



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

THAIS MARCHI GOULART

ESTUDO DOS ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Nyssomyia*  
*neivai* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E APRIMORAMENTO DAS  
TÉCNICAS DE COLONIZAÇÃO EM LABORATÓRIO

CAMPINAS  
2016

THAIS MARCHI GOULART

ESTUDO DOS ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *NYSSOMYIA NEIVAI*  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE) E APRIMORAMENTO DAS TÉCNICAS DE  
COLONIZAÇÃO EM LABORATÓRIO

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de  
Doutora em Biologia Animal, na Área de  
Relações Antrópicas, Meio Ambiente e  
Parasitologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA THAIS MARCHI GOULART, E  
ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A). MARA  
CRISTINA PINTO.

Orientador: MARA CRISTINA PINTO

Coorientador: MARILI VILLA NOVA RODRIGUES

CAMPINAS  
2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G729e Goulart, Thais Marchi, 1982-  
Estudo dos aspectos biológicos de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) e aprimoramento das técnicas de colonização em laboratório / Thais Marchi Goulart. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.  
  
Orientador: Mara Cristina Pinto.  
Coorientador: Marili Villa Nova Rodrigues.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.  
  
1. Diptero. 2. Flebotomíneo. 3. Colonização (Ecologia). 4. Microextração em fase sólida. 5. GC-MS. I. Pinto, Mara Cristina. II. Rodrigues, Marili Villa Nova, 1965-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of biological aspects of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) and improvement of colonization techniques in laboratory

**Palavras-chave em inglês:**

Diptera

Sand flies

Colonization (Ecology)

Solid phase microextraction

GC-MS

**Área de concentração:** Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Mara Cristina Pinto [Orientador]

Eunice Aparecida Bianchi Galati

Patricia Jacqueline Thyssen

Danilo Ciccone Miguel

Claudio Casanova

**Data de defesa:** 24-08-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

Campinas, 24 de Agosto de 2016.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof.(a) Dr.(a). Mara Cristina Pinto

Prof.(a). Dr.(a) Eunice Aparecida Bianchi Galati

Prof.(a) Dr(a). Patricia Jacqueline Thyssen

Prof.(a) Dr(a). Danilo Ciccone Miguel

Prof.(a) Dr(a). Claudio Casanova

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*



À minha família,  
alicerce da minha alma, razão do meu viver.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Sheila pela fonte de inspiração e minha razão de existir. Amo vocês! E aos meus irmãos, Rachel e Roberto pelas conversas e momentos de incentivo, brigas e alegrias. Amo muito tudo isso.

A querida orientadora, Prof. Dra. Mara Cristina Pinto por toda paciência, ensinamentos, inspiração, risadas e piadas, tornando a jornada do doutorado possível e muito mais agradável. E a querida coorientadora Dra. Marili Villa Nova Rodrigues, pelo apoio e carinho.

Aos professores do Departamento de Biologia Animal – IB/UNICAMP em especial aos Professores Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo e Dr. Angelo Pires do Prado, pela amizade, atenção e sugestões para a vida. A saudade é infinita. Estarão sempre no meu coração!

À querida amiga Sueli Gardim por **tudo**! Pelo abrigo, conversas, paciência, carinho, comilanças, coração enorme, pelo Paulo Curti, pelas amigos terceirizados, pelo Leozinho e o melhor de tudo: pela amizade. Sem você nada disso seria possível.

Aos queridos amigos Vicente Estevam Machado e Flávia Benini da Rocha Silva, que infernizaram meus dias, com músicas desagradáveis, puxões de cabelo, pincéis no ouvido e muito mais! Amigos para toda a vida. Sentirei muito a sua falta!

À melhor IC que pode existir: Camila Feitosa de Castro, pela paciência e por alegrar a todos por onde passa. Sua alegria é contagiante.

Às queridas amigas Renata Ribeiro, Thamyres Carvalho e Camila Biazoni, pelas longas conversas, risadas e amizade!

Ao queridos amigos Wanderson Oliveira e Dennys Ortiz, pelo apoio nos momentos de desespero e por dividir os momentos de alegria.

Aos queridos amigos da parte dos triatomíneos, pelos momentos maravilhosos, risadas, besteiras e comilanças na cozinha: Prof. Dr. João Aristeu, Heloísa Pinoti, Jader Oliveira, Aline Rimoldi, Danila Blanco, Tiago Beliantani, Lucas Abrantes, Rossana Falcone, Juliana Damieli;

Aos funcionários, técnicos e colegas do Laboratório de Parasitologia da FCFar Unesp, pela ajuda e contribuição;

Ao querido Prof. Dr. Christiann Davis Tosta do Instituto Federal de São Paulo, pelo apoio recebido para as análises de SPME em GC-MS;

Ao querido Felipe Silva Telles, minha metade, que sempre acreditou no meu potencial e que, mesmo à distância, continuou me incentivando e acalmando nos momentos difíceis. Te amo!

## RESUMO

Algumas espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), transmissoras de *Leishmania*, são de difícil manutenção ou baixa produtividade em laboratório. Essas limitações prejudicam a realização de bioensaios que, de modo geral, utilizam grande quantidade de insetos. As tentativas de manutenção da espécie *Nyssomyia neivai* (= *Lutzomyia neivai*), considerada de importância na transmissão da leishmaniose tegumentar Americana, em laboratório são escassas, além de serem observadas altas taxas de mortalidade quando utilizados protocolos para outras espécies de flebotomíneos. Visando aumentar os conhecimentos de biologia básica de *Ny. neivai* e o aprimoramento de técnicas de criação mais específicas e eficientes, este estudo teve como objetivo principal investigar alternativas possíveis durante as diferentes fases de desenvolvimento do inseto. Basicamente quatro pontos cruciais no processo de criação foram focados: fonte alimentar sanguínea para as fêmeas, fonte alimentar de açúcares para os adultos, dieta das formas imaturas e investigação da presença de feromônios de oviposição. Entretanto, ao longo do processo de colonização de *Ny. neivai*, e das dificuldades encontradas, observamos outros pontos que poderiam apresentar relevância para um melhor rendimento no número final de adultos produzidos. Como resultado, foi obtida a maior produtividade de adultos e menor perda de larvas adicionando de cinco a dez casais em recipientes de criação (145 mL) para oviposição. A vermiculita mostrou-se um ótimo substrato a ser adicionado por cima do gesso na criação das larvas. A dieta artificial tradicional autoclavada, mostrou-se mais atrativa dentre as testadas e proporcionou o melhor desenvolvimento das formas imaturas. O camundongo mostrou-se a melhor alternativa como fonte alimentar sanguínea para os insetos. A alimentação artificial com membrana não foi eficiente para a manutenção da colônia, porém, para estudos de infecção de poucos indivíduos por micro-organismos, a alimentação artificial com membrana de pele de camundongo e sangue humano pode ser uma alternativa viável. Através da cromatografia gasosa, foram encontrados os carboidratos: frutose, glucose, isomaltose, ribose e trealose em insetos de campo e foi avaliada a curva de sobrevivência dos insetos alimentados com os três primeiros açúcares, separadamente, e com dois alimentos glicosados comerciais, resultando na melhor opção para a rotina laboratorial o alimento glicosado Favinho®. Na procura de feromônios de oviposição, experimentos de evidência biológica foram delineados e em todos esses experimentos não houve indicação da presença de voláteis na superfície dos ovos. Ainda na tentativa de isolamento químico de compostos nos ovos de *Ny. neivai* testes foram realizados com Microextração em fase sólida (SPME) e GC-MS. Esses testes apresentaram contaminantes nos cromatogramas, impedindo sua real análise e encobrendo possíveis picos de interesse. A partir desses resultados levanta-se a hipótese de que *Ny. neivai* não possua feromônios de oviposição, apresentando resposta visual. Porém, pode haver um sinergismo entre a resposta visual e os feromônios ainda não detectados pela metodologia adotada.

Palavras-chave: Flebotomíneo, *Nyssomyia neivai*, técnicas de colonização

## ABSTRACT

Some sandflies species (Diptera: Psychodidae), vector of *leishmania* are difficult to maintain or to produce in laboratory conditions. These limitations prejudice experiments that demand high number of insects. *Nyssomyia neivai* (= *Lutzomyia neivai*) is considered important in the transmission of the American Cutaneous Leishmaniasis and it is a specie with the features above. The attempts to maintain this specie in laboratory conditions are scarce and follow another phlebotomine species protocol resulting in a great mortality of insects. Aiming to increase the knowledge of the basic biology of *Ny. neivai* and the improvement of the rearing techniques to be more specific and efficient, the main purpose of this project was to investigate possible alternatives during the different development phases of the insect. Basically, four crucial points were focused: blood source for female sandflies, sugar source for adults, diet for immature stages and investigation of presence of oviposition pheromones. However, in this long process of colonization of *Ny. neivai* and the difficulties found, we were able to observe another points that could be relevant for a higher number of produced adults. The best result was achieved with five to ten couples inside a rearing pot (145 mL) for oviposition and vermiculite grains proved to be a great substrate to cover the plaster of Paris for the larvae rearing. The traditional diet, sterilized by autoclave, proved to be more attractive among the diets tested and provided better development for immature stages. The mice proved to be the best blood source for the female insects. The membrane feeding technique was not efficient to maintain the colony; however, it is a viable method for studies, with few sandflies, of infection with microorganism using mice skin as membrane and human blood as blood source. Fructose, glucose, isomaltose, ribose and trealose were the carbohydrates found in field insects, using gas chromatography, and the survival curve of sandflies was analyzed with the three first sugars mentioned above; two more commercial products were offered to the insects. As result, the commercial product Favinho<sup>®</sup> proved to be the better one to be used in the laboratory routine. Searching for oviposition pheromones, experiments of biological evidence were performed and the results revealed no indication of volatiles in the surface of the eggs. In the attempt to isolate chemical compounds, *Ny. neivai* eggs were exposed to Solid Phase Microextraction (SPME) and GC-MS. The tests result presented contamination in the chromatograms, preventing the real analysis and occulting possible peaks of interest. Thus, these results raise the hypothesis that there is no oviposition pheromones in *Ny. neivai*, presenting visual stimulus. Nevertheless, it could be a synergism between visual stimulus and pheromones not yet detected with the methodology adopted.

Keywords: Sandfly, *Nyssomyia neivai*, colonization techniques

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### MATERIAL E MÉTODOS

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - (a) Rio Mogi-Guaçu, (b) uma das áreas de coleta; (c) uma das casas da região; (d) parede onde os insetos pousam. ....                      | 35 |
| Figura 2 - (a) Armadilha luminosa, (b) capturador de Castro. ....                                                                                     | 36 |
| Figura 3 - (a) Gaiolas utilizadas na criação dos insetos, (b) sacos plásticos transparentes utilizados para manter a umidade dentro das gaiolas. .... | 36 |
| Figura 4 - (a) Fêmea alimentada, (b) Recipiente de criação. ....                                                                                      | 37 |
| Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Ny. neivai</i> dentro do recipiente de criação. (a) ovos, (b) larva, (c) pupas e (d) adulto.....                       | 38 |
| Figura 6 - (a) Espermatecas de <i>Ny. neivai</i> , (b) Ductos ejaculatórios de <i>Ny. neivai</i> (seta) . ....                                        | 39 |

### CAPÍTULO 1

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Recipientes de criação de larvas até adultos em três tratamentos da dieta oferecida às larvas de <i>Ny. neivai</i> : não autoclavada, autoclavada e tinalizada. ....                   | 53 |
| Figura 2 - (a) Diferentes dietas distribuídas nos quadrantes do recipiente; (b) os recipientes do experimento foram colocados em organizadores.....                                               | 55 |
| Figura 3 - (a) Recipientes com fundo de gesso e substratos de escolha: 1-terra vegetal, 2-cascalho, 3-vermiculita, 4-gesso; (b) casais adicionados ao recipiente de criação com vermiculita. .... | 57 |
| Figura 4 - Diferença no tamanho dos recipientes de criação de 250 mL e 145 mL utilizados para estimar a produtividade de <i>Ny. neivai</i> . ....                                                 | 58 |
| Figura 5 - (a) Camundongo anestesiado exposto aos insetos, (b) fêmeas se alimentando em pata de hamster anestesiado.....                                                                          | 60 |
| Figura 6 - (a) Alimentador artificial acoplado ao banho Maria e insetos mantidos em gaiola; (b) Pele de frango posicionada para ser utilizada em alimentador artificial. ..                       | 61 |
| Figura 7 - (a) Fêmeas de <i>Ny. neivai</i> se alimentando em alimentador artificial; (b) Fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> se alimentando em alimentador artificial.....                               | 62 |
| Figura 8 - Esquematização do "Glytube", metodologia utilizada para alimentação artificial (COSTA DA SILVA et al., 2013).....                                                                      | 63 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 9 - (a) Glytube acoplado à gaiola; (b) alimentador acoplado ao tudo Falcon; (c) alimentador acoplado diretamente à gaiola; (d) alimentador acoplado perpendicularmente em caixa de acrílico. ....                                                                                                                               | 63 |
| Figura 10 - (a) Nova metodologia utilizada nos testes de alimentador artificial: banho-maria acoplado ao alimentador, (b) recipientes interligados com o alimentador artificial. ....                                                                                                                                                  | 64 |
| Figura 11 - (a) Remoção da pele de pintinho; (b) pele de pintinho como membrana no alimentador artificial; (c) pele de camundongo, intestino de porco e pele de pintinho acoplados em alimentadores para realização dos testes. ....                                                                                                   | 65 |
| Figura 12 - (a) Pele do camundongo fêmea sendo aparada para remoção; (b) pele acoplada ao alimentador artificial. ....                                                                                                                                                                                                                 | 65 |
| Figura 13 - Número de adultos oriundos das dietas: autoclavada, não autoclavada e tindalizada (N= 100 ovos). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). ....                                                                                                                       | 67 |
| Figura 14 - Número de larvas por dia em cada dieta artificial (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). ....                                                                                                                                                                | 68 |
| Figura 15 - Número de larvas atraídas pelas dietas conforme a contagem diária (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). ....                                                                                                                                                | 68 |
| Figura 16 - Produção de adultos comparados à quatro diferentes tipos de alimentação larval (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). ....                                                                                                                                   | 69 |
| Figura 17 - Produção de adultos em diferentes substratos (n=5). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). ....                                                                                                                                                                     | 70 |
| Figura 18 - Produção de adultos de <i>Ny. neivai</i> em recipientes com gesso e vermiculita (n=10). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). ....                                                                                                                                 | 70 |
| Figura 19 - Porcentagem de adultos emergidos por número de ovos nos diferentes tamanhos de recipientes de (a) ● cinco casais, ■ dez casais, ▲ quinze casais, ○ vinte casais, ◆ vinte e cinco casais, * trinta casais em recipientes de 250 mL e (b) ● cinco casais, ■ dez casais, ▲ quinze casais em recipientes de 150 mL (n=4). .... | 72 |
| Figura 20 - (a) Porcentagem de fêmeas alimentadas em diferentes fontes alimentares; (b) número de ovos por fêmea; (c) porcentagem de adultos por ovos.                                                                                                                                                                                 |    |

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).....                                                         | 73 |
| Figura 21 - (a) Insetos se alimentando através da pele de camundongo fêmea; (b) fêmea ingurgitada através da alimentação pela pele de camundongo.....       | 78 |
| Figura 22 - (a) Fêmeas alimentadas em sangue desfibrinado de carneiro mortas antes da oviposição; (b) ovo normal ao lado de ovo com deformidade (seta)..... | 78 |

## **CAPÍTULO 2**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - Etapas da reação de derivatização (a) Amostras em banho-maria, (b) processo de filtração em microfiltro.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 95  |
| Figura 2 - (a) Cromatogramas obtidos por GC-FID de insetos de laboratório alimentados com Karo®. Extratos de fêmeas; machos; mistos, (b) sobreposição do extrato misto (de cor preta) com padrões de açúcares. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 98  |
| Figura 3 - Cromatogramas obtidos por GC-MS dos insetos de campo pertencentes ao grupo de fêmeas e grupo de machos. Em (a) e (b) cromatogramas apresentando os picos majoritários de açúcares referentes à frutose e glucose para fêmeas e machos, respectivamente. Em (c) janela expandida da sobreposição dos cromatogramas de machos (preto) e fêmeas (azul) mostrando picos minoritários referentes a presença de isomaltose e trealose. Em (d) janela expandida da sobreposição dos cromatogramas de machos (preto) e fêmeas (azul) mostrando picos minoritários referentes a presença de ribose. .... | 100 |
| Figura 4 - Cromatogramas obtidos por GC-MS das amostras analisadas de insetos machos e fêmeas de laboratório com e sem alimentação e com alimentação em Favinho®(a) ; onde são apontadas, em janela expandida as semelhanças e diferenças em termos dos açúcares encontrados (b, c), cromatograma dos açúcares oferecidos aos insetos (d). ....                                                                                                                                                                                                                                                            | 102 |
| Figura 5 - Curvas de sobrevivência de machos e fêmeas de <i>Ny. neivai</i> alimentados com diferentes fontes de carboidratos. (a) Fêmeas; (b) Machos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 103 |

## **CAPÍTULO 3**

|                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - (a) Pasta de “frass” feita com água deionizada; (b) pasta adicionada em uma área de 3,14 cm <sup>2</sup> em recipiente de criação de 250 mL..... | 115 |
| Figura 2 - (a) Preparo da dieta artificial para o teste; (b) recipiente de criação de 250 mL com 1 mL da dieta fermentada por 24h.....                      | 116 |
| Figura 3 - Recipiente de criação com três fontes de estímulos.....                                                                                          | 116 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 4 - (a) Tubo Falcon contendo 3 casais de <i>Ny. neivai</i> ; (b) aparência do recipiente de criação após remoção do tubo falcon. ....                                                                                                                                             | 118 |
| Figura 5 - (a) Ovos mortos por congelamento; (b) ovos vivos e ovos mortos posicionados em quadrantes opostos. ....                                                                                                                                                                       | 119 |
| Figura 6 - (a) <i>Aedes aegypti</i> ; (b) ovos de <i>Ny. neivai</i> e de <i>Ae. aegypti</i> em quadrantes contrários.....                                                                                                                                                                | 119 |
| Figura 7 – (a) Ranhuras feitas em lados opostos do recipiente de criação, (b) detalhe da ranhura feita com o auxílio de uma lamínula.....                                                                                                                                                | 120 |
| Figura 8 - Ovos de <i>Ny. neivai</i> sobre o papel de seda de cor preta inserido sobre o gesso com o objetivo de camuflar os ovos.....                                                                                                                                                   | 121 |
| Figura 9 - (a) Gesso envolvido em papel filme, (b) gesso inserido no recipiente de criação de 250 mL; (c) ovos de <i>Ny. neivai</i> por baixo do papel filme.....                                                                                                                        | 122 |
| Figura 10 - Parte do gesso foi envolta em papel filme para cobrir os ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                                                                                                                                     | 123 |
| Figura 11 - Lamínulas cobrindo cavidade com e sem ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                                                                                                                                                        | 123 |
| Figura 12 - Organizadores foram encapados e inseridos dentro de armários fechados para impedir a entrada de luz. ....                                                                                                                                                                    | 124 |
| Figura 13 - (a) Fibra para adsorção de possíveis voláteis; (b) tubos com as fibras inseridas; (c) GC-MS; aparelho utilizado para a análise das fibras. ....                                                                                                                              | 127 |
| Figura 14 - Fibras para extração de voláteis acopladas os recipientes com os tratamentos. ....                                                                                                                                                                                           | 127 |
| Figura 15 - Metodologia de criação sem gesso foi utilizada. ....                                                                                                                                                                                                                         | 129 |
| Figura 16 - (a) Extração dos possíveis voláteis emanados pelos ovos; (b) fibra inserida em CG-MS.....                                                                                                                                                                                    | 129 |
| Figura 17 - (a) Ovos de <i>Ny. neivai</i> sobre o “frass”; (b) oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes de oviposição contendo "frass" em um dos quadrantes (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos (p<0,05). 130                   |     |
| Figura 18 - Oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes de oviposição contendo fezes de coelho em um dos quadrantes mostrou maior quantidades de ovos no quadrante com estímulo (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos (p<0,05). .... | 130 |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 19 - Oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes contendo dieta para larvas em um dos quadrantes mostrou diferença estatística entre os tratamentos (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). 131             | 131 |
| Figura 20 - Oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes de oviposição contendo conjuntamente: "frass", fezes de coelho e dieta para larvas em um dos quadrantes (n=4). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). 131       | 131 |
| Figura 21 - Oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes de oviposição contendo isoladamente: "frass", fezes de coelho, dieta para larvas e gesso em um dos quadrantes (n=4). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). 132 | 132 |
| Figura 22 - Oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes de oviposição contendo ovos conspécíficos em uma das seis partes divididas do gesso como fonte de estímulo (n=5). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). 133     | 133 |
| Figura 23 – Comparação da oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes de oviposição entre ovos vivos e mortos utilizados como fonte de estímulo (n=4). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). 133                       | 133 |
| Figura 24 - Comparação da oviposição de <i>Ny. neivai</i> em recipientes de oviposição entre ovos do flebotomíneo e <i>Ae. aegypti</i> utilizados como fonte de estímulo (n=5). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). 134 | 134 |
| Figura 25 – Oviposição e comparação do número de ovos de <i>Ny. neivai</i> em ranhuras com e sem ovos (n = 4). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). 134                                                                  | 134 |
| Figura 26 – Oviposição de <i>Ny. neivai</i> sobre o papel preto (n = 4). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). 135                                                                                                        | 135 |
| Figura 27 - Oviposição em recipientes de oviposição cm papel filme recobrimdo toda a área do gesso e ovos no quadrante 1, abaixo do papel filme (n=5). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). 135                           | 135 |
| Figura 28 - Oviposição em recipientes de oviposição com papel filme recobrimdo metade da área do gesso e ovos previamente colocados nas duas metades (n = 4).                                                                                                                      |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 136 |
| Figura 29 - Oviposição em recipientes de oviposição com lamínulas recobrimdo as cavidades no gesso ( $n = 10$ ). Letras diferentes significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ).....                                                                                                                                                              | 136 |
| Figura 30 - Oviposição em recipientes de oviposição totalmente no escuro ( $n = 6$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).....                                                                                                                                                                                         | 137 |
| Figura 31 – (a) Maior oviposição no tratamento com ovos (mortos); (b) não houve diferença entre os quadrantes quando utilizado apenas o extrato de ovos; (c) não houve diferença estatística quando utilizado apenas o controle (hexano) ( $n=4$ ). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ).....                            | 138 |
| Figura 32 – (a) Oviposição de <i>Ny. neivai</i> em teste utilizando clorofórmio, metanol e água não apresentou diferença estatística no número de ovos entre os quadrantes, (b) assim como no teste utilizando os ovos lavados como fonte de estímulo ( $p>0,05$ ) ( $n=4$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ )..... | 138 |
| Figura 33 - Picos majoritários no cromatograma são correspondentes a siloxanos, sobrepondo possíveis picos dos voláteis de interesse.....                                                                                                                                                                                                                                        | 139 |
| Figura 34 - Comparação entre os cromatogramas: (a) picos altos de contaminação por ciclotrisiloxano em análise utilizando gesso no fundo recipiente de criação, sem insetos e sem gesso (b) picos de contaminação ausentes em recipientes de criação sem insetos e com fundo recoberto de algodão e papel filtro.....                                                            | 140 |
| Figura 35 - Análise entre frascos com ovos e branco mostraram picos semelhantes. Linha superior: Ovos e metanol. Linha inferior: Metanol. ....                                                                                                                                                                                                                                   | 141 |

## ANEXO

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - (a) Capturador de Castro, (b) armadilha de Shannon, (c) armadilha CDC. ....                                        | 152 |
| Figura 2 - (a) Placas de petri (setas) inseridas no plástico, (b) plásticos envolvendo as gaiolas para manter a umidade. .... | 152 |
| Figura 3 - (a) Tesoura de ponta fina e curva, (b) recipiente e tampa recortados, (c) recipiente de criação pronto. ....       | 154 |

|                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 4 - Quantidade de vermiculita que deve ser inserida no recipiente de criação.                                                                                                                                     | 156 |
| Figura 5 - (a) Pincéis de ponta redonda utilizados na colônia, (b) pinça de ponta fina e ponta redonda, (c) estiletes confeccionados com “hachi” e alfinetes entomológicos podem auxiliar na remoção dos adultos mortos. | 157 |
| Figura 6 - (a) Larvas se alimentando dos fungos, (b) aspecto do fungo que deve ser removido do recipiente.                                                                                                               | 160 |
| Figura 7 - (a; b) Pupas mortas, (c) pupa pronta para a liberação do adulto, com a região das asas de cor preta (d) pupa jovem de aparência normal.                                                                       | 161 |
| Figura 8 - (a) pupa inteira (esquerda), pupa pronta para a emergência do adulto (centro) e pupa vazia (direita); (b) pupa recém-formada.                                                                                 | 162 |
| Figura 9 - Pincéis de ponta chata utilizados na limpeza de recipientes de criação.                                                                                                                                       | 163 |
| Figura 10 - (a) Ácaros de cor alaranjada se alimentando de inseto morto, (b) ácaro de cor esbranquiçada se alimentando da dieta das larvas.                                                                              | 164 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela I - Primeiras variáveis testadas em alimentador artificial com <i>Ny. neivai</i> . ....                                                                             | 61 |
| Tabela II - Médias do número de ovos por fêmeas e erro padrão nos recipientes de criação de 145 mL (5,10 e 15 casais) e 250 mL (5, 10, 15, 20, 25 e 30 casais) (N=4) ..... | 71 |
| Tabela III - Dados brutos referentes à alimentação de 50 fêmeas de <i>Ny. neivai</i> em diferentes fontes sanguíneas (n=3). .....                                          | 73 |
| Tabela IV - Resultados dos testes feitos com diferentes membranas .....                                                                                                    | 75 |
| Tabela V - Produtividade de adultos em relação ao número de ovos de acordo com o tipo de membrana e sangue utilizados no alimentador artificial. ....                      | 77 |

### CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela I - Padrões de açúcares analisados com os respectivos tempos de retenção obtidos nas condições cromatográficas empregadas .....                                                                                                                                                                                     | 99  |
| Tabela II - Alimentos oferecidos aos machos e fêmeas de <i>Ny. neivai</i> para avaliar sua curva de mortalidade. Os alimentos glicosados (Yoki® e Favinho®) e açúcar comum (sacarose) não apresentaram diferença estatística e resultaram em melhores alimentos para os dois sexos em condições laboratoriais (n=3).. .... | 103 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                    | 24 |
| As leishmanioses                                                                                                     | 24 |
| Leishmaniose tegumentar Americana                                                                                    | 25 |
| Flebotomíneos                                                                                                        | 26 |
| Estabelecimento de colônia de flebotomíneos em laboratório                                                           | 28 |
| <i>Nyssomyia neivai</i>                                                                                              | 33 |
| <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                     | 34 |
| Objetivo Geral:                                                                                                      | 34 |
| Objetivos específicos:                                                                                               | 34 |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                                            | 35 |
| 1. Coleta e transporte dos flebotomíneos                                                                             | 35 |
| 2. Manutenção dos insetos em laboratório                                                                             | 37 |
| 3. Identificação dos flebotomíneos                                                                                   | 38 |
| <b>RESULTADOS</b>                                                                                                    | 40 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                    | 41 |
| <b>CAPÍTULO 1</b>                                                                                                    |    |
| Técnicas para o estabelecimento de criação <i>Nyssomyia neivai</i> (Diptera: Psychodidae) em condições laboratoriais | 51 |
| <b>RESUMO</b>                                                                                                        | 51 |
| 1. OBJETIVOS                                                                                                         | 52 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS                                                                                                | 53 |
| 2.1. Avaliação do desenvolvimento das larvas em dieta artificial esterilizada e não esterilizada                     | 53 |
| 2.2. Dietas artificiais alternativas para a alimentação das formas imaturas de <i>Ny. neivai</i>                     | 54 |
| 2.2.1. Preferência alimentar de larvas de <i>Ny. neivai</i> a diferentes dietas artificiais                          | 55 |
| 2.2.2. Preferência alimentar de larvas de <i>Ny. neivai</i> entre dieta tradicional e a multimistura                 | 55 |
| 2.3. Desenvolvimento das larvas de <i>Ny. neivai</i> em dieta Tradicional, Dieta de peixe e a Dieta 3 (F+Te+P)       | 56 |

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4. Avaliação de diferentes substratos para o desenvolvimento da colônia..                                                                                                | 56 |
| 2.5. Avaliação do gesso e da vermiculita como substratos para o desenvolvimento da colônia.....                                                                            | 57 |
| 2.6. Produtividade de ovos e adultos de <i>Ny. neivai</i> (Diptera: Psychodidae) em relação à densidade de insetos .....                                                   | 58 |
| 2.6.1. Efeito da densidade de adultos na oviposição das fêmeas de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                                  | 58 |
| 2.6.2. Efeito da densidade de ovos na produção de adultos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                                       | 59 |
| 2.7. Comparação da produção de ovos e adultos por fêmeas alimentadas em diferentes fontes sanguíneas.....                                                                  | 59 |
| 2.8. Avaliação da alimentação sanguínea em alimentador artificial.....                                                                                                     | 60 |
| 2.8.1. Experimentos para padronização do alimentador artificial .....                                                                                                      | 60 |
| 2.8.2. Alimentador artificial para <i>Ny. neivai</i> .....                                                                                                                 | 64 |
| 3. RESULTADOS .....                                                                                                                                                        | 67 |
| 3.1. Avaliação do desenvolvimento das larvas em dieta artificial esterilizada e não esterilizada.....                                                                      | 67 |
| 3.2. Dietas artificiais alternativas para a alimentação das formas imaturas de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                     | 67 |
| 3.2.1. Preferência alimentar de larvas de <i>Ny. neivai</i> a diferentes dietas artificiais .....                                                                          | 67 |
| 3.2.2. Preferência alimentar de larvas de <i>Ny. neivai</i> entre dieta tradicional e a multimistura.....                                                                  | 68 |
| 3.3. Desenvolvimento das larvas de <i>Ny. neivai</i> em dieta Tradicional, Dieta de peixe, Dieta 3 (F+Te+P) e Multimistura .....                                           | 69 |
| 3.4. Avaliação de diferentes substratos para o desenvolvimento da colônia..                                                                                                | 70 |
| 3.5. Avaliação do gesso e da vermiculita como substratos para o desenvolvimento da colônia.....                                                                            | 70 |
| 3.6. Produtividade de ovos e adultos de <i>Nyssomyia neivai</i> (Diptera: Psychodidae) em relação à densidade de insetos dentro de diferentes recipientes de criação ..... | 71 |
| 3.6.1. Efeito da densidade de indivíduos dentro do recipiente de criação na oviposição das fêmeas de <i>Ny. neivai</i> .....                                               | 71 |

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.2. Efeito da densidade de ovos na produção de adultos de <i>Ny. neivai</i> .....                      | 71 |
| 3.7. Comparação da produção de ovos e adultos por fêmeas alimentadas em diferentes fontes sanguíneas..... | 72 |
| 3.8. Alimentação artificial para <i>Ny. neivai</i> .....                                                  | 74 |
| 4. DISCUSSÃO .....                                                                                        | 79 |
| 5. CONCLUSÕES .....                                                                                       | 87 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                       | 88 |

## CAPÍTULO 2

Identificação dos açúcares ingeridos pelos adultos de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) na natureza.....

RESUMO.....

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. OBJETIVOS .....                                                                                                    | 93 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                           | 93 |
| 2.1. Material biológico .....                                                                                         | 93 |
| 2.2. Padrões analíticos .....                                                                                         | 94 |
| 2.3. Procedimento analítico para ensaio prévio .....                                                                  | 94 |
| 2.3.1. Extração dos açúcares:.....                                                                                    | 94 |
| 2.3.2. Derivatização (metoximação e sililação) .....                                                                  | 94 |
| 2.3.3. Preparo dos padrões .....                                                                                      | 95 |
| 2.3.4. Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama .....                                      | 95 |
| 2.4. Procedimento analítico para identificação dos açúcares .....                                                     | 96 |
| 2.4.1. Preparo dos padrões .....                                                                                      | 96 |
| 2.4.2. Preparo das amostras .....                                                                                     | 96 |
| 2.4.3. Derivatização (sililação) .....                                                                                | 96 |
| 2.4.4. Análise por GC-MS .....                                                                                        | 97 |
| 2.5. Avaliação da longevidade de grupos de adultos de <i>Ny. neivai</i> observando-se a sua curva de mortalidade..... | 97 |
| 3. RESULTADOS .....                                                                                                   | 98 |
| 3.1. Procedimento analítico para ensaio prévio .....                                                                  | 98 |
| 3.2. Procedimento analítico para identificação dos açúcares .....                                                     | 99 |

|                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3. Avaliação da longevidade de grupos de adultos de <i>Ny. neivai</i> observando-se a sua curva de mortalidade ..... | 102 |
| 4. DISCUSSÃO .....                                                                                                     | 104 |
| 5. CONCLUSÕES .....                                                                                                    | 108 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                    | 109 |

### **CAPÍTULO 3**

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Comportamento de oviposição de <i>Nyssomyia neivai</i> (Diptera: Psychodidae).....                                            | 113 |
| RESUMO.....                                                                                                                   | 113 |
| 1. OBJETIVOS .....                                                                                                            | 114 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                   | 115 |
| 2.1. Comportamento de oviposição de <i>Ny. neivai</i> frente à diferentes fontes de estímulo .....                            | 115 |
| 2.1.1. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional .....                                                                     | 115 |
| 2.1.2. Comparação da atratividade de “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional em um mesmo recipiente de criação .....     | 116 |
| 2.1.3. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional apresentados isoladamente e distribuídos pelo recipiente de criação ..... | 117 |
| 2.2. Comportamento de oviposição de <i>Ny. neivai</i> frente aos ovos conspecíficos e não específicos .....                   | 117 |
| 2.2.1. Ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                                        | 118 |
| 2.2.2. Ovos vivos e ovos mortos .....                                                                                         | 118 |
| 2.2.3. Ovos de <i>Aedes aegypti</i> e ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                         | 119 |
| 2.2.4. Ovos em ranhuras do gesso .....                                                                                        | 120 |
| 2.2.5. Camuflagem dos ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                         | 121 |
| 2.2.6. Gesso e ovos envoltos em papel filme .....                                                                             | 122 |
| 2.2.7. Gesso e ovos parcialmente envoltos em papel filme .....                                                                | 122 |
| 2.2.8. Ovos cobertos por lamínula.....                                                                                        | 123 |
| 2.2.9. Ovos totalmente no escuro.....                                                                                         | 124 |
| 2.3. Comportamento de oviposição de <i>Ny. neivai</i> com extrato de ovos .....                                               | 125 |
| 2.3.1. Ovos de <i>Ny. neivai</i> em hexano.....                                                                               | 125 |
| 2.3.2. Ovos de <i>Ny. neivai</i> em metanol / clorofórmio .....                                                               | 125 |
| 2.4. Cromatografia gasosa para identificação de possível feromônios de oviposição em ovos de <i>Ny. neivai</i> .....          | 126 |



|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.4.1. Micro extração em fase sólida (Solid Phase Microextraction - SPME).....                                                | 126 |
| 2.4.2. Aumento do número de ovos e tempo de exposição das fibras .....                                                        | 127 |
| 2.4.3. Extração com hexano.....                                                                                               | 128 |
| 2.4.4. Transferência dos ovos dos recipientes de criação, aumento no número de ovos e fibras.....                             | 128 |
| 2.4.5. Metodologia de criação sem utilização de gesso .....                                                                   | 128 |
| 2.4.6. Extração em metanol .....                                                                                              | 129 |
| 3. RESULTADOS .....                                                                                                           | 130 |
| 3.1. Comportamento de oviposição de <i>Ny. neivai</i> frente à diferentes fontes de estímulo .....                            | 130 |
| 3.1.1. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional .....                                                                     | 130 |
| 3.1.2. Comparação da atratividade de “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional em um mesmo recipiente de criação .....     | 131 |
| 3.1.3. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional apresentados isoladamente e distribuídos pelo recipiente de criação ..... | 132 |
| 3.2. Comportamento de oviposição de <i>Ny. neivai</i> frente à ovos conspecíficos .....                                       | 132 |
| 3.2.1. Ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                                        | 132 |
| 3.2.2. Ovos vivos e ovos mortos .....                                                                                         | 133 |
| 3.2.3. Ovos de <i>Aedes aegypti</i> e ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                         | 134 |
| 3.2.4. Ovos em ranhuras do gesso .....                                                                                        | 134 |
| 3.2.5. Camuflagem dos ovos de <i>Ny. neivai</i> .....                                                                         | 135 |
| 3.2.6. Gesso e ovos envoltos em papel filme .....                                                                             | 135 |
| 3.2.7. Gesso e ovos parcialmente envoltos em papel filme .....                                                                | 136 |
| 3.2.8. Ovos cobertos por lamínula.....                                                                                        | 136 |
| 3.2.9. Ovos totalmente no escuro.....                                                                                         | 137 |
| 3.3. Comportamento de oviposição de <i>Ny. neivai</i> com extratos de ovos.....                                               | 137 |
| 3.3.1. Ovos em hexano .....                                                                                                   | 137 |
| 3.3.2. Ovos em metanol/clorofórmio.....                                                                                       | 138 |
| 3.4. Cromatografia gasosa para identificação de feromônios de oviposição                                                      | 139 |

|                                                                                                                                        |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4.1. Micro extração em fase sólida (Solid Phase Microextraction - SPME).....                                                         | 139        |
| 3.4.2. Aumento do número de ovos e tempo de exposição das fibras .....                                                                 | 139        |
| 3.4.3. Extração com hexano.....                                                                                                        | 140        |
| 3.4.4. Transferência dos ovos dos recipientes de criação, aumento no número de ovos e fibras.....                                      | 140        |
| 3.4.5. Metodologia sem utilização de gesso.....                                                                                        | 140        |
| 3.4.6. Extração em metanol .....                                                                                                       | 141        |
| 4. DISCUSSÃO .....                                                                                                                     | 142        |
| 5. CONCLUSÕES .....                                                                                                                    | 147        |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                    | 148        |
| <b>ANEXO I - PROTOCOLO DE CRIAÇÃO DE <i>Nyssomyia neivai</i> (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS .....</b>               | <b>151</b> |
| Preparo para a coleta .....                                                                                                            | 151        |
| Material para a criação de <i>Ny. neivai</i> em laboratório.....                                                                       | 153        |
| Confecção dos recipientes de criação.....                                                                                              | 154        |
| Alimentação sanguínea .....                                                                                                            | 154        |
| Recipientes de oviposição.....                                                                                                         | 156        |
| 2ª alimentação sanguínea .....                                                                                                         | 157        |
| Preparo da dieta artificial das larvas.....                                                                                            | 158        |
| Eclosão das larvas .....                                                                                                               | 158        |
| Alimentação das larvas .....                                                                                                           | 158        |
| Cuidados com a umidade.....                                                                                                            | 159        |
| Proliferação de fungos.....                                                                                                            | 160        |
| Pupariação .....                                                                                                                       | 161        |
| Emergência dos adultos .....                                                                                                           | 162        |
| Higienização dos recipientes de criação .....                                                                                          | 163        |
| Higienização das gaiolas, tecido “voil” e placas de petri .....                                                                        | 163        |
| Ácaros e formigas.....                                                                                                                 | 164        |
| REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....                                                                                                          | 165        |
| <b>ANEXO II - Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of <i>Nyssomyia neivai</i> (Diptera: Psychodidae) .....</b> | <b>166</b> |

|                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ANEXO III</b> - Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/Unicamp..... | 173 |
| <b>ANEXO IV</b> - Declaração .....                                                                     | 174 |

## INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são hospedeiros naturais de microorganismos que podem desencadear doenças de importância médica e veterinária. No grupo dos protozoários, existem cinco gêneros de tripanossomatídeos parasitas encontrados em flebotomíneos, *Endotrypanum*, *Trypanosoma*, *Sauroleishmania*, *Strigomonas* e *Leishmania*. Somente *Leishmania* é transmitida ao ser humano pela picada deste inseto. Os flebotomíneos são os únicos insetos hematófagos comprovadamente capazes de transmitir a *Leishmania* através da picada de uma fêmea infectada que se alimentou anteriormente em um mamífero infectado. São então considerados grandes transmissores de leishmaniose pelo mundo e nas Américas (YOUNG & DUNCAN, 1994; TEIXEIRA et al., 2011; ALVAR et al., 2012; MAROLI et al., 2013).

### As leishmanioses

A leishmaniose caracteriza-se por um complexo de doenças em todo o mundo com uma série de manifestações clínicas e epidemiológicas. Seus agentes etiológicos são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, podendo infectar numerosos mamíferos, incluindo os seres humanos (GRAMICCIA & GRADONI, 2005). A leishmaniose se apresenta nas formas tegumentar e visceral, ocorrendo em 98 países, em cinco continentes, com 350 milhões de pessoas em risco e 12 milhões de pessoas infectadas anualmente (WHO, 2016). Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru. Dos 500.000 novos casos de leishmaniose visceral, mais de 90% foram reportados na Índia, Nepal, Bangladesh, Sul do Sudão e Nordeste do Brasil (SINGH, 2006). Estas doenças têm um impacto importante na saúde pública, dada a natureza zoonótica do processo (WHO, 2010) e são transmitidas pelos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).

Das 988 espécies de flebotomíneos conhecidas, aproximadamente 530 são encontradas na região Neotropical. Dentro desse grupo, um pouco mais de 20 espécies são comprovadas como vetoras da leishmaniose nas Américas (BRAZIL et al., 2015). Este pequeno número de espécies vetoras, em relação às demais espécies, deve-se a interações fisiológicas e bioquímicas entre hospedeiros e

parasitas, fatores que influenciam na sobrevivência dos parasitas no trato digestivo do inseto e que resultam no desenvolvimento das formas parasitas infectantes, influenciando na transmissão para o hospedeiro vertebrado (GALATI, 2003; BATES, 2004).

Nas Américas, o ser humano é considerado hospedeiro acidental. Os hospedeiros reservatórios, mamíferos de outros grupos, mantêm o ciclo da doença na natureza. Para que ocorra a transmissão, é necessário que as fêmeas dos flebotomíneos realizem ao menos dois repastos sanguíneos, o primeiro dos quais, em um hospedeiro reservatório infectado (LAINSON, 1989).

### **Leishmaniose tegumentar Americana**

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada importante tanto pela sua extensa distribuição geográfica no Brasil como pelas graves lesões cutâneas e mucocutâneas que provoca, pelo grande número de casos, pelo envolvimento psicológico do doente e reflexos no campo social e econômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No geral, as espécies de flebotomíneos do Velho Mundo vivem em ecossistemas desérticos ou semiáridos e as espécies do Novo Mundo vivem em florestas ou ambientes onde exista alguma vegetação. De modo geral, a transmissão da doença nas Américas é associada aos humanos que vivem ou que trabalham próximo ao ambiente de matas (SHARMA & SINGH, 2008).

No Estado de São Paulo, a LTA é relatada há mais de um século quando era conhecida pelo seu caráter ocupacional, acometendo trabalhadores associados a atividades de desmatamento (TOLEZANO, 1994). O número de casos passou a decrescer no terço final de 1950, quando a área florestada do Estado havia caído a níveis próximos a 18% da cobertura original. Apesar disso, de forma surpreendente a incidência da doença voltou a crescer por volta de 1978 na região sul do Estado, e daí em diante mantém-se crescente e ocorre de forma endêmica em áreas de colonização estabelecida, com ciclo de transmissão zoonótico associado a animais silvestres ou sinantrópicos (TOLEZANO, 1994). O centro de vigilância epidemiológico registrou 12.978 casos autóctones de LTA em 385 municípios do estado de São Paulo entre os anos de 1975 e 2008 (SILVA et al, 2012). Nos anos de

2007 a 2016, foram 2.232 casos confirmados no estado segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2016).

*Leishmania braziliensis* é o agente etiológico principal para o Estado de São Paulo (GOMES, 1994). As principais espécies de flebotomíneo que são incriminadas como vetoras de *Leishmania braziliensis* em São Paulo são *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fisheri* e *Pintomyia pessoai* (CAMARGO-NEVES et al., 2002; MARCONDES, 1996; ANDRADE-FILHO et al., 2007; PITA-PEREIRA et al., 2011).

### **Flebotomíneos**

Os flebotomíneos são insetos pequenos, com corpo que não ultrapassa 3 mm de comprimento e possuem coloração que varia de branca acastanha escura. Algumas características de insetos adultos machos e fêmeas os deixam muito fáceis de serem reconhecidos: quando em repouso, mantêm suas asas eretas, em um ângulo superior ao abdome (45°), em forma de “V” e possuem o corpo revestido por cerdas. Somente as fêmeas são hematófagas e antes do repasto, sobrevoam em volta do hospedeiro antes de pousarem. Ao contrário dos mosquitos, seu ataque é silencioso, alimentando-se geralmente durante a noite ou anoitecer, mas também podem picar durante o dia em áreas de floresta ou cavernas (QUATE, 1964; ALEXANDER & YOUNG, 1992; GALATI et al, 2006; BRAZIL et al., 2015). São insetos holometábolos, isto é, tem o seu ciclo de vida caracterizado pelos estágios de ovo, larva (o qual possui quatro estádios), pupa e adulto (BRAZIL & BRAZIL, 2003)

Considera-se que os flebotomíneos tenham pouca capacidade de voo para longas distâncias, sendo incapazes de voar na presença de qualquer corrente de ar produzida por ventilador (SHARMA & SINGH, 2008). Seu voo é lento e caracterizado por saltos (BRAZIL et al., 2015); essas características tornam-se fatores limitantes para a sua dispersão, que é de aproximadamente 300 metros (MAROLI et al., 2013). Porém, estudos de marcação-soltura-recaptura indicaram que para algumas espécies peridomiciliares como *Plebotomus ariasi* a dispersão pode chegar a distância de mais de 2 km (RIOUX et al., 1979; KILLICK-KENDRICK et al., 1984).

Sua oviposição ocorre em micro-habitats onde exista matéria orgânica, calor e umidade necessários para o desenvolvimento das formas imaturas, como fendas, cupinzeiros, cavernas, buracos em raízes de árvores, toca de animais e galinheiros (ALEXANDER, 2000; SHARMA & SINGH, 2008; CASANOVA et al, 2013). A oviposição é dependente da umidade, sendo que as fêmeas grávidas de flebotomíneos ovipõem eficientemente quando a umidade está perto de 100% (ADLER & THEODOR, 1957).

Os ovos podem variar entre 0,3 e 0,5 mm de comprimento e assim que ocorre a oviposição são de cor clara (branco ou cinza claro), mas se tornam escuros após algumas horas. A eclosão da larva é dependente da temperatura e o desenvolvimento da mesma é lento (MAROLI et al, 2013). O número de ovos por fêmea é variável entre as espécies, dependendo da quantidade de sangue ingerida e do número de repastos (READY, 1979; KILLICK-KENDRICK, 1999), podendo chegar em média a 40 ovos em colônias de laboratório (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

As larvas são de formato alongado, com cápsula cefálica escura e possuem um par de filamentos caudais no primeiro estágio larval e dois pares nos três estádios seguintes. Esses filamentos permitem que as formas imaturas sejam fáceis de ser identificadas como pertencentes aos flebotomíneos, porém, essa característica peculiar não é empregada para identificação taxonômica específica entre as diferentes espécies deste inseto devido a dificuldade de se encontrar larvas de flebotomíneos no ambiente natural (FELICIANGELI, 2004).

Ao contrário dos mosquitos, as larvas não se desenvolvem na água, desenvolvem no solo, mas necessitam de relativa umidade (70 a 80%) e temperaturas propícias (variável entre as espécies) para completar seu desenvolvimento. As larvas de flebotomíneos não se afastam muito do local aonde nasceram e se alimentam de matéria orgânica. Quando atinge o quarto estágio, fixam a exúvia da parte caudal no substrato e empupam (MAROLI et al, 2013).

Assim como os ovos, as pupas logo no início são esbranquiçadas tornando-se mais escuras com o passar do tempo. Como são fixas, se movem apenas com movimentos de extensão e flexão do corpo. A quetotaxia torna-se importante para a diferenciação das pupas (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Os insetos adultos, machos e fêmeas, apresentam diferenças morfológicas nos últimos segmentos abdominais, onde no macho, é composto por

apêndices ornamentados e desenvolvidos e na fêmea, por estruturas menos desenvolvidas e de aspecto ovalado (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

O tempo de cada fase de desenvolvimento dos flebotomíneos varia entre as espécies e de acordo com a temperatura e umidade. Geralmente as larvas demoram de 7 a 10 dias para eclodir, demorando até três semanas para empupar. Os adultos emergem cerca de 10 dias após as larvas empuparem, emergindo primeiramente os machos (KILLICK-KENDRICK & KILLICK-KENDRICK, 1999).

Ambos os sexos se alimentam de fontes naturais de açúcares como seiva de plantas (SCHLEIN & WARBUG, 1986) e também do líquido açucarado excretado pelos afídeos e coccídeos (KILLICK-KENDRICK & KILLICK-KENDRICK, 1987). As fêmeas necessitam se alimentar de sangue, pelo menos uma vez, para obter proteínas necessárias para o desenvolvimento de seus ovos (KILLICK-KENDRICK, 1999; SHARMA & SINGH, 2008; MAROLI et al, 2013).

### **Estabelecimento de colônia de flebotomíneos em laboratório**

Das mais de 988 espécies de flebotomíneos conhecidas, menos de 60 espécies foram bem sucedidas em colônias de laboratório e um número ainda menor tem sido mantido continuamente produzindo números suficientes de insetos para trabalhos experimentais (VOLF & VOLFOVA, 2011). O grau de sucesso varia com a espécie. Enquanto algumas espécies são criadas mais facilmente, outras se alimentam com grande dificuldade em condições de laboratório ou em qualquer animal, incluindo seu hospedeiro natural e apresentam baixa produtividade de descendentes (HERTIG & McCONNEL, 1963).

Colônias de flebotomíneos mantidas em laboratório podem ser utilizadas em vários tipos de pesquisa com caráter mais aplicado com relação à transmissão da *Leishmania* spp como o xenodiagnóstico em humanos e animais infectados e infecções experimentais para estudos de competência vetorial. Podem também ser utilizadas para estudos básicos relacionados à biologia e a genética dos vetores. Tais experimentos normalmente exigem um grande número de flebotomíneos e, portanto, a melhoria das técnicas de criação com o objetivo principal de produção em massa desses insetos, com sucesso é, obviamente, importante (WERMELINGER et al., 1987). Muitos autores enfatizaram a dificuldade em



estabelecer tais colônias (KILLICK-KENDRICK, 1978; KILLICK-KENDRICK & KILLICK-KENDRICK, 1991; VOLF & VOLFOVA, 2011).

Flebotomíneos demandam de cuidados especiais no estabelecimento e manutenção da colônia e o início de uma colônia em laboratório é, de longe, mais difícil de realizar do que a manutenção de colônias já estabelecidas (KILLICK-KENDRICK, 1978; YOUNG et al., 1981).

Logo ao iniciar uma colônia e também para a sua manutenção, é necessário um número elevado de ovos. São vários os fatores envolvidos para a escolha do local ideal para a oviposição dos flebotomíneos como físicos, químicos e ambientais (NIEVES et al., 1997). El Naiem & Ward (1992) demonstraram em experimento que fêmeas grávidas de *Lu. longipalpis* preferem ovipor em fendas feitas no gesso do que em locais sem as fendas. Nieves et al. (1997) demonstraram que o tamanho do recipiente de criação não interfere na oviposição e quantidade de ovos em *Lutzomyia migonei*, diferente do que foi demonstrado por Santamaría et al. (2002) que evidenciaram que a densidade de insetos dentro do recipiente de criação influencia na oviposição de *Lutzomyia serrana*.

No que diz respeito a atrativos químicos, o feromônio de oviposição, o qual é secretado junto com os ovos no momento da oviposição (BRAZIL & BRAZIL, 2003), é de grande importância. Em experimento realizado em 1990 por El Naiem & Ward, foi observado que as fêmeas grávidas de *Lu. longipalpis* ovipuseram em maior número em locais aonde se encontrava ovos conspecíficos, concluindo-se que o feromônio estava presente na superfície dos ovos. Em 1997, foi descoberto que o feromônio de oviposição de *Lu. longipalpis* é o ácido dodecanóico, composto que atrai ou estimula as fêmeas grávidas a oviporem no local onde há esse composto (DOUGHERTY & HAMILTON, 1997).

Identificar tais compostos em diferentes espécies de flebotomíneos seria de grande ajuda para o estímulo de oviposição das fêmeas e diminuição da sua mortalidade pré-oviposição em condições laboratoriais, além de confecção de iscas e armadilhas de oviposição que podem ser utilizadas em trabalhos em campo, como monitoramento e armadilhas de controle (DOUGHERTY et al, 1993; HAMILTON, 2008).

Para que haja uma colônia com o número elevado de formas adultas é necessário também haver um número elevado de larvas. As larvas são delicadas e

morrem facilmente. Devido a esses fatores, Modi & Tesh (1983) reportaram que a dieta das larvas é o fator mais importante para manter uma colônia vigorosa de flebotomíneos. Porém, poucos estudos têm comparado diferentes dietas com o objetivo de selecionar a melhor para a criação desses vetores (WERMELINGER & ZANUNCIO, 2001).

Algumas espécies, incluindo *Phlebotomus papatasi* (SCOPOLI, 1786) e *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912), prontamente se adaptaram em condições de laboratório, mas outras não se adaptaram em condições similares (KILLICK-KENDRICK, 1978).

Com relação à criação das espécies *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai*, próximas taxonomicamente, os estudos não apresentam dados muito animadores. Rangel et al. (1985) conseguiram uma produtividade de adultos a partir dos ovos de apenas 34,4% com *Ny. intermedia*. Já em trabalho realizado por Andrade Filho et al. em 2004, obtiveram produtividade de adultos de apenas 35,4% e 20,7%, a partir do número de ovos gerados, para *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*, respectivamente.

Durante o processo de estabelecimento de colônia em laboratório de flebotomíneos, além dos fatores abióticos como temperatura e umidade, os fatores bióticos, como as fontes alimentares oferecidas às fases imaturas e aos adultos, são cruciais. Rangel et al. (1986) avaliaram o efeito da alimentação sanguínea de ser humano, cão, pinto e hamster para *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis* e observaram que o hamster foi o que proporcionou a produção de um maior número de adultos para as duas espécies.

Ressalta-se que além da fonte alimentar, a colonização de insetos hematófagos deve incluir um método eficiente de alimentação, preferencialmente buscando métodos artificiais (HARRE et al., 2001). Atualmente, regras rígidas para a obtenção de licenças de uso de animais, custos elevados na manutenção desses animais e o efeito indireto da anestesia na saúde do animal, justifica o desenvolvimento de uma técnica de alimentação artificial por membrana. A técnica de alimentação artificial por membrana foi usada com sucesso em algumas espécies de flebotomíneos como *Lu. longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* (MODI & TESH, 1983; TESH & MODI, 1984; HARRE et al., 2001; VOLF & VOLFOVA, 2011),

*Lutzomyia flaviscutellata* (WARD et al., 1978) e *Lutzomyia shannoni* (MANN & KAUFFMAN, 2010).

Assim como o sucesso da colonização em laboratório varia com a espécie, a alimentação através de membranas artificiais também varia. Surpreendentemente, Mann & Kaufman (2010) não conseguiram alimentar *Lutzomyia shannoni*, exemplares de laboratório e de campo, através da pele de frango/ pintinho, sendo que essa espécie de flebotomíneo é conhecida por se alimentar de sangue de galinhas.

Adler & Theodor (1927) foram os primeiros a usar alimentação através de membrana em flebotomíneos. Obtiveram resultados satisfatórios na infecção de *Phlebotomus papatasi* com *Leishmania tropica*, mas não obtiveram grande sucesso ao alimentar *Phlebotomus sergenti* através de membranas (WARD et al, 1978).

O que torna difícil a alimentação em membrana é encontrar as condições ideais como o tipo de sangue, o tipo de membrana, temperatura do sangue e do ambiente, além da umidade. Diversos tipos de sangue já foram testados como o sangue humano, de carneiro, de coelho, de boi, de cavalo, de porco, de cachorro e de hamster, assim como diversos tipos de membrana: asa de morcego, pele humana, envoltório de rim humano, envoltório de fígado de boi, pele de pintinho, pele de ratos bebês, intestino de boi e papel Parafilme (READY, 1978; WARD et al., 1978; NOGUERA et al., 2006; MANN & KAUMAN, 2010).

Assim que um padrão é alcançado para uma espécie de flebotomíneo, infecções com *Leishmania* e alimentação artificial para a manutenção de colônias tornam-se possíveis. Harre et al (2001) notaram que a produção de *Ph. papatasi* era maior quando este era alimentado com sangue humano através do método de alimentação artificial com membrana de pintinho do que quando alimentados em hamster. Esse resultado mostrou-se animador para a substituição dos animais pelo método artificial.

Como dito anteriormente, sabe-se que tanto machos quanto fêmeas de flebotomíneos se alimentam de açúcares, que são necessários para sua sobrevivência e atividades metabólicas (KILLICK-KENDRICK, 1979). A importância dessa alimentação por açúcares foi demonstrada em estudos experimentais na transmissão da *Leishmania* durante a picada do vetor (SMITH et al, 1941; SHORTT, 1945). Esses estudos comprovam que a ingestão de açúcares pelo vetor infectado,

facilita a transmissão do parasita. A importância dos carboidratos no aumento da taxa de sobrevivência e aumento no número de ovos em criação de flebotomíneos em laboratório foi confirmada experimentalmente para diversas espécies, incluindo *Lutzomyia trapidoi* (CHANIOTIS, 1974), *Lu. longipalpis* (READY, 1978; EL NAIEM & WARD, 1991; PETSS et al., 1997) e *Ph. papatasi* (HAMED et al., 1986).

Embora seja confirmado ser de origem vegetal, a fonte de carboidratos para os flebotomíneos são controversas. Alguns trabalhos afirmam que são obtidos através da alimentação em vários órgãos de plantas, incluindo pedúnculo, folhas e flores (SCHLEIN & WARBURG, 1986), outros concluem que os carboidratos são obtidos através de secreções de afídeos e coccídeos (KILLICK-KENDRICK & KILLICK-KENDRICK, 1987; MOORE et al., 1987; MACVICKER et al., 1990; MOLYNEUX et al., 1991; CAMERON et al., 1995).

Devido a essas afirmações, pouca atenção tem sido direcionada às frutas como importante fonte de açúcares para flebotomíneos (JUNILLA et al., 2011). Pela importância do carboidrato na sobrevivência dos flebotomíneos, e devido as frutas serem ricas em açúcares, contendo glucose, frutose e sucrose, mesmos componentes do néctar (VAN HALDEN et al., 1972), mais testes foram realizados com o intuito de encontrar as fontes de carboidratos dos flebotomíneos. Junilla et al. (2011) realizaram trabalho em Israel relacionando a atração dos flebotomíneos a 24 frutas comercializadas naquela região. Chegaram a uma lista de três frutas mais atrativas: nectarina, fruto de cacto e goiaba.

A distribuição ecológica das espécies de flebotomíneos pode estar relacionada com a disponibilidade de específicas fontes de carboidratos em uma localidade (AÑEZ et al., 1994).

A identificação dos açúcares ingeridos pelos flebotomíneos é relevante pois pode aumentar a taxa de sobrevivência dos adultos em colônias de laboratório e com isso, facilitar pesquisas na relação entre *Leishmania* e seu vetor.

### **Nyssomyia neivai**

A espécie *Ny. neivai*, previamente considerada como sinonímia de *Ny. intermedia*, foi revalidada por Marcondes em 1996. A partir de então, estudos taxonômicos e biológicos vêm sendo realizados para caracterizar as diferenças e /ou similaridades entre essas espécies.

Com relação ao seu papel epidemiológico, *Ny. neivai* foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* spp (PITA-PEREIRA *et al.*, 2009) e é incriminada como vetora do agente da leishmaniose cutânea em algumas áreas da América do Sul (CORDOBA-LANUS *et al.*, 2006, CASANOVA *et al.*, 2009, MARCONDES *et al.*, 2009, DINIZ *et al.*, 2014).

Apenas um trabalho havia sido publicado com relação à colonização de *Ny. neivai* em laboratório até 2015 e os dados apontaram uma rentabilidade de 20,7% de adultos a partir das larvas (ADRADE-FILHO *et al.*, 2004). Em 2010, na Faculdade de Farmácia Bioquímica, UNESP, Araraquara, foram coletadas 24 fêmeas dessa espécie para estabelecimento de colônia em condições de laboratório e como resultado da tentativa de colonização, apenas 13,1% das larvas (a partir de um total de ovos) chegaram à fase adulta. Nessa tentativa, poucas modificações foram feitas a partir do trabalho citado anteriormente (Dra. Mara Cristina Pinto – comunicação pessoal).

Mediante a escassez de dados referentes à colonização de *Ny. neivai* - mesmo assim com baixa rentabilidade - e de sua relevância epidemiológica na transmissão da leishmaniose cutânea, evidencia-se a necessidade de aprimoramento nas técnicas de criação dessa espécie em laboratório.

Com o objetivo de aumentar os conhecimentos de biologia básica de *Ny. neivai*, uma das espécies fortemente indicada como vetora da *leishmania* que causa a leishmaniose cutânea nas Américas, este trabalho visa o aprimoramento de técnicas de criação mais específicas e eficientes deste inseto em condições laboratoriais em suas diferentes fases do ciclo de vida.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

Avaliar aspectos biológicos envolvidos no processo de estabelecimento de colônia de *Ny. neivai* e alcançar o sucesso na manutenção e produção dessa espécie em laboratório.

### Objetivos específicos:

- ✚ Comparar a produção de ovos das fêmeas, quando alimentadas em hamster, camundongo e codorna;
- ✚ Avaliar a possibilidade de utilização de alimentação em membrana artificial com sangue de bovinos e aves e compará-los quanto à produção de ovos;
- ✚ Avaliar a melhor membrana para a alimentação artificial com sangue;
- ✚ Avaliar dietas alternativas para a alimentação das larvas e compará-las com a dieta tradicional descrita na literatura para *Ny. neivai*;
- ✚ Identificar os açúcares ingeridos pelos adultos na natureza;
- ✚ A partir da identificação dos açúcares ingeridos na natureza, oferecer misturas de açúcares a grupos de adultos de *Ny. neivai* e observar a curva de sobrevivência;
- ✚ Investigar a presença de feromônio de oviposição em *Ny. neivai*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Coleta e transporte dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram coletados às margens do rio Mogi-Guaçu em Santa Eudóxia, SP (21°35'13"S; 48°04'15"O), área em que, de acordo com estudo prévio, predomina a população de *Ny. neivai* (PINTO et al., 2011) (Fig. 1a e b).

Os insetos foram atraídos por armadilhas luminosas e capturados com capturador de Castro nas paredes das casas (Fig. 1c e d). O horário de coleta ocorreu entre 18h e 23h.



Figura 1 - (a) Rio Mogi-Guaçu, (b) uma das áreas de coleta; (c) uma das casas da região; (d) parede onde os insetos pousam.

Ao utilizarmos as armadilhas luminosas, muitas espécies de insetos são atraídas, fazendo com que a gaiola fique com uma densidade de insetos muito alta. Dessa forma, pode ocasionar a morte dos flebotomíneos devido a sua fragilidade. Optou-se então pela captura com o capturador de Castro para ser possível capturar somente flebotomíneos (Fig. 2a e b).

O capturador deve conter um filtro, pois além dos flebotomíneos possuírem o corpo com alta pilosidade, os ambientes de descanso e micro-habitats podem conter fungos e bactérias prejudiciais a saúde do homem (WARBURG, 1989).

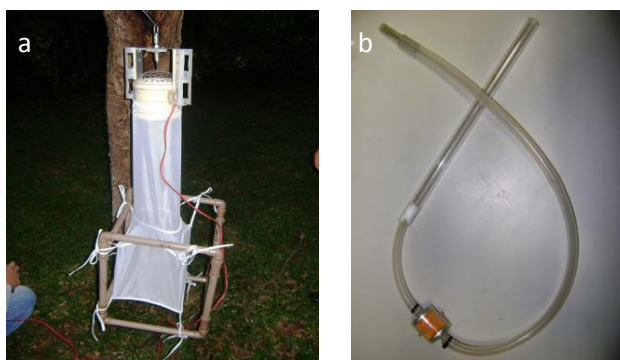


Figura 2 - (a) Armadilha luminosa, (b) capturador de Castro.

Em seguida, os flebotomíneos foram acondicionados em gaiolas com estrutura de tubo PVC recobertas com um tecido fino, “voil” (30x30x30cm) e algodão embebido em solução açucarada (30%). As gaiolas foram inseridas em sacos plásticos transparentes e algodão umidecido em seu interior a fim de manter a umidade e diminuir a mortalidade dos insetos durante o transporte.

No laboratório, os flebotomíneos foram mantidos nestas mesmas gaiolas, a 28°C, 80–90% de umidade, fotoperíodo de 12h com acesso a solução açucarada a 30% (Fig. 3).

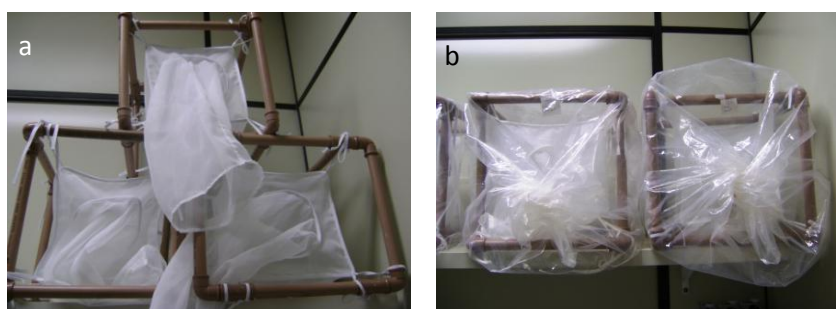


Figura 3 - (a) Gaiolas utilizadas na criação dos insetos, (b) sacos plásticos transparentes utilizados para manter a umidade dentro das gaiolas.



## 2. Manutenção dos insetos em laboratório

Camundongos fêmeas BALB/c, de 5 semanas de idade e 30 gramas de peso, foram oferecidas aos insetos como fonte alimentar sanguínea. Os camundongos foram imobilizados em envelopes de arame e inseridos dentro da gaiola de "voil".

Após 1 a 2 horas, os camundongos foram retirados das gaiolas e as fêmeas de flebotomíneos alimentadas, juntamente com um número igual de machos, foram separadas em recipientes plásticos de polipropileno (recipientes de criação) (Fig. 4).

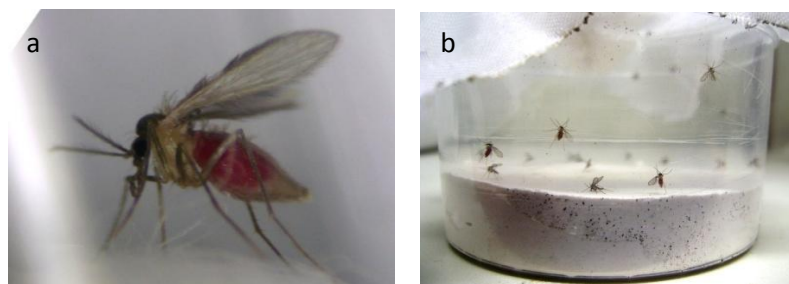


Figura 4 - (a) Fêmea alimentada, (b) Recipiente de criação.

Os recipientes de criação foram confeccionados baseando-se na metodologia de Modi & Tesh (1983), com algumas alterações. Os recipientes de criação são compostos por recipientes plásticos, com fundo recortado em uma abertura de 3 cm de diâmetro e recoberto com 2 cm de gesso. Sua tampa é recortada em uma abertura de 5 cm e cobertos com tecido "voil", sobre o qual é colocado um pedaço de algodão embebido em solução saturada de açúcar (30%). Nestes recipientes de criação, o ciclo de vida do inseto se completa até a fase adulta (Fig. 5a, b, c e d).

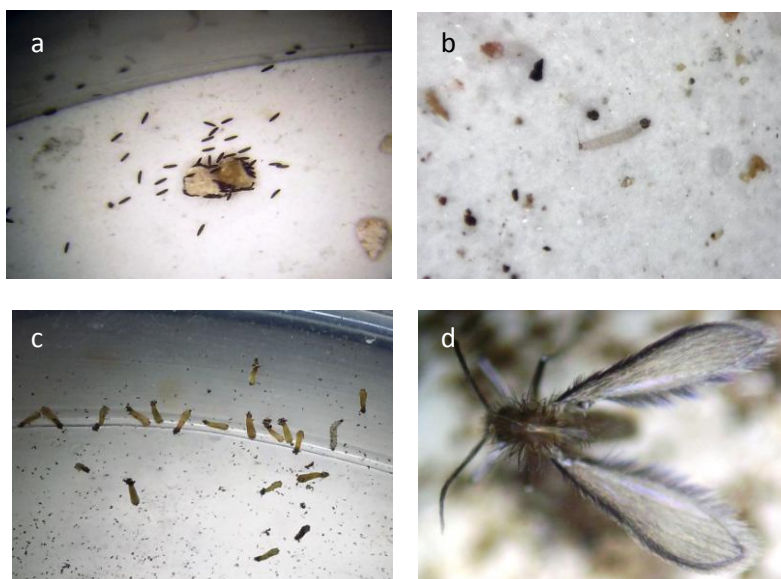


Figura 5 - Ciclo de vida de *Ny. neivai* dentro do recipiente de criação. (a) ovos, (b) larva, (c) pupas e (d) adulto.

Inicialmente foram utilizados recipientes de criação de 250 mL. Devido à alta mortalidade de larvas provocadas por fungos, decidiu-se utilizar recipientes menores (145 mL a 150 mL). Dessa forma, a proliferação dos fungos é controlada pela alimentação das larvas que agora estão concentradas nesse espaço menor.

### 3. Identificação dos flebotomíneos

Após oviposição, fêmeas e machos foram retirados do recipiente de criação para serem identificados.

Em uma placa de toque, machos e fêmeas foram mergulhados em hidróxido de potássio (20%) e mantidos nessa solução por 2 a 3 horas. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, o líquido foi removido e descartado. Ácido acético (10%) foi adicionado e os insetos permaneceram mergulhados nessa solução por 10 a 15 minutos. Após nova retirada do líquido com pipeta Pasteur, água destilada foi adicionada e mantida por 10 minutos. Por fim, após a retirada da água, os insetos foram mergulhados em lactofenol e mantidos nessa solução por 24 horas para observação em microscópio.

Os insetos foram clarificados e identificados segundo o método de clarificação e chave de identificação de Galati, 2003.

Para a identificação das espécies de *Ny.* do complexo *intermedia*, são utilizados alguns caracteres morfológicos dos insetos, tais como espermatecas nas fêmeas (Figura 6a) e ápice dos ductos ejaculatórios nos machos (figura 6b).

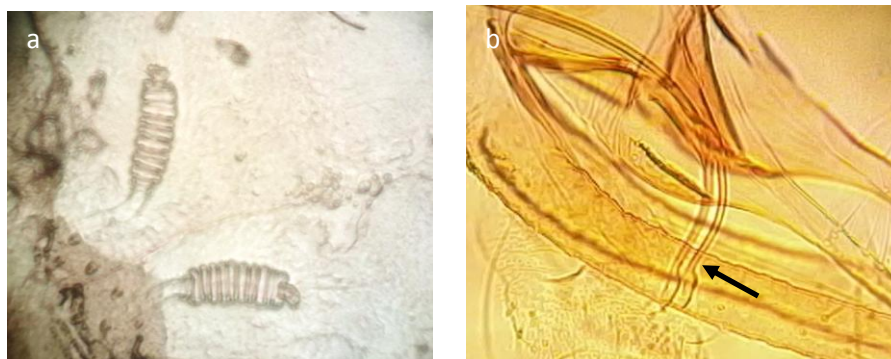


Figura 6 - (a) Espermatecas de *Ny. neivai*, (b) Ductos ejaculatórios de *Ny. neivai* (seta) .

## RESULTADOS

**Capítulo 1:** Desenvolvimento das técnicas de criação de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) em condições laboratoriais

**Capítulo 2:** Identificação dos açúcares ingeridos pelos adultos de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) na natureza.

**Capítulo 3:** Comportamento de oviposição de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) e identificação de possíveis feromônios de oviposição.

**Anexo:** Protocolo de criação de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) em condições laboratoriais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER S, THEODOR O (1957) Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. **Annual Review of Entomology** .2:203-226.

ALEXANDER B (2000) Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. 14: 109-122.

ALEXANDER B, YOUNG DG (1992) Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 87: 123-130.

ALVAR J, VELEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, DEN BOER M, WHO Leishmaniasis Control Team (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 7(5).

ANDRADE FILHO JD, GALATI EAB, FALCÃO AL (2007) *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. 102: 481-487.

ANDRADE-FILHO JD, GALATI EAB, FALCÃO AL (2004) Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926)(Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99(6): 597-601.

AÑEZ N, LUGO A, LOAIZA A, NIEVES E, OROZCO J (1994) Sugars in the alimentary canal of *Lutzomyia youngi* (Diptera: Phlebotominae). **Medical and Veterinary Entomology**. 8(1): 38-42.

BATES PA, ROGERS ME (2004) New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**. 4: 601-609.

BRAZIL RP, BRAZIL BG (2003) Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL EF, LAINSON R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fio Cruz. 4: 257-274.

BRAZIL RP, RODRIGUES AAF, ANDRADE FILHO JD (2015) Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. **Entomology Ornithology & Herpetology**, 4:2.

CAMARGO-NEVES VLF, GOMES AC, ANTUNES JLF (2002) Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos de leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 35: 299-306.

CAMERON MM, PESSOA FAC, VASCONCELOS AW, WARD RD (1995) Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**. 9: 263-272.

CASANOVA C, NATAL D, SANTOS FAM (2009) Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**. 46: 42-50.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROF. ALEXANDRE VRANJAC” (2016) Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/zoo/dados/lta\\_gve\\_muninfec.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/dados/lta_gve_muninfec.pdf)

CORDOBA-LANUS E, DE GROSSO ML, PINERO JE, VALLADARES B, SALOMÓN OD (2006) Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. **Acta Tropica**. 98: 1-5.

DINIZ MMCSL, OVALLOS FG, GOMES CMC, LAVITSCHKA CO, GALATI EAB (2014) Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasites & Vectors**. 7:139.

DOUGHERTY MJ, HAMILTON JGC (1997) Dodecanoic acid is the oviposition pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Chemical Ecology**. 23:2657-2671.

DOUGHERTY MJ, HAMILTON JGC, WARD RD (1993) Semiochemical mediation of oviposition by in phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Medical and Veterinary Entomology**. 7:219-224.

ELNAIEM DA, WARD RD (1990) An oviposition pheromone on the eggs of sandflies (Diptera: Psychodidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 84:456-457.

ELNAIEM DA, WARD RD (1991) Response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to an oviposition pheromone associated with conspecific eggs. **Medical and Veterinary Entomology**. 5: 87-91.

ELNAIEM DA, WARD RD (1992) The thigmotropic oviposition response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to crevices. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 86(4):425-30.

FELICIANGELI MD (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. 18(1):71-80.

GALATI EAB (2003) Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. (2ª ed). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz. 23-53.

GALATI EAB, NUNES VL, BOGGIANI PC, DORVAL MEC, CRISTALDO G, ROCHA HC, OSHIRO ET, DAMASCENO-JÚNIOR GA (2006) Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 101: 175–193.

GOMES AC (1994) Sand fly vectorial ecology in the state of São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 89: 457-460.

GRAMICCIA M, GRADONI L (2005) The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**. 35: 1169-1180.

HAMILTON JGC (2008) Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. **Parasite**. 15: 252-256.

HARRE JG, DORSEY KM, ARMSTRONG KL, BURGE JR, KINNAMON KE (2001) Comparative fecundity and survival rates of *Phlebotomus papatasi* sandflies membrane fed on blood from eight mammal species. **Medical and Veterinary Entomology**. 15: 189-196.

HERTING M, McCONNEL E (1963) Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. **Experimental Entomology**. 14:92-106.

JUNILLA A, GÜNTER C, SCHLEIN Y (2011) Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field. **Journal of Vector Ecology**. 36(1): 206-211.

KILLICK-KENDRICK M, KILLICK-KENDRICK R (1987) The laboratory colonization of *Ph. ariasi*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. 62: 354-356.

KILLICK-KENDRICK M, KILLICK-KENDRICK R (1991) The initial establishment of sandfly colonies. **Parasitologia**. 33: 315-20.

KILLICK-KENDRICK M, KILLICK-KENDRICK R (1999) The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**. 17: 279-289.

KILLICK-KENDRICK R (1978) Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. **Acta Tropica**, 35: 315-320.

KILLICK-KENDRICK R (1979) Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: Lumsden WHR and Evans DA. (Eds), **Biology of the Kineplastida**, vol.2, pp. 396-460. Academic Press, London.



KILLICK-KENDRICK R, RIOUX JA, BAILLY M, GUY MW, WILKES TJ, GUY FM, DAVIDSON I, KNECHTLI R, WARD RD, GUILVARD E, PERIERES J, DUBOIS H (1984) Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cevennes. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, 59, 555–572.

LAINSON R (1989) Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In MW Service, **Demography and vector-borne diseases**, CRC Press, Boca Raton, p. 85-106.

MACVICKER JAK, MOORE JS, MOLYNEAUX DH, MAROLI M (1990) Honeydew sugars in wild-caught Italian phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) as detected by high performance liquid chromatography. **Bulletin of Entomological Research**. 80: 339-344.

MANN RS, KAUFMAN PE (2010) Colonization of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) utilizing an artificial blood feeding technique. **Journal of Vector Ecology**. 35(2): 286-294.

MARCONDES CB (1996) A redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 91: 457-462.

MARCONDES CB, BITTENCOURT IA, STOCO PH, EGER I, GRISARD EC, STEINDEL M (2009) Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 103: 1093-1097.

MAROLI M, FELICIANGELI MD, BICHAUD L, CHARREL RN, GRADONI L (2013) Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**. (2): 123-47.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, secretaria de Vigilância em Saúde (2010) MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf)

MODI GB, TESH RB (1983) A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**. 20: 568-569.

MOLYNEUX DH, MOORE J, MAROLI M (1991) Sugars in sandflies. **Parassitologia**. 33(1): 431-436.

MOORE JS, KELLY TB, KILLICK-KENDRICK R, KILLICK-KENDRICK M, WALLBANKS R, MOLYNEUX DH (1987) Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). **Medical and Veterinary Entomology**. 1: 427-434.

NIEVES E, RIBEIRO A, BRAZIL R (1997) Physical Factors Influencing the Oviposition of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) in Laboratory Conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 92(6): 733-737.

NOGUERA P, RONDÓN M, NIEVES E (2006) Effect of blood source on the survival and fecundity of the sandfly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania*. **Biomedica**. 26: 57-63.

PETTS SL, TANG Y, WARD RD (1997) Nectar from the wax plant *Hoya* sp., as a carbohydrate source for *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 91: 443-446.

PINTO MC, BARBIERI K, SILVA MC, GRAMINHA MA, CASANOVA C, ANDRADE AJ, EIRAS AE (2011) Octenol as attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the field. **Journal of Medical Entomology**. 48(1):39-44.

PITA-PEREIRA D, SOUZA GD, ZWETSCH A, ALVES CR, BRITTO C, RANGEL EF (2009) First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 80: 593-595.

PITA-PEREIRA D, SOUZA GD, PEREIRA TA, ZWETSCH A, BRITTO C, RANGEL EF (2011) *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Tropica**. 120: 273–275.

QUATE LW (1964) *Phlebotomus* sandflies of the Poloich area in the Sudan. **Journal of Medical Entomology**. 1:213-268.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA AF (1985) Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 80(2).

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA F, ANDRADE CA (1986) Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 8: 347-349.

READY PD (1978) The feeding habits of laboratory-bred. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 14: 545-552.

READY PD (1979) Factors affecting egg production of laboratory bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Enomology**. 16: 413-423.

RIOUX, J.A., KILLICK-KENDRICK, R., LEANEY, A.J., TURNER, D.P., BAILLY, M. & YOUNG, C.J. (1979) Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France—12.

Dispersion horizontale de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Esp'erieence preliminaires. **Annales de Parasitologie Humane et Compar'ee**, 54, 673–682.

SANTAMARÍA E, MUNSTERMNN LE, FERRO C (2002) Estimating carrying capacity in a newly colonized sand fly *Lutzomyia serrana* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Economic Entomology**. 95(1): 149-154.

SCHLEIN Y, WARBURG A (1986) Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **Journal of Medical Entomology**. 23: 11-15.

SHARMA U, SINGH S (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**. 225-272.

SHORTT HE (1945) Recent research on kala-azar in India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 39: 13-41.

SILVA RA, MERCADO VTC, HENRIQUES LF, CIARAVOLO RMC, WANDERLEY DMV (2012) Magnitude e tendência da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 15(3): 617-26.

SINGH S (2006) New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**. 123: 311-330.

SMITH ROA, HALDER KC, AHMED I (1941) Further investigations on the transmission of kala-azar. Part VI. A second series of transmissions of *L. donovani* by *P. argentipes*. **Indian Journal of Medical Research**. 29: 799-802.

TEIXEIRA MM, BORGHESAN TC, FERREIRA RC, SANTOS MA, TAKATA CS, CAMPANER M, NUNES VL, MILDRE RV, DE SOUZA W, CAMARGO EP (2011) Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of

trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist.** 162(3):503-24.

TESH RB, MODI GB (1984) A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 33: 41-46.

TOLEZANO JE (1994). Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 89: 427-434.

VAN HANDEL E, HAEGAR JS, HANSEN CW (1972) The sugars of some Florida nectars. **American Journal of Botany.** 59: 1030-1032.

VOLF P, VOLFOVA V (2011) Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology.** 36(1): 1-9.

WARBURG A (1989) An improved air filter for sand fly aspirators. **Medical and Veterinary Entomology.** 3: 325-326.

WARD RD, LAINSON R, SHAW JJ (1978) Some methods for membrane feeding of laboratory reared, neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** 72: 269-276.

WERMELINGER E, RANGEL E, SOUZA N, BARBOSA A (1987) A practical method for mass breeding of sandflies in the laboratory: *Lutzomyia intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912) and *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) (DIPTERA: PSYCHODIDAE). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 82(3): 441-442.

WERMELINGER ED, ZANUNCIO JC (2001) Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different diets. **Brazilian Journal of Biology,** 61 (3), 405–408.

WHO (2010) Control of Leishmaniasis: report of the meeting of the WHO Expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: **World Health Organization Technical Report Series**. 949:186.

WHO (2016) Leishmaniasis worldwide epidemiological and drug access update. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> >.

YOUNG DG, DUNCAN MA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**. 54,1–881.

YOUNG DG, PERKINS PV, ENDRIS RG (1981) A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 18: 446.

## CAPÍTULO 1

### **Técnicas para o estabelecimento de criação de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) em condições laboratoriais**

#### **RESUMO**

Desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de colonização de *Ny. neivai* em condições de laboratório são aqui apresentados. Os experimentos incluíram a escolha do tamanho ideal de recipiente de criação que apresentasse melhor produção de ovos e adultos, melhor substrato para a oviposição e criação das formas imaturas dessa espécie de flebotomíneo em laboratório, escolha da dieta adequada para as larvas dessa espécie levando-se em conta a atratividade das larvas à dieta e seu desenvolvimento até a fase adulta, preferência alimentar dos insetos quando oferecidas diferentes fontes sanguíneas e alimentação artificial em membrana. Como resultado foi obtido a maior produtividade de adultos e menor perda de larvas quando cinco a dez casais foram adicionados em recipientes de criação de 145 mL para oviposição. A produção de quase o dobro de insetos adultos foi alcançada com a adição de uma fina camada de vermiculita, uma vez que esse substrato permite a fácil quebra das hifas dos fungos e promove abrigo para as larvas mais novas. A dieta artificial tradicional autoclavada, composta por fezes de coelho, dieta de coelho, dieta de peixe e terra vegetal, mostrou-se mais atrativa e proporcionou o melhor desenvolvimento das formas imaturas. O camundongo mostrou-se a melhor alternativa como fonte alimentar sanguínea para os insetos, uma vez que não houve diferença entre os tratamentos com os outros animais e este é de mais fácil obtenção em biotérios. A alimentação artificial com membrana não foi eficiente para a manutenção rotineira da colônia, porém, para estudos de infecção de poucos indivíduos por micro-organismos, a alimentação artificial com membrana de pele de camundongo e sangue humano pode ser uma alternativa viável. A partir destes aprimoramentos, foi estabelecida e mantida a colônia de *Ny. neivai* desde 2014 até os dias atuais com 15 gerações.

## 1. OBJETIVOS

- ✚ Aprimorar as técnicas de colonização de flebotomíneos em condições laboratoriais adaptando-as para colônia de *Nyssomyia neivai*;
- ✚ Comparar a produção de ovos das fêmeas, quando alimentadas em hamster, camundongo e codorna;
- ✚ Avaliar a possibilidade de utilização de alimentação em membrana artificial com sangue de bovinos e aves e compará-los quanto à produção de ovos;
- ✚ Avaliar a melhor membrana para a alimentação artificial com sangue;
- ✚ Avaliar dietas alternativas para a alimentação das larvas e compará-las com a dieta tradicional descrita na literatura para *Ny. neivai*;



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os recipientes de todos os experimentos foram mantidos dentro de armários fechados, no escuro, em organizadores também fechados, a 28°C e com umidade de 80 a 90%.

### 2.1. Avaliação do desenvolvimento das larvas em dieta artificial esterilizada e não esterilizada

Com o auxílio de um pincel de ponta fina e macia, 100 ovos de *Ny. neivai* foram transferidos para o centro de um recipiente de criação de 145 mL. A dieta artificial utilizada rotineiramente na alimentação das larvas é composta por terra vegetal, fezes de coelho, dieta de coelho e dieta de peixe, em partes iguais.

Três foram os tratamentos: dieta autoclavada, dieta não autoclavada e dieta tindalizada.

O processo de esterilização por autoclavagem consiste em colocar o material em autoclave e por pressão e temperatura elevados o material é esterilizado. É um processo eficaz e rápido, sendo que o material autoclavado pode ser utilizado no mesmo dia.

Já a tindalização consiste em um processo de três etapas onde o material é esterilizado à temperatura de 100°C e sem pressão. Entre os intervalos de um dia a outro, fungos e bactérias se desenvolvem e são eliminadas nas etapas seguintes, levando três dias para que o material esteja pronto para uso.

A dieta foi adicionada aos recipientes de acordo com a necessidade de alimentação das larvas (Figura 1). A observação dos recipientes foi realizada diariamente. O experimento transcorreu até a emergência de adultos, que foram contabilizados.



Figura 1 - Recipientes de criação de larvas até adultos em três tratamentos da dieta oferecida às larvas de *Ny. neivai*: não autoclavada, autoclavada e tindalizada.

O experimento foi replicado nove vezes. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.0.

## **2.2. Dietas artificiais alternativas para a alimentação das formas imaturas de *Ny. neivai***

Na literatura diversas dietas artificiais são citadas como a de escolha para a criação de flebotomíneos (BARRETTO, 1942; MODI & TESH, 1983; RANGEL et al, 1985). Nesse trabalho, cinco dietas foram avaliadas para *Ny. neivai*.

- ✚ Dieta 1 – Tradicional – utilizada rotineiramente na colônia de *Ny. neivai* composta por fezes de coelho, dieta de coelho, dieta de peixe e terra vegetal;
- ✚ Dieta 2 - composta por fezes de coelho e terra vegetal (F+Te);
- ✚ Dieta 3 – composta por fezes de coelho, terra vegetal e dieta de peixe (F+Te+P);
- ✚ Dieta 4 – composta por terra vegetal e limo (Te+L);
- ✚ Multimistura – Suplemento para mulheres grávidas e crianças para combater a desnutrição, composta por farelo de arroz e trigo, farinha de trigo, fubá de milho, gergelim, soja, linhaça, folha de moringa, semente de girassol, semente de abóbora e pó da folha da mandioca, em proporções iguais.

Para a preparação das dietas, fezes de coelho foram secadas ao sol por três dias. A dieta de peixe (Alcon® Colours), a dieta de coelho (Purina Presence®) e terra vegetal (Verde Campo®) foram utilizadas sem preparo prévio. O limo foi extraído de parede úmida de uma casa da localidade, deixado em estufa por 24h e triturado. A multimistura foi adquirida da Pastoral da Criança da Paróquia Nossa Senhora Aparecida (Passos - MG). As fezes e a dieta de coelho foram trituradas, separadamente, em processador. Em seguida, todos os itens da composição das dietas passaram por tamis de malhas de diâmetro 0,297 mm, 0,125 mm e 0,074 mm, e foram esterilizadas por autoclavagem.

### 2.2.1. Preferência alimentar de larvas de *Ny. neivai* a diferentes dietas artificiais

Após o preparo das dietas, 50 ovos de *Ny. neivai* foram transferidos para o centro de recipientes de 145 mL, com fundo de gesso devidamente esterilizados e umedecidos. O gesso foi dividido em quatro partes e em cada parte foi colocada uma das quatro dietas citadas acima em quantidades proporcionais (Figura 2a), com exceção da multimistura que, foi adquirida posteriormente. Foram feitas quatro repetições.

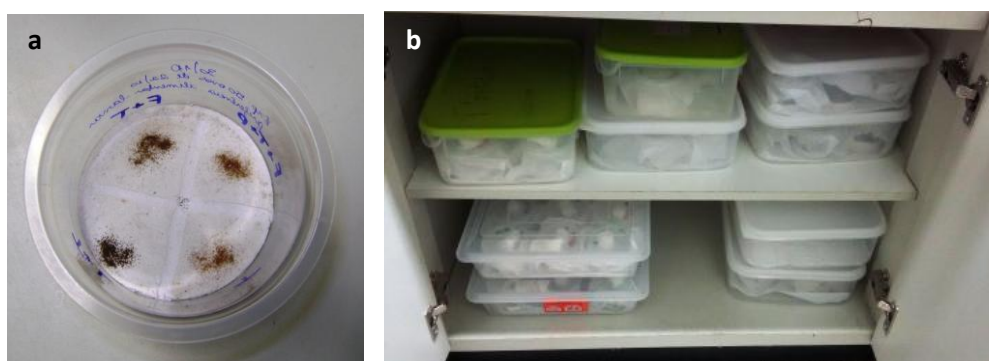


Figura 2 - (a) Diferentes dietas distribuídas nos quadrantes do recipiente; (b) os recipientes do experimento foram colocados em organizadores.

Diariamente, cada quadrante do gesso foi observado e contabilizado o número de larvas ali presentes. Os recipientes foram mantidos no escuro, em organizadores fechados (Figura 2b) e os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### 2.2.2. Preferência alimentar de larvas de *Ny. neivai* entre dieta tradicional e a multimistura

Cem ovos foram transferidos para o centro de recipientes de criação de 145 mL. O gesso foi dividido em quadrantes e dois tipos de dietas foram adicionadas: Tradicional, e a Multimistura. Quadrantes contrários receberam a mesma dieta, mantendo uma alternância de dietas entre quadrantes vizinhos. O

número de larvas em cada quadrante foi observado e contabilizado diariamente, até que as larvas atingissem a forma de pupa, levando em consideração o quadrante ao qual a larva estava localizada. O experimento foi replicado quatro vezes sob as mesmas condições. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Teste t de Student (não paramétricos).

### **2.3. Desenvolvimento das larvas de *Ny. neivai* em dieta Tradicional, Dieta de peixe, Dieta 3 (F+Te+P) e Multimistura**

Uma vez que a dieta tradicional se mostrou mais atrativa, foi comparado o desenvolvimento das formas imaturas com dieta de peixe (utilizada em diversas colônias de flebotomíneos), dieta 3 (F+Te + P) e Multimistura.

Cem ovos da geração F7 foram transferidos para o centro de recipientes de criação de 145 mL. Cada dieta foi adicionada aos recipientes de acordo com a necessidade diária de alimentação das larvas até a emergência de adultos.

Para cada dieta, houve quatro replicatas. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### **2.4. Avaliação de diferentes substratos para o desenvolvimento da colônia**

Com a finalidade de fornecer o melhor substrato para a manutenção da colônia de *Ny. neivai*, diferentes substratos foram adicionados aos recipientes de criação de 145 mL previamente higienizados e preenchidos com 2 cm de gesso. Os substratos escolhidos foram: terra vegetal- representando um ambiente mais natural- , vermiculita -mineral formado por silicatos hidratados de alumínio e magnésio, utilizada também na criação da mosca-das-frutas (MACHOTA - JUNIOR et al, 2010), cascalho – pelo seu tamanho e composição de solos; e gesso – utilizado rotineiramente em diversas colônias de flebotomíneos (MODI & TESH, 1983; KILLICK-KENDRICK, 1999; GOULART et al, 2015) (Figura 3a).

Para não coletar ovos inférteis e não danificá-los por ação mecânica, ao invés de transferirmos uma quantidade definida de ovos optamos por inserir um número definido de insetos. Após a esterilização dos substratos e preparação dos recipientes, 5 fêmeas ingurgitadas e 5 machos foram adicionados (Figura 3b). Algodão com solução açucarada (30%) foi oferecido aos casais.

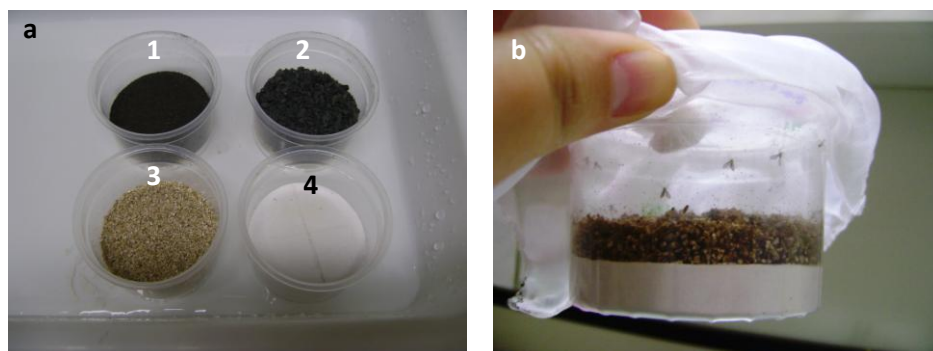


Figura 3 - (a) Recipientes com fundo de gesso e substratos de escolha: 1-terra vegetal, 2-cascalho, 3-vermiculita, 4-gesso; (b) casais adicionados ao recipiente de criação com vermiculita.

O experimento foi replicado cinco vezes. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

## **2.5. Avaliação do gesso e da vermiculita como substratos para o desenvolvimento da colônia**

A partir dos resultados do experimento anterior, decidiu-se comparar apenas o gesso e a vermiculita com um maior número de repetições. Esse experimento seguiu a mesma metodologia do experimento anterior, porém com 10 réplicas. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Teste t de Student (não paramétricos).

## 2.6. Produtividade de ovos e adultos de *Ny. neivai* (Diptera: Psychodidae) em relação à densidade de insetos

### 2.6.1. Efeito da densidade de adultos na oviposição das fêmeas de *Ny. neivai*

Após a alimentação sanguínea de insetos de campo, fêmeas alimentadas e um número equivalente de machos foram transferidos, em grupos, para recipientes de criação de 250 mL. Foram inseridos em cada recipiente um grupo de : 5, 10, 15, 20, 25 e 30 casais. Algodão com solução açucarada a 30% foi oferecido aos adultos e após a mortalidade dos insetos, houve a identificação da espécie.

Com a intenção de verificar se haveria diferença na produção de formas adultas em uma área menor, 5, 10 e 15 casais foram inseridos em recipientes de criação de 145 mL e a mesma metodologia do teste com recipientes maiores foi adotada (Figura 4).



Figura 4 - Diferença no tamanho dos recipientes de criação de 250 mL e 145 mL utilizados para estimar a produtividade de *Ny. neivai*.

Foram realizadas 4 repetições. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### **2.6.2. Efeito da densidade de ovos na produção de adultos de *Ny. neivai***

Para avaliar o efeito da densidade dos ovos, na produção de insetos adultos dentro do recipiente de criação a partir dos ovos do experimento anterior, foi permitido que o ciclo de vida do inseto se completasse dentro dos mesmos recipientes. Devido à fragilidade e mortalidade das larvas de primeiro instar após manuseio para contagem, foi comparada apenas a produtividade de adultos em relação ao número de ovos.

Os recipientes de criação foram observados diariamente quanto à alimentação das larvas, controle de umidade e de fungos até o surgimento de adultos e em seguida os resultados entre os grupos foram comparados. O experimento foi replicado quatro vezes sob as mesmas condições.

Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### **2.7. Comparação da produção de ovos e adultos por fêmeas alimentadas em diferentes fontes sanguíneas**

Inicialmente, os experimentos para avaliação dos efeitos da fonte alimentar foram realizados com fêmeas individualizadas (campo e F1) e os resultados não foram satisfatórios (dados não apresentados). Em virtude da alta mortalidade de fêmeas antes da oviposição, todos os experimentos foram repetidos com as fêmeas agrupadas. As repetições foram feitas com fêmeas da geração F1 e F7.

As fêmeas foram divididas em grupos de 50 casais por gaiola e expostas a cinco formas de alimentação sanguínea: hamster e camundongos (anestesiados e não anestesiados) e codorna não anestesiada. Os animais foram anestesiados com Xilazina 2% (0,05 mL/ 200 mg) e Ketamina 10% (0,20 mL/ 200 mg) (Figura 5a e b). Os animais não anestesiados foram imobilizados em envelopes feitos de arame.

No dia seguinte à alimentação sanguínea, cinco a sete fêmeas foram transferidas para os recipientes de oviposição (145 mL), aos quais foi colocado um

pedaço de algodão embebido em solução saturada de açúcar (30%). Nestes recipientes de criação, o ciclo de vida dos insetos se completou até a fase adulta.

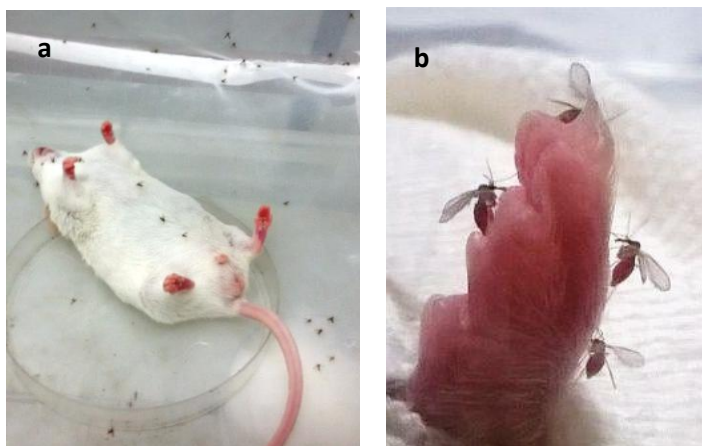


Foto: Flávia Benini

Figura 5 - (a) Camundongo anestesiado exposto aos insetos, (b) fêmeas se alimentando em pata de hamster anestesiado.

Diariamente, os recipientes foram observados para controle da umidade, proliferação de fungos, troca de solução açucarada e presença de ovos. Foi feita a contagem do número total de ovos, média de ovos por fêmea e total de adultos emergidos.

O experimento foi replicado três vezes. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

## **2.8. Avaliação da alimentação sanguínea em alimentador artificial**

### **2.8.1. Experimentos para padronização do alimentador artificial**

O sistema de alimentação sanguínea artificial é composto por um funil de vidro invertido rodeado por uma câmara, pela qual a água flui. Esse aparato é interligado por mangueiras de silicone a um banho-maria acoplado com uma bomba de aquário que faz a água circular e a mantém aquecida. No interior desse compartimento 5 mL de sangue com anticoagulante são inseridos (Figura 6a e b).



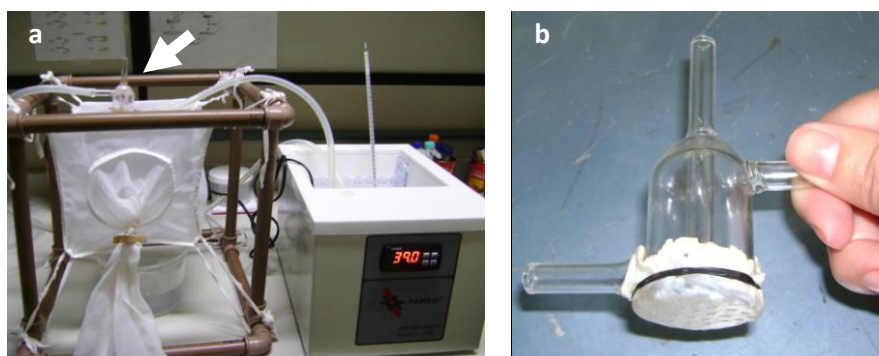


Figura 6 - (a) Alimentador artificial acoplado ao banho Maria e insetos mantidos em gaiola; (b) Pele de frango posicionada para ser utilizada em alimentador artificial.

Nesse sistema de alimentação alguns parâmetros foram avaliados, tais como: local de acondicionamento dos insetos, temperatura da água circulante, tipo de membrana, origem do sangue e tipo de anticoagulante utilizado (Tabela I).

Uma vez que em todos os experimentos com *Ny. neivai* o número das fêmeas que tentaram se alimentar foi muito baixo, foi realizado um teste paralelo com *Aedes aegypti* para se ter a certeza de que o aparato estava funcionando perfeitamente (Figura 7b). O ensaio com *Ae. aegypti* seguiu a mesma metodologia do ensaio 8 (com *Ny. neivai*) (Tabela I).

Tabela I - Primeiras variáveis testadas em alimentador artificial com *Ny. neivai*.

| Ensaio            | 1           | 2           | 3           | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Local dos insetos | Tubo Falcon | Tubo Falcon | Tubo Falcon | Gaiola | Gaiola | Gaiola | Gaiola | Gaiola | Gaiola |
| Temperatura       | 36°C        | 36°C        | 36°C        | 36°C   | 36°C   | 36°C   | 39°C   | 39°C   | 39°C   |
| Membrana          | Int. P      | Int. P      | Int. P      | Pele F | Pele F | Int. P | Int. P | Int. P | Int. P |
| Geração           | Campo       | Campo       | Campo       | F1     | Campo  | F1     | F1     | Campo  | Campo  |
| Sangue            | Cam.        | Cam.        | Cam.        | Rato   | Rato   | Rato   | Rato   | Humano | Humano |

Int.P = Intestino de porco; Pele F = Pele de frango (sobrecosta); Cam. = Camundongo

O Citrato Fosfato Dextrose Adenina 1 (CPDA-1) foi o anticoagulante utilizado em todos os testes. Até o experimento 3, tubos Falcon foram utilizados para

conter os insetos. A partir do 4º experimento, gaiolas de “voil”, utilizadas na criação dos adultos, substituíram os tubos para abrigar um número maior de insetos e para a observação de possíveis mudanças quanto o comportamento dos mesmos (Figura 6a).

Nos experimentos iniciais (1 a 3) a membrana utilizada foi proveniente de intestino de porco desidratado que sofreu apenas processo de hidratação por 12 horas em água deionizada. Já nos ensaios de 6 ao 9, o intestino de porco foi mantido em água destilada por aproximadamente 5 horas e lavado com solução salina. Nos ensaios utilizando pele de frango (4 e 5), as membranas foram mantidas em álcool 70% por 10 minutos para remoção da gordura e lavadas 3 vezes com solução salina. Nos ensaios 8 e 9 uma tela foi colocada junto à membrana para que os insetos conseguissem se fixar melhor no momento do repasto (Figura 7a).

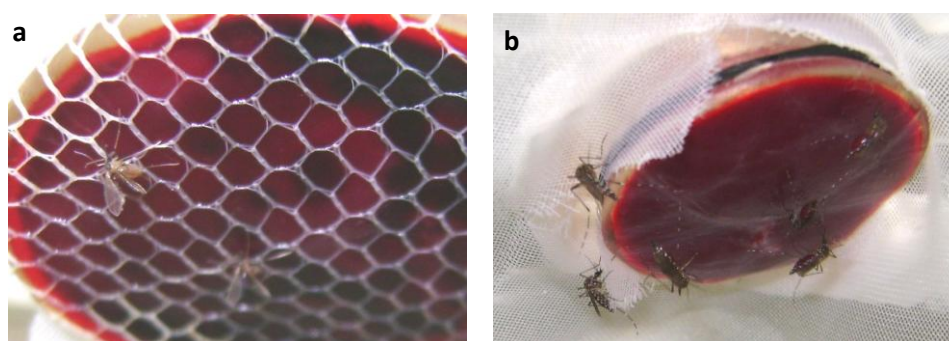


Figura 7 - (a) Fêmeas de *Ny. neivai* se alimentando em alimentador artificial; (b) Fêmeas de *Ae. aegypti* se alimentando em alimentador artificial.

Outras duas metodologias foram usadas na tentativa de tornar o alimentador mais eficiente. Avaliou-se primeiramente se a posição do alimentador poderia influenciar os resultados como em *Lutzomyia shannoni* (MANN & KAUFMAN, 2009). Em uma caixa de acrílico o alimentador foi acoplado na perpendicular com sangue desfibrinado de carneiro a 36°C. A tentativa seguinte baseou-se na utilização de uma metodologia aplicada na alimentação artificial de culicídeos, chamada de "Glytube" (COSTA DA SILVA et al., 2013). Esta metodologia baseia-se na utilização de um tubo cônico contendo glicerol aquecido, papel Parafilm M® como membrana e sangue, formando um aparato de alimentação artificial (Figura 8). O "Glytube" foi utilizado com sangue humano com heparina em nosso teste (Figura 9a).

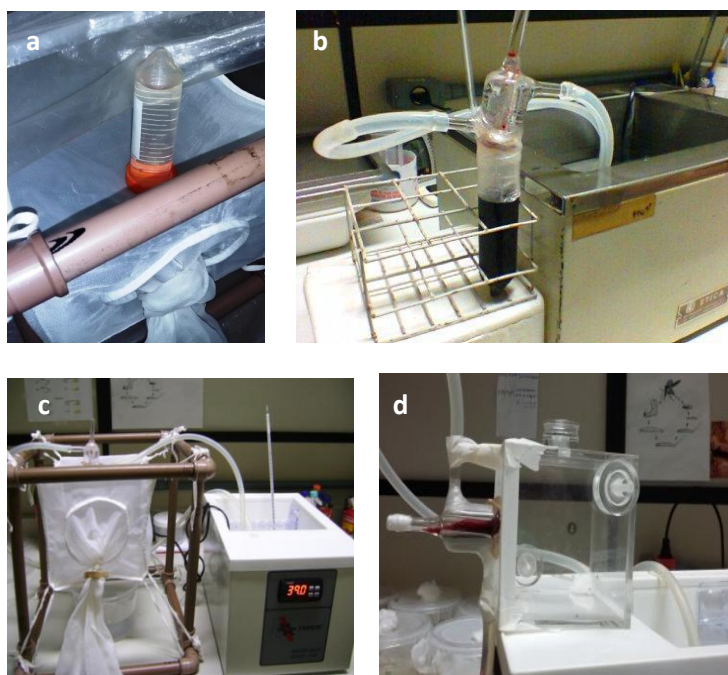
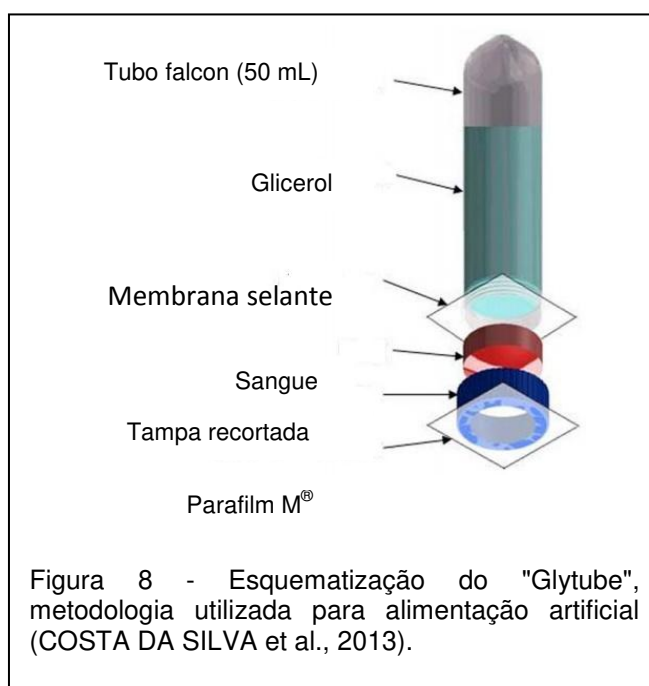


Figura 9 - (a) Glytube acoplado à gaiola; (b) alimentador acoplado ao tubo Falcon; (c) alimentador acoplado diretamente à gaiola; (d) alimentador acoplado perpendicularmente em caixa de acrílico.

### 2.8.2. Alimentador artificial para *Ny. neivai*

A partir dos muitos resultados não satisfatórios dos experimentos acima, uma nova metodologia, na qual recipientes plásticos de 500 mL foram modificados para que o alimentador fosse encaixado em sua tampa. Os fundos dos recipientes foram recortados com uma abertura de 5 cm de diâmetro e recobertos com 2 cm de gesso para que a umidade em seu interior fosse mantida. O alimentador foi interligado por mangueiras de silicone ao banho-maria (Figura 10a e b).

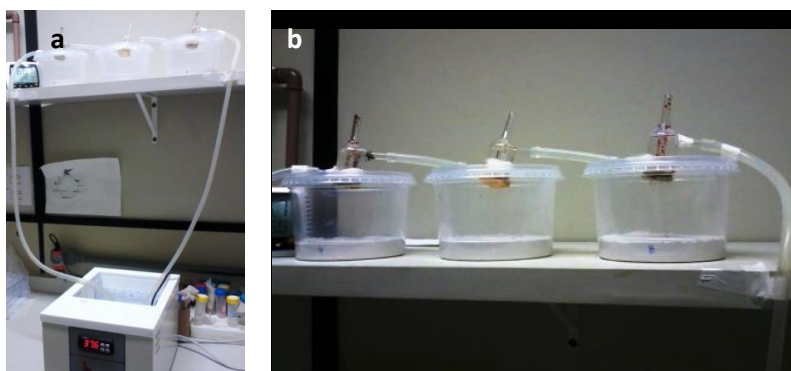


Figura 10 - (a) Nova metodologia utilizada nos testes de alimentador artificial: banho-maria acoplado ao alimentador, (b) recipientes interligados com o alimentador artificial.

Intestino de porco, salgado, intestino de boi desidratado, pele de pintinho, pele de rato, Parafilm M<sup>®</sup> e pele de camundongo foram avaliados como membranas. O intestino de porco passou por lavagem em água corrente e foi mantido em soro fisiológico por aproximadamente 5 horas. Após esse período, a membrana foi acoplada ao alimentador. O intestino de boi foi mantido em soro fisiológico por 3h para hidratação.

Pintinhos de um dia provenientes de granja local e mortos naturalmente foram congelados e trazidos ao laboratório. A pele do peito e costas do animal foi removida, com o auxílio de um bisturi, assim como o excesso de penugem (Figura 11a). Sem lavagem alguma, a pele foi acoplada ao alimentador (Figura 11b).

As peles de ratos e camundongos foram adquiridas de animais mortos pós-alimentação de colônias de triatomíneos do laboratório de Parasitologia (Departamento de Ciências Biológicas – FCFAR UNESP) (Figura 11c).



Figura 11 - (a) Remoção da pele de pintinho; (b) pele de pintinho como membrana no alimentador artificial; (c) pele de camundongo, intestino de porco e pele de pintinho acoplados em alimentadores para realização dos testes.

A pele de rato e de camundongo foram removidas da parte dorsal do animal. Os pelos foram aparados com o auxílio de uma tesoura, deixando falhas para facilitar a fixação dos insetos à pele. A gordura aderida à pele foi removida por raspagem com o auxílio de um bisturi (Figura 12a e b).

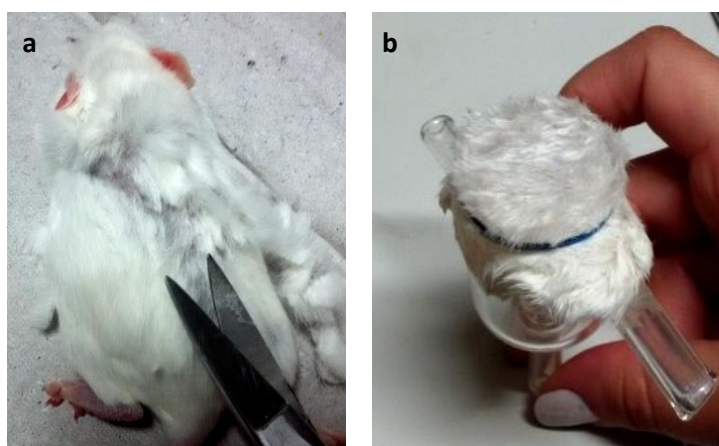


Figura 12 - (a) Pele do camundongo fêmea sendo aparada para remoção; (b) pele acoplada ao alimentador artificial.

Devido à disponibilidade, três outras fontes sanguíneas, além do sangue de boi e de galinha, foram utilizadas: soro fetal bovino, sangue de carneiro desfibrinado (Newprov®) e sangue humano (concentrado de hemácias) cedido pelo Hemonúcleo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. O sangue humano cedido é normalmente descartado pelo Hemonúcleo por ser originado de amostras de bolsas de sangue negativas em todas as provas de rotina. O

anticoagulante utilizado nos sangues de boi e de galinha foi EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). O anticoagulante CPDA-1 foi utilizado no concentrado de hemácias humano.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação do desenvolvimento das larvas em dieta artificial esterilizada e não esterilizada

De acordo com os resultados, a partir de 100 ovos, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p>0,05$ ) na produção de adultos, porém, as médias foram mais altas nas dietas autoclavada (39 adultos) e tindalizada (35 adultos), para apenas 34 adultos na dieta não autoclavada (Figura 13).

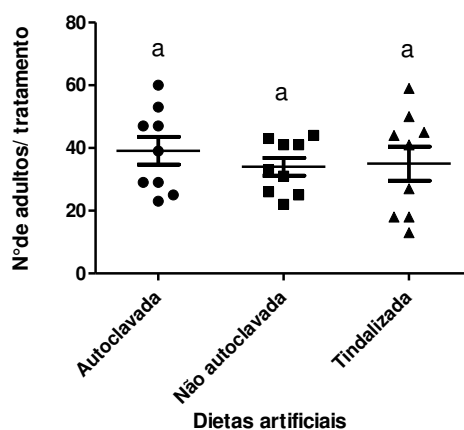


Figura 13 - Número de adultos oriundos das dietas: autoclavada, não autoclavada e tindalizada (N= 100 ovos). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).

#### 3.2. Dietas artificiais alternativas para a alimentação das formas imaturas de *Ny. neivai*

##### 3.2.1. Preferência alimentar de larvas de *Ny. neivai* a diferentes dietas artificiais

Nos testes de preferência alimentar das larvas de *Ny. neivai* (a partir de 50 ovos) com diferentes dietas artificiais para larvas, os resultados mostraram que as dietas mais atrativas foram a dieta 1, tradicional (T) e dieta 3, fezes de coelho +



terra + dieta de peixe (F+Te+P), dietas que apresentam dieta de peixe e terra em comum na composição (Figura 14).

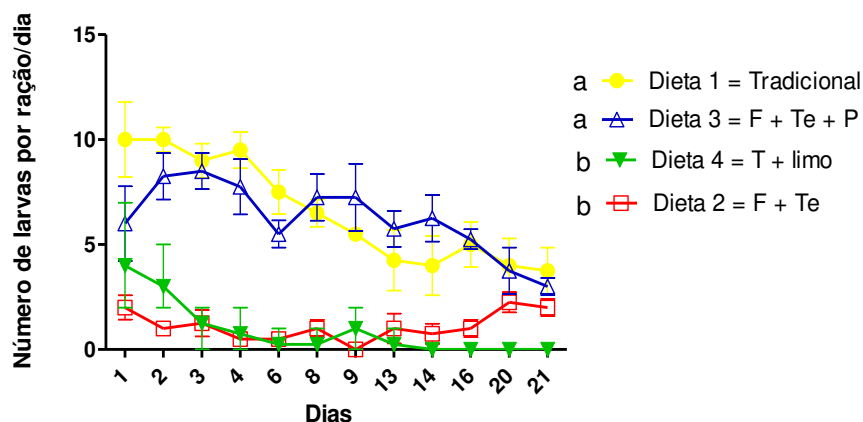


Figura 14 - Número de larvas por dia em cada dieta artificial (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Pelo teste de Análise de Variância houve diferença entre as quatro dietas ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença estatística entre as dietas 1 e 3 ( $p > 0,05$ ) ou entre as dietas 2 e 4 ( $p > 0,05$ ). Esse dado mostrou-se interessante para o estudo de atratividade de larvas.

### 3.2.2. Preferência alimentar de larvas de *Ny. neivai* entre dieta tradicional e a multimistura

Na contagem diária das larvas (a partir de 100 ovos) em dieta tradicional e a multimistura foi possível observar a preferência das larvas pela dieta tradicional. As médias diárias de larvas por dieta foram de 29 para a dieta tradicional e 17 para multimistura (Figura 15), apresentando diferença estatística entre as duas ( $p < 0,05$ ).

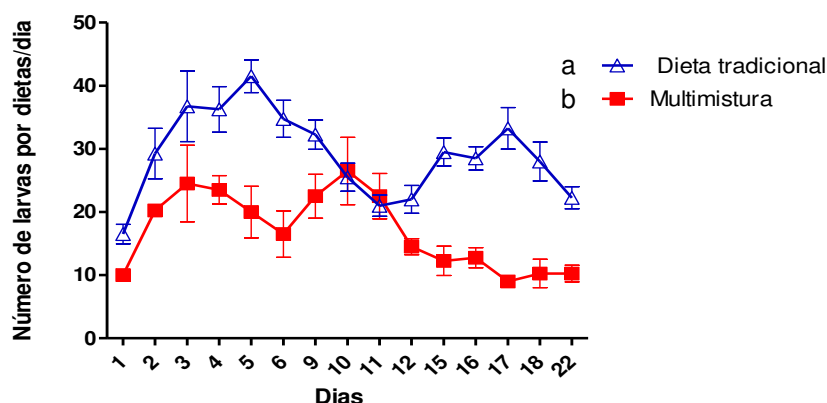


Figura 15 - Número de larvas atraídas pelas dietas conforme a contagem diária (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).



### 3.3. Desenvolvimento das larvas de *Ny. neivai* em dieta Tradicional, Dieta de peixe, Dieta 3 (F+Te+P) e Multimistura

Pelo teste de Análise de Variância na comparação do desenvolvimento das larvas de *Ny. neivai* (a partir de 100 ovos) entre as quatro dietas, houve diferença entre a dieta tradicional e a dieta de peixe ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença estatística entre a dieta Tradicional e a dieta 3 ( $p > 0,05$ ), ou entre a dieta 3 e a dieta de peixe ( $p > 0,05$ ) (Figura 16). A multimistura diferiu estatisticamente de todas as outras dietas ( $p < 0,05$ ). A dieta de peixe e a multimistura, mesmo que autoclavadas proporcionam grande proliferação de fungos, sendo um fator negativo para o desenvolvimento das larvas.

Mesmo não havendo diferença estatística entre a dieta tradicional e dieta 3, a dieta tradicional apresentou média de 57 adultos contra 44,2 adultos em recipientes com a dieta 3. A dieta tradicional, após testes com outras dietas artificiais, continua sendo a mais indicada para a criação de *Ny. neivai* em condições laboratoriais, porém observa-se que a retirada da dieta de coelho não afeta demasiadamente a produção de adultos, como não afetou a atratividade das larvas no experimento anterior.

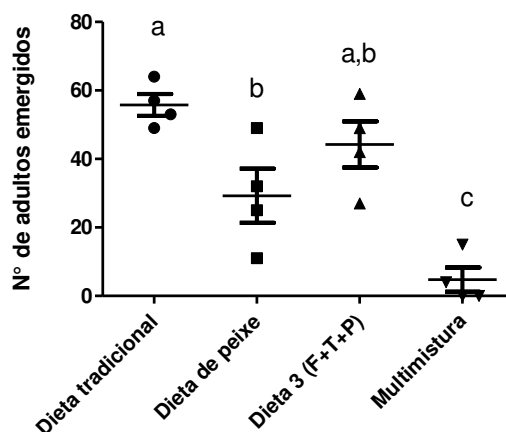


Figura 16 - Produção de adultos comparados à quatro diferentes tipos de alimentação larval (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ( $\alpha < 0.05$ ).

### 3.4. Avaliação de diferentes substratos para o desenvolvimento da colônia

O número total de adultos que emergiram nos recipientes com vermiculita foi de 417, no gesso 240 e no cascalho 156. Embora os resultados mostrem que no gesso o número de adultos gerados foi de 177 insetos a menos em relação ao total dos insetos oriundos dos recipientes com vermiculita, essa diferença não se mostrou significativa estatisticamente ( $p > 0,5$ ). A diferença estatística foi evidenciada entre vermiculita e cascalho ( $p < 0,05$ ) (Figura 17). Não houve emergência de insetos na terra vegetal.

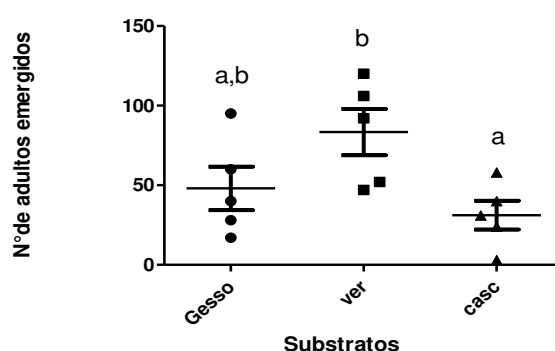


Figura 17 - Produção de adultos em diferentes substratos ( $n=5$ ). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.5. Avaliação do gesso e da vermiculita como substratos para o desenvolvimento da colônia

A quantidade de adultos emergidos na vermiculita foi de 690 insetos contra 428 insetos emergidos no gesso. Diferença de 262 apresentando diferença estatística entre os dois tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Figura 18).

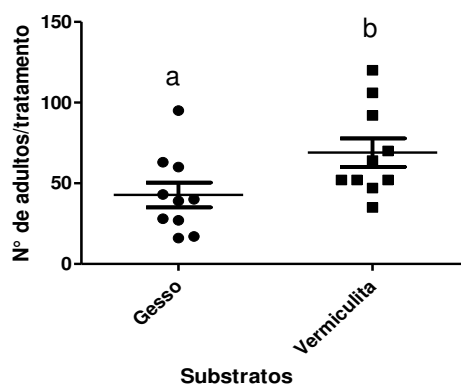


Figura 18 - Produção de adultos de *Ny. neivai* em recipientes com gesso e vermiculita ( $n=10$ ). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.6. Produtividade de ovos e adultos de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) em relação à densidade de insetos dentro de diferentes recipientes de criação

#### 3.6.1. Efeito da densidade de indivíduos dentro do recipiente de criação na oviposição das fêmeas de *Ny. neivai*

Em relação ao efeito da densidade de indivíduos dentro do recipiente de criação e a produção de ovos, os resultados mostraram que a mortalidade das fêmeas antes da oviposição foi aleatória e não foi dependente do número de casais nos recipientes (dados não publicados). A média de número de ovos por fêmea variou entre os diferentes tamanhos de recipientes. Nos recipientes menores (145 mL), cinco casais apresentaram a maior média de ovos por fêmea (67,2 ovos;  $p < 0,05$ ). Nos recipientes maiores (250 mL), não houve diferença estatística entre o número de casais dentro dos recipientes (de 47,1 a 56,5 ovos;  $p > 0,05$ ) (Tabela II).

Tabela II - Médias do número de ovos por fêmeas e erro padrão nos recipientes de criação de 145 mL (5, 10 e 15 casais) e 250 mL (5, 10, 15, 20, 25 e 30 casais) (N=4).

| Recipientes | Número de casais por recipiente |               |               |               |               |               |
|-------------|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|             | 5                               | 10            | 15            | 20            | 25            | 30            |
| 145 mL      | 67.2a                           | 44.4b         | 41.6b         | -             | -             | -             |
|             | ( $\pm 5.2$ )                   | ( $\pm 4.4$ ) | ( $\pm 4.6$ ) |               |               |               |
| 250 mL      | 47.1a                           | 50.5a         | 51a           | 51.1a         | 56.5a         | 51a           |
|             | ( $\pm 10.6$ )                  | ( $\pm 3.3$ ) | ( $\pm 2.0$ ) | ( $\pm 6.4$ ) | ( $\pm 3.9$ ) | ( $\pm 5.5$ ) |

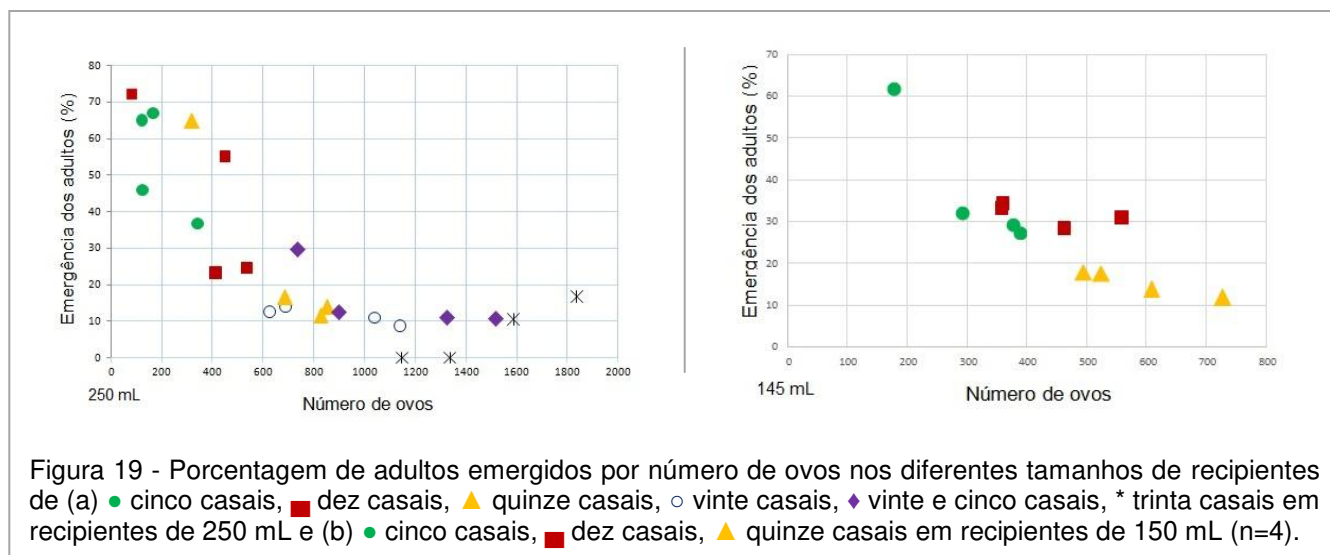
Médias com diferentes letras na mesma linha são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

#### 3.6.2. Efeito da densidade de ovos na produção de adultos de *Ny. neivai*

O número de adultos emergidos foi negativamente relacionado com o número de ovos dentro dos recipientes de criação. As taxas de emergência dos adultos foram acima de 50% nos recipientes de 250 mL que continham aproximadamente 400 ovos.

Já nos recipientes de 145 mL, a taxa de emergência dos adultos foi de 30% nos recipientes que continham aproximadamente 600 ovos. Os melhores

resultados para ambos tamanhos de recipientes de criação foram alcançados com 5 a 10 casais (Figura 19).



### 3.7. Comparação da produção de ovos e adultos por fêmeas alimentadas em diferentes fontes sanguíneas

Os resultados mostraram um maior número de fêmeas alimentadas no hamster anestesiado e, conseqüentemente, um número maior de ovos e adultos resultantes (Tabela III). Não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao número de ovos por fêmea e à porcentagem de adultos em relação aos ovos ( $p > 0,05$ ), demonstrando que as diferentes fontes alimentares avaliadas não afetaram fisiologicamente as fêmeas de *Ny. neivai* quanto à progênie (Figura 20a, b e c).

Tabela III - Dados brutos referentes à alimentação de 50 fêmeas de *Ny. neivai* em diferentes fontes sanguíneas (n=3).

| Anestesiados | ♀<br>alimentadas | Total<br>ovos | Média de<br>ovos/♀ | Total<br>adultos | %<br>adultos/ovos |
|--------------|------------------|---------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Camundongo   | 13               | 535           | 41,15              | 247              | 46,17             |
| Camundongo   | 18               | 879           | 62,79              | 302              | 34,36             |
| Camundongo   | 8                | 389           | 55,57              | 130              | 33,42             |
| Hamster      | 35               | 1672          | 49,18              | 474              | 28,35             |
| Hamster      | 37               | 1652          | 44,65              | 511              | 30,93             |
| Hamster      | 40               | 1308          | 33,54              | 395              | 30,20             |
| Imobilizados | ♀<br>alimentadas | Total<br>ovos | Média de<br>ovos/♀ | Total<br>adultos | %<br>adultos/ovos |
| Camundongo   | 17               | 694           | 49,57              | 187              | 26,95             |
| Camundongo   | 12               | 420           | 38,18              | 184              | 43,81             |
| Camundongo   | 15               | 491           | 37,77              | 232              | 47,25             |
| Hamster      | 15               | 650           | 46,43              | 185              | 28,46             |
| Hamster      | 21               | 1123          | 53,48              | 392              | 34,91             |
| Hamster      | 17               | 756           | 44,47              | 211              | 27,91             |
| Codorna      | 10               | 438           | 43,80              | 89               | 20,32             |
| Codorna      | 23               | 898           | 44,90              | 280              | 31,18             |
| Codorna      | 21               | 775           | 36,90              | 243              | 31,35             |

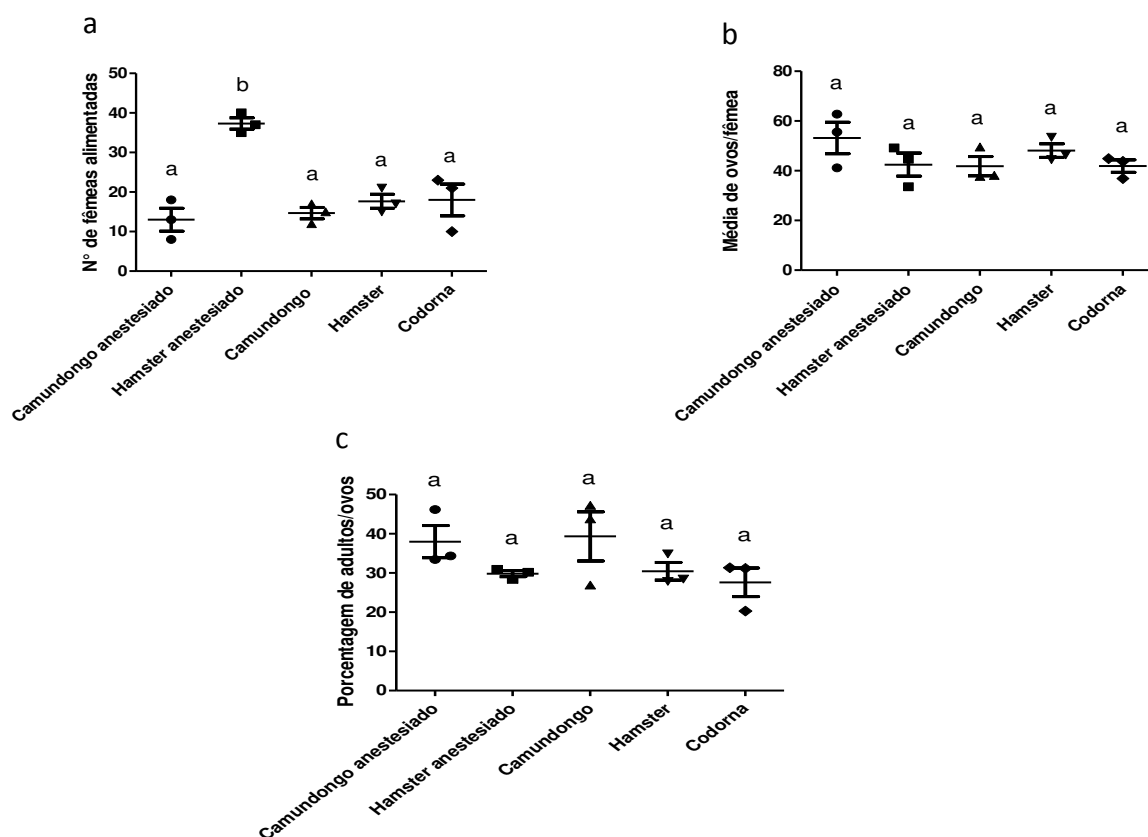


Figura 20 - (a) Porcentagem de fêmeas alimentadas em diferentes fontes alimentares; (b) número de ovos por fêmea; (c) porcentagem de adultos por ovos. Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### **3.8. Alimentação artificial para *Ny. neivai***

Após os testes iniciais para padronização do alimentador artificial, focando especialmente no melhor local para conter os insetos, foi observado que os recipientes de plástico acoplados seriam a melhor escolha. Todos os resultados abaixo foram realizados seguindo essa metodologia (Figura 9a e b). O número de casais nos testes variou entre 10 a 50, sendo que na maioria dos testes foram utilizados 30 casais.

Os resultados dos vários testes com variações na membrana e sangue ainda não foram muito satisfatórios, com baixo número de fêmeas que se alimentaram e ovipuseram (Tabela IV).

Tabela IV - Resultados dos testes feitos com diferentes membranas e diferentes tipos de sangue para *Ny. neivai*.

| Membranas       | Sangues avaliados | Nº de testes realizados | Nº de testes com alimentação das fêmeas | Nº de fêmeas avaliadas | Nº de fêmeas alimentadas | % Fêmeas alimentadas |
|-----------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| Intestino porco | soro fetal        | 4                       | 0                                       | 50                     | 0                        | 0                    |
|                 | galinha           | 6                       | 0                                       | 60                     | 0                        | 0                    |
|                 | boi               | 3                       | 0                                       | 30                     | 0                        | 0                    |
|                 | humano            | 1                       | 0                                       | 25                     | 0                        | 0                    |
| <b>Total</b>    |                   | <b>14</b>               | <b>0</b>                                | <b>165</b>             | <b>0</b>                 | <b>0</b>             |
| Intestino boi   | humano            | 3                       | 0                                       | 157                    | 0                        | 0                    |
|                 | carneiro          | 1                       | 0                                       | 30                     | 0                        | 0                    |
| <b>Total</b>    |                   | <b>4</b>                | <b>0</b>                                | <b>187</b>             | <b>0</b>                 | <b>0</b>             |
| Parafilme       | humano            | 3                       | 1                                       | 97                     | 0                        | 0                    |
|                 | carneiro          | 1                       | 0                                       | 30                     | 3                        | 10                   |
| <b>Total</b>    |                   | <b>4</b>                | <b>1</b>                                | <b>127</b>             | <b>3</b>                 | <b>2.4</b>           |
| Pele rato       | humano            | 2                       | 0                                       | 0                      | 0                        | 0                    |
| <b>Total</b>    |                   | <b>2</b>                | <b>0</b>                                | <b>0</b>               | <b>0</b>                 | <b>0</b>             |
| Pele pintinho   | soro fetal        | 5                       | 1                                       | 54                     | 4                        | 7.4                  |
|                 | galinha           | 4                       | 0                                       | 40                     | 0                        | 0                    |
|                 | boi               | 3                       | 3                                       | 30                     | 10                       | 33.3                 |
|                 | carneiro          | 6                       | 6                                       | 180                    | 41                       | 22.8                 |
|                 | humano            | 1                       | 1                                       | 25                     | 9                        | 36                   |
| <b>Total</b>    |                   | <b>19</b>               | <b>11</b>                               | <b>329</b>             | <b>64</b>                | <b>19.5</b>          |
| Pele camundongo | carneiro          | 5                       | 5                                       | 146                    | 42                       | 29.6                 |
|                 | humano            | 8                       | 8                                       | 110                    | 73                       | 66.4                 |
| <b>Total</b>    |                   | <b>13</b>               | <b>13</b>                               | <b>256</b>             | <b>115</b>               | <b>44.9</b>          |

Com relação às membranas avaliadas, o intestino de porco, intestino de boi, Parafilm M<sup>®</sup> e pele de rato apresentaram as piores respostas de alimentação para as fêmeas. Nos intestinos de porco (14 repetições) e boi (quatro repetições), as fêmeas nem ao menos foram atraídas (observação no momento da alimentação) não havendo alimentação. No Parafilm M<sup>®</sup> houve quatro repetições com uma alimentação e três fêmeas alimentadas. A pele de rato apresentou-se atrativa para os insetos, porém, devido à sua espessura, as fêmeas não conseguiram acesso ao sangue; em nenhuma das duas tentativas houve alimentação das fêmeas.

A pele de pintinho e a pele de camundongo demonstraram as maiores taxas de alimentação. Das 19 repetições com a pele de pintinhos, houve alimentação em 11 vezes; na pele de camundongos, das 13 repetições, houve alimentação em 100% das vezes.

A pele de camundongo mostrou-se atrativa e de espessura suficiente para que as fêmeas conseguissem se alimentar. Foi observado que a pele de camundongos fêmeas é mais indicada por possuir a camada de gordura mais fina (Figura 21a e b). Além disso, a pele de camundongo pode ser reaproveitada para mais uma alimentação sanguínea, não sendo viável para uma terceira alimentação.

Os dados referentes à taxa de oviposição e desenvolvimento posterior até a fase adulta serão apresentados para as membranas de pintinho e camundongo (Tabela V). Além dessas membranas, houve oviposição apenas nos testes com Parafilm M<sup>®</sup> que resultaram em 54 ovos e dois adultos.



Tabela V - Produtividade de adultos em relação ao número de ovos de acordo com o tipo de membrana e sangue utilizados no alimentador artificial.

| <b>Membranas</b>       | <b>sangue</b> | <b>Nº ♀ que ovipuseram</b> | <b>Nº ovos</b> | <b>Ovos/♀</b> | <b>L1</b> | <b>Adultos</b> |
|------------------------|---------------|----------------------------|----------------|---------------|-----------|----------------|
| <b>Pele pintinho</b>   | soro fetal    | 2                          | 59             | 29,5          | não       | 0              |
|                        | galinha       | 0                          | 0              | 0             | não       | 0              |
|                        | boi           | 2                          | 32             | 16,0          | não       | 0              |
|                        | boi           | 2                          | 40             | 20,0          | não       | 0              |
|                        | boi           | 5                          | 130            | 26,0          | sim       | 0              |
|                        | carneiro      | 3                          | 112            | 37,3          | sim       | 54             |
|                        | carneiro      | 1                          | 36             | 36,0          | sim       | 8              |
|                        | carneiro      | 3                          | 97             | 32,3          | sim       | 3              |
|                        | carneiro      | 3                          | 72             | 24,0          | sim       | 24             |
|                        | carneiro      | 0                          | 0              | 0             | não       | 0              |
|                        | carneiro      | 0                          | 0              | 0             | não       | 0              |
|                        | humano        | 5                          | 110            | 22,0          | sim       | 0              |
| <b>Pele camundongo</b> | carneiro      | 9                          | 314            | 34,9          | não       | 0              |
|                        | carneiro      | 0                          | 0              | 0             | não       | 0              |
|                        | carneiro      | 0                          | 0              | 0             | não       | 0              |
|                        | carneiro      | 0                          | 0              | 0             | não       | 0              |
|                        | carneiro      | 11                         | 370            | 33,6          | sim       | 35             |
|                        | carneiro      | 4                          | 127            | 31,8          | sim       | 11             |
|                        | carneiro      | 2                          | 41             | 20,5          | sim       | 12             |
|                        | carneiro      | 19                         | 550            | 28,9          | sim       | 146            |
|                        | carneiro      | 1                          | 15             | 15,0          | sim       | 3              |
|                        | humano        | 16                         | 300            | 18,75         | sim       | 27             |
|                        | humano        | 16                         | 100            | 6,25          | não       | 0              |
|                        | humano        | 6                          | 94             | 15,7          | sim       | 18             |
|                        | humano        | 6                          | 173            | 28,8          | sim       | 68             |
|                        | humano        | 11                         | 111            | 10,1          | sim       | 25             |
|                        | humano        | 6                          | 95             | 15,8          | sim       | 4              |
|                        | humano        | 5                          | 79             | 15,8          | sim       | 11             |
|                        | humano        | 7                          | 50             | 7,1           | sim       | 9              |

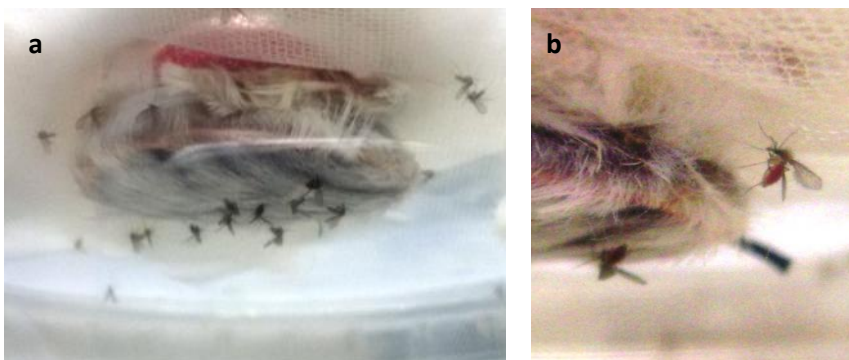


Figura 21 - (a) Insetos se alimentando através da pele de camundongo fêmea; (b) fêmea ingurgitada através da alimentação pela pele de camundongo.

Apesar de haver alimentação em pele de camundongo, grande parte das fêmeas morre no primeiro ou segundo dias após a alimentação no alimentador artificial, isto é, antes do ciclo gonotrófico se completar (Figura 22a).

Foi observado também que parte dos ovos é de tamanho e formatos diferentes, não eclodindo (Figura 22b).

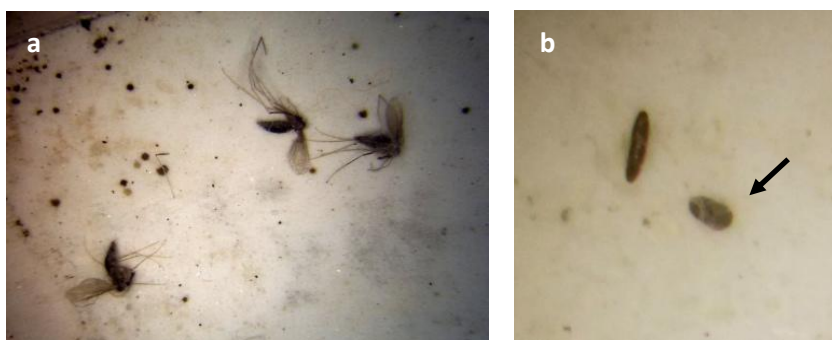


Figura 22 - (a) Fêmeas alimentadas em sangue desfibrinado de carneiro mortas antes da oviposição; (b) ovo normal ao lado de ovo com deformidade (seta).

#### 4. DISCUSSÃO

Um dos maiores problemas no estabelecimento de uma colônia de flebotomíneos em laboratório é a proliferação de fungos. A umidade alta juntamente com temperatura elevada e dietas nutritivas para as formas imaturas tornam os recipientes de criação ambientes favoráveis ao aparecimento de diferentes tipos de fungo, que por sua vez atrapalham o desenvolvimento dos insetos. Pode-se dizer que a pesquisa pela dieta artificial ideal, o surgimento de fungos e sua forma de controle estão sempre descritos juntos.

As larvas dos flebotomíneos são detritívoras e para encontrarmos uma dieta artificial apropriada para as mesmas em condições de laboratório, estas devem conter substratos ricos em bactérias, material vegetal e fungos (MORAES et al, 2012).

É comum encontrarmos descrições de autores relatando a dificuldade em lidar com a mortalidade das formas larvais nos primeiros estádios devido à proliferação não controlada de fungos na dieta artificial das larvas (YOUNG et al., 1981; RANGEL et al., 1985; MONTOYA-LERMA et al, 1998; MANN & KAUFMAN., 2009; GOULART et al., 2015).

Uma dieta artificial preconizada por Modi & Tesh (1983), composta de fezes e dieta de coelho envelhecida, foi utilizada na criação de diferentes espécies de flebotomíneos em condições de laboratório, como: *Lutzomyia cruciata*, *Dampfomyia anthophora*, *Psathyromyia shannoni*, e *Micropygomyia vexator* (ENDRIS et al., 1982). Neste trabalho o autor não relata o aparecimento de fungos e nem a utilização de esterilização da dieta por causa dos mesmos. Com essa dieta houve a diminuição do crescimento de fungos em outras colônias (YOUNG et al., 1981). Essa dieta é a de preferência de muitos pesquisadores por ser considerada semelhante à encontrada no ambiente natural. Essa dieta passa por processo de fermentação, diminuindo o surgimento de fungos (VOLF & VOLFOVA, 2011).

Variações dessa dieta foram utilizadas na criação das colônias de *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus duboscqi*, *Lutzomyia longipalpis* (LAWYER et al., 1991) e *Pi. serrana* (VOLF & VOLFOVA, 2011).

Na tentativa de diminuir a contaminação por fungos na colônia de *Lu. longipalpis*, Luitgards-Moura et al (2000) trocaram o gesso a cada geração do inseto,

flambaram os instrumentos utilizados diariamente na colônia e mantiveram a dieta artificial das larvas a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Como resultado relataram a diminuição dos fungos, podendo estes cuidados ser administrados em outras colônias.

Montoya-Lerma et al (1998) usaram uma mistura de fezes de coelho, dieta de coelho e 5% de pó de fígado na dieta das larvas; esterilizaram e congelaram a dieta para evitar o crescimento de fungos. Mesmo com esses cuidados os fungos surgiram e, como medida de controle, os pesquisadores utilizaram-se da remoção manual das hifas com o auxílio de um estilete, fato que acabou por prejudicar as larvas de *Pintomyia evansi* em sua colônia.

Devido às discordâncias de muitos autores em relação aos fungos causarem a morte das larvas nos primeiros estádios por se prenderem nas hifas (BARRETTO, 1942; HERTIG & JOHNSON, 1961; SHERLOCK & SHERLOCK, 1972) ou de serem uma complementação da alimentação das mesmas (WERMELINGER & ZANNUCIO, 2001), utilizando a dieta artificial empregada rotineiramente em nossa colônia (Dieta 1 – Tradicional: fezes de coelho, dieta de coelho, terra e dieta de peixe) decidimos comparar dietas esterilizadas (autoclavagem e tindalização) e não esterilizadas. Apesar de nossos resultados não apresentarem diferença estatística entre as dietas comparadas, as dietas que passaram pelo método de esterilização apresentaram um surgimento mais lento de fungos. O surgimento de fungos nessas dietas demorou três dias, dando tempo suficiente para as larvas de primeiro instar crescerem e se desvencilharem das hifas.

Em trabalho realizado em 2001 por Wermelinger & Zannucio, dietas industrializadas para coelhos, hamsters e peixes foram comparadas com dieta envelhecida para larvas de colônias de *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis*. Os resultados mostraram que as duas espécies se desenvolveram bem na dieta envelhecida, mas apenas *Ny. intermedia* apresentou bons resultados com a dieta feita de dieta industrializada.

Algumas espécies do gênero *Phlebotomus* preferem dietas não autoclavadas, mas outras espécies, como *Lu. longipalpis*, as larvas se desenvolvem normalmente em dietas autoclavadas (VOLF & VOLFOVA, 2001).

Em nosso trabalho, larvas de todos os estádios de *Ny. neivai* não recusaram as dietas esterilizadas. Para a colônia de *Ny. neivai* indicamos a

autoclavagem por ser mais rápida que a tinalização e alcançar resultado similar no retardo do surgimento dos fungos.

Observamos ácaros nos recipientes de criação, porém, assim como relatado por Endris et al (1982), estes estavam se alimentando da dieta das larvas ou de adultos mortos, não prejudicando o desenvolvimento da colônia.

Apesar de alguns estudos terem como objetivo a busca pela dieta ideal para as formas imaturas de diferentes espécies de flebotomíneos, não há uma receita para todas as espécies. Foi sugerido que a variedade na dieta alimentar das larvas de diferentes espécies poderia ser importante na redução da competição em condições naturais (BARRETTO, 1942; WERMELINGER & ZANNUCIO, 2001).

Em nosso estudo não utilizamos dieta envelhecida. Como resultado, o teste de atração das larvas em diferentes dietas mostrou que as dietas que continham ração de peixe (Dieta tradicional: dieta de peixe, terra, fezes de coelho e dieta de coelho; Dieta 3 = Fezes de coelho, terra e dieta de peixe) eram mais atrativas do que as que não continham esse ingrediente (Dieta 2: fezes de coelho e terra; Dieta 4: terra e limo). Esse resultado está de acordo com os resultados que Rangel et al., (1986) obtiveram com larvas de *Lu. longipalpis*.

Os mesmos autores descrevem a pouca ocorrência de fungos em seus recipientes de criação quando utilizaram dieta de peixe, fato que não se assemelha aos resultados obtidos por nós. A dieta de peixe trouxe grandes transtornos relacionados à quantidade de fungos nos recipientes. A perda de tempo na manutenção dos recipientes, para a soltura das larvas das hifas e remoção dos mesmos, foi triplicado.

Em relação aos experimentos de desenvolvimento das larvas em diferentes dietas artificiais, a produção de adultos foi maior quando as larvas foram alimentadas com a dieta tradicional do que com dietas feitas apenas de grãos ou plantas. Assim como a dieta de peixe, a multimistura apresentou problemas muito alarmantes em relação ao surgimento de fungos, além de não ter sido apreciada pelas larvas. Notamos que as larvas se alimentavam dos fungos e não dos grãos da multimistura.

A partir dos resultados obtidos dos experimentos anteriores, testamos qual o melhor substrato para a criação das larvas que facilitasse a rotina da colônia em relação à remoção de fungos e diminuísse a mortalidade das larvas.

Os experimentos mostraram que as fêmeas grávidas de *Ny. neivai* preferem ovipor em superfícies irregulares. As fêmeas ovipuseram entre os grãos de vermiculita e as larvas de primeiro instar conseguiram se refugiar das hifas de fungos. Além disso, agitar os recipientes com vermiculita permitiu que as hifas fossem rompidas sem prejudicar as larvas.

Esse resultado é similar aos de espécies como *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei* que apresentam uma resposta tigmotrópica à superfícies irregulares. Tais superfícies fornecem maior proteção, maior umidade e possivelmente mais alimento para as larvas recém nascidas do que superfícies planas (ELNAIEM & WARD, 1992; NIEVES et al, 1997).

Barretto (1942) descreve três substratos empregado por diversos autores, sendo eles: gesso, vasos porosos de barro e papel filtro. Esses autores relatam a dificuldade de criar as larvas em gesso devido à dificuldade de regular a umidade (SMITH, 1927; ROUBAUD & COLAS-BELCOUR, 1927 *apud* Barretto, 1942). Quando o gesso se torna muito úmido as larvas ficam grudadas e acabam morrendo. Nota-se que o gesso utilizado no referido trabalho era o de secagem lenta e não o de secagem rápida utilizado em nossa colônia. Para os vasos porosos de barro o problema consistia na constante umidificação do mesmo. Já no papel filtro, era difícil o controle da umidade e o surgimento de fungos era muito alto e constante.

Em nossos experimentos constatou-se que a utilização de uma fina camada de vermiculita sobre a camada de gesso proporcionou umidade constante e diminuição do surgimento de fungos. Tal processo permitiu quase o dobro de produção de adultos comparada com o gesso. A partir desse experimento em todos os recipientes de criação da colônia de *Ny. neivai* são adicionados vermiculita.

A avaliação da densidade dependente (*Carrying capacity*) consiste em determinar o número ideal de indivíduos de uma mesma espécie dentro de um ambiente específico (PRICE, 1984; SANTAMARÍA et al, 2002).

Neste estudo, o ambiente específico e delimitado é o recipiente de criação. Utilizamos o número máximo de 30 casais por recipiente, e essa densidade de indivíduos dentro do recipiente não afetou a mortalidade das fêmeas antes ou durante a oviposição, problema demonstrado em diversos trabalhos (KILLICK-KENDRICK, 1978; ENDRIS et al, 1982; MAROLI et al, 1987; SCHLEIN et al, 1990).

Para *Ny. neivai*, nossos resultados mostraram que o número ideal de indivíduos dentro do recipiente de criação, tanto para recipientes de 145 mL como 250 mL, é de 5 a 10 casais. Com esse número de casais foi produzido de 100 a 400 ovos, produzindo o maior número de adultos. Em nossos testes não houve diferença no número de fêmeas mortas antes da oviposição com mais ou menos casais dentro dos recipientes de criação.

Santamaría et al (2002) estudaram a densidade ideal de indivíduos de *Pi. serrana* dentro de recipientes de criação de 150 mL e verificaram que o aumento da densidade de flebotomíneos dentro do mesmo recipiente afetou negativamente a sobrevivência das fêmeas antes da oviposição. Os autores trabalharam com 1 a 50 casais por recipiente, número de casais mais alto do que usamos em nosso experimento. A melhor produtividade de ovos, adultos e a menor taxa de mortalidade das fêmeas grávidas antes da oviposição foi alcançada pelos autores quando utilizaram 22 casais por recipiente.

Mann & Kaufman (2009) testaram a influência da densidade dependente para *Pa. shannoni* na produção de ovos. Os autores utilizaram 1, 5, 10 e 20 casais por recipiente e constataram que quanto maior a quantidade de casais, conseqüentemente maior a quantidade de ovos. Os autores não compararam a quantidade de ovos com a produtividade de insetos adultos.

Um estudo realizado com *Ny. neivai* mostrou como resultado, a partir da quantidade de ovos obtidos, uma taxa de produtividade de adultos de 20,7% (ANDRADE FILHO et al., 2004). Nossos resultados mostraram que um número menor de casais iniciais dentro do recipiente produz um número mais elevado de adultos em relação ao número de ovos, chegando a mais de 70% em alguns recipientes de criação. Esse fato pode ter ocorrido pela competição intra-específica das larvas por comida e espaço.

O fenômeno chamado “migração de suicídio em massa” foi relatado por Hertig & Johnson (1961) observando uma criação de densidade alta de *Lutzomyia sanguinaria*. Esse fenômeno consiste na migração das larvas pelas laterais dos recipientes que acabam morrendo pela desidratação (SANTAMARÍA et al., 2002). Esse comportamento também foi observado em nosso experimento com *Ny. neivai*. Mais casais significa maior quantidade de ovos dentro do recipiente de criação, mas não significa que o maior número de adultos será alcançado ao final do processo.

Experimentos realizados com *Culex sitiens* mostraram que a super população de larvas em um mesmo espaço retarda o crescimento e aumenta a mortalidade das mesmas. Esse fato ocorre tanto por interferências mecânicas quanto químicas. As larvas liberam substâncias químicas para retardar o crescimento das outras (ROBERTS, 1998).

Quando o número ideal de indivíduos de uma espécie é alcançado, um único indivíduo a mais adicionado causa a ruptura do sistema, levando ao desequilíbrio daquele ambiental (TURK, 1981).

Na literatura há diversos trabalhos comparando diferentes fontes sanguíneas para a alimentação das fêmeas de diferentes espécies de flebotomíneos. Ready (1979) mostrou que a quantidade e composição do repasto, feito pela *Lu. longipalpis*, foram os principais fatores de influência na oviposição, sendo o número de ovos produzidos dependente da quantidade de sangue ingerida.

Volf & Volfova (2011) relataram que a adaptação para uma fonte alternativa de alimentação sanguínea é um processo longo que pode demorar diversas gerações. Os autores utilizaram camundongos como fonte sanguínea na maioria de suas colônias, mas observaram que a preferência alimentar difere entre as várias espécies mantidas no laboratório. *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *P. sergenti*, *P. arabicus*, e *Lu. longipalpis* são mantidos rotineiramente apenas com camundongos. Já *P. perniciosus*, *P. tobyi*, *P. argentipes*, *P. simici* e *P. halepensis* preferem se alimentar de coelhos, hamster e seres humanos.

Nosso experimento com diferentes fontes sanguíneas de alimentação mostrou que *Ny. neivai* apresentou maior taxa de alimentação em hamster, resultando em um maior número de ovos. Porém, a quantidade de ovos e larvas que se perde é extremamente alta. O número de ovos por fêmea manteve-se por igual em todos os tratamentos, com ou sem anestesia, porém a aplicação da anestesia repetidas vezes e exposição aos repastos dos flebotomíneos em longo prazo causam efeitos colaterais na saúde dos animais. Os animais desenvolvem anticorpos contra a saliva dos flebotomíneos e assim que uma nova fêmea se alimenta desde animal, acaba por morrer antes da oviposição pelos efeitos desses anticorpos (GOSH & MUKHOPADHYAY, 1998).

Em criação de primeira geração de *Ny. neivai* e *Ny. intermedia* em laboratório, Andrade Filho et al. (2004) alimentaram os insetos de campo



primeiramente em hamster. Para a segunda alimentação ofereceram hamster, codorna e o ser humano. As fêmeas de *Ny. neivai* se alimentaram prontamente do hamster e também se alimentaram do homem, porém não se alimentaram da codorna. Como já dito anteriormente, os autores obtiveram uma produtividade de 20,7% de adultos quando alimentados em hamster. Ao contrário do resultado negativo da alimentação com a codorna, em nosso estudo obtivemos um máximo de 31,3% de produtividade quando alimentamos *Ny. neivai* com a mesma espécie de ave, taxa esta, mais alta do que a obtida pelos autores com hamster.

Os autores não apresentaram os resultados de produtividade de ovos e adultos com o sangue do ser humano.

Apesar de o hamster ser o animal usualmente utilizado para alimentação de colônias de flebotomíneos e ter obtido vantagem na produtividade dos adultos, no nosso laboratório, especificamente, é muito mais prático a manutenção de camundongos na rotina. Uma vez que o número de ovos por fêmea e o número de adultos por ovos também não foram alterados em virtude da fonte alimentar, preferimos adotar o camundongo em nossa colônia, mesmo tendo que aumentar a quantidade de vezes para as alimentações. Essa pode ser a realidade de outros laboratórios.

Devido às questões éticas da utilização de animais como fonte alimentar sanguínea, o uso de alimentadores artificiais tem sido cada vez mais estimulado.

Os alimentadores artificiais são preferidos a hospedeiros infectados, pois fornecem e possuem a vantagem de oferecer a quantidade exata de parasitas em certa quantidade de sangue, permitir altas infecções nos vetores e a alimentação de artrópodes que se recusam a se alimentar em um animal infectado (ADLER & THEODOR, 1927).

Apesar dessas vantagens no uso do alimentador artificial para infecções com *Leishmania* spp, nossos experimentos focaram na possibilidade de utilização desta metodologia para a manutenção da colônia, assim como foi demonstrado por Mann & Kaufman (2009) que mantiveram por quatro gerações, *Pa. shannoni* alimentando-as com sangue desfibrinado de boi e intestino de porco como membrana. Neste trabalho, os autores mantiveram os insetos se alimentando pelo período de apenas quatro horas. Em nosso estudo, os insetos se alimentaram durante todo o período noturno, totalizando 14 horas (18h às 8h).

A partir dos resultados obtidos, a alimentação artificial não se mostrou uma opção viável para manter a colônia de *Ny. neivai* em laboratório, devido a alta mortalidade das fêmeas pós-alimentação, baixa produção de ovos e mortalidade das larvas. No entanto, uso de pele de camundongo como membrana e o sangue humano como fonte alimentar permitiu maior porcentagem de alimentação das fêmeas com reduzida mortalidade pós-alimentação e maior capacidade de completar o ciclo gonotrófico, podendo ser considerado como uma alternativa para estudos de infecção com micro-organismos em pequeno grupo de insetos.

## 5. CONCLUSÕES

- ✚ A dieta autoclavada é a mais indicada para a alimentação das formas imaturas de *Ny. neivai* em comparação com dietas não esterilizadas,
- ✚ Entre as dietas testadas em nossos experimentos a dieta tradicional (dieta de coelho, fezes de coelho, dieta de peixe e terra vegetal) foi a preferida e a que ocasionou melhor desenvolvimento das larvas de *Ny. neivai*, porém a retirada da dieta de coelhos não altera demasiadamente a produtividade de adultos,
- ✚ A vermiculita sobre o gesso mostrou-se o melhor substrato para o desenvolvimento das larvas quando comparado com a terra, gesso e cascalho,
- ✚ Os recipientes de criação de 145 mL foram os mais adequados para a criação dessa espécie em condições de laboratório,
- ✚ Cinco a 10 casais de *Ny. neivai* em ambos recipientes de criação (145 e 250 mL) é o número indicado para melhor produtividade de adultos,
- ✚ As fontes de alimentação sanguínea avaliadas não induziram ação fisiológica diferenciada no número de ovos por fêmea ou número de adultos por ovos, porém um maior número de fêmeas se alimentou em hamsters anestesiados. Para o nosso laboratório, logisticamente, vale mais a pena, escolher a alimentação em camundongos,
- ✚ A pele de camundongo e o sangue humano mostraram-se as melhores opções no alimentador artificial,
- ✚ O alimentador artificial não se mostrou eficiente na manutenção de uma colônia de *Ny. neivai* em laboratório, porém, pode ser usado em experimentos com objetivos mais específicos como por exemplo, infecção artificial de flebotomíneos com micro-organismos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER S. THEODOR O (1927) The behavior of cultures of *Leishmania tropica*, *L. infantum* and *L. braziliensis* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. **Nature**. 119: 48-49.

ANDRADE FILHO JD, GALATI EA, FALCÃO AL (2004) Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99(6):597–601.

BARRETTO MP (1942) Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera Psychodidae). Tese de Doutorado, Fac. Med. USP, São Paulo, Brasil.

COSTA-DA-SILVA AL, NAVARRETE FR, SALVADOR FS, COSTA MK, IOSHINO RS, AZEVEDO DS, ROCHA DR, ROMANO CM, CAPURRO ML (2013) Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. **Plos one**. 8(1): e53816.

ELNAIEM DA, WARD RD (1992) The thigmotropic oviposition response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to crevices. **Annals of the Tropical Medicine & Parasitology**. 1992;86(4):425–30.

ENDRIS RG, PERKINS PV, YOUNG DG, JOHNSON RN (1982) Techniques for laboratory rearing of sand flies (Diptera: Psychodidae). **Mosquito News**. 42(3): 400-407.

GHOSH KN, MUKHOPADHYAY J (1998) The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmanis donovani*. **International Journal for Parasitology**. 28: 275-281.

GOULART TM, CASTRO CF, MACHADO VE, SILVA FBR, PINTO MC (2015) Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). **Parasites & Vectors**. 8:423.

HERTIG M, JOHNSON PT (1961) The rearing of Phlebotomus sandflies (Diptera:Psychodidae). 1 Technique. **Annals of the Entomology Society of America**. 54:753–66.

KILLICK-KENDRICK M, KILLICK-KENDRICK R (1999) The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**. 17: 279-289.

KILLICK-KENDRICK R (1978) Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. **Acta Tropica**, 35: 315-320.

LAWYER PG, ROWTON ED, PERKINS PV, JOHNSON RN, YOUNG DG (1991) Recent advances in laboratory mass rearing of phlebotomine sand flies. **Parassitologia**.33 :361–364.

LUITGARDS-MOURA JF, BERMÚDEZ EGC, ROSA-FREITAS MG (2000) Aspects Related to Productivity for Four Generations of a *Lutzomyia longipalpis* Laboratory Colony. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 95(2): 251-257.

MACHOTA-JÚNIOR R, BORTOLI LC, TOLOTTI A, BOTTON M, GONÇALVES B (2010) Técnica de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em laboratório utilizando hospedeiro natural. **Embrapa Uva e Vinho**. 23.

MANN RS, KAUFMAN PE (2009) Colonization of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) utilizing an artificial blood feeding technique. **Journal of Vector Ecology**. 35(2): 286-294.

MAROLI M, FLORENTINO S, GUANDALINI E (1987) Biology of a labratoty colony of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 24: 547-551.

MODI GB, TESH RB (1983) A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**. 20: 568-569.

MONTOYA-LERMA J, CADENA-PEÑA H, JARAMILLO-SALAZAR C (1998) Rearing and Colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a Vector of Visceral Leishmaniasis in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 93(2): 263-268.

MORAES CS, LUCENA SA, MOREIRA BH, BRAZIL RP, GONTIJO NF, GENTA FA (2012) Relationship between digestive enzymes and food habit of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) larvae: Characterization of carbohydrases and digestion of microorganisms. **Journal of Insect Physiology**. 2012;58(8):1136–45.

NIEVES E, RIBEIRO A, BRAZIL R (1997) Physical factors influencing the oviposition of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 92(6):733–7.

PRICE WP (1984) Insect Ecology, Second edn. USA: John Wiley & Sons, Inc.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER E, BARBOSA AF (1985) Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia*, LUTZ & NEIVA, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 80(2): 219-226.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA F, ANDRADE CA (1986) Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 8: 347-349.

READY PD (1979) Factors affecting egg production of laboratory bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 16: 413-423.

ROBERTS D (1998) Overcrowding of *Culex sitiens* (Diptera: Culicidae) larvae: population regulation by chemical factors or mechanical interference. **Journal of Medical Entomology**. 35(5):665–9.

SANTAMARÍA E, MUNSTERMANN LE, FERRO C (2002) Estimating carrying capacity in a newly colonized sand fly *Lutzomyia serrana* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Economic Entomology**. 95(1):149–54.

SCHLEIN Y, BORUT S, JACOBSON RL (1990) Oviposition diapause and other factors affecting the egg-laying of *Phlebotomus papatasi* in the laboratory. **Medical and Veterinary Entomology**. 4(1):69-78.

SHERLOCK IA, SHERLOCK VA (1972) Métodos práticos para a criação de flebotomíneos em laboratório. **Revista Brasileira de Biologia**. 32:209–17.

SMITH ROA (1927) The breeding of sandflies in nature and in the laboratory. **Transactions**. 7th Congress Far Eastern Assoc. Trop. Med. 3: 182-185.

TURK A (1981) Tratado de ecología. Interamericana, México.

VOLF P, VOLFOVA V (2011) Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**. 36(1): 1-9.

WERMELINGER ED, ZANUNCIO JC (2001) Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different diets. **Brazilian Journal of Biology**, 61 (3), 405–408.

YOUNG DG, PERKINS PV, ENDRIS RG (1981) A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 18(5):446-446 .

## CAPÍTULO 2

### Identificação dos açúcares ingeridos pelos adultos de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) na natureza.

#### RESUMO

Os experimentos referentes à identificação dos açúcares ingeridos por adultos de *Ny. neivai* ocorreram com insetos em três situações: coletados em campo, criados em laboratório antes e após alimentação. Para a identificação dos açúcares, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa. Dois procedimentos foram avaliados, o primeiro empregando reações de metoximação e sililação e outro apenas sililação. A partir desses resultados, os mesmos carboidratos foram ofertados a grupos de flebotomíneos, a fim de determinar a curva de mortalidade dos mesmos; além disso, acrescentou-se a sacarose, usada como alimentação em muitas colônias de flebotomíneos. Como resultado foram encontrados frutose, glucose, isomaltose, ribose e trealose em insetos de campo, sendo o mais provável que a ribose e a trealose façam parte da estrutura interna dos insetos. Para insetos de laboratório alimentados com alimento glicosado Favinho<sup>®</sup> os mesmos açúcares dos insetos de campo foram encontradas, porém em intensidades mais baixas. Para insetos de laboratório sem alimentação prévia foram encontrados apenas glucose, frutose e ribose também em intensidades reduzidas. A curva de mortalidade de *Ny. neivai* resultou em maior longevidade para as fêmeas com os dois produtos comerciais (YOKI<sup>®</sup> e Favinho<sup>®</sup>). Para os machos, Favinho<sup>®</sup> apresentou as melhores taxas de sobrevivência. Dentre os açúcares avaliados, as curvas de sobrevivência com sacarose foram melhores para os machos e fêmeas.



## 1. OBJETIVOS

- ✚ Identificar os carboidratos ingeridos pelos adultos de *Ny. neivai* coletados em campo e oferecê-los aos insetos de geração de laboratório, a fim de avaliar sua longevidade.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das análises dos açúcares encontrados em insetos de campo, foi feito um ensaio prévio para a validação do método. A partir da validação do método, ensaios com insetos de campo e de laboratório foram realizados.

### 2.1. Material biológico

Para realização do ensaio prévio foram utilizados três grupos de insetos: grupo de fêmeas, grupo de machos e grupo misto (machos e fêmeas) criados em laboratório com oferecimento de alimento glicosado Karo<sup>®</sup>.

Dois diferentes grupos de insetos foram utilizados nos ensaios seguintes ao ensaio prévio:

- ✚ Insetos de campo: fêmeas e machos (coletados em maio de 2014) e machos (coletados em dezembro de 2013),
- ✚ Insetos de laboratório sem alimentação: fêmeas e machos isoladamente nunca alimentados.

Os insetos foram coletados em campo, como previamente descrito, e sem nenhuma alimentação em açúcar, foram colocados em microtubos (1,7 mL) e mantidos em freezer (-20°C). Os insetos de laboratório foram coletados logo após a emergência, em jejum, e também mantidos em freezer.

## **2.2. Padrões analíticos**

Os açúcares utilizados como padrões foram: D-frutose, D-manose,  $\alpha$ -lactose, D-arabinose, maltose, ribitol, D(+)glucose, D-xilose, D(+)galactose, sacarose, isomaltose, trealose e D-ribose da marca Sigma-Aldrich®.

## **2.3. Procedimento analítico para ensaio prévio**

O preparo das amostras para análise cromatográfica envolveu as etapas de extração dos açúcares, derivatização (processo que torna os açúcares voláteis) e análise por Cromatografia gasosa - com detector por ionização de chama (GC-FID).

### **2.3.1. Extração dos açúcares:**

Os três grupos de insetos de laboratório (fêmeas, machos e misto) foram previamente pesados e os carboidratos extraídos três vezes com piridina (400  $\mu$ L) em aparelho de ultrassom por 10 minutos a 30°C. Os extratos de piridina foram combinados e o solvente removido por evaporação à temperatura ambiente dentro de uma capela durante 24h e submetido à etapa de derivatização.

### **2.3.2. Derivatização (metoximação e sililação):**

A reação de derivatização dos açúcares para análise cromatográfica foi realizada a partir dos processos de metoximação e sililação.

A realização da reação de formação de oximas (metoximação) antes da sililação foi no intuito de bloquear a interconversão entre as estruturas cíclica e acíclica de açúcares redutores e para evitar a descarboxilação da molécula (GULLBERG et al, 2004).

A sililação é uma etapa simples, rápida e eficiente utilizada para análises em GC. O rendimento é alto, eleva a volatilidade dos compostos e resulta em picos mais estreitos e simétricos no cromatograma. É realizada em apenas uma etapa (BLAU & HALKET, 1993).

Para a metoximação, foi preparada uma solução contendo 30 mg de cloridrato de metoxiamina em 1,5 mL de piridina. Em seguida, foram adicionados 80  $\mu$ L dessa solução na amostra/padrão a ser derivatizado, com subsequente aquecimento em banho-maria a 30°C por 90 minutos (Figura 1a).

Após esta etapa, iniciou-se o processo de sililação, o qual consistia em adicionar 200  $\mu$ L de N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida (MSTFA) nos frascos oriundos da metoximação. As amostras foram homogeneizadas e aquecidas a 37°C por 30 minutos em banho-maria. Após o aquecimento, o líquido foi filtrado com microfiltro de 0,22  $\mu$ m e transferido para um frasco de 2 mL com "insert" de 350  $\mu$ L (Figura 1b), deixado em repouso por 24 horas a 5°C e então submetido à análise por cromatografia gasosa.



Figura 1 - Etapas da reação de derivatização (a) Amostras em banho-maria, (b) processo de filtração em microfiltro.

### 2.3.3. Preparo dos padrões:

O preparo das soluções padrão dos açúcares foi feita de forma similar ao preparo das amostras, partindo-se de soluções a 1 mg/mL em piridina.

### 2.3.4. Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama:

As análises cromatográficas foram realizadas no sistema GC-FID Varian Chrompack CP-3800 e autosampler Varian CP-8200. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar ZB-5 (30 m comprimento x 0,25 mm de diâmetro e 0,25  $\mu$ m de espessura de filme) operando a 140°C/3 min (3°C/min) 320°C/10 min. As

temperaturas do injetor e detector foram de 260° e 320°C, respectivamente. Utilizou-se nitrogênio a 1 mL/min como gás de arraste.

## **2.4. Procedimento analítico para identificação dos açúcares**

O procedimento analítico baseou-se no trabalho de Hamilton e ElNaiem (2000) com pequenos ajustes e envolveu etapas de extração dos açúcares, derivatização (sililação) e análise por cromatografia gasosa com detector de massas.

### **2.4.1. Preparo dos padrões:**

Os padrões de açúcares foram diluídos em piridina seca na concentração de 1,0 mg/mL. Uma alíquota de 200 µL de cada solução foi transferida para frascos de 2 mL e submetida à reação de derivatização com N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida (MSTFA).

### **2.4.2. Preparo das amostras:**

As soluções para análise foram obtidas a partir da extração em banho de ultrassom dos insetos coletados (aproximadamente 1,9 mg) em 200 µL de piridina seca durante 30 min. Ao extrato obtido foram adicionados 200 µL de MSTFA e aquecidos a 60°C durante 1 h antes da análise cromatográfica.

### **2.4.3. Derivatização (sililação):**

Nos frascos de amostra e padrão foram adicionados 200 µL MSTFA, os frascos foram fechados e aquecidos a 60°C durante 1 h para formação dos derivados voláteis (processo de derivatização) e submetidos à análise cromatográfica. O meio reacional dos padrões foram diluídos 0,1:10 mL em piridina antes da injeção cromatográfica.

#### **2.4.4. Análise por GC-MS:**

As análises cromatográficas foram realizadas no GC-MS Agilent 6890N equipado com detector de massas 5975. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar HP-5MS (30 m comprimento x 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme) operando a 40°C (30°C/min) 170°C (2°C/min) 210°C (50°C/min) 300°C/5 min. As temperaturas do injetor e detector foram de 220° e 300°C, respectivamente. Utilizou-se hélio a 1 mL/min como gás de arraste e as injeções foram realizada no modo splitless.

A identificação dos açúcares presentes nas amostras deu-se através da comparação dos tempos de retenção e espectros de massas.

Essa parte do projeto foi realizada em colaboração com a Dra. Marili Villa Nova Rodrigues (CPQBA) e o Dr. Alberto Cavalheiro do Instituto de Química da UNESP, Araraquara.

#### **2.5. Avaliação da longevidade de grupos de adultos de *Ny. neivai* observando-se a sua curva de mortalidade**

Dez casais da geração F8 foram colocados em recipientes de criação (145 mL) e os açúcares encontrados nos insetos de campo e também a sacarose, que é um açúcar comumente encontrado em flebotomíneos e utilizado rotineiramente em colônias (BRAZIL & BRAZIL, 2003), por meio da cromatografia foram oferecidos, diluídos em água deionizada a 30%. Foram também avaliados dois produtos comerciais utilizados regularmente no nosso laboratório: os alimentos glicosados das marcas Yoki® e Favinho®.

Os recipientes foram mantidos em organizadores, no escuro, a 28°C e com umidade de 80 a 90%. Foram realizadas três repetições. Diariamente a mortalidade dos adultos foi contabilizada e o teste de log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparação das curvas de sobrevivência.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Procedimento analítico para ensaio prévio

Esse procedimento foi aplicado para alguns padrões de açúcares e amostras de insetos provenientes da geração em laboratório e analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID) por ser o único sistema cromatográfico disponível naquele momento.

Os três extratos dos insetos de laboratório apresentaram os mesmos picos. O ribitol foi adicionado às amostras de fêmeas e machos como um controle interno, não sendo acrescentado no extrato misto para verificar se esse açúcar estaria originalmente presente na amostra (Figura 2a e b).

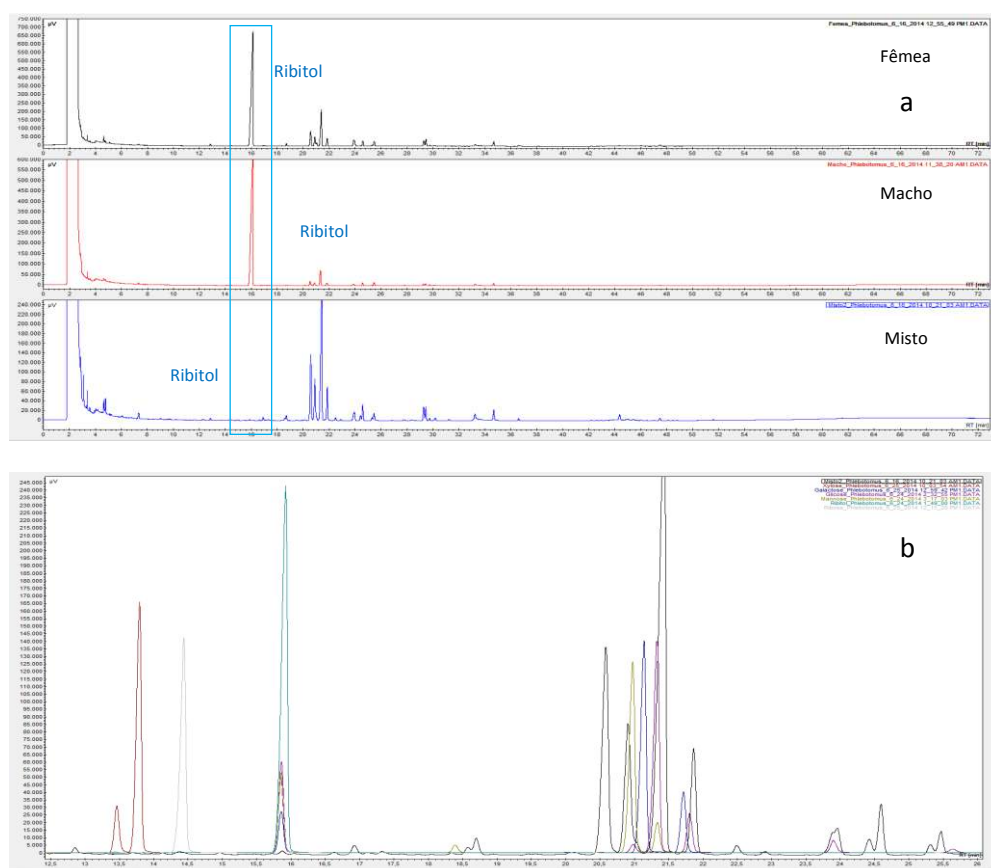


Figura 2 - (a) Cromatogramas obtidos por GC-FID de insetos de laboratório alimentados com Karo®. Extratos de fêmeas; machos; mistos, (b) sobreposição do extrato misto (de cor preta) com padrões de açúcares.

Esse ensaio prévio por GC-FID serviu como base para o uso da cromatografia gasosa com derivatização para a detecção dos açúcares presentes nos insetos. Portanto, os estudos foram continuados para identificação dos açúcares, fazendo-se pequenos ajustes à metodologia de Hamilton & ElNaiem (2000) utilizando-se a cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS).

### 3.2. Procedimento analítico para identificação dos açúcares

Em alguns casos, a análise por GC-MS dos derivados derivatizados revelou a presença de mais de um pico relativo ao padrão representando as diferentes formas isoméricas e enantioméricas dos açúcares (Tabela 1).

Tabela I - Padrões de açúcares analisados com os respectivos tempos de retenção obtidos nas condições cromatográficas empregadas.

| <b>Padrões<br/>analíticos</b> | <b>Tempo de retenção (min)</b> |
|-------------------------------|--------------------------------|
| <b>D-arabinose</b>            | 8,26                           |
| <b>D-ribose</b>               | 8,80 e 9,06                    |
| <b>D-xilose</b>               | 9,79                           |
| <b>ribitol</b>                | 10,14                          |
| <b>D-manose</b>               | 11,90                          |
| <b>D-frutose</b>              | 11,84; 12,03 e 12,17           |
| <b>D(+)-galactose</b>         | 13,17 e 13,33                  |
| <b>D(+)-glucose</b>           | 14,03                          |
| <b>sucrose</b>                | 27,87                          |
| <b>lactose</b>                | 27,89                          |
| <b>maltose</b>                | 28,31                          |
| <b>trealose</b>               | 28,43                          |
| <b>isomaltose</b>             | 29,12 e 29,32                  |

As amostras de insetos de campo nas duas épocas de coleta apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, apontando para a mesma fonte de nutriente (açúcares) tanto para machos como fêmeas. Através da comparação dos

tempos de retenção da amostra com padrões de açúcares, foram identificadas a presença de frutose, glucose e isomaltose nas três amostras analisadas (Figura 3).

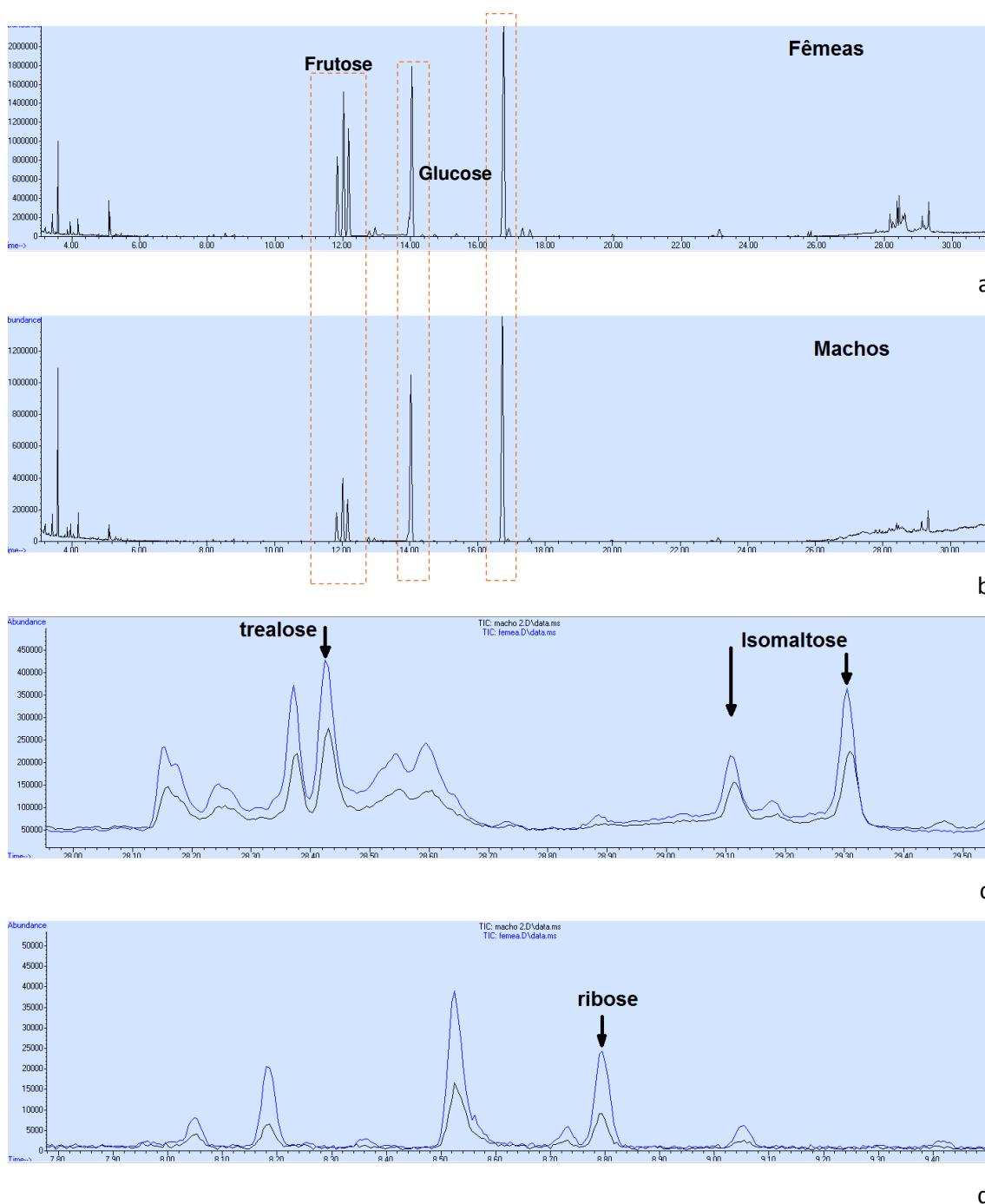


Figura 3 - Cromatogramas obtidos por GC-MS dos insetos de campo pertencentes ao grupo de fêmeas e grupo de machos. Em (a) e (b) cromatogramas apresentando os picos majoritários de açúcares referentes à frutose e glucose para fêmeas e machos, respectivamente. Em (c) janela expandida da sobreposição dos cromatogramas de machos (preto) e fêmeas (azul) mostrando picos minoritários referentes a presença de isomaltose e trealose. Em (d) janela expandida da sobreposição dos cromatogramas de machos (preto) e fêmeas (azul) mostrando picos minoritários referentes a presença de ribose.



A presença de frutose, glucose, isomaltose, trealose e ribose foram confirmadas através dos espectros de massas e pelo tempo de retenção com os padrões respectivos. Um pico presente em 28,17 min sugere ser referente à turanose, porém, para confirmação de sua identidade é necessária a aquisição do padrão analítico.

Adicionalmente, foi possível detectar além da presença de açúcares, alguns aminoácidos e ácidos graxos que foram derivatizados pelo MSTFA.

O pico majoritário de 16,74 min não pode ser identificado inequivocamente, porém a biblioteca Nist do equipamento sugere tratar-se de glucopirranose (glucose de cadeia aberta), talose ou gulose. Constata-se no cromatograma da Figura 4 (d) que esse pico veio do alimento comercial Favinho oferecido aos insetos, assim como a frutose e glucose. Dessa forma, é bem provável, tratar-se de outro isômero da glucose.

Para os insetos de laboratório alimentados com alimento glicosado Favinho® os mesmos açúcares identificados nos insetos de campo foram encontrados (Figura 4a). Porém para os insetos sem esse tipo de alimentação nota-se a presença, embora em menor quantidade dos picos majoritários (Figura 4b), mas ausência dos dissacarídeos que eluem no final do cromatograma (Figura 4c).

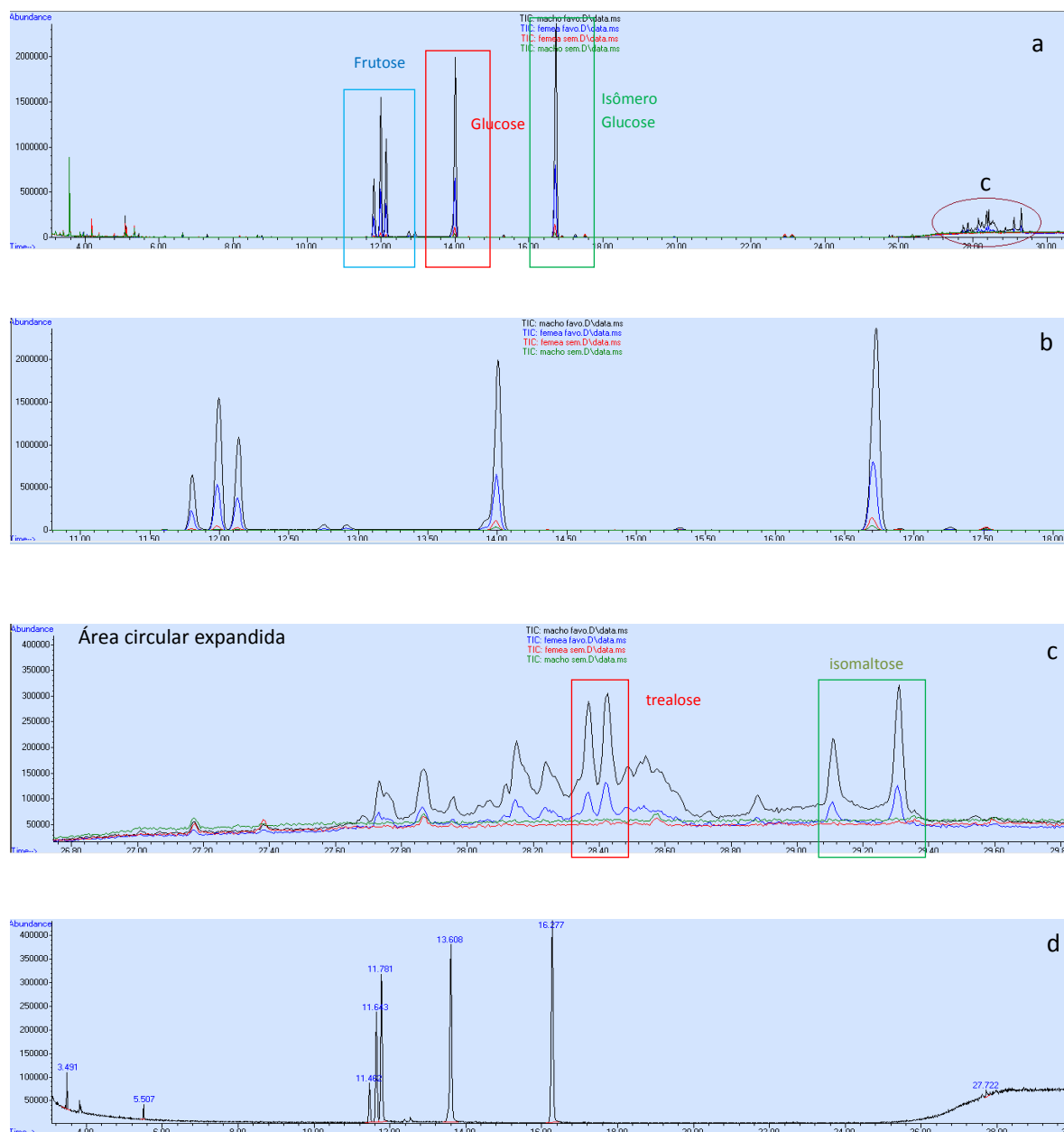


Figura 4 - Cromatogramas obtidos por GC-MS das amostras analisadas de insetos machos e fêmeas de laboratório com e sem alimentação e com alimentação em Favinho<sup>®</sup> (a) ; onde são apontadas, em janela expandida as semelhanças e diferenças em termos dos açúcares encontrados (b, c), cromatograma dos açúcares oferecidos aos insetos (d).

### 3.3. Avaliação da longevidade de grupos de adultos de *Ny. neivai* observando-se a sua curva de sobrevivência

Os açúcares identificados em insetos de campo: frutose, glucose, isomaltose foram oferecidos a grupos de adultos. Além desses, a sacarose também foi oferecida por ser um açúcar comumente oferecido em colônias de flebotomíneos e ter sido encontrada em outras espécies de flebotomíneos.

Como resultado obtivemos medianas de mortalidade entre 11 a 15 dias para fêmeas e 10 a 15 dias para machos sendo que os alimentos glicosados e a sacarose apresentaram os melhores resultados para os dois sexos. Isomaltose apresentou os piores resultados para a longevidade de machos e fêmeas (Figura 5; Tabela II).

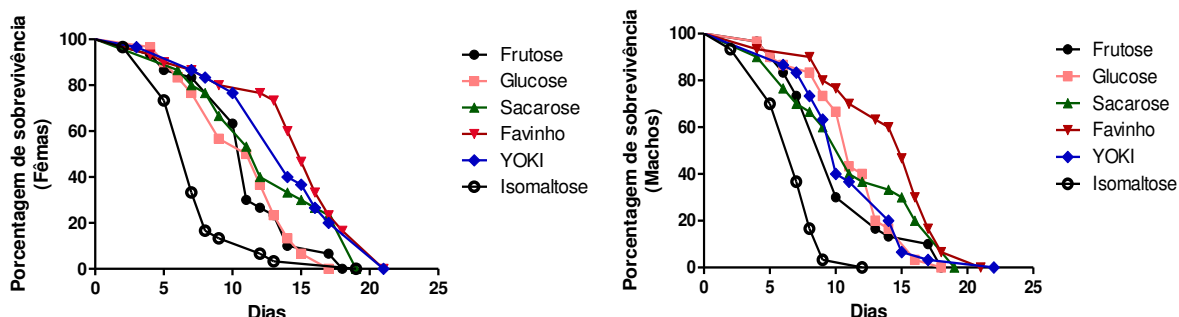


Figura 5 - Curvas de sobrevivência de fêmeas e machos de *Ny. neivai* alimentados com diferentes fontes de carboidratos. (a) Fêmeas; (b) Machos.

Tabela II – Alimentos oferecidos aos machos e fêmeas de *Ny. neivai* para avaliar sua curva de mortalidade. Os alimentos glicosados (Yoki® e Favinho®) e açúcar comum (sacarose) não apresentaram diferença estatística e resultaram em melhores alimentos para os dois sexos em condições laboratoriais (n=3).

| Alimento                   | Fêmeas     | Machos     |
|----------------------------|------------|------------|
| Yoki® x Favinho®           | não        | sim        |
| Yoki® x frutose            | não        | sim        |
| Yoki® x glucose            | não        | sim        |
| <b>Yoki® x sacarose</b>    | <b>não</b> | <b>não</b> |
| sacarose x frutose         | não        | não        |
| Frutose x glucose          | não        | não        |
| Favinho® x frutose         | sim        | sim        |
| Favinho® x glucose         | sim        | sim        |
| <b>Favinho® x sacarose</b> | <b>não</b> | <b>não</b> |

Não: Não apresentaram diferença estatística ( $p > 0.05$ ),  
 Sim: Apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Machos e fêmeas de flebotomíneos se alimentam de açúcares que são necessários para o seu metabolismo e sobrevivência (KILLICK-KENDRICK, 1979). Tal fator é importante para a compreensão da ecologia e biologia desses insetos e também da epidemiologia das leishmanioses (WARBURG & SCHLEIN, 1986; KILLICK-KENDRICK, 1978; MOLYNEUX et al., 1991; MORTON et al., 1991).

A fonte de carboidratos gera controvérsias entre alguns pesquisadores que afirmam que podem ser provenientes de plantas (SCHLEIN & WARBURG, 1986) ou líquido açucarado secretado por afídeos e coccídeos (KILLICK-KENDRICK & KILLICK-KENDRICK, 1987; CAMERON et al, 1995; BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Dentre os carboidratos encontrados ao analisarmos *Ny. neivai* proveniente do campo, dois deles (glucose e frutose) já foram encontrados em outras espécies de flebotomíneos, como *Lu. ovalesi*, *Ny. ylephiletrix*, *Pa. shannoni* (LEWIS & DOMONEY, 1966) e *Ny. intermedia*. Para esta última espécie, além da glucose e frutose, a trealose também foi encontrada (SOUZA et al, 1992).

A sacarose foi encontrada em *Lu. longipalpis* (MAGNARELLI & MODI, 1988; MORTON et al, 1991) e também nas demais espécies citadas acima. O fato de não termos encontrado sacarose em *Ny. neivai* deve-se a hidrólise desse dissacarídeo, uma vez que o alimento glicosado Favinho<sup>®</sup> apresenta esse açúcar em sua composição. A hidrólise da sacarose resulta nos monossacarídeos frutose e glucose. A trealose e a ribose encontradas nas análises dos adultos de *Ny. neivai* são referentes aos constituintes corporais do inseto. A trealose está presente em quantidades elevadas na hemolinfa e armazenada no corpo gorduroso dos insetos. Este açúcar é formado através da ligação de duas moléculas de glucose através de seus carbonos redutores (MARQUARDT, 2003).

Outro açúcar encontrado, a isomaltose, é um carboidrato encontrado naturalmente no mel (MELLADO-MOJICA & LÓPEZ, 2015) e obtido artificialmente através da caramelização da glucose (HIROSHI & HIROSHI, 1966), além de ser encontrado em alimentos glicosados à base de milho (ASHURST & DENNIS, 1996). Esse carboidrato foi um dos açúcares utilizados por Vale et al (2012) para avaliar a digestão de carboidratos pelas larvas de *Lu. longipalpis*. Tal estudo não conseguiu medir a atividade da isomaltose no intestino médio das larvas, uma vez que não ocorre a quebra da isomaltose.

Para Killick-Kendrick (1979), a excreta açucarada dos afídeos é a mais provável das fontes de carboidratos dos flebotomíneos na natureza, estando a frente do néctar, das frutas e da seiva das plantas. O açúcar melezitose e seu produto da hidrólise turanose são carboidratos específicos encontrados no líquido excretado pelos afídeos, tornando-se indicativo ou marcador da alimentação dos flebotomíneos (CAMERON et al, 1995). Além desses dois carboidratos, frutose, glucose e sucrose também são encontradas na excreta desses insetos (MOORE et al., 1987; SOUZA et al., 1992).

Além do líquido açucarado excretado pelos afídeos, diversas árvores frutíferas como mangueiras, laranjeiras, bananeiras, amoreiras, abacateiros, limoeiros, além de uma vasta plantação de cana-de-açúcar presentes no local de coleta podem ter servido como fonte alimentar dos flebotomíneos.

Em experimento realizado em campo por Junilla et al (2011), *Phlebotomus papatasi* alimentou-se de várias frutas que são comuns às encontradas no local de coleta de *Ny. neivai*, tais como a banana, laranja, abacate, manga, além de cana-de-açúcar.

As análises de *Ny. neivai* de geração de laboratório, em jejum, apresentaram apenas frutose, glucose e ribose, em intensidades bem mais baixas que os insetos alimentados com alimento glicosado. Os insetos alimentados com alimentos glicosados mostraram os mesmos açúcares encontrados em insetos de campo, porém em menor intensidade.

A presença de açúcares em adultos que ainda não receberam solução artificial após a emergência pode ser explicado pela alimentação das larvas, que são detritívoras e se alimentam de micro-organismos como fungos que se desenvolvem na dieta artificial que lhes é oferecida em laboratório. Quando fungos e bactérias sofrem situações de estresse (alta ou baixa temperatura e umidade) produzem trealose, formando uma quitina que protege suas células (ELBEIN et al., 2003). A trealose é ingerida pelas larvas e rapidamente transformada em glucose, assim como demonstrado em larvas de *Lu. longipalpis* por Cameron et al em 1995. Outro açúcar ingerido através de fungos é o glicogênio, que pode estar armazenado no corpo da larva na forma de gordura. Quando necessário, o glicogênio é rapidamente transformado em glucose pela intermediação de hormônios (ALVES et al., 2011).

A frutose e glicose podem ter sido proveniente da dieta das larvas que é composta por dieta de coelho (beterraba, extrato de ervas, extrato de yucca e cenoura desidratada), fezes de coelho, dieta de peixe (farelo de soja, farinha de peixe, creme de milho, farinha de lula, espirulina desidratada, leveduras, adsorvente de micotoxinas, óleo de soja refinado, proteína isolada de soja, premix vitamínico mineral, óleo de peixe, cloreto de sódio, fécula de mandioca, corante natural urucum, farinha de minhoca, premix mineral, aditivo prebiótico, antioxidantes, aditivo enzimático, astaxantina) e terra.

A partir dos açúcares encontrados em insetos de campo foi realizado estudo da longevidade de fêmeas e machos de *Ny. neivai* em condições laboratoriais e constatou-se que a fonte de carboidrato mais indicada para a manutenção de colônia dessa espécie em laboratório é o alimento glicosado Favinho<sup>®</sup>. Porém, não havendo a disponibilidade deste produto comercial, a sacarose mostrou-se o carboidrato mais indicado.

Para as fêmeas que foram alimentadas com glucose ou Favinho<sup>®</sup>, 90% estavam vivas no 5º dia e a sobrevivência perdurou por 18 dias (17%). Já para machos, 86% estavam vivos quando alimentados com glucose ou Yoki<sup>®</sup> e a sobrevivência perdurou por 17 dias (7%) quando alimentados somente com o Favinho<sup>®</sup>. Para a sacarose, 100% das fêmeas e 77% dos machos estavam vivos no 5º dia, chegando a mortalidade total das fêmeas no 16º dia e no 18º dia para os machos.

Tal alimento comercial possui frutose, glucose de milho e sacarose em sua composição. O produto da hidrólise do amido de milho é a isomaltose, que está presente na glucose de milho. Somente a sacarose não foi encontrada nos insetos de campo.

Rangel et al (1985) avaliaram a longevidade de fêmeas de *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis* somente alimentadas com solução açucarada (sacarose). Foi constatado que até o 5º dia após a emergência, 100% dos insetos estavam vivos, porém, após o 8º dia a porcentagem havia caído para 65% e 85% para *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis* respectivamente, demonstrando que *Lu. longipalpis* é a espécie mais resistente.

Barretto (1942) realizou estudos de longevidade com *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* alimentadas apenas com solução açucarada (sacarose) e seus resultados

mostraram que até o 8º dia 70% dos insetos haviam sobrevivido, chegando ao 14º dia com 5% de sobrevivência. Há outros pesquisadores que avaliaram a longevidade de flebotomíneos quando alimentados em diferentes fontes de carboidratos, porém, o foco é a longevidade das fêmeas após a oviposição (CHANIOTIS, 1974; KILLICK-KENDRICK et al, 1977; RANGEL et al, 1985).

Em trabalho realizado em 1995, Souza e colaboradores estudaram aspectos da alimentação de carboidratos na longevidade e na otimização da manutenção de *Lu. longipalpis* em condições de laboratório. Seus resultados mostraram que uma mistura de açúcares (frutose, glucose, sacarose, trealose, sucrose e melezitose) em conjunto com meio de Schneider, meio de cultura rico em aminoácidos, foi uma grande fonte de energia e permitiu maior longevidade das fêmeas após a alimentação sanguínea, permitindo também uma segunda alimentação com geração de ovos. Foi observado que fêmeas alimentadas com o “pool” de açúcares + meio de Schneider, trealose com adição do mesmo meio e a sucrose comercial levaram a um maior número de fêmeas a realizar repasto sanguíneo posteriormente.

Além de maior chance de realização de repasto, os autores também relataram a maior produção de ovos quando fêmeas se alimentaram previamente do “pool” de açúcares + meio de Schneider, fato importante para a produtividade de insetos em laboratório. Os autores acreditam que na natureza as fêmeas que se alimentam de certos tipos especiais de açúcares possuem uma chance maior de realizar repastos.

## 5. CONCLUSÕES

✚ A glucose e frutose, açúcares majoritários, foram encontrados em insetos provenientes do campo e em insetos provenientes de geração de laboratório (em jejum ou alimentados previamente), porém em proporções menores nos insetos de laboratório;

✚ Os açúcares encontrados nos insetos provenientes do campo podem ter sido adquiridos por meio de alimentação de frutas presentes na área de coleta ou do líquido açucarado de afídeos;

✚ Os açúcares encontrados nos insetos provenientes de geração de laboratório, em jejum ou alimentados previamente, foram adquiridos provavelmente da reserva das larvas obtidas através da alimentação com dieta artificial;

✚ O alimento glicosado comercial da marca Favinho®, e dentre os açúcares, a sacarose são os mais indicados como fonte de carboidratos para *Ny. neivai* criados em condições laboratoriais.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES VR, FREITAS RA, SANTOS FL, BARRETT TV (2011) Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 106(3): 353-359.

ASHURST PR, DENNIS MJ (1996) Food Authentication. **Blackie Academic & Professional, An imprint of Chapman & Hall**. 1<sup>st</sup> ed. London, UK. 284-284.

BARRETTO MP (1942) Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera Psychodidae). Tese de Doutorado, Fac. Med. USP, São Paulo, Brasil.

BLAU K, HALKET JM (1993) Handbook of derivatives for chromatography. 2<sup>nd</sup> edition. Chichester: **John Wiley & Sons**.

BRAZIL RP, BRAZIL BG (2003) Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL EF, LAINSON R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fio Cruz. 4: 257-274.

CAMERON MM, MILLIGAN PJM, LLANOS-CUENTAS A, DAVIS R (1995) An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes. **Medical and Veterinary Entomology**. 9, 127- 132.

CHANIOTIS B (1974) Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **Journal of Medical Entomology**. 11: 73-79.

ELBEIN AD, PAN YT, PASTUSZAK I, CARROLL D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology** 13: 17–27.

GULLBERG M, GÚSTAFSDÓTTIR SM, SCHALLMEINER E, JARVIUS J, BJARNEGÅRD M, BETSHOLTZ C, LANDEGREN U, FREDRIKSSON S (2004) Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America** 101(22): 8420-8424.

HAMILTON JG, EL NAIEM DA (2000) Sugars in the gut of the sandfly *Phlebotomus orientalis* from Dinder National Park, Eastern Sudan. **Medical and Veterinary Entomology**. 14(1):64-70.

HIROSHI S, HIROSHI E (1966). "The Thermal Degradation of Sugars I. Thermal Polymerization of Glucose". **Journal of Food Science**. 31 (4): 561.

JUNILLA A, GÜNTER C, SCHLEIN Y (2011) Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field. **Journal of Vector Ecology**. 36(1): 206-211.

KILLICK-KENDRICK M, KILLICK-KENDRICK R (1987) The laboratory colonization of *Ph. ariasi*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. 62: 354-356.

KILLICK-KENDRICK R (1978) Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. **Acta Tropica**, 35: 315-320.

KILLICK-KENDRICK R (1979) Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: Lumsden WHR and Evans DA. (Eds), **Biology of the Kineplastida**, vol.2, pp. 396-460. Academic Press, London.

KILLICK-KENDRICK R, LEANEY AJ, READY, PD (1977) The Establishment, Maintenance and Productivity of a Laboratory Colony of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 13(4-5):429-240.

LEWIS DJ, DOMONEY CR (1966) Sugar meals in Phlebotominae and Simuliidae (Diptera). **Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology**. 41(10-12):175–179.

MAGNARELLI LA, MODI GB (1988) Caloric determination of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medicine and Entomology**. 20:568-569.

MARQUARDT WC (2003) Biology of Disease Vectors. **Elsevier Academic Press**, 2nd ed., Burlington, Massachusetts. 785p.

MELLADO-MOJICA E, LÓPEZ MG (2015) Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. **Food Chemistry**. 167: 349–357.

MOLYNEUX DH, MOORE J, MAROLI M (1991) Sugars in sandflies. **Parassitologia**. 33(1): 431-436.

MOORE JS, KELLY TB, KILLICK-KENDRICK R, KILLICK-KENDRICK M, WALLBANKS R, MOLYNEUX DH (1987) Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). **Medical and Veterinary Entomology**. 1: 427-434.

MORTON IE, BRAZIL RP, WARD RD, VASCONCELOS AW (1991) The presence of fructose in wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 86 (1): 125-126.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA AF (1985) Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 80(2).

SCHLEIN Y, WARBURG A (1986) Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **Journal of Medical Entomology**. 23: 11-15.

SOUZA N, COUTADA LCM, ANDRADE CA, VILELA ML, RANGEL EF, DEANE MP (1992) Carbohydrates in wild caught *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) as detected by high performance liquid chromatography. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. (87): 208.

SOUZA NA, ANDRADE-COELHO CA, BARBOSA AF, VILELA ML, RANGEL EF, DEANE MP (1995) The influence of sugars and amino acids on the blood-feeding behaviour, oviposition and longevity of laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 90(6):751-7.

VALE VF, MOREIRA BH, MORAES CS, PEREIRA MH, GENTA FA, GONTIJO NF (2012) Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera – Psychodidae). **Journal of Insect Physiology.** 58(10): 1314–1324.

WARBURG A, SCHLEIN Y. (1986) The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 35(5):926-30.

## CAPÍTULO 3

### Comportamento de oviposição de *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae).

#### RESUMO

Para investigar a atração das fêmeas grávidas de *Ny. neivai* a locais com a presença de ovos, buscou-se observar se a atração ocorre devido à presença de feromônio de oviposição ou a outra fonte de estímulo (visual, tátil ou olfatória). Foram abordados experimentos relacionados ao comportamento de oviposição de *Ny. neivai* em matéria orgânica de diferentes composições; possíveis evidências biológicas da existência de feromônios de oviposição e abordados também, os esforços na identificação de possíveis feromônios de oviposição para esta espécie de flebotômíneo. Como resultado obtivemos maiores respostas das fêmeas grávidas de *Ny. neivai* nas diferentes fontes de estímulo com diferentes fontes de matéria orgânica ("Frass", fezes de coelho e dieta tradicional) e em ovos conspecíficos. Nenhuma diferença quanto ao número de ovos produzidos foi observada quando a fonte de estímulo para oviposição foi adicionada ao recipiente todo de criação. Com relação a feromônios de oviposição, vários experimentos foram delineados para investigar se uma maior oviposição, onde havia ovos previamente colocados, devia-se a voláteis presentes nos ovos ou a outro estímulo (visual ou tátil). Foram avaliados extratos de ovos lavados em solventes como hexano e metanol/clorofórmio; camuflagem dos ovos sob algodão, ovos colocados sobre papel escuro ou ovos colocados no interior de ranhuras no gesso e ovos sob papel filme. Em todos esses experimentos biológicos não houve indicação da presença de voláteis na superfície dos ovos. Ainda na tentativa de isolamento químico de compostos nos ovos de *Ny. neivai* testes foram realizados com Microextração em fase sólida (SPME) e GC-MS. Esses testes apresentaram contaminantes nos cromatogramas, impedindo sua real análise e encobrindo possíveis picos de interesse. A partir desses resultados levanta-se a hipótese de que *Ny. neivai* não possua feromônios de oviposição, apresentando resposta visual. Porém, pode haver um sinergismo entre o visual e os feromônios ainda não detectados pela metodologia adotada.

## 1. OBJETIVOS

- ✚ Avaliar o comportamento de oviposição de *Ny. neivai* frente à diferentes fontes de estímulos, sendo táteis, visuais e olfatórios;
- ✚ Investigar a presença de feromônio de oviposição para esta espécie;
- ✚ Utilizar diferentes solventes na extração dos possíveis feromônios dos ovos,
- ✚ Utilizar fibras de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa na identificação dos possíveis feromônios de oviposição

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Comportamento de oviposição de *Ny. neivai* frente à diferentes fontes de estímulo

#### 2.1.1. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional

Neste experimento três fontes de estímulo foram utilizadas: “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional. Embora não exista uma tradução literal para o termo inglês “frass”, esse material é basicamente composto pelas fezes das larvas, resto de exúvias, resto de dieta, fungos e larvas mortas. Essa matéria orgânica acumula-se de uma ou mais gerações dentro de um recipiente de criação.

Com o “frass” e as fezes de coelho foi feita uma pasta com água deionizada e inserida em uma área de 3,14 cm<sup>2</sup> em um dos quadrantes de um recipiente de criação de 250 mL (Figura 1a e b). Cinco fêmeas ingurgitadas e cinco machos foram adicionados ao recipiente.

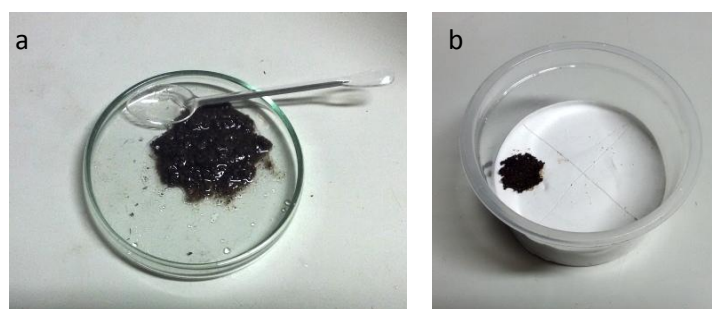


Figura 1 - (a) Pasta de “frass” feita com água deionizada; (b) pasta adicionada em uma área de 3,14 cm<sup>2</sup> em recipiente de criação de 250 mL.

A dieta tradicional para larvas utilizada rotineiramente em nossa colônia contendo fezes de coelho, dieta de coelho, dieta de peixe e terra vegetal foi inserida em um béquer com água deionizada. Após 24h, 1 mL da mistura foi adicionada e foi seguida a mesma metodologia descrita acima (Figura 2a e b).

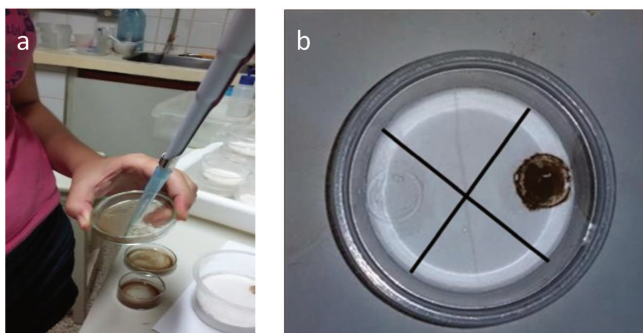


Figura 2 - (a) Preparo da dieta artificial para o teste; (b) recipiente de criação de 250 mL com 1 mL da dieta fermentada por 24h.

Foram feitas quatro repetições e os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

#### **2.1.2. Comparação da atratividade de “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional em um mesmo recipiente de criação**

“Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional foram colocados em água deionizada, separadamente, e deixados para fermentação por 24h. Em seguida, foi colocado 1 mL de cada fonte de estímulo, em apenas uma das três áreas de 3,14 cm<sup>2</sup> demarcadas de um recipiente de criação de 250 mL (Figura 3). Cinco casais, com fêmeas ingurgitadas, foram inseridos nos recipientes.



Figura 3 - Recipiente de criação com três fontes de estímulos.



Foram feitas quatro repetições e os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### **2.1.3. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional apresentados isoladamente e distribuídos pelo recipiente de criação**

Com a intenção de verificar se a produção de ovos aumentaria com as diferentes fontes de estímulos distribuídos por todo o recipiente de criação, “frass”, fezes de coelho e dieta tradicional foram colocados em água deionizada, separadamente, e deixados para fermentação por 24h. Em seguida, foram adicionados 5 mL de cada fonte de estímulo, por cima do gesso, em recipientes de criação de 250 mL, de modo que o líquido se espalhasse por completo. Água deionizada foi adicionada em recipientes apenas com gesso. Cinco casais com fêmeas ingurgitadas foram adicionadas aos recipientes.

Foram feitas quatro repetições e os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

## **2.2. Comportamento de oviposição de *Ny. neivai* frente aos ovos conspecíficos e não conspecíficos**

Os experimentos a seguir foram delineados para se observar se haveria indicação biológica em fêmeas grávidas de *Ny. neivai* da presença de feromônio de oviposição. A sequência de experimentos foi sendo delineada à medida que as respostas obtidas causavam dúvidas sobre uma real percepção olfatória, visual ou tátil das fêmeas frente aos estímulos apresentados. Os dados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### 2.2.1. Ovos de *Ny. neivai*

O gesso da base dos recipientes de criação de 250 mL foi dividido em seis partes. Para evitar o mau-seio dos ovos, em uma das partes, um tubo Falcon de 50 mL foi cortado ao meio e uma das extremidades foi fixada no gesso. Pela outra extremidade, foram inseridas três fêmeas ingurgitadas e três machos de *Ny. neivai*. Essa extremidade foi vedada com “voil” e sobre esse tecido, um pedaço de algodão com açúcar foi colocado para alimentação dos adultos (Figura 4a).

Após a oviposição, os adultos e o tubo Falcon foram retirados sobrando apenas os ovos, que foram contabilizados. Em seguida, cinco novas fêmeas ingurgitadas e cinco machos foram colocados no recipiente de oviposição e posteriormente foi feita a contagem dos ovos nos respectivos compartimentos delimitados, descontando-se aqueles previamente adicionados. (Figura 4b). Cinco repetições foram realizadas.

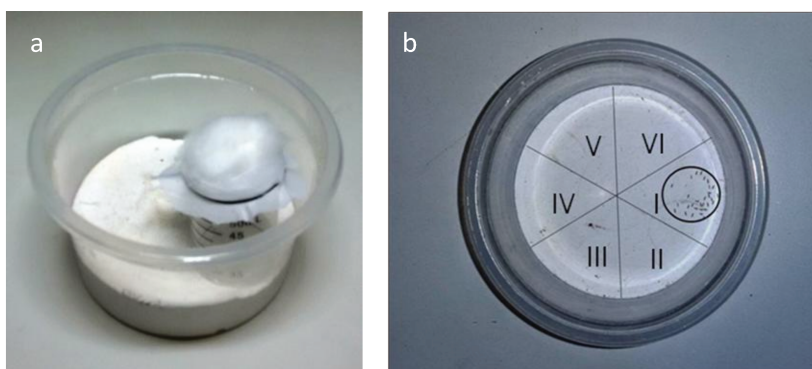


Figura 4 - (a) Tubo Falcon contendo 3 casais de *Ny. neivai*; (b) aparência do recipiente de criação após remoção do tubo falcon.

Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### 2.2.2. Ovos vivos e ovos mortos

Para verificarmos se haveria diferença de preferência de oviposição entre ovos vivos e mortos, 100 ovos vivos e 100 ovos mortos de 1 a 2 dias de idade de *Ny. neivai* foram posicionados em quadrantes opostos de um recipiente de criação de 250 mL (Figura 5b). Os 100 ovos mortos foram, anteriormente, deixados 48h à

temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 5a). Quatro casais com fêmeas ingurgitadas foram adicionados aos recipientes.

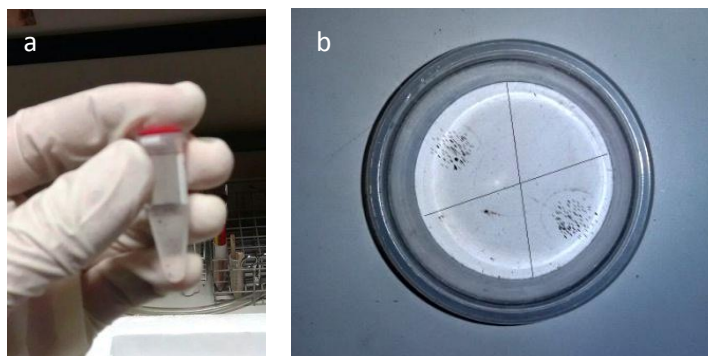


Figura 5 - (a) Ovos mortos por congelamento; (b) ovos vivos e ovos mortos posicionados em quadrantes opostos.

Foram realizadas quatro repetições e depois de decorridos cinco dias, a contagem dos ovos foi feita. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### 2.2.3. Ovos de *Aedes aegypti* e ovos de *Ny. neivai*

Como não conseguimos ovos de outras espécies de flebotomíneos para comparação com ovos de *Ny. neivai* e com o objetivo de observar o comportamento de oviposição de *Ny. neivai* frente a ovos de insetos de outra espécie (Figura 6a), foi montado um experimento em que 20 ovos de *A. aegypti* e 50 ovos de 1 a 2 dias de idade de *Ny. neivai* foram colocados em quadrantes contrários de um recipiente de criação de 250 mL (Figura 6b). Três casais de *Ny. neivai* com fêmeas ingurgitadas foram adicionadas ao recipiente e após 5 dias a avaliação da quantidade de ovos de cada quadrante foi feita. Cinco repetições foram realizadas.

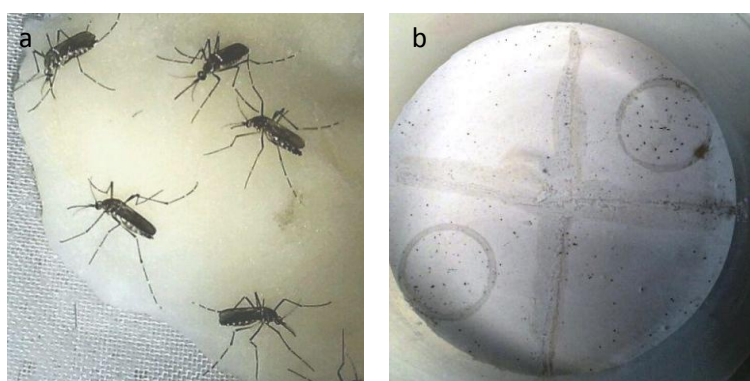


Figura 6 - (a) *Aedes aegypti*; (b) ovos de *Ny. neivai* e de *Ae. aegypti* em quadrantes contrários.

Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

#### 2.2.4. Ovos em ranhuras do gesso

Com o intuito de reproduzir para *Ny. neivai* o experimento com *Lu. longipalpis*, onde observou-se evidência biológica para a presença de feromônio de oviposição, com ovos ocultados visualmente, este experimento foi delineado. Ranhuras de 3 mm de profundidade em formato de um quadrado de 2x2 cm<sup>2</sup> foram feitas em lados opostos de um recipiente de criação de 250 mL (Figura 7a e b) com o auxílio de uma lamínula. Em um dos lados, 150 ovos de 1 a 2 dias de idade foram inseridos no fundo das ranhuras. Cinco casais de *Ny. neivai* com fêmeas ingurgitadas foram adicionadas ao recipiente e após 5 dias houve a contagem de ovos. Quatro repetições foram realizadas.

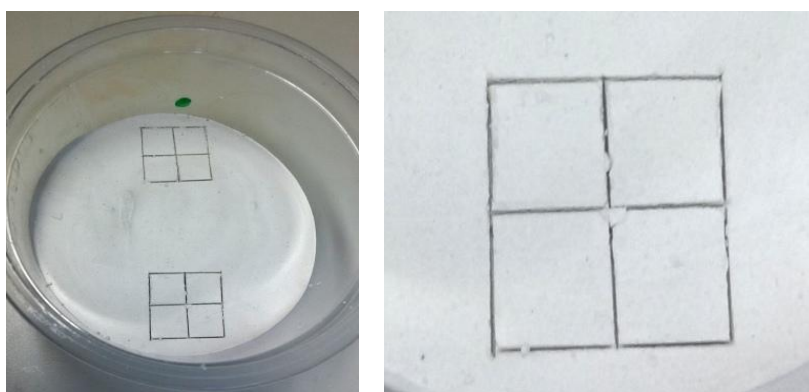


Figura 7 – (a) Ranhuras feitas em lados opostos do recipiente de criação, (b) detalhe da ranhura feita com o auxílio de uma lamínula.

Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### 2.2.5. Camuflagem dos ovos de *Ny. neivai*

Nos dois experimentos a seguir o objetivo foi camuflar os ovos de *Ny. neivai* removendo o efeito visual. Utilizou-se para isso ovos sob algodão e ovos sobre um fundo preto como descrito abaixo.

**Ovos sob algodão:** Cem ovos de *Ny. neivai* foram colocados sobre o gesso em um dos quatro quadrantes de um recipiente de criação de 250 mL. Uma camada fina de algodão foi colocada sobre os ovos. Três casais de insetos foram adicionados ao recipiente para oviposição. Foram realizadas cinco repetições.

**Ovos sobre um fundo escuro:** Um papel de seda de cor preta foi colocado por cima do gesso de um recipiente de criação de 250 mL. Quadrantes foram demarcados com lápis, assim como dois círculos de 3,14 cm<sup>2</sup> de área. Cem ovos de 1 a 2 dias de idade foram colocados por cima do papel, em apenas um dos círculos (Figura 8). Três casais de flebotomíneos com fêmeas ingurgitadas foram inseridas no recipiente e após cinco dias a avaliação do experimento foi realizada.

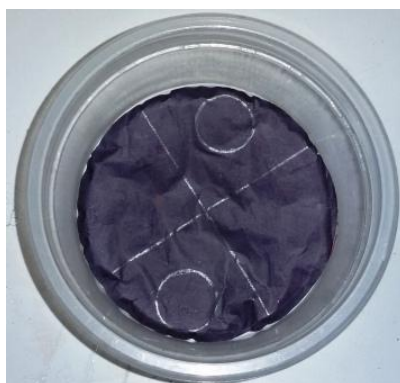


Figura 8 - Ovos de *Ny. neivai* sobre o papel de seda de cor preta inserido sobre o gesso com o objetivo de camuflar os ovos.

Foram realizadas quatro repetições. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### 2.2.6. Gesso e ovos envoltos em papel filme

Com a premissa de ocultar os possíveis voláteis emanados pelos ovos de *Ny. neivai*, foi utilizado papel filme para envolver todo o gesso de um recipiente de criação (250 mL) (Figura 9a e b). Anteriormente, o gesso foi dividido em quadrantes e em apenas um deles foi posicionado 100 ovos de 1 a 2 dias de idade (Figura 9c).

Quatro casais de geração F13 com fêmeas ingurgitadas foram inseridos no recipiente. Após cinco dias a contagem de ovos entre os quadrantes foi concluída.

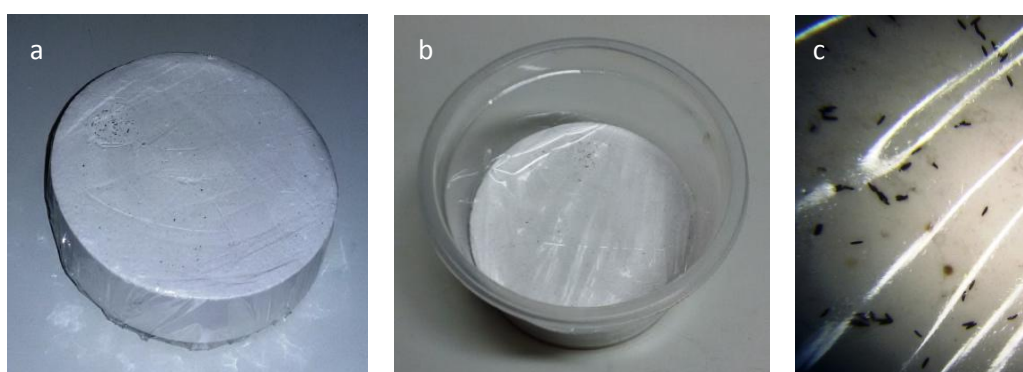


Figura 9 - (a) Gesso envolvido em papel filme, (b) gesso inserido no recipiente de criação de 250 mL; (c) ovos de *Ny. neivai* por baixo do papel filme.

Foram feitas cinco repetições. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### 2.2.7. Gesso e ovos parcialmente envoltos em papel filme

Com o objetivo de ocultar parcialmente os ovos e os possíveis voláteis emanados pelos ovos de *Ny. neivai*, o gesso de um recipiente de criação de 250 mL foi partido ao meio. Nas duas metades, 100 ovos de 1 a 2 dias foram posicionados em uma área de 3,14 cm<sup>2</sup>. Uma das metades do gesso foi envolta em papel filme, cobrindo os ovos e dividido em quatro quadrantes, marcados com uma caneta (Figura 10). Após esse procedimento, quatro casais de geração F13 com fêmeas



ingurgitadas foram inseridos no recipiente. Passados cinco dias a avaliação foi realizada.

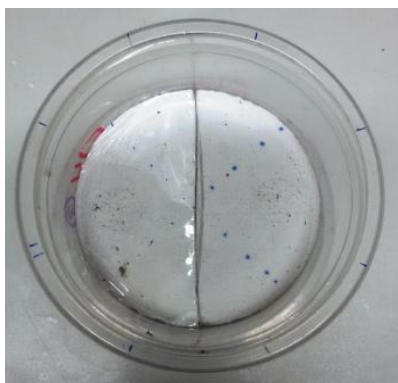


Figura 10 - Parte do gesso foi envolta em papel filme para cobrir os ovos de *Ny. neivai*.

Foram realizadas quatro repetições. Os dados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

#### **2.2.8. Ovos cobertos por lamínula**

Com o intuito de manter o estímulo visual, porém remover o estímulo tátil e impedir que possíveis feromônios de oviposição se dissipassem pelo recipiente de criação (250 mL), duas cavidades rasas, em posições opostas, foram feitas no gesso. Em apenas uma das cavidades 150 ovos de *Ny. neivai* (1 a 2 dias de idade) foram adicionados. Lamínulas foram encaixadas no gesso, tampando as cavidades (Figura 11). Cinco fêmeas ingurgitadas e número igual de machos foram adicionados ao recipiente.

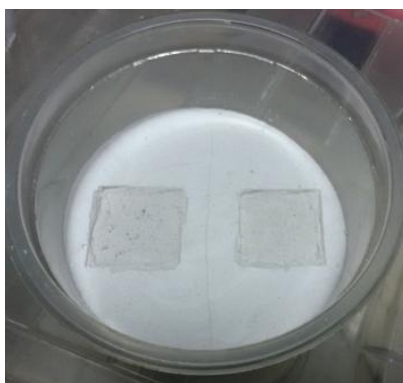


Figura 11 – Lamínulas cobrindo cavidades com e sem ovos de *Ny. neivai*.

Após cinco dias a contagem de ovos foi realizada. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Teste t de Student (não paramétricos).

#### 2.2.9. Ovos totalmente no escuro

Este experimento foi realizado com o objetivo de retirar totalmente a luz dentro do ambiente dos insetos. Para isso, 150 ovos de *Ny. neivai* (1 a 2 dias de idade) foram adicionado em apenas um dos quadrante de um recipiente de criação (250 mL). Quatro casais, com fêmeas ingurgitadas, foram inseridos dentro do recipiente. Posteriormente, os recipientes foram inseridos em organizadores encapados com duas camadas de papel pardo e colocados em armário fechado (Figura 12). Após cinco dias a avaliação do experimento foi realizada.



Figura 12 – Organizadores foram encapados e inseridos dentro de armários fechados para impedir a entrada de luz.

Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.



## **2.3. Comportamento de oviposição de *Ny. neivai* com extrato de ovos**

### **2.3.1. Ovos de *Ny. neivai* em hexano**

Mil ovos de *Ny. neivai* (5 dias de idade) foram coletados com o auxílio de um pincel de ponta fina e inseridos em um frasco (2 mL) juntamente com 1 mL de hexano grau pesticida. O frasco, em seguida, permaneceu por 48 horas à temperatura de -20°C. O gesso do fundo de recipientes de criação (250 mL) foi dividido em quadrantes e em apenas um dos quadrantes uma fonte de estímulo foi adicionada: 100 ovos (os mesmos que foram mergulhados no hexano), 100 µL do extrato de ovos (hexano em que os ovos foram lavados) e 100 µL do hexano puro.

Três fêmeas ingurgitadas e o mesmo número de machos foram adicionados nos recipientes para oviposição. Foram realizadas quatro repetições. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

### **2.3.2. Ovos de *Ny. neivai* em metanol / clorofórmio**

Com o objetivo ainda de extração de possíveis feromônios de oviposição, quatrocentos e cinquenta ovos de *Ny. neivai* (1 a 2 dias de idade) foram inseridos, com auxílio de um pincel de ponta fina, em um frasco de 2 mL. Uma mistura de clorofórmio, metanol e água, na proporção de 1:2:0.8, utilizada em método rápido de extração de lipídios (BLIGH & DYER, 1959) foi adicionada ao frasco e essa mistura foi mantida por 48 horas à temperatura de -20°C.

O gesso de um recipiente de criação de 250 mL foi dividido em quadrantes e nos quadrantes opostos foram gotejados 100 µL do extrato de ovos e metanol/clorofórmio no quadrante oposto.

Em novos recipientes de criação (250 mL) o gesso também foi dividido em quadrantes e em um deles 100 ovos, dos que foram utilizados para a remoção de possíveis voláteis, foram posicionados.

Três casais de geração F14 com fêmeas ingurgitadas foram inseridas no recipiente de criação. Foram realizadas quatro repetições. Os resultados foram

analisados estatisticamente por Análise de variância (One-way ANOVA) e o teste de Tukey (múltipla comparação) a 5% de significância, para averiguar diferenças significativas entre os tratamentos.

## **2.4. Cromatografia gasosa para identificação de possíveis feromônios de oviposição em ovos de *Ny. neivai***

### **2.4.1. Micro extração em fase sólida (Solid Phase Microextraction - SPME)**

Para a primeira tentativa de extração de feromônios foram utilizadas as fibras para extração em fase sólida (24Ga Gray) e tubos de polietileno com fundo recoberto de gesso de secagem rápida e tampa recoberta em tecido “voil”. Essas fibras são revestidas por polímeros que adsorvem compostos voláteis (Figura 13a). Para se evitar a perda de possíveis voláteis da superfície dos ovos, foi delineado um experimento onde após a oviposição pelas fêmeas, o frasco ficasse o mais vedado possível. Para isso, foram três os tratamentos: casais, casais com ovos e branco.

No tratamento com casais, três casais foram transferidos para tubos plásticos e um algodão com solução açucarada a 30% foi posicionado sobre o “voil”. A tampa, juntamente com o “voil” e o algodão, foi selada com Parafilm M<sup>®</sup> para evitar a dispersão dos possíveis voláteis. No tratamento com casais e ovos, três casais, com fêmeas que passaram por alimentação sanguínea, foram adicionadas aos tubos e o mesmo procedimento do tratamento anterior foi seguido. No tubo branco não foram utilizados insetos, mas o mesmo procedimento dos tratamentos anteriores foi seguido.

Após quatro dias, três fibras foram adicionadas aos tubos (Figura 13b). Cada fibra permaneceu um tempo diferente de extração dos possíveis voláteis: 15, 30 e 45 minutos. Após esse período, as fibras foram removidas e levadas para análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massas em aparelho do fabricante Shimadzu GC-MS QP2010 Plus (Figura 13c).

As condições da corrida (análise) da fibra no CG-MS foram: Temperatura de injeção de 200°C, temperatura do forno de 50°C, coluna de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura. Após manutenção da

temperatura inicial de 50°C por três minutos, houve um aumento numa taxa de 3°C/min até alcançar 210°C, que foi mantida por 3 minutos.



Figura 13 - (a) Fibra para adsorção de possíveis voláteis; (b) tubos com as fibras inseridas; (c) GC-MS; aparelho utilizado para a análise das fibras.

#### **2.4.2. Aumento do número de ovos e tempo de exposição das fibras**

Na tentativa de aumentar a extração de voláteis em relação ao teste anterior, seis casais foram então utilizados e o tempo de exposição das fibras aumentado para seis horas. Outros ajustes foram realizados, como a utilização de tubos Falcon de 50 mL cortados ao meio e posicionados em recipientes de criação de 250 mL com o objetivo de que o fundo do tubo fosse preenchido com gesso de secagem rápida e que as mesmas condições fossem aplicadas em três repetições. Foram quatro os tratamentos: branco, casais com ovos, casais com fêmeas alimentadas e casais com fêmeas não alimentadas. Uma fibra foi posicionada em cada repetição (Figura 14). Após o período de 6 horas, as fibras foram removidas e levadas para análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.



Figura 14 - Fibras para extração de voláteis acopladas os recipientes com os tratamentos.

### **2.4.3. Extração com hexano**

Na tentativa de eliminar a contaminação ambiental pelas fibras ocorrida nos experimentos anteriores, houve a tentativa de extração dos compostos com solvente. Seiscentos ovos (1 a 2 dias de idade) foram colocados em frasco de 2 mL e 100 µL de hexano (graus HPLC) foram inseridos a fim de solubilizar possíveis voláteis da casca dos ovos dos flebotomíneos. Posteriormente, o frasco contendo os ovos permaneceu a temperatura de -20°C por 48 h. Mais 1 mL de hexano foi adicionado aos ovos e filtrados com o auxílio de um filtro de 0,22 µm.

O conteúdo filtrado também foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

### **2.4.4. Transferência dos ovos dos recipientes de criação, aumento no número de ovos e fibras**

Mil e duzentos ovos de *Ny. neivai* (1 a 2 dias de idade) foram transferidos dos recipientes de criação, com gesso, para um frasco de 2 mL. O controle foi outro frasco com raspas de gesso do recipiente de criação de onde os ovos foram retirados. As fibras foram inseridas nos frascos por uma hora e foram feitas três repetições. Posteriormente, as fibras foram levadas para análise em GC-MS.

### **2.4.5. Metodologia de criação sem utilização de gesso**

Vinte fêmeas ingurgitadas foram colocadas no interior de um copo de plástico de 150 mL com o fundo recoberto com algodão úmido e uma folha de papel filtro. A boca do copo foi recoberta com tecido “voil” onde havia também um pedaço de algodão com solução açucarada. Posteriormente, a boca do copo foi coberta com Parafilm M<sup>®</sup> (Figura 15).

Os tratamentos foram: copo branco e copo com casais + ovos. Os copos foram deixados por cinco dias em recipientes plásticos fechados a 28°C, 80–90% de umidade. Três fibras foram colocadas em cada copo e o período de extração de voláteis foi feita por 1 hora. Após a extração, as fibras foram levadas para análise em GC-MS.



Figura 15 - Metodologia de criação sem gesso foi utilizada.

#### 2.4.6. Extração em metanol

Aproximadamente 600 ovos de *Ny. neivai* (1 a 2 dias de idade), obtidos da mesma forma que o experimento anterior (sem o contato com o gesso), foram adicionados em um frasco de 2 mL e 200  $\mu$ L de metanol (grau HPLC) foram adicionados a fim de solubilizar possíveis voláteis da casca dos ovos dos flebotomíneos e mantidos por 48 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram feitas três repetições com as fibras inseridas no frasco que continha os ovos e mais três repetições foram feitas em um frasco contendo apenas metanol, pelo período de 1 hora (Figura 16a).

Após o tempo de extração, as fibras foram levadas para análise em CG-MS (Figura 16b).

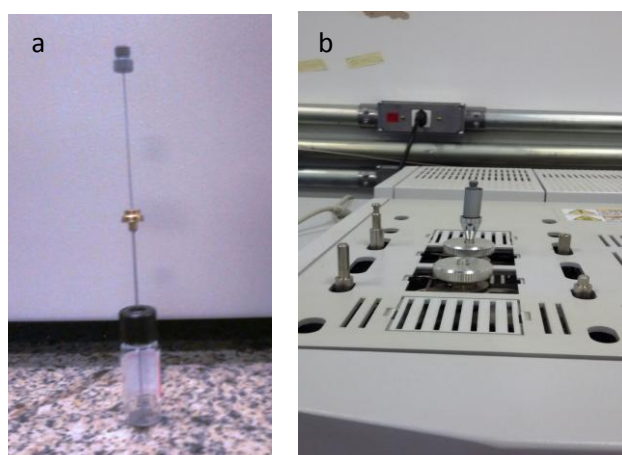


Figura 16 - (a) Extração dos possíveis voláteis emanados pelos ovos; (b) fibra inserida em CG-MS.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Comportamento de oviposição de *Ny. neivai* frente a diferentes fontes de estímulo

##### 3.1.1. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional

“Frass” - Como resultado foi obtido o maior número de ovos e média de 72,5 ovos no quadrante onde o estímulo foi inserido (Figura 17a), diferindo estatisticamente dos demais quadrantes que apresentaram média de 17, 21 e 15 ovos nos quadrantes 2, 3 e 4 consecutivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 17b).

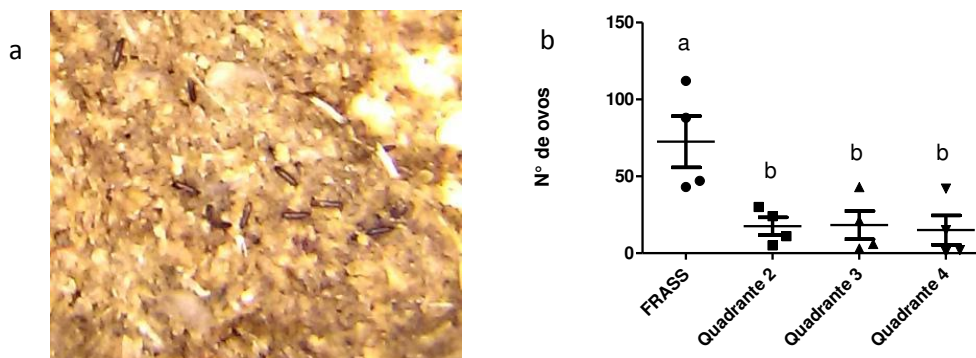


Figura 17 - (a) Ovos de *Ny. neivai* sobre o “frass”; (b) oviposição de *Ny. neivai* em recipientes de oviposição contendo “frass” em um dos quadrantes ( $n=4$ ). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Fezes de coelho - Assim como no experimento anterior, os resultados mostraram que houve diferença estatística entre os quadrantes e o quadrante contendo fezes de coelho ( $p < 0,05$ ). Foi obtida uma média de 70 ovos no quadrante contendo o estímulo contra uma média de 15, 15 e 9 ovos nos quadrantes 2, 3 e 4 consecutivamente (Figura 18).

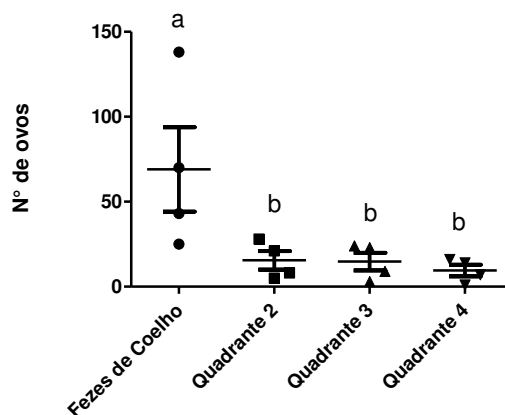


Figura 18 - Oviposição de *Ny. neivai* em recipientes de oviposição contendo fezes de coelho em um dos quadrantes mostrou maior quantidades de ovos no quadrante com estímulo ( $n=4$ ). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Dieta tradicional - Neste experimento foi obtido maior média de ovos em todos os quadrantes comparados aos testes anteriores. O quadrante com estímulo continuou apresentando maior média de ovos (150 ovos), apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos quadrantes 2 (70 ovos), 3 (64 ovos) e 4 (71 ovos) (Figura 19).

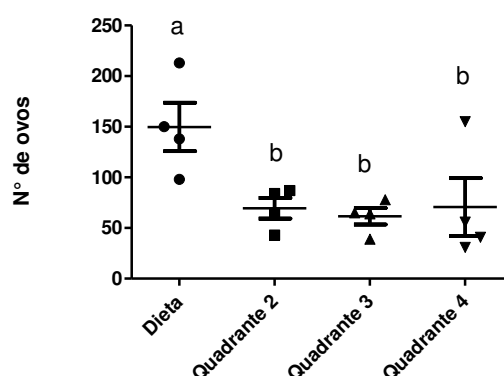


Figura 19 - Oviposição de *Ny. neivai* em recipientes contendo dieta para larvas em um dos quadrantes mostrou diferença estatística entre os tratamentos ( $n=4$ ). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. Comparação da atratividade de “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional em um mesmo recipiente de criação

Quando três fontes de estímulo foram inseridas no mesmo recipiente de criação para comparação da atratividade das fêmeas de *Ny. neivai*, os resultados mostraram que a maior média de ovos obtidos foi com a dieta tradicional (150 ovos), contra 70 ovos nas fezes de coelho e 73 no “frass”. Apesar desta media alta na quantidade de ovos apresentada da dieta tradicional, não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Figura 20).

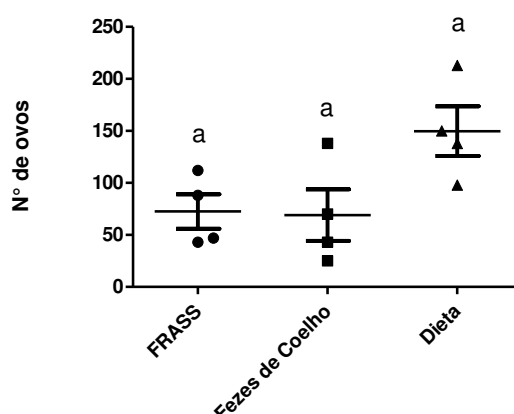


Figura 20 - Oviposição de *Ny. neivai* em recipientes de oviposição contendo conjuntamente: “frass”, fezes de coelho e dieta para larvas em um dos quadrantes ( $n=4$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3. “Frass”, fezes de coelho e dieta tradicional apresentados isoladamente e distribuídos pelo recipiente de criação

Os resultados deste experimento não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). As médias de ovos obtidas foram: 186 ovos para os recipientes de criação contendo “frass”, 185 ovos para fezes de coelho, 148 ovos para a dieta tradicional e 189 para o recipiente de criação apenas com gesso (Figura 21). Não houve, dessa forma, aumento na oviposição das fêmeas com os diferentes estímulos.

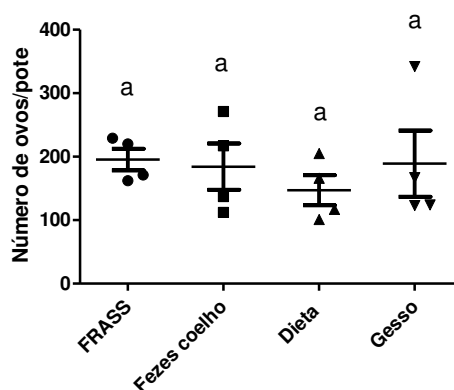


Figura 21 - Oviposição de *Ny. neivai* em recipientes de oviposição contendo isoladamente: "frass", fezes de coelho, dieta para larvas e gesso em um dos quadrantes ( $n=4$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).

## 3.2. Comportamento de oviposição de *Ny. neivai* frente a ovos conspecíficos

### 3.2.1. Ovos de *Ny. neivai*

Houve uma maior oviposição nos quadrantes onde havia a presença de ovos, apresentando uma média de 102 ovos. O quadrante dos ovos apresentou diferença estatística entre os demais quadrantes ( $p<0,05$ ), que apresentaram média máxima de 31 ovos e média mínima de 13 ovos (Figura 22).



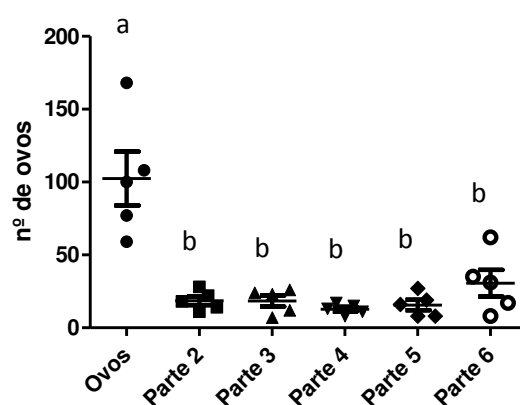


Figura 22 - Oviposição de *Ny. neivai* em recipientes de oviposição contendo ovos conspecíficos em uma das seis partes divididas do gesso como fonte de estímulo (n=5). Letras desiguais significam que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2. Ovos vivos e ovos mortos

Como resultado para este experimento, não obtivemos diferença estatística entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), porém houve maior oviposição onde continha ovos vivos e ovos mortos. O quadrante com ovos vivos mostrou uma média de 48 ovos e o quadrante com ovos mortos apresentou média de 33 ovos (Figura 23).

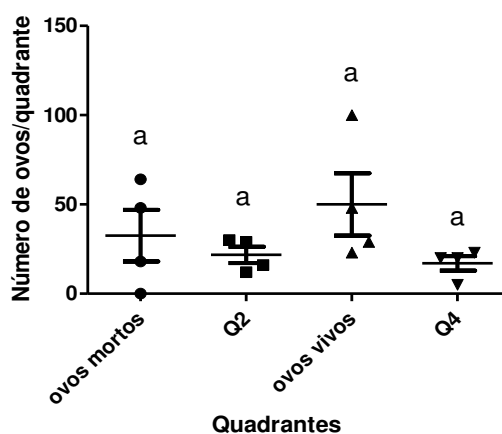


Figura 23 – Comparação da oviposição de *Ny. neivai* em recipientes de oviposição entre ovos vivos e mortos utilizados como fonte de estímulo (n=4). Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3. Ovos de *Aedes aegypti* e ovos de *Ny. neivai*

Neste experimento pudemos observar que houve oviposição em todos os quadrantes, demonstrando que as fêmeas grávidas de *Ny. neivai* não tiveram preferência nem por ovos de *Ae. aegypti* e nem para ovos conspecíficos (Figura 24). Não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).

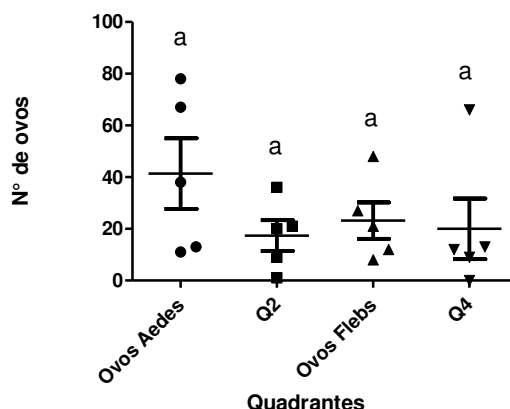


Figura 24 - Comparação da oviposição de *Ny. neivai* em recipientes de oviposição entre ovos do flebotomíneo e *Ae. aegypti* utilizados como fonte de estímulo ( $n=4$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos

### 3.2.4. Ovos em ranhuras do gesso

Os resultados mostraram que não houve maior oviposição nas ranhuras aonde já existiam ovos, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ) (Figura 25).

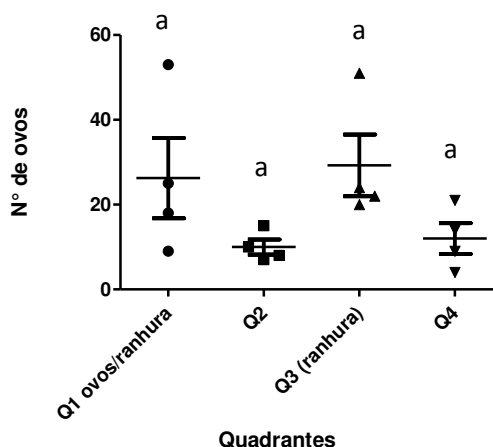


Figura 25 – Oviposição e comparação do número de ovos de *Ny. neivai* em ranhuras com e sem ovos ( $n = 4$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).

### 3.2.5. Camuflagem dos ovos de *Ny. neivai*

**Ovos sob o algodão:** Nos testes de retirada do estímulo visual, a oviposição foi aleatória e entre os fios de algodão, impossibilitando a contagem dos ovos por quadrante. Foi possível verificar que não houve maior oviposição no quadrante onde os 100 ovos estavam.

**Ovos sobre fundo escuro:** os resultados mostraram que não houve preferência da fêmea grávida de *Ny. neivai* pelo quadrante que apresentava os ovos conspecíficos (Figura 26). Segundo a análise estatística não houve diferença entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).

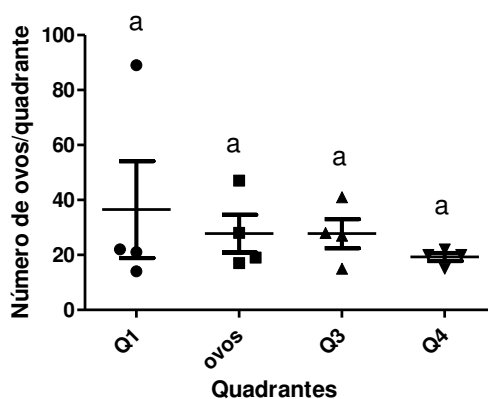


Figura 26 – Oviposição de *Ny. neivai* sobre o papel preto ( $n = 4$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).

### 3.2.6. Gesso e ovos envoltos em papel filme

Neste experimento, os resultados mostraram que as fêmeas de *Ny. neivai* preferiram ovipor no quadrante onde havia ovos. A análise estatística apresentou diferença entre os tratamentos (Figura 27).

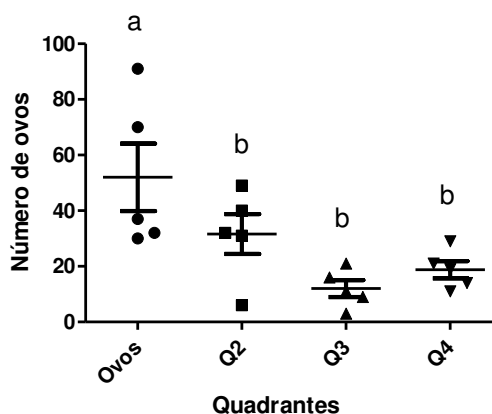


Figura 27 - Oviposição em recipientes de oviposição cm papel filme recobrindo toda a área do gesso e ovos no quadrante 1, abaixo do papel filme ( $n=5$ ). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ).

### 3.2.7. Gesso e ovos parcialmente envoltos em papel filme

Os resultados mostraram que as fêmeas grávidas de *Ny. neivai* ovipuseram igualmente nas duas metades do gesso, com ou sem papel filtro, não apresentando diferença estatística ( $p>0,05$ ) (Figura 28).

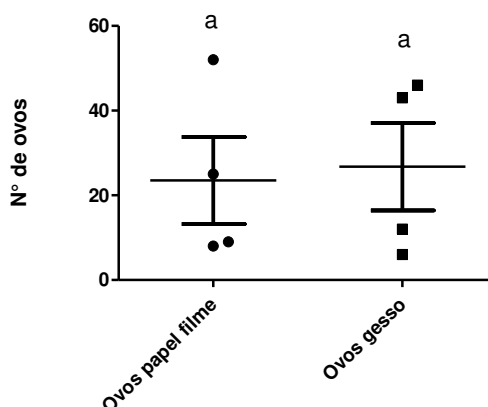


Figura 28 - Oviposição em recipientes de oviposição com papel filme recobrindo metade da área do gesso e ovos previamente colocados nas duas metades ( $n = 4$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).

### 3.2.8. Ovos cobertos por lamínula

Neste experimento, os resultados mostraram que houve maior oviposição do lado, e sobre a lamínula, onde previamente estavam os 150 ovos ( $p<0,05$ ) (Figura 29).

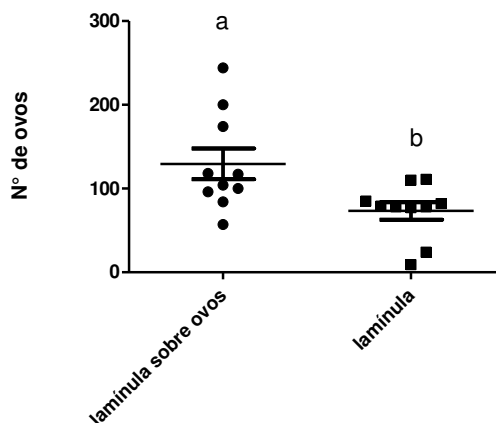


Figura 29 - Oviposição em recipientes de oviposição com lamínulas recobrindo as cavidades no gesso ( $n = 10$ ). Letras diferentes significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p<0,05$ ).

### 3.2.9. Ovos totalmente no escuro

Os resultados deste teste mostraram que quando os insetos são colocados em ambiente totalmente escuro, a oviposição ocorre de forma aleatória, não apresentando diferença estatística entre os quadrantes ( $p < 0,05$ ) (Figura 30).

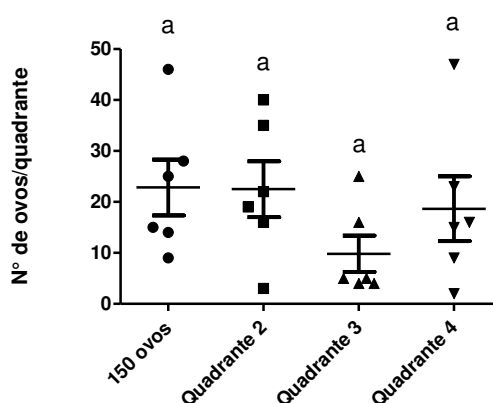


Figura 30 - Oviposição em recipientes de oviposição totalmente no escuro ( $n = 6$ ). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

## 3.3. Comportamento de oviposição de *Ny. neivai* com extratos de ovos

### 3.3.1. Ovos em hexano

De acordo com os resultados, apenas no tratamento com ovos (mortos) (Figura 31a), houve maior número de oviposição e diferença significativa entre os demais quadrantes ( $p < 0,05$ ) (Figura 31b e c).

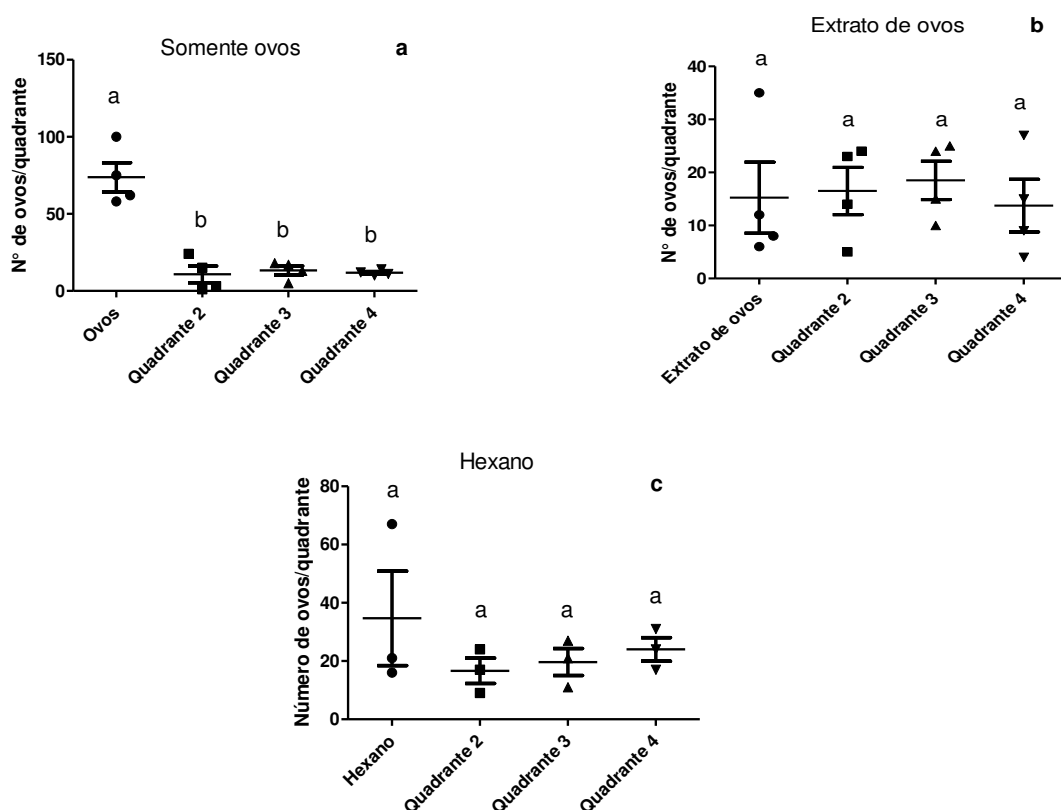


Figura 31 – (a) Maior oviposição no tratamento com ovos (mortos); (b) não houve diferença entre os quadrantes quando utilizado apenas o extrato de ovos; (c) não houve diferença estatística quando utilizado apenas o controle (hexano) (n=4). Letras desiguais significa que houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2. Ovos em metanol/clorofórmio

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os tratamentos ou entre os quadrantes nos dois testes, com o extrato de ovos e com ovos lavados ( $p > 0,05$ ) (Figura 32).

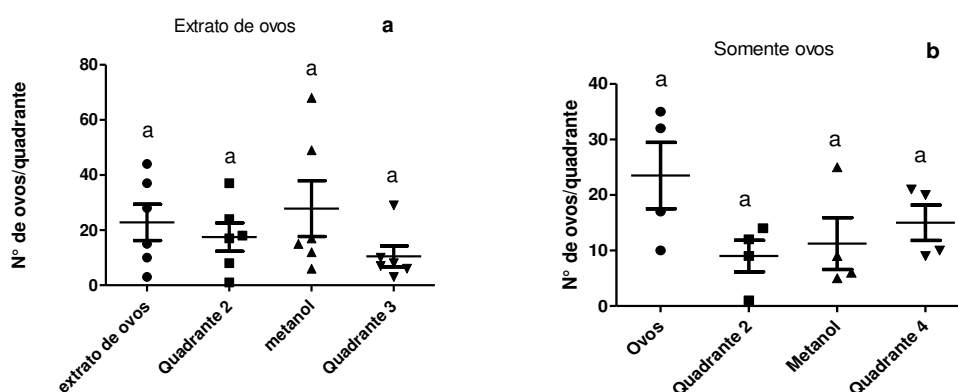


Figura 32 – (a) Oviposição de *Ny. neivai* em teste utilizando clorofórmio, metanol e água não apresentou diferença estatística no número de ovos entre os quadrantes, (b) assim como no teste utilizando os ovos lavados como fonte de estímulo ( $p > 0,05$ ) (n=4). Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

### 3.4. Cromatografia gasosa para identificação de feromônios de oviposição

#### 3.4.1. Micro extração em fase sólida (Solid Phase Microextraction - SPME)

O primeiro resultado não mostrou diferença entre os três tratamentos nos diferentes tempos. Isso pode ser explicado pela pouca quantidade de insetos e pouca quantidade de ovos produzidos (49 ovos). Devido a esses resultados, nova metodologia foi elaborada.

#### 3.4.2. Aumento do número de ovos e tempo de exposição das fibras

Foi obtido um maior número de ovos: 208, 166 e 124 ovos, porém, a análise do cromatograma mostrou muitos picos de ciclوترисiloxano, (classe de siloxanos) que por não ser um material biológico, foi um indicativo de possível contaminação ambiental no procedimento (Figura 33).

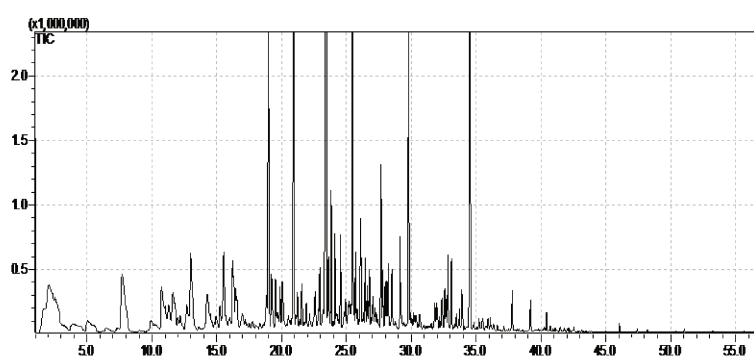


Figura 33 - Picos majoritários no cromatograma são correspondentes a siloxanos, sobrepondo possíveis picos dos voláteis de interesse.

### 3.4.3. Extração com hexano

Apesar da nova metodologia, os resultados cromatográficos apontaram grande contaminação por ciclotrisiloxano, sobrepondo possíveis picos dos voláteis de interesse.

### 3.4.4. Transferência dos ovos dos recipientes de criação, aumento no número de ovos e fibras

Novamente os resultados cromatográficos apontaram grande contaminação por ciclotrisiloxano, inclusive no frasco controle, o qual continha apenas raspas de gesso.

### 3.4.5. Metodologia sem utilização de gesso

Mesmo com a nova metodologia, sem o gesso, ainda houve contaminação por ciclotrisiloxano em vários picos da análise, mas com intensidade de picos muito menores (Figura 34a e b). Provavelmente o gesso que fica aderido aos adultos passa para os ovos.

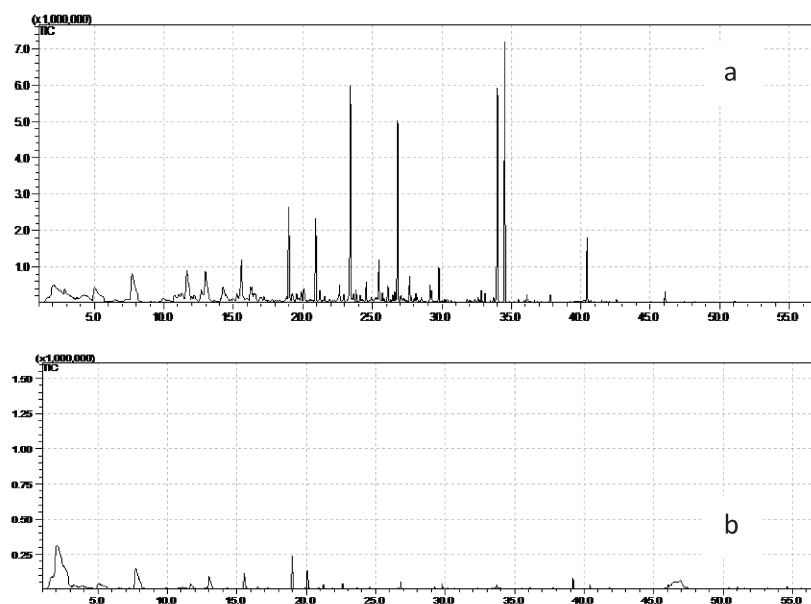


Figura 34 - Comparação entre os cromatogramas: (a) picos altos de contaminação por ciclotrisiloxano em análise utilizando gesso no fundo recipiente de criação, sem insetos e sem gesso (b) picos de contaminação ausentes em recipiente de criação sem insetos e com fundo recoberto de algodão e papel filtro.



### 3.4.6. Extração em metanol

As análises dos cromatogramas demonstram que na sobreposição do metanol e do metanol com ovos, ainda há a presença do ciclotrisiloxano, embora em menor quantidade (Figura 35). Comparativamente ao cromatograma anterior (Figura 30), houve uma diminuição dos picos. Entretanto, a presença dos picos desse composto pode mascarar a presença de outros compostos que, eventualmente, estejam ali.

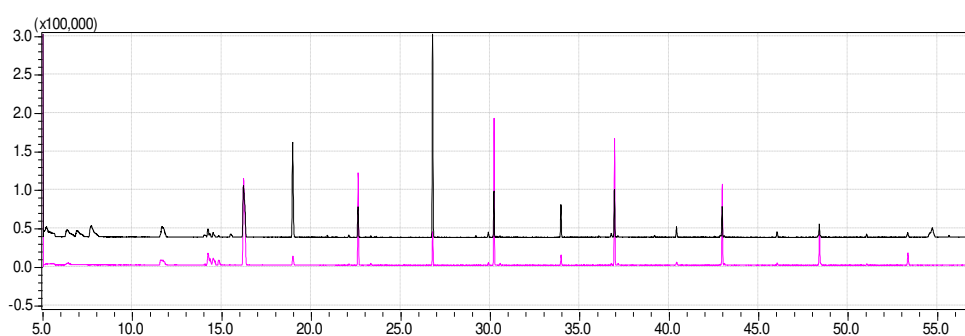


Figura 35 - Análise entre frascos com ovos e branco mostraram picos semelhantes. Linha superior: Ovos e metanol. Linha inferior: Metanol.

#### 4. DISCUSSÃO

Como dito anteriormente, devido à sua importância epidemiológica, as colônias de flebotomíneos em laboratório são mantidas para o estudo de sua biologia e de diversas interações entre hospedeiro/vetor/parasita. A pesquisa por respostas das fêmeas grávidas a substâncias estimulantes ou atrativas para oviposição tem crescido, porém poucas espécies de flebotomíneos têm sido estudadas. Fêmeas grávidas de flebotomíneos se guiam por diversos semioquímicos para encontrar um lugar adequado para depositar seus ovos e garantir o futuro das larvas (KILLICK-KENDRICK & KILLICK-KENDRICK, 1999).

Há um grande número de flebotomíneos descritos na América Latina, mas somente em *Lu. longipalpis* houve sucesso na identificação de feromônio de oviposição (DOUGHERTY & HAMILTON, 1997). Para outras espécies de flebotomíneos, *Lutzomyia renei*, demonstrou uma pequena resposta em fêmeas grávidas, a extrato de ovos com hexano, apenas quando utilizado uma grande quantidade de ovos e mesmo assim não houve a identificação do possível feromônio de oviposição (ALVES et al, 2008).

Talvez essa falta de estudos se deva a dificuldade de colonizar algumas espécies de flebotomíneos em condições de laboratório ou por problemas na metodologia de extração dos feromônios ou ainda a não existência do mesmo, podendo apontar para um resultado inconclusivo ou negativo.

Identificar tais compostos em diferentes espécies de flebotomíneos seria importante para o estímulo de oviposição das fêmeas e diminuição da mortalidade antes da oviposição em condições laboratoriais, além de confecção de iscas e armadilhas que podem ser utilizadas em trabalhos em campo, como monitoramento e armadilhas de controle (DOUGHERTY et al, 1993; HAMILTON, 2008).

Em nossos experimentos, as fêmeas grávidas de *Ny. neivai* responderam às fontes de estímulo adicionadas aos recipientes de criação, porém não conseguimos detectar nenhum feromônio de oviposição nos testes realizados com solventes. Levantando a dúvida se a resposta das fêmeas seria visual, tátil ou olfatória.

Alguns trabalhos demonstraram que a matéria orgânica e ovos conspecíficos atraem ou estimulam fêmeas grávidas de flebotomíneos a ovipor em

determinados locais (DOUGHERTY & HAMILTON 1997, ELNAIEM & WARD,1991; ELNAIEM & WARD,1992; RADJAME et al. 1997).

Experimentos para avaliar a resposta de fêmeas grávidas de *Lu. longipalpis* ao “frass”, fezes de coelho e dieta para as larvas indicaram uma preferência na oviposição para o “frass” e as fezes de coelho (ELNAIEM & WARD, 1992). Já em experimento conduzido com *P. argentipes* utilizando somente o “frass” como fonte de estímulo/atrativo de oviposição mostrou que a quantidade de ovos depositados no local aonde havia a matéria orgânica foi maior do que o local do controle, uma vez que o “frass” contém restos de larvas, ovos não eclodidos, adultos e dietas (KUMAR et al., 2013). Schlein et al (1989) relataram uma maior atratividade de *Phlebotomus papatasi* em iscas feitas com estrume de boi do que iscas somente com água em experimento realizado para observar a dispersão e a população dos locais de acasalamento dessa espécie. Wasserberg & Rowton (2011) também obtiveram respostas fortes à oviposição em “frass” para *Lu. longipalpis* e *Ph. papatasi* em seus experimentos com a matéria orgânica e ovos conspecíficos.

Em nossos experimentos com “frass”, fezes de coelho, dieta de coelho e dieta artificial separadamente, os resultados mostraram que nos quadrantes onde havia a fonte de estímulo sempre houve maior oviposição. Já nos experimentos em que as fontes de estímulo foram colocadas em um mesmo recipiente de criação, a fonte mais atraente/estimulante foi a dieta artificial para larvas. Sabe-se que, na natureza, as fêmeas de flebotomíneos escolhem locais ricos em matéria orgânica para a oviposição, garantindo assim a alimentação da futura prole (KILLICK-KENDRICK, 1987). As fêmeas grávidas de *Ny. neivai* preferiram a dieta artificial tradicional para larvas às outras fontes de estímulo por ser mais rica em nutrientes, assim como observamos nos experimentos de atratividade realizados com as larvas desta espécie.

As fontes de estímulo foram espalhadas por todo o recipiente com o objetivo de verificar a produtividade de ovos das fêmeas grávidas, porém, não houve aumento na produção de ovos para nenhuma das fontes. No momento em que espalhamos as fontes de estímulo pelo recipiente de criação, essas fontes se anularam, deixando de ser atrativas, igualando-se ao gesso. As fontes também não foram estimulantes, já que não houve aumento na produção de ovos.

Em estudo realizado com insetos de laboratório, ovos conspecíficos de *Lu. longipalpis* foram utilizados como fonte de estímulo/atrativo para fêmeas grávidas. Como resultado, foi constatada maior oviposição em locais aonde havia os ovos conspecíficos. Os autores concluíram que havia um feromônio de oviposição e que este estava presente na superfície dos ovos (ELNAIEM & WARD, 1991). Relataram também que a quantidade de ovos como fonte de estímulo/atrativo influenciou no teste, sendo que uma quantidade pequena de ovos não gerou resposta alguma das fêmeas grávidas.

Neste estudo, as fêmeas de *Ny. neivai* também ovipuseram no local aonde havia ovos conspecíficos, levando-nos a acreditar que estariam ali presentes voláteis emanados pelos ovos. Em 1997, foi descoberto que o feromônio de oviposição de *Lu. longipalpis* é o ácido dodecanóico, composto que atrai ou estimula as fêmeas grávidas a oviporem no local onde há esse composto (DOUGHERTY & HAMILTON). Realizamos testes com auxílio de cromatógrafo, porém nada foi encontrado. Paralelamente foram feitos mais testes de evidência biológica de feromônio de oviposição com *Ny. neivai*.

Experimentos cobrindo os ovos conspecíficos com algodão e camuflando-os com papel preto, para remover o estímulo visual, mostraram que as fêmeas grávidas ovipuseram aleatoriamente em ambos os testes. Ovos vivos e mortos de *Ny. neivai* mostraram igual atratividade/estímulo em fêmeas grávidas, evidência de que não há voláteis emanados pelos ovos por estarem vivos. Quando o gesso foi envolto com papel filme a fim de impedir possíveis voláteis fossem emanados pelos ovos, houve maior oviposição no local aonde havia ovos conspecíficos. Mesmo resultado foi obtido no teste em que os ovos foram cobertos pela lamínula. Em outro teste houve oviposição igualmente distribuída nos recipientes com papel filme cobrindo os ovos de um lado e sem papel filme sobre os ovos do outro.

Em experimento realizado com *Ny. neivai* similar ao de Elnaiem & Ward (1991), as fêmeas de *Ny. neivai* não ovipuseram em maior quantidade nas ranhuras aonde havia ovos conspecíficos. Demonstrando que pode não haver feromônio de oviposição ou que a quantidade de ovos conspecíficos presentes nas ranhuras foi insuficiente para gerar algum estímulo atrativo.

Nos testes realizados com extrato de ovos, ovos lavados com hexano, metanol/clorofórmio não houve resposta em *Ny. neivai*, diferente do que foi

encontrado em *Lu. renei*. Seria então, para *Ny. neivai*, apenas estímulo visual? Entretanto, em todos os experimentos os ovos foram mantidos em local escuro - dentro de recipientes plásticos que por sua vez ficavam dentro de um armário de madeira.

Os dados de literatura sobre a visão de *Lu. longipalpis* apontam para um espectro de luz mais atrativo no ultra-violeta (350 nm) e no espectro azul-verde-amarelo (490-546 nm), apresentando diferenças nas respostas entre machos e fêmeas. *Lu. longipalpis* consegue enxergar cores, pois distinguem diferentes comprimentos de ondas e suas intensidades. Sugere-se que esta espécie seja capaz de se guiar no escuro pelo espectro de luz na faixa do azul-verde-amarelo, sob a luz da lua e estrelas (MELLOR et al, 1996; MELLOR & HAMILTON, 2003).

Os autores estudaram apenas a faixa de luz visível, não estudando a resposta dos insetos nas faixas abaixo do ultra-violeta (abaixo de 350 nm) e no infravermelho (acima de 700 nm). Apesar das respostas dos insetos diminuírem nas intensidades de luz mais baixas do ultra-violeta e na faixa do laranja-vermelho (600 - 670 nm), não sabemos ainda como os flebotomíneos se guiam em outras faixas de luz não-visível em ambientes totalmente escuros.

O experimento realizado totalmente no escuro resultou em oviposição aleatória, não deixando dúvida de que a visão é um fator muito importante para a identificação de ovos conspecíficos pelas fêmeas grávidas de *Ny. neivai*.

Nos testes com o cromatógrafo utilizamos o método SPME, o qual foi desenvolvido para detectar traços de compostos orgânicos em análises líquidas (PAWLISZYN, 1995). Não há estudos utilizando esse método para identificação de feromônios de oviposição em insetos, mas há o uso de SPME para a identificação de feromônios sexuais em algumas ordens de insetos como: Lepidoptera (FRÉROT et al., 1997), Coleoptera (FUJIWARA-TSUJII et al., 2012), Diptera (FARINE et al., 2012) e Hemiptera (MAY-CONCHA et al., 2015).

Em estudo realizado por Farine e colaboradores em 2012, os autores utilizaram as fibras SPME para a extração de voláteis de um recipiente contendo *Drosophila melanogaster*, metodologia similar adotada em nosso estudo com *Ny. neivai*.

Os primeiros resultados aqui obtidos utilizando essa metodologia mostraram grande contaminação por siloxanos. Entretanto, o siloxano está presente

tanto na coluna cromatográfica (ZB-5) quanto nas fibras de extração e inicialmente achávamos que tínhamos encontrado a fonte de contaminação. Porém, outras análises, sem nosso material, resultaram em imagens cromatográficas limpas.

Após algumas pesquisas verificamos que os siloxanos estão presentes na sílica (KELLUM & SMITH, 1967; GRABBE et al, 1995), e a sílica é um contaminante comum encontrado no gesso (OLIVEIRA, 1997).

Em tentativa de eliminarmos a fonte da contaminação, fêmeas foram colocadas para ovipor no papel filtro. A contaminação ainda persistiu, porém em menor quantidade. Esse fato pode ser explicado pela aderência do siloxanos nas pernas dos insetos, uma vez que todas as gerações de criação de *Ny. neivai* em laboratório são criadas nos recipientes com fundo de gesso.

Tentamos então iniciar uma criação de *Ny. neivai* fora do gesso, apenas com algodão, papel filtro e vermiculita como substratos. Não obtivemos sucesso devido a falta de controle da umidade, levando ao ressecamento ou à grande proliferação de diversos fungos. A tentativa de criação de flebotomíneos fora do gesso também foi negativamente avaliada por Rangel et al (1985).

Não foi possível realizar coleta em campo devido a problemas climáticos e ausência de insetos. Apesar das dificuldades encontradas, novas coletas estão previstas para avaliação de ovos provenientes de geração livre do gesso para a realização de novas análises.

## 5. CONCLUSÕES

- ✚ A dieta artificial tradicional para larvas confeccionada em nosso laboratório mostrou ser mais atrativa/estimulante para fêmeas grávidas de *Ny. neivai* o que indica um local apropriado para a oviposição, garantindo a alimentação da futura prole,
- ✚ Os testes de evidência biológica de um possível feromônio de oviposição não foram claros, e não podemos descartar que a atratividade/estímulo das fêmeas grávidas tem fortes indícios de ser resposta visual,
- ✚ A metodologia de extração de voláteis dos ovos utilizada (Extrato de ovos com solventes e a utilização de SPME) não permitiu o encontro de feromônio de oviposição em *Ny. neivai*, podendo ter ocorrido contaminação ou a não existência do feromônio,
- ✚ O uso de gesso em recipientes de criação para análise com fibras SPME e GC-MS não é o indicado, sendo necessária a criação dos insetos fora do gesso ou análises realizadas com ovos de insetos diretamente coletados em campo, com oviposição em substrato livre de gesso.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES JCM, HAMILTON JGC, BRAZIL RP (2008) Oviposition response of *Lutzomyia (Lutzomyia) renei* (Martins, Falcão & Silva) (Diptera: Psychodidae) to extracts of conspecific eggs in laboratory bioassays. **Entomotropica**. 18(2):3.

BLIGH EG, DYER WJ (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 37(8): 911-917.

DOUGHERTY MJ, HAMILTON JGC, WARD RD (1993) Semiochemical mediation of oviposition by in phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Medical and Veterinary Entomology**. 7:219-224.

DOUGHERTY M, HAMILTON G (1997) Dodecanoic acid is the oviposition pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Chemical Ecology**. 23(12):15.

ELNAIEM DA, WARD RD (1991) Response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to an oviposition pheromone associated with conspecific eggs. **Medical and Veterinary Entomology**. 5: 87-91.

ELNAIEM DA, WARD RD (1992) Oviposition Attractants and Stimulants for the Sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. 29(1): 5-12.

FARINE JP, FERVEUR JF, EVERAERTS C (2012) Volatile *Drosophila* cuticular pheromones are affected by social but not sexual experience. **PLoS One**. 7(7):e40396.

FUJIWARA-TSUJII N, YASUI H, WAKAMURA S, MOCHIZUKI F, ARAKAKI N (2012) Age-dependent changes in the ratio of (R)- and (S)-2-butanol released by virgin females of *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Bulletin of Entomological Research**. 102(6):730-736.



FRÉROT B, MALOSSE C, CAIN A-H (1997) Solid-phase microextraction (SPME) A new tool in pheromone identification in lepidoptera, **Journal of High Resolution Chromatography**. 20(6): 340-342.

GRABBE A, MICHALSKE TA, SMITH WL (1995) Strained Siloxane Rings on the Surface on Silica: Their Reaction with Organosiloxanes, Organosilanes, and Water. **Journal of Physical Chemistry**. 99(13):7.

HAMILTON JGC (2008) Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. **Parasite**. 15: 252-256.

KELLUM GE, SMITH RC (1967) Determination of Water, Silanol, and Strained Siloxane on Silica Surfaces. **Analytical Chemistry**. 39:5.

KILLICK-KENDRICK, R (1987) Methods for the study of phlebotomine sandflies. In: PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R., ed. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London, Academic Press.1: 473-497.

KILLICK-KENDRICK M, KILLICK-KENDRICK R (1999) The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**. 17: 279-289.

KUMAR V, RAMA A, KESARI S, BHUNIA GS, DINESH DS, DAS P (2013) Oviposition behaviour of *Phlebotomus argentipes* - A laboratory-based study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 108(8): 1065-1067.

MAY-CONCHA I, ROJAS JC, CRUZ-LÓPEZ L, IBARRA-CERDEÑA CN, RAMSEY JM (2015) Volatile compound diversity and conserved alarm behaviour in *Triatoma dimidiata*. **Parasites & Vectors**. 8:84.

MELLOR HE, HAMILTON JGC, ANDERSON M (1997) Spectral sensitivity in the eyes of male and female *Lutzomyia longipalpis* sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. 10, 371-374.

MELLOR HE, HAMILTON JGC (2003) Navigation of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) under dusk or starlight conditions. **Bulletin of Entomological Research**. 93, 315–322.

OLIVEIRA HMD: Aglomerantes (1997) In: Materiais de Construção. Editado por Bauer LAF, vol. 1, 5 edn. Rio de Janeiro: LTC: 488.

PAWLISZYN J (1995) New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. **Trends in analytical chemistry**. 14(3):10.

RADJAME K, SRINIVASAN R, DHANDA V (1997) Oviposition response of phlebotomine sandfly *Phlebotomus papatasi* to soil bacteria isolated from natural breeding habitats. **Indian Journal of Experimental Biology**. 35: 59-61.

RANGEL EF, SOUZA NAD, WERMELINGER ED, BARBOSA AF (1985) Estabelecimento de colonia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 80(2):8.

SCHLEIN Y, YUVAL B, JACOBSON RL (1989) Leishmaniasis in the Jordan Valley: differential attraction of dispersing and breeding site populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to manure and water. **Journal of Medical Entomology**. 26(5):411-3.

WASSERBERG G, ROWTON, ED (2011) Sub-additive effect of conspecific eggs and frass on oviposition rate of *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. **Journal of Vector Ecology**. 36(1): S138-S143.

## ANEXO I

### PROTOCOLO DE CRIAÇÃO DE *Nyssomyia neivai* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Iniciar e manter uma colônia de flebotomíneos em condições de laboratório exige três pontos principais: **observação, paciência e empenho**.

A observação é o ponto mais exaustivo, podendo demorar de horas a meses. É um processo que requer atenção e cuidado. A observação é a chave para o sucesso da colônia e deve ser feita sempre. A paciência vem com a observação. Seja paciente, a colônia não vai se desenvolver de um dia para o outro. Sem o seu empenho, seu esforço, sua insistência, a colônia não irá prosperar. Não seja indolente! Dedique-se nesses três pontos e o sucesso na criação de flebotomíneos em condições laboratoriais será alcançado.

#### **Preparo para a coleta**

Para o início da colônia é necessário uma grande quantidade de insetos coletados do campo para obtenção de grande quantidade de ovos no laboratório. O primeiro passo é preparar os equipamentos para a coleta, tais como:

- ✚ Capturador de Castro,
- ✚ Armadilha de Shannon e/ou armadilha luminosa,
- ✚ Gaiola de “voil” de 30x30x30 cm,
- ✚ Saco plástico para envolver a gaiola,
- ✚ Lanternas,
- ✚ Placas de Petri (90 mm),
- ✚ Algodão hidrófilo,
- ✚ Água,
- ✚ Solução açucarada a 30%,
- ✚ Fita crepe,
- ✚ Tesoura, faca, barbante.

A coleta pode ser feita de maneira manual utilizando-se o capturador de Castro (Figura 1a) e a armadilha de Shannon (Figura 1b). Dessa maneira há a seleção apenas dos flebotomíneos. Já a armadilha luminosa (Figura 1c), coletará diversos tipos de insetos, sendo necessária a separação dos flebotomíneos.



Figura 1 - (a) Capturador de Castro, (b) armadilha de Shannon, (c) armadilha CDC.

Os insetos coletados devem ser inseridos em uma gaiola previamente preparada. A preparação da gaiola consiste em envolver a mesma com um saco plástico transparente. Posteriormente, devem-se inserir duas placas de petri: uma por cima da gaiola (tecido “voil”) e outra na parte inferior do saco plástico. Algodão encharcado de água a fim de manter a umidade alta (80%) deve ser colocado nas placas de petri (Figura 2b).

Deve ser oferecido aos insetos algodão embebido em solução açucarada (30%). Posicione-o na parte superior da gaiola, por baixo da placa de petri (Figura 2a).

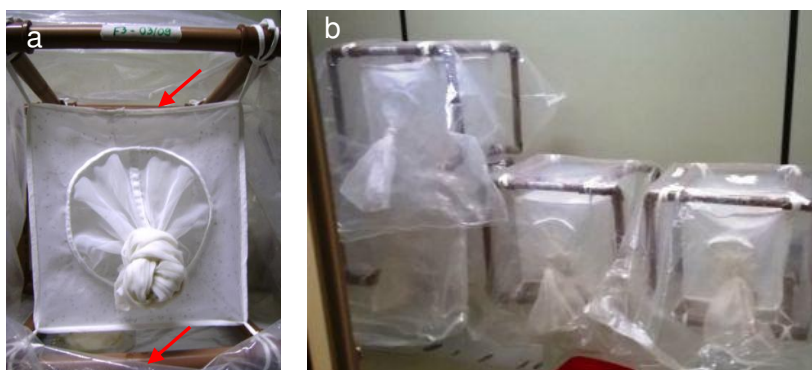


Figura 2 - (a) Placas de petri (setas) inseridas no plástico, (b) plásticos envolvendo as gaiolas para manter a umidade.

Cuidado para não encharcar muito o algodão com a solução açucarada, pois os insetos podem aderir ao algodão e morrer.

Todo esse preparo evita a mortalidade dos insetos no trajeto do campo até o laboratório.

É importante que o local para a criação dos insetos seja uma sala climatizada com cortina de vento e fotoperíodo.

### **Material para a criação de *Ny. neivai* em laboratório**

- ✚ Recipientes plásticos de 145 a 150 mL,
- ✚ Gesso de secagem rápida,
- ✚ Tubos Falcon 15 mL e 50 mL,
- ✚ Água sanitária,
- ✚ Tecido “voil”,
- ✚ Organizadores,
- ✚ Papel toalha,
- ✚ Esponja,
- ✚ Pincéis ponta redonda, (Tigre<sup>®</sup>, série 302, n°00; série 266, n°14 e 20)
- ✚ Pincel de ponta chata (Tigre<sup>®</sup>, série 815, n°20 a 24),
- ✚ Pinças de ponta redonda fina,
- ✚ Estiletes,
- ✚ Vermiculita,
- ✚ Alimento glicosado,
- ✚ Algodão hidrófilo,
- ✚ Dieta para larvas - Fezes de coelho, dieta de coelho (Purina<sup>®</sup>), dieta de peixe (Alcon<sup>®</sup> Colours) e terra vegetal,
- ✚ Tamises (0.297 mm e 0.125 mm),
- ✚ Processador,
- ✚ Camundongos BALB/c,
- ✚ Tesoura de ponta redonda e tesoura de ponta fina e curva,
- ✚ Canetas retroprojeter,
- ✚ Pissetas

### Confecção dos recipientes de criação

Recortar um círculo no fundo (2,5 cm diâmetro) e na tampa (4 cm diâmetro) dos recipientes de criação com o auxílio de uma tesoura de ponta fina e curva (Figura 3a e b). Preparar o gesso, como descrito na embalagem, e inseri-lo no recipiente de maneira que o gesso extravase pelo orifício, formando uma camada fina de gesso na parte inferior externa do recipiente. Espere secar e esfriar, eles estarão prontos para o uso após 1 hora.

Um pedaço de tecido “voil” (12x12 cm) deverá ser recortado e em seu centro, uma pequena abertura será feita para a adição ou remoção de insetos. O tecido será então colocado na boca do recipiente de criação e sua tampa encaixada (Figura 3c).

Basta utilizar um pedaço de algodão para tampar o pequeno recorte no centro do tecido, impedindo os insetos de sair.

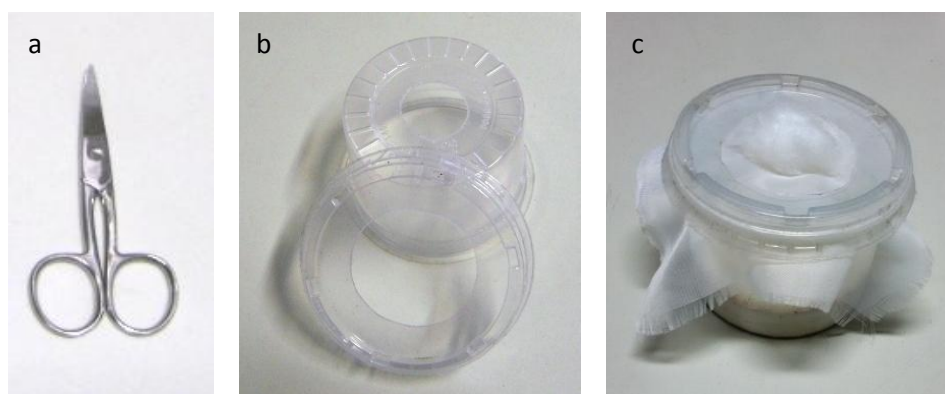


Figura 3 - (a) Tesoura de ponta fina e curva, (b) recipiente e tampa recortados, (c) recipiente de criação pronto.

É interessante queimar as bordas do “voil” com um isqueiro para que o tecido não fique soltando fios. Na figura 3c podemos ver o conjunto montado.

### Alimentação sanguínea

Nossos estudos demonstraram que o camundongo BALB/c é o mais indicado como fonte alimentar sanguínea para *Ny. neivai* em condições laboratoriais.

Não deve ser feito o manuseio dos animais ou de qualquer material da colônia, com luvas de látex, uma vez que o látex possui propriedades repelentes à *Ny. neivai* (observação pessoal). Luvas transparentes de vinil não repelem os insetos e podem ser usadas, porém não se deve manter as mãos por muito tempo dentro da gaiola dos insetos, já que o aparelho bucal de *Ny. neivai* consegue transpassar o material desse tipo de luva.

A alimentação sanguínea e a manutenção da colônia devem ser feitas em sala climatizada, fotoperíodo de 12/12h, 25+/-1°C e 80-90% umidade e com cortina de vento para impedir a saída dos insetos da sala. Em nosso laboratório, foram feitas diversas tentativas de criação de *Ny. neivai* em BODs, porém, a espécie não se adaptou a este ambiente.

Para a alimentação sanguínea há duas formas:

Sem anestesia: Inserir o camundongo em um envelope feito de arame e fechar firmemente para que o animal não se mova e espante as fêmeas de flebotomíneo no momento do repasto. Deixar o animal dentro da gaiola por no máximo duas horas, observando-o a cada 20 minutos. Não havendo mais a proximidade dos insetos, o animal deve ser retirado.

Com anestesia: Pesar o animal e calcular a dose dos anestésicos – Xilazina 2% (0,05 mL/ 200 mg) e Ketamina 10% (0,20 mL/ 200 mg). Aplicar com seringa de insulina de 1 mL com agulha curta. Essa dosagem de anestésico dura no máximo 1 hora, portanto observar a cada 10 minutos se o animal ainda está sob o efeito dos anestésicos. Assim que o animal acordar, colocá-lo de volta em sua caixa e observá-lo até que recupere todas suas funções.

O camundongo deve ser posicionado em uma placa de petri e inserido na gaiola. A placa de petri impede que urina e fezes do animal entrem em contato com o tecido. Deve ser inserido de dois a três camundongos se houver alta densidade de insetos dentro da mesma gaiola, ou deve-se dividir os flebotomíneos em demais gaiolas.

É importante a troca de camundongos após aproximadamente seis exposições à repastos (observação pessoal), pois estes desenvolvem anticorpos contra a saliva dos flebotomíneos. Os anticorpos do camundongo causam a

mortalidade das fêmeas antes que ocorra a oviposição, trazendo grande perda na colônia (GOSH & MUKHOPADHYAY, 1998).

### **Recipientes de oviposição**

Para os insetos que vêm do campo, após a alimentação deve-se individualizar as fêmeas ingurgitadas, sem machos, em um recipiente de criação (pode ser um recipiente menor que 145 mL) com solução açucarada a 30%. Os recipientes de oviposição serão colocados dentro de recipientes plásticos maiores (organizadores) e estes dentro de gavetas ou armários para a manutenção dos insetos no escuro por todo o ciclo de vida até a fase adulta. Na base do organizador colocam-se duas camadas de folhas de papel toalha e umedecidas bem com o auxílio de uma pisseta de água. A placa de gesso formada na parte externa do recipiente ficará em contato com o papel umedecido dos organizadores, mantendo sempre a umidade alta dentro dos recipientes de oviposição.

Passado o período de cinco dias ou após a oviposição, retirar a fêmea e fazer a identificação específica. Juntar os ovos de mesma espécie em um recipiente de 145 mL (até 300 ovos).

Para insetos de colônia, uma pequena quantidade de vermiculita deve ser adicionada ao recipiente (Figura 4) e então, fêmeas ingurgitadas juntamente com número igual de machos devem ser inseridos (5 a 10 casais). Um pequeno pedaço de algodão mergulhado em solução açucarada (30%) deve ser colocado sobre o tecido “voil” da tampa. A solução açucarada deve ser trocada a cada 48 horas.

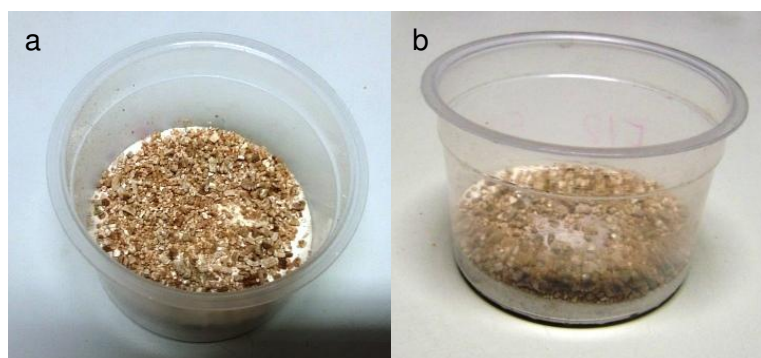


Figura 4 - Quantidade de vermiculita que deve ser inserida no recipiente de criação.



Se a intenção é fazer experimentos com contagem de ovos, a vermiculita deve ser adicionada após esse processo. Anotar no recipiente a geração dos insetos (Campo, F1, F2, etc), data e número de fêmeas alimentadas.

Para a manutenção da colônia, após a oviposição, retirar os insetos vivos para 2ª alimentação e retirar os insetos mortos, com uma pinça ou um estilete, para que estes não causem a proliferação de fungos. Com o auxílio de um pincel médio de ponta redonda e macia descer os ovos que estejam nas laterais dos recipientes (Figura 5a, b e c). Apesar da alta umidade, estes ovos costumam ressecar ao permanecerem ali por muito tempo.

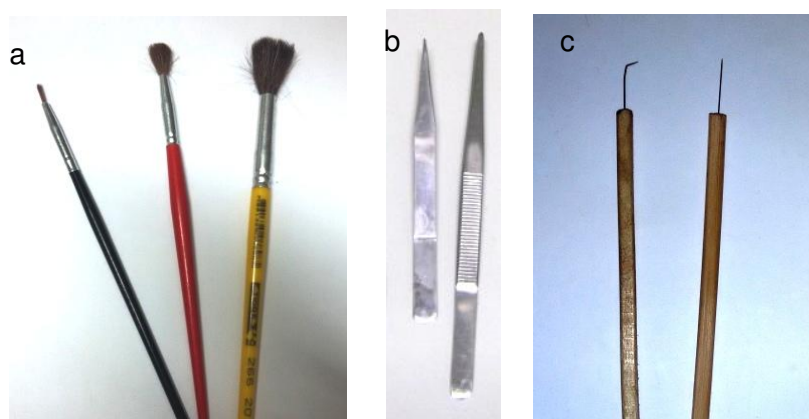


Figura 5 - (a) Pincéis de ponta redonda utilizados na colônia, (b) pinça de ponta fina e ponta redonda, (c) estiletes confeccionados com “hachi” e alfinetes entomológicos podem auxiliar na remoção dos adultos mortos.

## **2ª alimentação sanguínea**

A 2ª alimentação sanguínea consiste em alimentar os insetos após a oviposição. Na temperatura em que mantemos a colônia, o ciclo gonotrófico dos insetos ocorre entre o terceiro e quinto dias após alimentação sanguínea. Prestar atenção na temperatura do ambiente, que pode atrasar ou acelerar o ciclo gonotrófico, assim como o ciclo de vida do inseto.

A 2ª alimentação proporcionou a elevação do número de insetos da nossa colônia. Podemos afirmar que este procedimento é uma ferramenta ideal para a

manutenção e crescimento da colônia de *Ny. neivai*. Obtivemos êxito em 3 alimentações, porém em raras ocasiões.

### **Preparo da dieta artificial das larvas**

As fezes de coelho devem ser deixadas secando ao sol por três dias. Após a secagem, triturar as fezes, dieta de coelho, dieta de peixe e terra vegetal em processador, separadamente. Passe todos os componentes da dieta artificial pelos tamises de malha 0,297 mm e 0,125 mm, consecutivamente.

Fazer uma mistura 1:1:1:1 de todos os componentes, inserir em tubos falcon de 15 mL e autoclavar. Após a esterilização, deixar na estufa por algumas horas para a secagem.

Um pequeno pedaço de tecido “voil” deve ser usado para tampar o tubo falcon com o auxílio de um elástico. Agitar o tubo no primeiro uso para descompactar a dieta. Após a utilização da dieta, tampar o tubo falcon normalmente com a própria tampa por cima do tecido voil.

Se os tubos com dieta estiverem prontos a pelo menos um mês, autoclavar novamente.

### **Eclosão das larvas**

A partir da inserção das fêmeas ingurgitadas no recipiente de oviposição, as larvas nascerão a partir do décimo dia (cinco dias após a oviposição), portanto, no nono dia uma pequena quantidade de dieta deve ser adicionada.

### **Alimentação das larvas**

Este é o momento mais delicado de todo o processo de colonização. Mesmo com a esterilização da dieta e dos materiais há o surgimento de fungos. Se houver muita dieta, fungos se proliferarão e as larvas de primeiro instar morrerão presas nas hifas. Conforme as larvas vão crescendo, há o melhor controle de fungos, já que estas também se alimentam deles.

Se houver pouca dieta, as larvas sairão do recipiente à procura de alimento e morrerão desidratadas e de fome. Esse comportamento também é observado quando a densidade de larvas no recipiente está muito alta.

A dieta deve ser adicionada de acordo com a necessidade do recipiente. Quanto mais larvas, mais dieta. Porém a observação diária deve ser feita. No momento em que as larvas estão para mudar de estágio tornam-se lentas e há uma queda brusca na alimentação, portanto a quantidade de dieta adicionada deve diminuir.

Ao observar larvas robustas e de cor leitosa de 4º instar diminuir imediatamente ou cessar a introdução de dieta. Larvas com esse aspecto estão entrando em fase de pupação e não se alimentam mais. Observar se há ainda larvas de instar menos desenvolvidos no mesmo recipiente.

Após um longo período de observação diária passamos a observar os recipientes e alimentar as larvas apenas três vezes por semana: segunda, quarta e sexta-feira. Antes de se aventurar a essas condições, testar em apenas alguns recipientes de criação para que haja o conhecimento da quantidade de alimento que deve ser oferecido nestes dias.

Nas sextas-feiras há sempre maior quantidade de alimento do que em outros dias, tornando as segundas-feiras os dias mais exaustivos para o cuidado com a colônia. Nas segundas-feiras há excesso de fungo nos recipientes, assim como fungo nos papéis dos organizadores e no tecido “voil” que cobrem os recipientes.

Todos os tecidos e papéis devem ser trocados neste dia da semana. Se houver necessidade, trocar em outros dias também.

### **Cuidados com a umidade**

A oviposição é dependente de umidade. A umidade entre 90 a 100% é o ideal. Após a oviposição, a umidade deve diminuir consideravelmente dentro dos organizadores, passando a 70%. Se houver a formação de gotículas nas laterais dos recipientes de criação, remover as larvas que estiverem nas laterais e passar um papel absorvente para retirar a umidade. Larvas de primeiro e segundo instar

grudam nas gotículas e morrem afogadas. Se esse for o caso, diminuir a umidade ainda mais com a troca do papel toalha na base do organizador.

As pupas são bem resistentes ao clima seco, mas a orientação é que se mantenha a umidade dentro dos recipientes.

### **Proliferação de fungos**

Vários tipos de fungos podem aparecer nos recipientes de criação. Quanto mais coloridos os fungos, piores são. Sempre observar o formato, a densidade e a altura que o fungo alcança. Se o recipiente estiver muito contaminado, vale a pena passar as larvas para recipientes novos e livres de contaminação.

Muito cuidado ao utilizar os materiais de uso comum na colônia. Sempre manter ao alcance pisseta com álcool, papel toalha e um isqueiro para flambar os estiletes. Passar álcool e flambar os estiletes a cada vez que utilizá-los em recipientes com fungos diferentes.

Se o fungo for de aspecto filamentoso, branco e lembrando um algodão, que as larvas se alimentam, não é necessária a remoção do recipiente de criação uma vez que os fungos fazem parte da dieta das larvas (Figura 6a). Com o auxílio do estilete, amassá-lo e tentar soltar possíveis larvas enroscadas em suas hifas. Repetir o mesmo procedimento quando houver pupas, pois o inseto que emergirá poderá ficar preso nas hifas e morrer (Figura 6b).

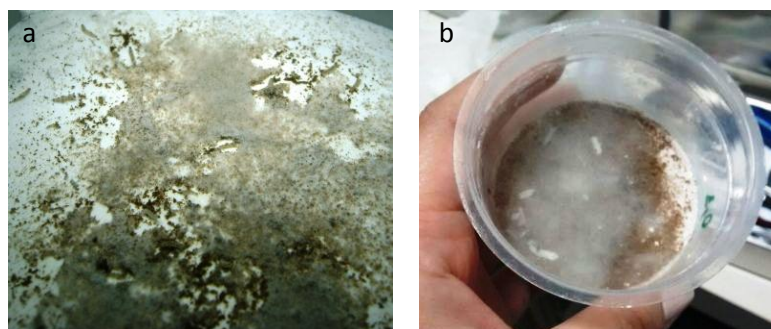


Figura 6 - (a) Larvas se alimentando dos fungos, (b) aspecto do fungo que deve ser removido do recipiente.

Agitar o recipiente de criação com vermiculita auxilia na quebra das hifas e não machuca as larvas e pupas. Evitar a agitação quando as larvas estiverem em primeiro instar, pois ainda estão muito frágeis.

Remover imediatamente larvas mortas, geralmente enegrecidas, assim como pupas. Estas podem ter morrido devido a fungos patogênicos ou bactérias. Se em um recipiente ocorrer muita mortalidade dessa forma, sacrificar o restante das larvas com álcool 70% e descartar o recipiente de criação.

Organizadores e o papel toalha em seu fundo também podem apresentar fungo enegrecido. Lavar com água e sabão neutro e passar álcool no organizador conforme necessário. Trocar o papel toalha pelo menos uma vez por semana.

## Pupariação

Sempre que surgir a primeira pupa em um recipiente de criação, anotar a data na tampa. A data auxilia no próximo passo a ser tomado para a manutenção da colônia.

É de grande importância aprender a diferenciar pupas vazias de pupas inteiras, assim como pupas mortas, recém-formadas e pupas que estão para liberar os adultos (Figura 7a, b, c, d).

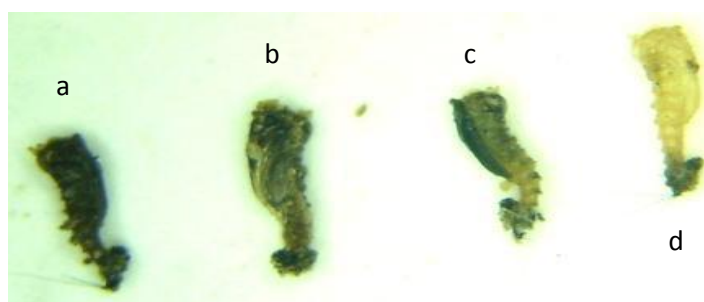


Figura 7 - (a; b) Pupas mortas, (c) pupa pronta para a liberação do adulto, com a região das asas de cor preta (d) pupa jovem de aparência normal.

Pupas recém-formadas apresentam a coloração esbranquiçada, tornando-se amarelo-alaranjadas após algumas horas e assim permanecem por pelo menos mais sete dias. Quando os adultos estão para emergir, parte da pupa (região das asas) torna-se negra (Figura 8a e b).

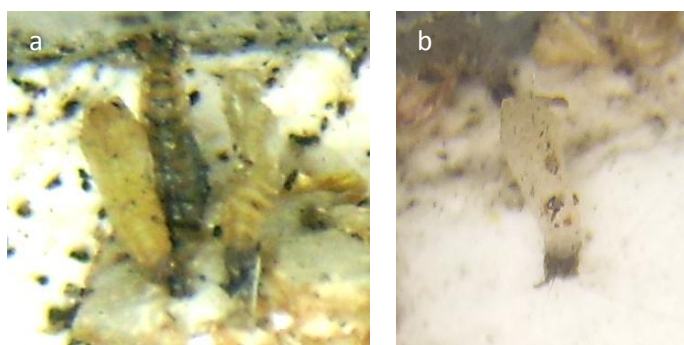


Figura 8 - (a) pupa inteira (esquerda), pupa pronta para a emergência do adulto (centro) e pupa vazia (direita); (b) pupa recém-formada.

Quando há pouca emergência de adultos em um recipiente de criação que apresenta apenas pupas, verificar a quantidade de pupas ali inteiras. Vale à pena retirar essas pupas, com o auxílio do estilete de ponta curva, e passar para outro recipiente de criação (de mesma geração) onde há mais pupas e larvas.

Este procedimento permite a economia de tempo e a diminuição de recipientes de criação que precisam ser visualizados rotineiramente.

### **Emergência dos adultos**

É sexta-feira e a colônia está sendo cuidada da maneira rotineira, porém, se há o aparecimento de uma pupa com a região das asas enegrecida, algodão com solução açucarada deve ser colocado sob o tecido “voil”. O adulto emergirá no mesmo dia ou no dia seguinte. A solução açucarada fornecerá alimento para os insetos adultos que emergirão no fim de semana.

Não há necessidade de oferecer solução para os adultos que emergiram durante a semana e que ainda estão nos recipientes de criação, pois estes serão retirados e passados para gaiolas. Por aproximadamente 24 horas os adultos não se alimentam de solução açucarada, pois seu aparelho bucal ainda não está rígido suficiente.

Os insetos devem ser colocados em gaiolas diferentes de acordo com o dia que nascem. Não se esquecer de oferecer a solução açucarada, colocar a placa

de petri com algodão encharcado com água e anotar a data, além do saco plástico transparente envolvendo as gaiolas.

Após cinco dias do nascimento, os adultos estão prontos para a realização de experimentos ou de alimentação sanguínea. Julgamos ser no 5º ao 7º dias após o nascimento as melhores datas para a realização destas tarefas. Após este período as fêmeas ficam relutantes a se alimentar.

### **Higienização dos recipientes de criação**

Para higienizar os recipientes de criação já usados, basta passar um pincel de ponta chata para retirar a sujeira (Figura 9) e com o auxílio de uma bucha macia, esfregar suavemente a superfície do gesso. Deixe secar e está pronto para uso.

Não há necessidade de deixar o gesso totalmente limpo, uma vez que a matéria orgânica serve como atrativo para as fêmeas oviporem.



Figura 9 - Pincéis de ponta chata utilizados na limpeza de recipientes de criação.

### **Higienização das gaiolas, tecido “voil” e placas de petri**

Como dito anteriormente, tecido “voil” adquire fungos. Para a higienização dos tecidos que recobrem os recipientes e higienização das gaiolas colocá-los em um balde com água e adicionar água sanitária em pequena quantidade. Observar após 1 hora se as manchas negras dos fungos desapareceram. Após o desaparecimento das manchas, lavar cuidadosamente peça por peça, com água abundante. Notar se há cheiro do produto, se sim nova lavagem com água deve ser feita. Deixar secar no ambiente ou em estufa.

As placas de petri que estão dentro das gaiolas devem ser lavadas e o algodão deve ser trocado pelo menos uma vez por semana. As placas podem ser colocadas no mesmo balde que as gaiolas e água sanitária. Isso evita a proliferação de mais fungos.

## Ácaros e formigas

Ácaros são recorrentes na colônia de flebotomíneos. Observar o comportamento desses acarinos, pois podem estar ali presentes apenas para se alimentar de insetos mortos ou da dieta das larvas.

Em nossa colônia é comum encontrarmos um ácaro de corpo ovalado e cor alaranjada (Figura 10a), de movimentação não muito rápida. Esse ácaro não faz mal aos flebotomíneos e sua densidade na colônia não altera em nada o nosso cotidiano. Já encontramos ácaros de cor esbranquiçada e com corpo com mais irregular, muito ágeis (Figura 10b), porém seu interesse estava também na dieta das larvas.

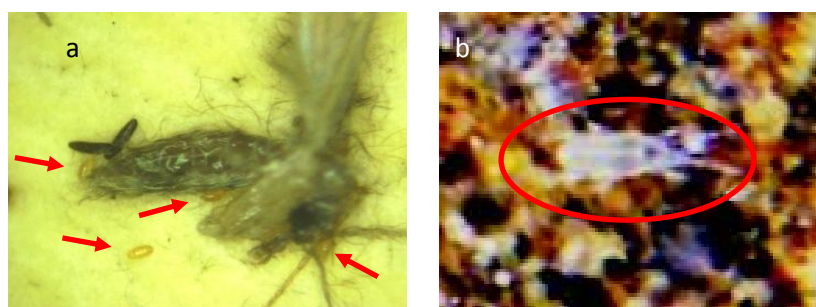


Figura 10 – (a) Ácaros de cor alaranjada se alimentando de inseto morto, (b) ácaro de cor esbranquiçada e alimentando da dieta das larvas.

Encontrar formigas em seu laboratório é um problema bem inoportuno. Elas conseguem entrar nos recipientes de criação, nas gaiolas e em qualquer experimento que esteja acontecendo. Atacam as larvas e adultos, causando uma grande perda na colônia. Obtivemos melhores resultados na eliminação das formigas com o inseticida da marca Formitek Gel<sup>®</sup>. Verificar todos os dias como está o aparecimento desses insetos na colônia.



## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

GHOSH KN, MUKHOPADHYAY J (1998) The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **International Journal for Parasitology**. 28: 275-281.

RESEARCH

Open Access



# Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)

Thais Marchi Goulart<sup>1</sup>, Camila Feitosa de Castro<sup>2</sup>, Vicente Estevam Machado<sup>2</sup>, Flávia Benini da Rocha Silva<sup>2</sup> and Mara Cristina Pinto<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Background:** The most critical phase in sand fly colonization is the high mortality in the larval instars. In this study, we sought out strategies for improving the colonization of *Nyssomyia neivai*, one of the vectors of cutaneous leishmaniasis agent in South America.

**Methods:** A colony of *Ny. neivai* was established in the laboratory from a field population, and the productivity of adults was evaluated considering carrying capacity, diet for larvae and surface for oviposition.

**Results:** The highest emergency rate of adults was achieved with the fewest couples inside 150 mL rearing chambers on a sterilized diet made of rabbit feces, rabbit food, soil and fish food and with vermiculite as a substrate for oviposition and the development of larvae.

**Conclusion:** Our data on *Ny. neivai* colonization showed that the best adult productivities were achieved with fewer couples inside the rearing chambers; smaller rearing containers of 150 mL (due to less fungi growth); sterilized diet made of rabbit feces, rabbit food, soil and fish food; and vermiculite as the substrate for oviposition and development of larvae.

**Keywords:** Sand flies, Phlebotomine, Immature stages, Larval diet, *Nyssomyia neivai*, Substrates, Sterilized diet

## Background

Colonies of insect vectors are suitable for a wide range of investigations, from basic biological aspects to applied research. Despite the importance of laboratory colonies of the vectors of leishmaniasis agent, the difficulty in providing the specific requirements of the more than 900 sand fly species [1] explain why less than 60 species have been successfully reared in the laboratory [2]. The main problem in rearing sand flies is the high mortality during the immature phases. Sand fly larvae are detritivores, and the conventional diet for larvae in laboratory colonies consists of a variety of substrates that are mainly rich in fungal, bacterial and plant material [3]. Although some studies have focused on diets for sand fly larvae, there is not a universal recipe for all species. There

have been discussions on whether the different alimentary requirements of phlebotomine larva can contribute to reducing the competition among sand fly species under natural conditions [4].

*Nyssomyia neivai* is incriminated as one of the vector of cutaneous leishmaniasis agents in South America [5–8].

The aim of this research was to evaluate the carrying capacity, attraction of the immature stages of *Ny. neivai* to different diets, survival of the larvae on distinct diets and different rearing surfaces.

## Methods

### Collection and maintenance of sand flies

Sand flies were collected in Santa Eudóxia, São Paulo state - Brazil (along the edges of the Mogi Guaçu River) on the wall of a house, using a manual aspirator between 18:00 and 23:00 h. In the laboratory, the sand flies were maintained in cages covered with voile (30x30x30 cm) at  $26 \pm 1$  °C, 80–90 % humidity, and a

\* Correspondence: marap@fcar.unesp.br

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP 14801-902, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

12:12 (L:D) photoperiod. The sand flies had access to a piece of cotton soaked in a 30 % sucrose solution. The non-bloodfed field-collected females were exposed to BALB/c mice as a blood source. The bloodfed females were individually transferred to vials to oviposition. After oviposition, sand flies were clarified and identified under an optical microscope following the identification key by Galati [9]. *Ny. neivai* eggs were placed in a 150 mL polystyrene container filled with 2 cm of plaster of Paris on its bottom (oviposition container). The following experiments were carried out in oviposition containers that were kept in the dark at  $26 \pm 1$  °C, 80–90 % humidity.

#### ***Ny. neivai* carrying capacity in rearing containers of different sizes**

Groups of bloodfed females and an equal number of males were selected and transferred to 250 mL and 150 mL polystyrene oviposition chambers. Pairs of male and female sand flies were placed in 250 mL containers in groups of 5, 10, 15, 20, 25 and 30. For the 150 mL containers, 5, 10 and 15 bloodfed females were placed to verify the carrying capacity. The experiments were repeated four times. The chambers were observed daily to check the humidity levels, the mortality of gravid females and the number of eggs. The sucrose solution was changed daily. At the end of the experiments, the productivity of adults was evaluated for each group.

#### **Attractiveness of different diets for *Ny. neivai* larvae**

In the laboratory, we use diets made of rabbit feces, rabbit food from Evalis®, fish food from Alcon® Colours and soil (modified from a personal communication with José Carlos Miranda). We tried other combinations to evaluate their attractiveness for larvae.

Fifty eggs of *Ny. neivai* were placed in the center of a 250 mL plastic container. The lining of plaster of Paris in the container bottom was divided into four quadrants, and over each of them a specific diet was added on 7<sup>th</sup> day after oviposition: diet 1 (traditional diet - used in routine rearing of sand flies), diet 2 (rabbit feces and soil), diet 3 (rabbit feces, soil and fish food) and diet 4 (soil and mud – Barretto, 1942). The number of larvae on each quadrant was observed and counted daily until the pupal phase. The experiments were repeated four times.

Diet preparation: rabbit feces were collected from the Veterinary Institute of Universidade de São Paulo (USP) and dried by solar heat for 3 days. The feces, rabbit food, fish food and soil were triturated and sieved through 0.297 mm, 0.125 mm and 0.074 mm meshes. All of the components, except the fish food, were sterilized in an autoclave.

#### **Attractiveness and development of *Ny. neivai* larvae on two different diets**

One hundred eggs were placed in the center of each container (250 mL). The plaster of Paris was divided into four quadrants, and over each one, of the two different diets was added: diet 1 (rabbit feces, rabbit food, fish food and soil) and diet 2 (multimixture flour - a food supplement for pregnant women and children to combat malnutrition - containing rice and wheat bran, wheat flour, corn meal, sesame, soybean, linseed, *Moringa oleifera* leaves, sunflower or pumpkin seeds and cassava leaf powder). Neighbouring quadrants received different diets. The number of larvae on each quadrant was observed and counted daily until the pupal phase.

To analyse which diet was better for the development of the insects, each diet was added in different containers with 100 eggs each. The diet was added according to the needs of the larvae in different instars. Both experiments were repeated four times.

#### **Development of immature stages on non-sterilized and sterilized diets**

One hundred eggs were placed in the center of clean containers (150 mL) and Diet 1 (rabbit feces, rabbit food, fish food and soil) was added daily in the following way: non-sterilized and sterilized (by autoclave or tyndallization). The tests were carried out until the adult phase and were replicated five times.

#### **Evaluation of different substrates for rearing the colony**

The substrates that were evaluated individually were plaster of Paris and plaster with a fine layer of vermiculite over it. Five engorged females and five males were placed in the oviposition containers (150 mL). A piece of plaster of Paris was put in the center of the container and used as resting spot. A piece of cotton soaked in a 30 % sucrose solution was offered to the couples. Emerged adults were counted, and the results were analysed. The experiments were repeated 10 times.

#### **Statistical analysis**

Data were analysed by Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's tests or t-tests performed using GraphPad Prism version 5.00.

#### **Ethical approval**

This study was carried out in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation, approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments at State University of Campinas (Protocol number 2951–1).

## Results

### *Ny. neivai* carrying capacity in rearing containers of different sizes

The female mortality before oviposition was random and was not dependent on the number of couples in the containers (data not shown). The mean number of eggs per female varied between the different sizes of the rearing containers. For the smallest containers (150 mL), five couples presented the highest mean number of eggs per female (67.2 eggs;  $p < 0.05$ ). For the largest containers (250 mL), there was no statistical difference among the number of couples in the pots (from 47.1 to 56.5 eggs;  $p > 0.05$ ) (Table 1).

The number of adults emerged was negatively correlated with the number of eggs per rearing container. Adult emergency rates were over 50 % in the 250 mL containers that contained approximately 400 eggs. For 150 mL containers, the emergency rates were 30 % (around 600 eggs per pot). The best results for both the smaller and larger containers were seen with five to ten insect couples (Fig. 1).

### Attractiveness of different diets to *Ny. neivai* larvae

According to the results, the most attractive larval food was diet 1, followed by diet 3 (Fig. 2). Both diets contained fish food. Differences were significant among the four diets ( $p < 0.05$ ), but there were no significant differences between diets 1 and 3 ( $p > 0.05$ ) or 2 and 4 ( $p > 0.05$ ). The presence of fish food appears to be an important factor in the attractiveness of a diet to the larval instars of *Ny. neivai*.

### Attractiveness and development of *Ny. neivai* larvae on two different diets

The number of larvae on diet 1 (traditional) was higher than on the multimixture ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

The productivity of adults was much higher on diet 1 (164 adults; 41 %) than on the multimixture (19; 9.5 %) ( $p > 0.05$ ).

**Table 1** Mean number of eggs per females and standard error in rearing chambers of 150 mL (5, 10 and 15 couples) and 250 mL (5, 10, 15, 20, 25, 30 couples)

| Containers | Number of couples per chamber |                 |                 |                 |                 |               |
|------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
|            | 5                             | 10              | 15              | 20              | 25              | 30            |
| 150 mL     | 67.2a<br>(±5.2)               | 44.4b<br>(±4.4) | 41.6b<br>(±4.6) | -               | -               | -             |
| 250 mL     | 47.1a<br>(±10.6)              | 50.5a<br>(±3.3) | 51a<br>(±2.0)   | 51.1a<br>(±6.4) | 56.5a<br>(±3.9) | 51a<br>(±5.5) |

Means with different letters on the same line are significantly different ( $P < 0.05$ )

### Development of immature stages on non-sterilized and sterilized diets

There were no significant differences among the treatments ( $p > 0.05$ ). However, the means were higher with both of the sterilized methods, autoclave (46.7 insects) and tyndallization (47.8 insects), compared to only 38.4 insects in the non-autoclaved diet (Fig. 4).

### Evaluation of different substrates for rearing the colony

There was a significant difference between the plaster of Paris and the vermiculite ( $p < 0.05$ ). The mean emergence of adults on the vermiculite was 690 insects, compared to 428 insects on the plaster of Paris (Fig. 5).

## Discussion

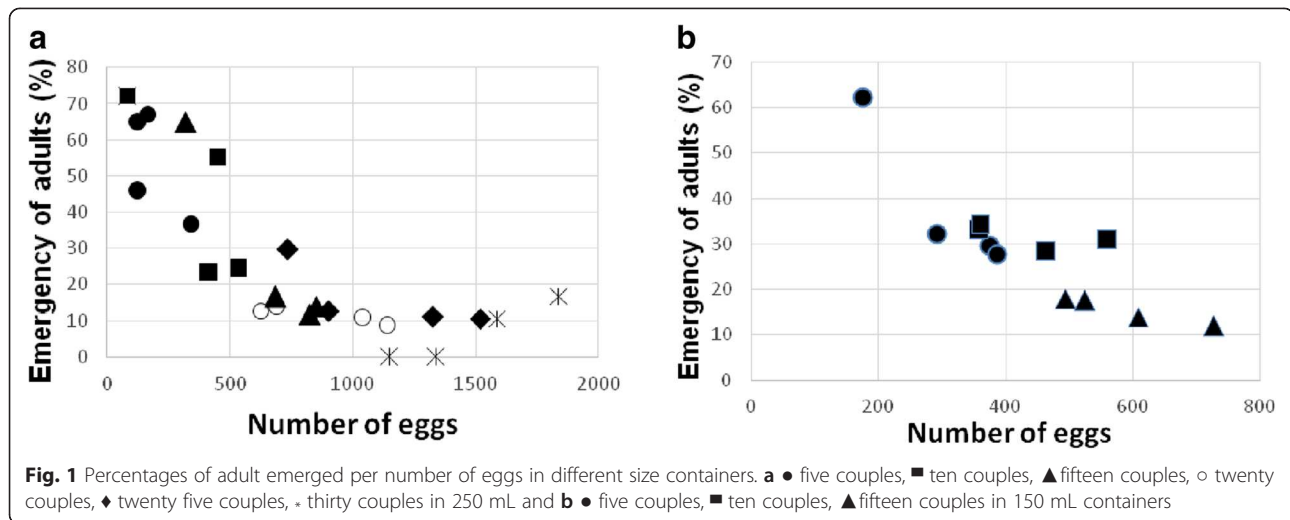
Rearing sand fly colonies in the laboratory provides the opportunity to improve the techniques for obtaining a large number of insects for basic or applied studies. Many aspects of the rearing process need to be considered for the success of a laboratory colony, such as carrying capacity, the right conditions for the immature stages, diet and substrate.

The concept of evaluating carrying capacity consists of determining the ideal number of individuals for a specific environmental condition [10, 11].

The maximum number of couples used in this work was 30, and with that number, the density of couples did not affect the mortality of females prior to oviposition. For *Ny. neivai*, our results showed that the carrying capacity was between five and ten couples for both sizes of containers (150 and 250 mL), where the highest number of adults were achieved.

Santamaría et al. studied the carrying capacity of *Pintomyia serrana* and verified that the density of flies negatively affected the survival of the females prior to oviposition [11]. However, those authors worked with 1 to 50 couples, which is more than the number of pairs used in our experiments. Their best productivity was with 22 females per container. Under those conditions, female mortality was low and the numbers of eggs and adults emerged were the highest. Apart from the different experimental conditions between the studies, it is probable that other specific characteristics could be involved.

A previous study with a colony of *Ny. neivai* showed a rate of adults emerged of 20.7 % [12]. Our results showed that a lower number of couples inside the rearing container produced a higher number of adults (Fig. 1). This could be explained by the intraspecific competition for food and space among the larvae. When the container is too crowded, the larvae climb the walls and end up dying of dehydration. The same behaviour was observed by Hertig & Johnson, who called this phenomenon a “suicidal mass migration”



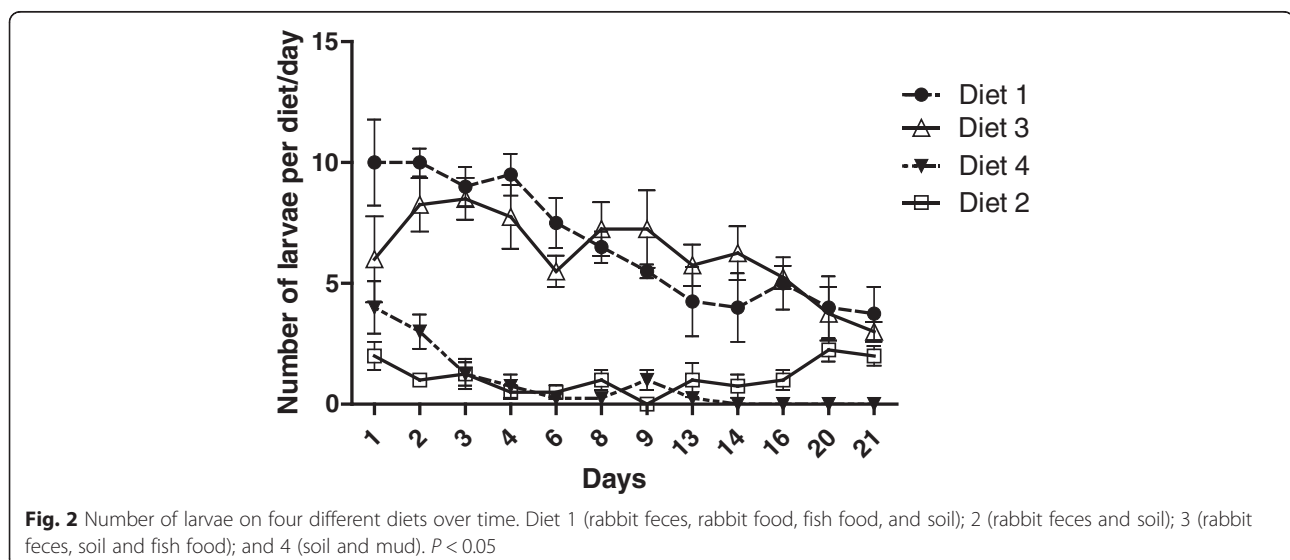
[13]. Experiments with *Culex sitiens* showed that when subjected to overcrowding, the larvae compete for space to feed, increasing their mortality [14].

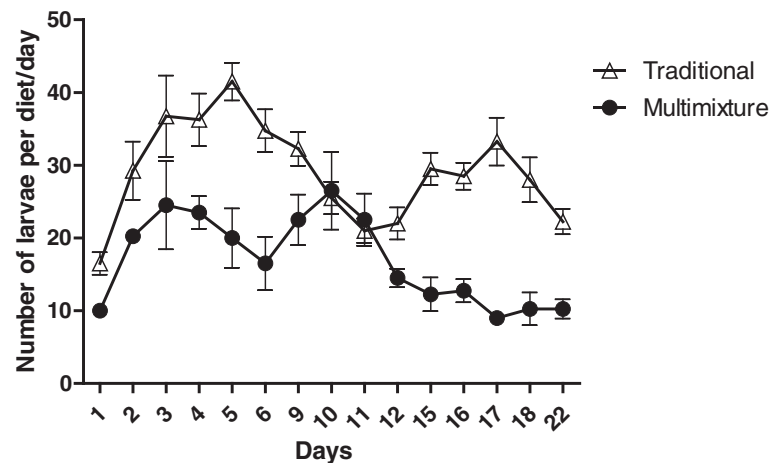
Many authors have been studying diets for the immature stages of different sand fly species. A mixture of aged rabbit feces and rabbit food was used to rear *Lutzomyia cruciata*, *Dampfomyia anthophora*, *Psathyromyia shannoni*, and *Micropygomyia vexator* under laboratory conditions. This diet was successful in reducing the growth of fungi [15]. Some modifications of this diet have been used in many sand fly colonies: *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus duboscqi*, *Lutzomyia longipalpis* [16, 17] and *Pi. serrana* [2].

Industrialized animal food (for rabbits, dogs, hamsters and aquarium fishes) was compared with aged food for larvae of *Nyssomyia intermedia* and *Lu. longipalpis*. Both species developed very well with the aged food, but

unlike *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* also presented good results with industrialized animal food [4]. It has been suggested that variability in sand fly species dietary preferences can be important in reducing competition under natural conditions [18].

We did not use aged food in this study. Our results showed that diets that were enriched with fish food were more attractive to sand fly larvae compared to ones without this component. This observation is in agreement with the previous experiments of Rangel et al. [19], and this should be investigated in further studies on the possible attractants for larvae. In our experiments, the survival of adults was higher with traditional food (rabbit feces, rabbit food, fish food and soil) than with other diets that were made up only of plants and different grains (multimixture diet). The multimixture also presented a huge growth of fungi, which cause damage to





**Fig. 3** Number of larvae on two different diets over time. Traditional diet (rabbit feces, rabbit food, fish food, and soil) and multimixture diet (plants and grains).  $P < 0.05$

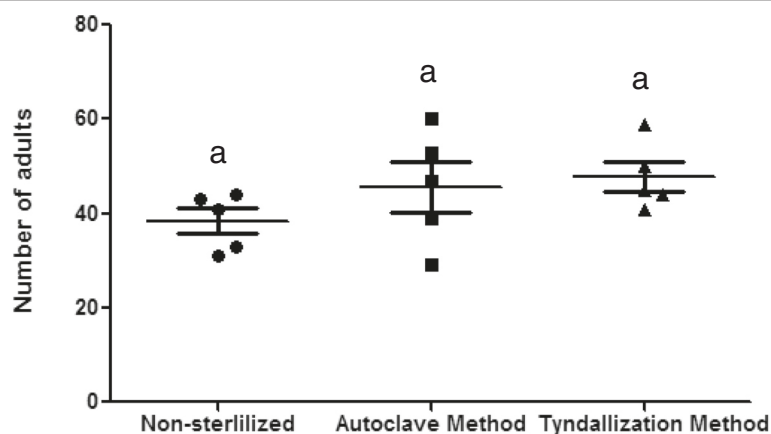
the lifecycle of the insect. The fungi that grew on the multimixture were extremely dense and had to be removed daily during the insect counting. There is a controversy surrounding the relevance of fungus in diets for sand flies. According to some authors, the fungi on the diet could be fatal to the early instar of the larvae by trapping them on fungi hyphae [13, 18, 20]. Otherwise, the fungi can be profitable for the larvae, complementing their nutrition [4].

Considering the disagreement of many authors about fungi growth on sand fly diets, we decided to compare non-sterilized and sterilized diets. Even though our results did not show a significant difference between sterilized and non-sterilized diets, the autoclave and tyndallization methods (sterilized diets) retarded fungal growth for at least three days, giving enough time for the first instar larvae to develop. Under these conditions,

the first instar larvae can grow a little more and avoid being trapped by the hyphae.

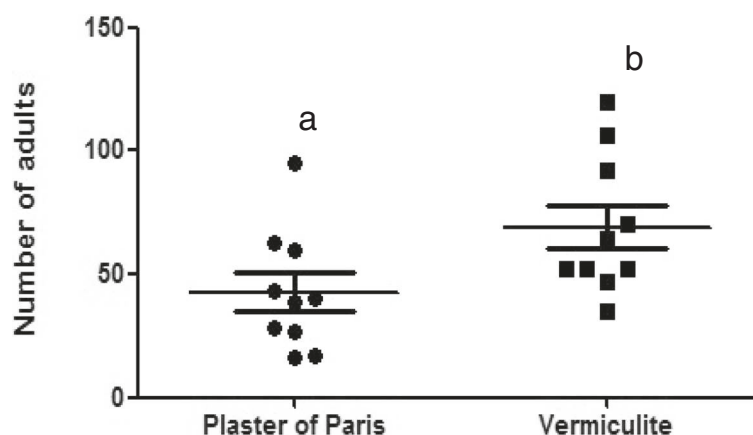
Some sand fly species of the *Phlebotomus* genus prefer non-autoclaved food, but for other species, like *Lu. longipalpis*, the food can be autoclaved [2]. We observed that the larvae of *Ny. neivai* did not refuse, in any stage, the sterilized diet, which had the advantage of a decrease in fungi growth; thus, we strongly advise the sterilization method for fungal control in *Ny. neivai* colonies.

The oviposition experiments on different substrates showed that an irregular surface (vermiculite) presented a higher productivity of adults compared to a flat surface (plaster of Paris). The gravid females were able to oviposit among vermiculite grains. The vermiculite also provided a “refuge” from the fungi hyphae among the grains for the first larval instars. Shaking the containers with grains would break the hyphae. Studies on the



**Fig. 4** Emergence of adults on non-sterilized and sterilized diets. Means with same letters are not significantly different ( $P > 0.05$ )





**Fig 5** Emergence of adults in containers with two different substrates: plaster of Paris or vermiculite. Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

physical factors showed that temperature and humidity are important factors in the oviposition behaviour of *Ny. neivai* [21, 22]. Rough and irregular substrates stimulate a thigmotropic response in gravid flies of *L. longipalpis* and *L. migonei* and also provide greater protection, higher humidity and possibly more food for newborn larvae than flat surfaces [23, 24].

## Conclusion

In conclusion, our data on *Ny. neivai* colonization showed a variable emergence rate of adults in different tests, depending on larval population density, diet and oviposition surface. The best adult productivities were achieved with fewer couples inside the rearing chambers (400–600 eggs depending on the size of the container); smaller rearing containers of 150 mL (due to less fungi growth); sterilized diet made of rabbit feces, rabbit food, soil and fish food; and vermiculite as the substrate for oviposition and development of larvae.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MP and TG conceived and executed the study and drafted the manuscript. TG, CC, VM and FS conducted field captures of sandflies and bioassay experiments. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We thank financial support of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Process 2012/23832–9) and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas at UNESP (PADC/FCFAr).

## Author details

<sup>1</sup>Departamento de Zoologia Animal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP 14801-902, Brazil.

Received: 15 June 2015 Accepted: 5 August 2015

Published online: 16 August 2015

## References

1. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:227–50.
2. Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol.* 2011;36 Suppl 1:S1–9.
3. Moraes CS, Lucena SA, Moreira BH, Brazil RP, Gontijo NF, Genta FA. Relationship between digestive enzymes and food habit of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) larvae: Characterization of carbohydrases and digestion of microorganisms. *J Insect Physiol.* 2012;58(8):1136–45.
4. Wermelinger ED, Zanuncio JC. Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different diets. *Braz J Biol.* 2001;61(3):405–8.
5. Córdoba-Lanús E, De Grosso ML, Piñero JE, Valladares B, Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 2006;98(1):1–5.
6. Casanova C, Natal D, Santos FA. Survival, population size, and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. *J Med Entomol.* 2009;46(1):42–50.
7. Marcondes CB, Bittencourt IA, Stoco PH, Eger I, Grisard EC, Steindel M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (Viannia) spp. in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(11):1093–7.
8. Brazil RP, Rodrigues AAF, Filho JDA. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol.* 2015;4:144.
9. Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, Brazil: Fiocruz; 2003.
10. Price WP. *Insect Ecology*, Second edn. USA: John Wiley & Sons, Inc; 1984.
11. Santamaría E, Munstermann LE, Ferro C. Estimating carrying capacity in a newly colonized sand fly *Lutzomyia serrana* (Diptera: Psychodidae). *J Econ Entomol.* 2002;95(1):149–54.
12. Andrade Filho JD, Galati EA, Falcão AL. Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(6):597–601.
13. Hertig M, Johnson PT. The rearing of Phlebotomus sandflies (Diptera:Psychodidae). 1 Technique. *Ann Entomol Soc Am.* 1961;54:753–66.
14. Roberts D. Overcrowding of *Culex sitiens* (Diptera: Culicidae) larvae: population regulation by chemical factors or mechanical interference. *J Med Entomol.* 1998;35(5):665–9.
15. Young DG, Perkins PV, Endris RG. A Larval diet for rearing Phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae). *J Med Entomol.* 1981;18:446.

16. Modi GB, Tesh RB. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol.* 1983;20(5):568–9.
17. Lawyer PG, Rowton ED, Perkins PV, Johnson RN, Young DG. Recent advances in laboratory mass rearing of phlebotomine sand flies. *Parassitologia.* 1991;33(Suppl):361–4.
18. Barreto MP. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera:Psychodidae). São Paulo: Universidade de São Paulo; 1942.
19. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera:Psychodidae) em condições experimentais. 1. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(4):431–8.
20. Sherlock IA, Sherlock VA. Métodos práticos para a criação de flebotomíneos em laboratório. *R Bras Biol.* 1972;32:209–17.
21. Foster WA, Tesfa-Yohannes TM, Tecle T. Studies on leishmaniasis in Ethiopia. II. Laboratory culture and biology of *Phlebotomus longipes* (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol.* 1970;64(4):403–9.
22. Chaniotis BH. Successful colonization of the sand fly *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae), with enhancement of its gonotrophic activity. *J Med Entomol.* 1986;23(2):163–6.
23. Elnaïem DA, Ward RD. The thigmotropic oviposition response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to crevices. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992;86(4):425–30.
24. Nieves E, Ribeiro A, Brazil R. Physical factors influencing the oviposition of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(6):733–7.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





### ANEXO III

## Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/Unicamp



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

### CERTIFICADO PROVISÓRIO

Certificamos que o projeto "Estudo de aspectos biológicos de Nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae) e aprimoramento das técnicas de colonização em laboratório" (protocolo nº 2951-1), sob a responsabilidade de Mara Cristina Pinto / Thais Marchi Goulart, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de dezembro de 2012. Este certificado tem vigência de um ano pela CEUA/UNICAMP. Após, não poderá mais ser validado.

Campinas, 27 de junho de 2016.

2ª. VIA

Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## ANEXO IV

**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
Presidente  
Comissão Central de Pós-Graduação  
**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo dos aspectos biológicos de Nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae) e aprimoramento das técnicas de colonização em laboratório**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 24 de Junho de 2016

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **Thais Marchi Goulart**  
RG n.º 43.574.855-5

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Mara Cristina Pinto**  
RG n.º 18.567.162