Entomol.* 16: 67-74.
- Mboera, L.E.G., Takken, W., Mdira, K.Y., Pickett, J. A. 2000.** Sampling gravid *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) Tanzania with traps baited with synthetic oviposition pheromone and grass infusion. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 37:172-76.
- Millar, J.G., Chaney, J.D. & Mulla, M.S. 1992.** Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented Bermuda grass infusions. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 8:11-17.
- Miller D.N. & Woodburry, B.L. 2006.** A solid phase microextraction chamber method for analysis of manure volatiles. *J. Environ. Qual.* 35:2383-2394.
- Ministério da Saúde 2007.** Disponível em <[http:// www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)> Cited:23 Març. 2007.
- Njiru, B. N., Mukabana, W. R., Takken, W. & Knols, B.G.J. 2006.** Trapping of malaria vector *Anopheles gambiae* with odour-baited MM-X traps in semi-field conditions in western Kenya. *Malaria J.* 5:39.
- Nordland, R.T. 1981.** Terminology of semiochemicals: a review, p.7-25. In the role of semiochemicals in insect pest control. Academic Press. New York. 306p.
- Okanda, F. M., Dão, A., Njiru, B. N., Arija, J., Akelo, H. A., Touré, Y., Odulaja, A., Beier, J. C., Githure, J. I., Yan, G., Gouagna, L.C., Knols, B.G.J. & Killeen, G.F. 2002.** Behavioural determinants of gene flow in malaria vector populations: *Anopheles gambiae* males select large females as mates. *Malaria J.* 1:10.
- Okech, B. A., Gouagna, L. C., Killeen, G. F., Knols, B.G.J., Kabiru, E. W., Beier, J. C., Yan, G. & Githure, J. I. 2003.** Influence of sugar availability and indoor microclimate on survival of *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) under semi-field conditions in western Kenya. *J. Med. Entomol.* 40: 657-663.

- Olagbemiro, T. O., Birkett, M.A., Mordue (Luntz), A.J. & Pickett, J.A. 2004.** Laboratory and field responses of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, to plant-derived *Culex* spp oviposition pheromone and the oviposition cue skatole. J. Chem.Ecol.. 30(5): 965-976.
- Organização Mundial da Saúde. 1987.** Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle. Genebra.
- Organización Panamericana de la Salud. 1986.** *Aedes aegypti*: Biología & Ecología. Washington, D.C., 50p.
- Organização Panamericana de la Salud. 1992.** El dengue y la fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: una vision general del problema. Bol. Epidemiol. 13 (1).
- Pessôa, S.B. & A.V. Martins. 1982.** Parasitologia Médica. Guanabara Koogan, RJ 11^a ed.
- Rawlins, S.C., Martinez, R., Wiltshire, S. & Legall, G. 1998.** A comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in port of Spain, Trinidad. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 14:131-136.
- Reiter, P., Amador, M.A. & Colon, N. 1991.** Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusion for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 7: 52-55.
- Reiter, P., Amador, M. A., Anderson, R. A. & Clark, G. G. 1995.** Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52: 177-179.
- Roberts, D. R. & Hsi, B. P., 1977.** Method of evaluating *Aedes* ovipositional attractants. J. Med. Entomol.14:129-131.

- Roque, R. A. 2002.** Avaliação de armadilhas iscadas com infusões de gramíneas como atraentes e/ou estimulantes de oviposição do mosquito *Aedes (Stegomyia) sp.* (Diptera:Culicidae). Dissertação Mestrado. Universidade Federal Minas Gerais. 84p.
- Russell, R.C., Webb, C. E., Williams, C. R. & Ritchie, S.A. 2005.** Mark-release-recapture study to measure dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *Med. Vet. Entomol.* 19:1-7.
- Sant'Ana, A. L. 2003.** Avaliação, Extração, Identificação 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. 103p.
- Sant'Ana, A. L., Roque, R. A. & Eiras, A. E. 2006.** Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes (Stegomyia)* (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol.* 43: 214-220.
- Seyoum, A., Kabiru, E. W., Lwande, W., Killeen, G. F., Hassanali, A., & Knols, B.G.J. 2002b.** Repellency of live potted plants against *Anopheles gambiae* from human baits in semi-fields experimental huts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67:191-195.
- Seyoum, A., Palsom, K., Kung'a, S., Kabiru, E. W., Lwande, W., Killeen, G. F., Hassanali, A. & Knols, B.G.J. 2002a.** Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96:225-231.
- Trexler, J.D., Apperson C.S., Gemeno C., Perich M. J., & Schal C. 2003.** Field and laboratory evaluations of potential oviposition attractants for *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19: 228-234.

Trexler, J.D., Apperson, C.S. & Schal C. 1998. Laboratory and field evaluations of oviposition responses of *Aedes albopictus* and *Aedes triseriatus* (Diptera:Culicidae) to oak leaf infusions. J. Med. Entomol. 35: 967-975.

Vilela, E.F. & Della Lucia, T.M.C.. 2001. Introdução aos semioquímicos e terminologia. Capítulo 1. p. 9-13. In E.F. Vilela & M.T.D. Lúcia (eds) Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Editora Holos, 206p.