

Biologia de anofelinos amazônicos

1- Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus - Boa Vista⁽¹⁾

Joselita M. Mendes dos Santos⁽²⁾

Eucleia Primo B. Contel⁽³⁾

Warwick E. Kerr⁽⁴⁾

Resumo

Os estudos de laboratório sobre a biologia de *A. darlingi* demonstraram que o ciclo biológico de ovo a adulto se faz, em média, em 15,6 dias e com uma taxa de sobrevivência de 57% quando criados de 25 a 28°C. O número médio de ovos por postura foi de $110 \pm 50,61$ e eclodiram em média $83,31 \pm 48,21$, com um tempo médio para eclosão de dois dias. O tempo de desenvolvimento de cada estádio imaturo apresentou variações. O 2.º e 3.º estádios larvais apresentaram um tempo de desenvolvimento menor do que o 1.º e 4.º estádios.

INTRODUÇÃO

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi é considerado o principal vetor da malária humana, sendo responsável pela sua transmissão em todo interior do País (Rachou, 1958; Ferreira, 1964). Alguns estudos foram feitos sobre a criação e manutenção desta espécie em laboratório, mas até o momento não foram bem sucedidos (Barreto & Coutinho, 1943; Bates, 1947; Freire & Faria, 1947). Quando esta colonização for obtida em laboratório, aumentará as possibilidades de estudo do comportamento e da constituição genética dessas populações.

Zulueta & Bates (1948) estudaram o comportamento de oviposição de *Anopheles darlingi* e verificaram que fatores físicos como orientação espacial, luz e obstáculos são de grande importância na seleção do local de oviposição no laboratório. A dinâmica de uma população desta espécie, durante um ciclo anual foi estudada por Hayes & Charlwood (1979) numa área endêmica de malária no Amazonas, obser-

vando um aumento da população e maior incidência de malária na estação seca. *A. darlingi* apresenta diferenças comportamentais em diferentes áreas, sendo possivelmente resultantes de variações genéticas interpopulacionais (Charlwood & Hayes, 1978).

Este trabalho visa a estabelecer o tempo de desenvolvimento de cada um dos estádios imaturos de *Anopheles darlingi*, bem como determinar o grau de fertilidade das fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Na execução deste trabalho, utilizamos a espécie *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* proveniente dos Km 137 e Km 182 da BR 174 (Estrada Manaus-Boa Vista, Fig. 1).

Na identificação do material, foram utilizadas concomitantemente as chaves sistemáticas de Corrêa & Ramalho, 1957 (*apud* Resende, 1969) de Gorham *et al.* (1967) e de Cova-Garcia (1961).

As coletas foram feitas mensalmente de setembro de 1977 a setembro de 1978, no período noturno, entre 18 e 24 horas, nas residências e em plantas ao redor das casas. Os mosquitos eram localizados com o auxílio de uma lanterna, capturados com um aspirador e transferidos para uma gaiola telada com cerca de 20X20 cm, na qual eram trazidos para o laboratório.

O método de criação de anofelinos em laboratório foi baseado em Freire & Faria (1947),

(1) — Parte da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor em 1979 ao Curso de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade do Amazonas.

(2) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

(3) — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP.

(4) — Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

Durante a manutenção desses mosquitos, foram feitas observações diárias, a fim de estabelecer-se o tempo de desenvolvimento de cada estágio imaturo através das ecdises. Para isso, foram retiradas 10 larvas de 1º estágio recentemente eclodidas de 10 posturas (total de 100 larvas) as quais foram colocadas individualmente nos copos com tampas de plástico contendo água destilada e alimentadas como já foi descrito.

Toda a criação dos anofelinos foi realizada no interior de um insectário medindo 3x3x3m, com temperatura variando entre 25 e 28°C.

RESULTADOS

De acordo com Boyd *et al.* (1935) citados em Barreto & Coutinho (1943), dois fatores são de grande importância para o desenvolvimento das larvas: fornecimento de alimentação abundante e manutenção da temperatura a nível constante e ótimo, sendo que o primeiro é de importância vital.

Partindo dessa premissa, procuramos adaptar esses dois fatores às melhores condições para o desenvolvimento dos anofelinos; entretanto, os resultados obtidos quando se usou o alimento feito com uma mistura de pó de fígado, ração de coelho e extrato de levedura, não foram animadores, em virtude da contaminação por fungos que atacavam as larvas, principalmente nos dois últimos estádios. Quando as larvas empupavam, não havia a emergência total dos adultos, que ficavam presos à exúvia pupal como acontece, por exemplo, quando a alimentação é imprópria (Freire & Faria, 1974). O mesmo aconteceu quando se usaram esses ingredientes individualmente. Empregando o alimento que se apresentou mais apropriado (descrito em Material e Métodos), a evolução de *A. darlingi*, de ovo até adulto se fez, em média, em 15,6 dias (Tab. I).

Das 229 posturas obtidas em laboratório resultaram num total de 25.214 ovos, sendo que houve uma variação de 10 a 246 ovos por fêmea, com uma média de 110 ovos (DP=50,6) por fêmea (Fig. 2). Na tabela II, pode verificar-se que houve um grande número de fêmeas (33) que botaram uma quantidade de ovos próxima à média de ovos/postura. Pode ainda ser

TABELA I — Tempo (dias) de emergência de adulto após a oviposição, com as respectivas freqüências absoluta e relativa, de *Anopheles darlingi*, em condições experimentais

Duração em dias	Número de observações	%
11	1	1,75
12	6	10,52
13	6	10,52
14	8	14,03
15	11	19,29
16	10	17,54
17	5	8,77
18	2	3,50
19	1	1,75
20	3	5,26
21	2	3,50
22	0	—
23	1	1,75
24	0	—
25	1	1,75
Total	57	100,00

\bar{x} = 15,6 dias
DP = 2,86 "

observado, através da mesma tabela, que a freqüência de fêmeas que puseram mais de 180 e menos de 40 ovos diminui abruptamente em relação aos outros intervalos situados entre esses.

Observou-se também que o número de ovos eclodidos por postura teve ampla variação (de 0 a 218 ovos), com uma média de tempo de eclosão dos ovos aproximadamente de 2 dias. Do total de ovos postos (25.214), 6.136 (24,34%) não eclodiram, ou seja, a taxa de eclosão foi de 75,66% (Tab. III).

Comparando-se os resultados da oviposição apresentados nas tabelas 2 e 4, verifica-se que as médias estão relativamente próximas (110 e 83,31 respectivamente) o que indica uma boa fertilidade dos ovos. Na tabela III, pode notar-se ainda que o maior número de ovos eclodidos (13.226) foi obtido dois dias após a oviposição.

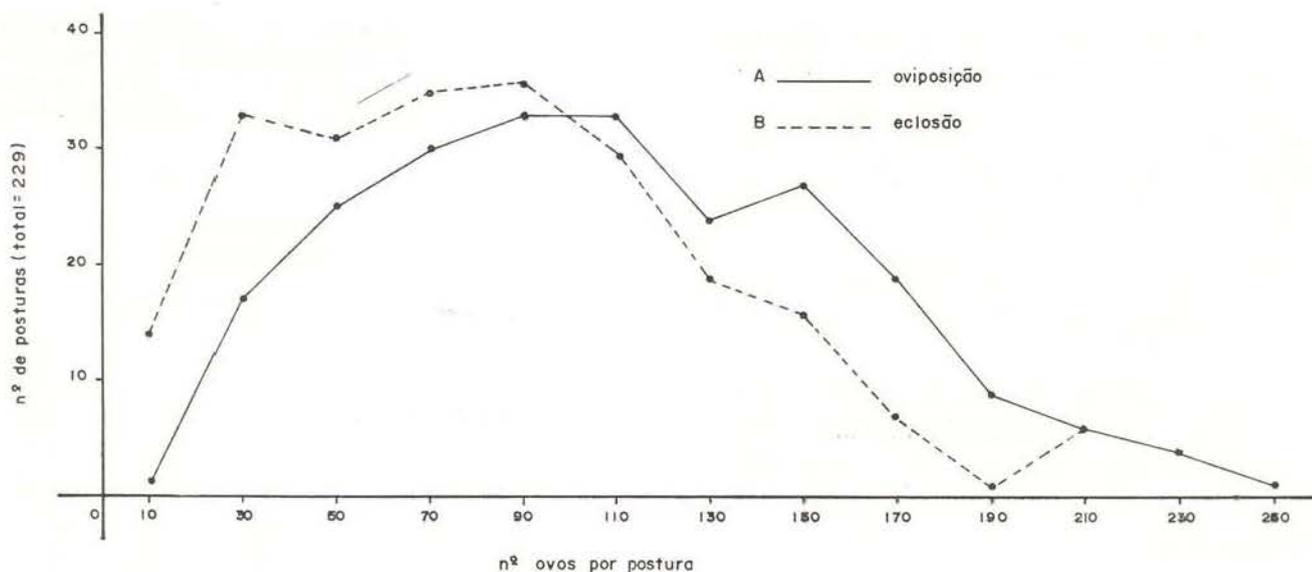


Fig. 2 — Frequências absolutas do número de ovos postos e eclodidos por postura de *Anopheles darlingi*, em laboratório.

TABELA II — Frequências absoluta e relativa do número de ovos postos por postura de *Anopheles darlingi*, em laboratório.

Ovos postos	N.º de posturas	
	n.º	%
1 — 20	1	0,44
21 — 40	17	7,42
41 — 60	25	0,92
61 — 80	30	13,10
81 — 100	33	14,41
101 — 120	33	14,41
121 — 140	24	10,48
141 — 160	27	11,79
161 — 180	19	8,30
181 — 200	9	3,93
201 — 220	6	2,62
221 — 240	4	1,75
241 — 260	1	0,47
T O T A L	229	100,00

\bar{x} = 110 ovos por postura
 DP = 50,61
 N = 229 posturas
 Postura mínima — 10 ovos
 Postura máxima — 246 ovos

TABELA III — Tempo (dias) gastos para a eclosão, número de ovos postos e eclodidos por postura, com as respectivas frequências relativas, de *Anopheles darlingi*, em laboratório

Dias após a oviposição	Número de ovos			
	não eclodidos		eclodidos	
	n.º	%	n.º	%
0	25.214	100,00	0	0
1	22.581	89,56	2.633	10,44
2	9.355	37,10	13.226	52,45
3	6.389	25,34	2.966	11,76
4	6.136	24,34	253	1,01
Total	6.136	24,34	19.078	75,66

\bar{x} — 2,04 dias

Essas mesmas observações foram feitas, a partir de 100 ovos provenientes de 10 posturas e observou-se que o tempo para a eclosão dos ovos foi de 2 a 3 dias, com uma média de 2,4 dias. O tempo de desenvolvimento de cada estágio apresentou variações, verificando-se que o 1º estágio sofreu variação pequena: 2 a 4 dias, apesar da duração média alta (2,9 dias) em relação aos outros estádios larvais. O 2º

TABELA IV — Frequência do número de ovos eclodidos por postura de *Anopheles darlingi*, no laboratório

Ovos eclodidos	N.º de posturas	
	n.º	%
0 — 20	15	6,55
21 — 40	33	14,41
41 — 60	31	13,54
61 — 80	35	15,28
81 — 100	36	15,72
101 — 120	30	13,10
121 — 140	19	8,30
141 — 160	16	6,99
161 — 180	7	3,06
181 — 200	1	0,44
201 — 220	6	2,62
T O T A L	229	100,00

\bar{x} = 83,31 ovos eclodidos por postura

DP = 48,21 "

N = 229 posturas

Eclusão mínima — 0 ovo

Eclusão máxima — 218 ovos

e 3º estádios apresentaram variação intermediária, com duração média semelhante (1,9 e 2,2, respectivamente). A fase de pupa teve duração baixa (1 a 3 dias) sendo que a duração média desse estágio foi de 1,8 dias (Tab. V).

Comparando-se estes resultados com os apresentados na tabela 6 (considerando-se apenas os 57 indivíduos que sobreviveram até à fase adulta, dos 100 ovos iniciais) verifica-se que não houve diferença significativa quanto ao tempo de desenvolvimento das diferentes fases.

Os resultados da tabela VI mostram o tempo de aparecimento e término de cada estágio de desenvolvimento, com os respectivos graus de mortalidade. A taxa de mortalidade foi de 43, sendo que as porcentagens mais altas (39,53 e 37,21) foram observadas nas fases de pupa e larva de 4º estágio, respectivamente. Larvas de 1º estágio apresentaram taxa de mortalidade nula e esta foi muito baixa no 2º e 3º estádios.

O tempo máximo de desenvolvimento de *A. darlingi*, de ovo adulto, foi de 25 dias e o mínimo de 11 dias, com uma média de 15,6 dias (Tab. I a VII).

TABELA V — Número de indivíduos observados e o tempo de desenvolvimento, em cada uma das fases, de ovo a adulto, sob condições experimentais *

Estádio	Tempo de desenvolvimento (dias)														Total de observações	\bar{x}	DP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Ovo — Eclusão	—	60	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	2,40	± 0,49
I — II	—	14	77	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	2,95	± 0,48
II — III	29	50	12	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	93	1,90	± 0,72
III — IV	13	54	17	4	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	90	2,20	± 0,87
IV — Pupa	—	1	11	16	12	14	6	4	3	2	1	2	1	1	74	5,80	± 2,56
Pupa — Adulto	11	45	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	57	1,80	± 0,43

(*) — Levando-se em consideração os indivíduos mortos (43) e sobreviventes (57).

I - IV: estádios larvais.

TABELA VI — Número de indivíduos observados e tempo de desenvolvimento em cada uma das fases, de ovo a adulto, estudados em condições experimentais *

Estádio	Tempo de desenvolvimento (dias)												\bar{x}	DP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Ovo — Eclosão	—	43	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,25	± 0,44
I — II	—	14	37	6	—	—	—	—	—	—	—	—	2,86	± 0,58
II — III	23	29	4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1,70	± 0,68
III — IV	11	34	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,02	± 0,64
IV — Pupa	—	1	11	16	12	9	3	1	2	1	—	1	4,95	± 1,91
Pupa — Adulto	11	45	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,82	± 0,43

(*) — Levando-se em consideração apenas o número de indivíduos sobreviventes (57).

I - IV : estádios larvais.

Resumindo os resultados em relação ao tempo de desenvolvimento, em que se consideraram todos os 100 indivíduos amostrados e somente 57 que sobreviveram até à fase adulta, encontramos as seguintes médias, respectivamente.

Incubação dos ovos	2,40 — 2,25 dias
1º estágio larval	2,95 — 2,86 dias
2º estágio larval	1,90 — 1,70 dias
3º estágio larval	2,20 — 2,02 dias
4º estágio larval	5,80 — 4,95 dias
Período pupal	1,82 — 1,80 dias
TOTAL	17,00 — 15,60 dias

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em condições de laboratório, obtivemos uma média de duração do ciclo de vida de *A. darlingi* de 15,6 dias e taxa de sobrevivência até adulto de 57%. Os nossos resultados diferem dos apresentados por Freire & Faria (1947) que obtiveram um rendimento de 91% de adultos de *A. darlingi* e um período de desenvolvimento de ovo a adulto de 10 dias. Resultado semelhante a esse último foi obtido em *A. albimanus* por Baily *et al.* (1979). Entretanto, os nossos assemelham-se aos de Barreto & Coutinho (1943) que demonstraram uma taxa

de sobrevivência até adulto de 64,6% e um período de evolução de ovo a adulto de cerca de 16 dias. Das quatro espécies do subgênero *Nyssorrhynchus* estudadas por esses autores, *A. darlingi* apresentou menor taxa de sobrevivência e mais longo ciclo evolutivo. Paraluppi (1978) estudando *A. nuneztovari*, obteve uma duração do ciclo evolutivo de 11,9 dias.

Os resultados apresentados parecem indicar que *A. darlingi* se cria com dificuldade em condições experimentais. É possível que haja algum fator influenciando no desenvolvimento ou talvez, as condições no nosso laboratório não são propícias à sua criação.

A grande variação observada quanto ao número de ovos postos (10 a 246) e eclodidos (0 a 218) por postura de *A. darlingi*, foi semelhante à demonstrada em *A. nuneztovari* (Paraluppi 1978) e *Culex tritaenorrhynchus* (Newson & Blakeslee, 1957).

Um período de 48 horas para incubação dos ovos é considerado normal nos anofelinos (Rachou, 1950) embora esse mesmo autor trabalhando com anofelinos do subgênero *Kerteszia*, no Estado de Santa Catarina, observou demoras de 2 até 18 dias para a eclosão dos ovos de *A. cruzi*. Resultados semelhantes foram encontrados em *A. culicifacies* onde Ains-

TABELA VII — Tempo (dias) de aparecimento, término e freqüências absolutas dos estádios imaturos, em relação ao período de oviposição e grau de mortalidade de *Anopheles darlingi*, em condições experimentais

Dias após a oviposição	Ovos	Estádios Larvais				Pupa	Adulto	Mortalidade
		I	II	III	IV			
1	100	—	—	—	—	—	—	—
2	40	60	—	—	—	—	—	—
3	—	100	—	—	—	—	—	—
4	—	87	13	—	—	—	—	—
5	—	40	58	2	—	—	—	—
6	—	7	60	32	—	—	—	1 (II)
7	—	—	32	55	7	—	—	5 (II)
8	—	—	11	46	35	—	—	1(II);1(III)
9	—	—	6	33	50	—	—	3 (IV)
10	—	—	—	16	66	4	—	2(III);1 (IV)
11	—	—	—	9	62	9	1	5 (IV)
12	—	—	—	4	54	14	7	2 (IV)
13	—	—	—	1	46	16	13	3 (IV)
14	—	—	—	1	31	22	21	1 (IV)
15	—	—	—	1	25	17	31	1 (pupa)
16	—	—	—	—	19	12	42	1 (pupa)
17	—	—	—	—	15	5	47	1(IV);5 (pupa)
18	—	—	—	—	12	4	49	2 (pupa)
19	—	—	—	—	8	6	50	1 (pupa)
20	—	—	—	—	6	4	53	1 (pupa)
21	—	—	—	—	4	2	55	2 (pupa)
22	—	—	—	—	2	3	55	1 (pupa)
23	—	—	—	—	—	2	56	2 (pupa)
24	—	—	—	—	—	1	56	1 (pupa)
25	—	—	—	—	—	—	57	—
% Mortalidade	—	—	16,28	6,98	37,21	39,53	—	43
% Sobrevivência	100	100	83,72	93,02	62,79	60,47	—	57
TOTAL	100	100	100	100	100	100	—	100

ley (1976) observou um período de 36 a 48 horas para a eclosão dos ovos, com uma taxa de 90%. O mesmo foi observado por Paraluppi (1978) para as primeiras eclosões dos ovos de *A. nuneztovari*. Desta forma, a duração de 1 a 4 dias (média de 2 dias) para a eclosão dos ovos parece estar dentro do esperado.

Os nossos resultados se assemelham, também, aos obtidos por Baily *et al.* (1979) em *A. albimanus*, sendo que estes obtiveram uma taxa de eclosão dos ovos mais elevada, alcançando 96%. Portanto, pode considerar-se que fêmeas de *A. darlingi* apresentam um grau de fertilidade relativamente alto, visto que a porcentagem de eclosão dos ovos foi de 75,66%.

A duração dos diferentes estádios larvais de *A. darlingi* não é a mesma. Sem levar em consideração as variações específicas, pode dizer-se que o 2º e 3º estádios apresentam um tempo de desenvolvimento menor do que o 1º e 4º estádios, sendo este último mais longo. Resultados semelhantes foram descritos para *Aedes aegypti* (Christophers, 1960) e para outros culicídeos (Forattini, 1962). É possível que o prolongamento do 4º estádio se deva, em grande parte, às transformações teciduais e morfológicas, acompanhadas de mudanças nos níveis de hormônios destinados à formação do futuro adulto.

Segundo Arias & Mulla (1975) quando larvas de 1º estádio de *Culex tarsalis* são tratadas com análogos de hormônio juvenil, ocorrem aberrações morfológicas, acompanhadas de grande mortalidade no último estádio de larva e de pupa, principalmente entre as ecdises. Desta forma, supõe-se que estas transformações sejam, também, em grande parte, responsáveis pelas maiores taxas de mortalidade que ocorreram no último estádio de larvas e em pupas de *A. darlingi* em condições experimentais. É de esperar-se, por exemplo, que alimentação, fotoperiodismo, temperatura e crescimento de fungos tenham influenciado no desenvolvimento de larvas, contribuindo para o grande índice de mortalidade e maior duração do ciclo vital.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Jorge R. Árias pelas sugestões, ao José Marinho Correia pela ajuda nos trabalhos de campo e de laboratório e ao Geraldo Mendes dos Santos pela leitura do manuscrito.

SUMMARY

Laboratory studies about the biological cycle of *Anopheles Darlingi* showed that the development from egg to adult is completed in 15,6 days in average, and that the survival rate (from 25 to 28°C) was 57%. The mean number of eggs per female was $110 \pm 50,61$ and the eclosion rate $83,31 \pm 48,21$. Mean eclosion time was estimated in about 2 days. Data regarding the larval and pupal development are also showed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSLEY, R.W.
1976 — Laboratory colonization of the malaria vector, *Anopheles culicifacies*. *Mosq. News*, 37: 256-258.
- ARIAS, J.R. & MULLA, S.
1975 — Morphogenetic aberrations induced by a juvenile hormone analogue in the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Ent.*, 12: 309-316.
- BARRETO, M.P. & COUTINHO, J.O.
1943 — Criação de algumas espécies de Anofelinos brasileiros. *Rev. Bras. Biol.*, 3: 317-323.
- BAILY, D.L.; FOWLER, J.E.F. & LOWE, R.E.
1979 — Production efficiency and rate of increase of a massreared laboratory colony of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *Mosq. News*, 39: 640-644.
- BATES, M.
1947 — The laboratory colonization of *Anopheles darlingi*. *J. Nat. Malaria Soc.*, 6: 155-158.
- CHARLWOOD, J.D. & HAYES, J.
1978 — Variações geográficas no ciclo de picada do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. *Acta Amazonica*, 8 (4): 605-611.
- CHRISTOPHERS, S.R.
1960 — The larval instars in *Aedes aegypti* (L.) in: *The yellow fever mosquito*. Cambridge Univ. Press, Londres. p. 227-249.
- COVA-GARCIA, P.
1961 — Descripción de los huevos de Anofelinos. In: *Notas sobre los Anofelinos de Venezuela y su identificación*. 2. ed Caracas. Ed. Grafos. p. 11-12.

- FERREIRA, E.
1964 — Distribuição geográfica dos Anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual da erradicação da malária. **Rev. Bras. Malariol.**, 16: 329-348.
- FORATTINI, O.P.
1962 — **Entomologia médica**. São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, vol. I, 662p.
- FREIRE, S.A. & FARIA, G.S.
1947 — Criação e alguns dados sobre a biologia de **Anopheles (N.) darlingi**. **Rev. Biol.**, 7: 57-66.
- GERBER, E.J.
1970 — Manual for Mosquito Rearing and Experimental Techniques. **Amer. Mosq. Cont. Assoc. Bull.**, N.º 5. 107p.
- GORHAM, J.M.; STOJANOVICH, C.J. & SCOTT, H.G.
1967 — **Clave ilustrada para los mosquitos Anofelinos de Sudamérica Oriental** U. S. Dept. of Health, Education and Welfare. 64p.
- HAYES, J. & CHARLWOOD, J.D.
1979 — Dinâmica estacional de uma população de **Anopheles darlingi** numa área endêmica de malária no Amazonas. **Acta Amazonica**, 9: 79-86.
- NEWSON, H.D. & BLANKESLEE, T.E.
1957 — Observations of a Laboratory colony of the Mosquito **Culex tritaeniorhynchus** Giles. **Mosq. News**, 17: 308-311.
- PARALUPPI, N.D.
1978 — Alguns aspectos da Biologia e do comportamento de **Anopheles (N.) nuneztovari** Galdon. (Diptera: Culicidae) dos arredores da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado. Manaus, INPA/FUA. 62p.
- RABBANI, M.G.; SEAWRIBHT, J.A. & LEATHERWOOD, L.B.
1976 — A method for culturing single families of **Anopheles albimanus**. **Mosq. News**, 36: 100-102.
- RACHOU, R.
1950 — Observações sobre o ciclo evolutivo dos Anofelinos do subgênero **Kerteszia** em laboratório: fase de ovo. **Res. Bras. Malariol. D. Trop.**, 2: 111-118.
1958 — Algumas manifestações de resistência do comportamento de insetos aos inseticidas no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, 10: 277-290.
- RESENDE, J.N.
1969 — Chave para o subgênero **Nyssorhynchus**. In: **Chave para os subgêneros de Anopheles do Brasil baseada nos caracteres das larvas**. Campanha de Erradicação da Malária.
- ZULUETA, J. & BATES, M.
1948 — Laboratory experiments with selection of oviposition site by **Anopheles darlingi**. **Amer. J. Hyg.**, 48: 350-360.

(Aceito para publicação em 13/03/81)