

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Dissertação

Sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo para criação e manutenção de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em laboratório

Angelita Milech

Pelotas, 2021

ANGELITA MILECH

Sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo para criação e manutenção de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em laboratório

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr^a Camila Belmonte de Oliveira

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M642s Milech, Angelita

Sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo para criação e manutenção de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em laboratório / Angelita Milech ; Camila Belmonte de Oliveira, orientadora. — Pelotas, 2021.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Culicidae. 2. Hematofagia artificial. 3. Biofilme atrativo. 4. ácido L-láctico. 5. Membrana. I. Oliveira, Camila Belmonte de, orient. II. Título.

CDD : 595.77

Angelita Milech

Sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo para criação e manutenção de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em laboratório

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22 de dezembro de 2021

Banca Examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Camila Belmonte Oliveira (Orientadora) Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade de Santa Maria.

.....
Dr. Prof. Marcos Marreiro Villela, Doutor em Ciências da Saúde pelo Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

.....
Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva, Doutora em Parasitologia Humana pela Eberhardt-Karls Universität Tübingen, Alemanha.

.....
Prof^a. Dr^a. Rovaina Laureano Doyle, Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Santa Maria.

.....
Dr^a. Franciele de Souza Masiero, Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, por acreditarem em mim e não me deixarem desistir. Por me ouvirem, apoiarem e ajudarem a fazer escolhas. Por sempre estarem presentes, mesmo que distantes fisicamente, e pelo esforço em me ajudar a concretizar meus objetivos. Obrigada por tudo, jamais chegaria aqui sem vocês.

A Andressa, minha companheira, obrigada por toda ajuda, pelas trocas de ideias, pelas longas ligações interurbanas, por se fazer presente, por ser paz e aconchego, pela ajuda na manutenção dos mosquitos nas férias e pelos momentos de distrações. Obrigada por ser essa pessoa incrível que nunca deixou de acreditar em mim, e sempre me encorajou a enfrentar meus medos e inseguranças. É um privilégio ter seu apoio nessa trajetória, partilhamos dessa conquista. Enfim, “ainda bem a gente tem a gente”.

Aos meus padrinhos Oldi e Gilda, vocês fazem parte dessa conquista, palavras não expressam todo carinho e gratidão que sinto por vocês. Obrigada por me abrigarem em seu lar, pelo aconchego, pelas conversas e risadas, e por tornarem essa trajetória possível. Obrigada por todo cuidado e proteção que sempre tiveram.

À Elisa, obrigada pelo incentivo e apoio constante. Por dedicar um tempo de sua vida para me fazer olhar por outros ângulos buscando pelo lado positivo. Obrigada por ser essa pessoa extraordinária e empática e pela beleza de nossa amizade.

À doutoranda Jaqueline e ao professor André, agradeço pela confiança e parceria, obrigada por acreditarem nessa ideia, por buscarmos juntos alternativas e por continuarmos insistindo até concluir o objetivo.

Às “caróis”, Carolina e Caroline agradeço por toda ajuda, pelas conversas, apoio nas aulas e experimentos, por estarmos sempre juntas nos incentivando e pelo amparo nos momentos delicados, principalmente neste momento pandêmico que vivemos. Sou eternamente grata pela amizade e parceria, acredito que tudo foi possível por que tivemos uma a outras.

Agradeço ao pessoal do laboratório, principalmente os ICs, Yan e Filipe, obrigada por toda ajuda na coleta a campo, na manutenção dos mosquitos e nos testes. Sou grata aos momentos descontraídos, as risadas e festas.

À Franciéle, por me apresentar a criação de moscas e conseqüentemente, me fazer apaixonar pelos dípteros e a manutenção destes em laboratório. Por me ensinar

minúcias dos procedimentos, para manter colônias de inseto e a importância de seguir os protocolos à risca. Obrigada pela amizade, pelas conversas e incentivo.

À professora Onilda, pela receptividade ao me receber em seu laboratório, pelas trocas de conhecimentos e descobertas, por sanar minhas dúvidas, me apoiar mesmo que a distância e por acreditar na minha pesquisa.

À professora Élvia, sou grata por me designar a tarefa de criar Culex em laboratório, agradeço por toda confiança e incentivo que teve comigo, por acreditar que eu daria conta, por comemorar junto comigo as pequenas conquistas e não me deixar desistir.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Camila, pela ajuda e confiança na elaboração deste trabalho. Pela paciência, pelo suporte e pelas correções. Muito obrigada pelo tempo destinado a me ajudar.

Agradeço ao programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia, em especial aos professores e colegas que fazem parte, pela troca de conhecimentos mútuo, pelas aulas, conversas, e pelo apoio com diálogos ou empréstimos de equipamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. *“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”;*

*“O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos.”
(Eleanor Roosevelt)*

Resumo

MILECH, Angelita. **Sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo para criação e manutenção de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em laboratório.** 2021. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O gênero *Culex* agrupa a maior diversidade de espécies entre os culicídeos, destacando-se, *Culex quinquefasciatus* que possui grande importância na saúde pública por sua capacidade vetorial em transmitir agentes de doenças. A produção e manutenção deste inseto em laboratório é fundamental para auxiliar nas pesquisas sobre seu comportamento e sua biologia. As fêmeas realizam hematofagia, portanto a manutenção de colônias em laboratório implica na necessidade de suprimento de sangue. Para isso, são utilizados alimentadores artificiais constituídos por um reservatório de sangue e membranas finas que facilitam a penetração e alimentação dos mosquitos. Neste estudo, foi desenvolvido e avaliado um sistema de hematofagia artificial para a colonização e manutenção de *Cx. quinquefasciatus* em laboratório, utilizando como membrana um biofilme polimérico atrativo, que contém ácido L-lático em sua composição. A eficiência deste sistema foi avaliada através da taxa de ingurgitamento de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas através do sistema de hematofagia artificial com biofilme e pelo método utilizando Parafilm-M[®]. Para isso foi medido a taxa oviposição, desenvolvimento larval, taxa de pupação e emergência de adultos alimentados através do biofilme polimérico atrativo. A porcentagem média de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas através do biofilme atrativo foi de 87%, enquanto apenas 20% ingurgitaram com Parafilm - M[®] ($p < 0,0001$). A alimentação através do biofilme atrativo foi capaz de produzir altas taxas dos parâmetros biológicos avaliados. Concluímos que o biofilme atrativo foi superior ao Parafilm - M[®] e não houve interferência dos componentes do biofilme nos parâmetros avaliados.

Palavras – chave: Culicidae, hematofagia artificial, biofilme atrativo, ácido L-lático, membrana.

Abstract

MILECH, Angelita. **Artificial hematophagy system with attractive polymeric biofilm for creation and maintenance of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in the laboratory.** 2021. Dissertation (Master in Microbiology and Parasitology) - Postgraduate Program in Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021. 70 p.

Culex genus groups the greatest diversity of species among Culicidae, and specie *Culex quinquefasciatus*, has great importance in public health due to the vectorial ability to transmit disease agents. The production and maintenance of this insect in the laboratory is essential to assist in research on its behavior and biology. Females perform hematophagy, so the maintenance of colonies in the laboratory implies the need for blood supply. For this, artificial feeders are used consisting of a blood reservoir and thin membranes that facilitate the penetration and feeding of mosquitoes. In this study, an artificial hematophagy system was developed and evaluated for the colonization and maintenance of *Cx. quinquefasciatus* in the laboratory, using as membrane an attractive polymeric biofilm, which contains L-lactic acid in its composition. The efficiency of this system was evaluated through the engorgement rate of *Cx. quinquefasciatus* females fed through the artificial hematophagy system with biofilm and by the method using Parafilm-M®. For this, the oviposition rate, larval development, pupation rate and emergence of adults fed through the attractive polymeric biofilm were measured. The mean percentage of *Cx. quinquefasciatus* females fed through the attractive biofilm was 87%, while only 20% were engorged with Parafilm - M ® ($p < 0.0001$). Feeding through the attractive biofilm was able to produce high rates of the evaluated biological parameters. We concluded that the attractive biofilm was superior to Parafilm - M ® and there was no interference of the biofilm components in the evaluated parameters

Palavras – chave: Culicidae, blood feeding, polymer biofilm, L-lactic acid, membrane.

Lista de figuras

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Culex quinquefasciatus</i> . a. Fêmea de <i>Cx. quinquefasciatus</i> realizando a postura de ovos. b. Estágios larvais, L1, L2, L3 E L4. c. Pupa. d. Fêmea adulta de <i>Cx. quinquefasciatus</i> . e. Fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> realizando a hematofagia.	17
Figura 2 - Fêmea de <i>Cx. quinquefasciatus</i> realizando a oviposição de seus ovos em condição laboratorial.	18

Manuscrito

Figura 1 - Processo de montagem e utilização do aparato alimentar (a) biofilme polimérico atrativo (b) biofilme polimérico atrativo após ser tratado com EDTA 1% (c) aparato alimentar preparado para utilização (d) fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> realizando o repasto sanguíneo através do biofilme.....	46
Figura 2 - Número de fêmeas ingurgitadas depois da hematofagia artificial em biofilme e Parafilm - M®. O * mostra diferença estatística pelo teste ANOVA seguido	46

Lista de tabelas

Manuscrito

Tabela 1 Propriedades mecânicas determinadas a partir do ensaio de tração para amostras de biofilme antes e após a exposição à solução de EDTA 1% (m/v) 47

Sumário

1 Introdução	13
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 Revisão de Literatura	17
3.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823	17
3.2 Métodos de alimentação artificial em laboratório	19
3.3 Substâncias quimiotáticas para <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823.....	24
4 Manuscrito	28
4.1 Sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo para manutenção de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae) em laboratório	28
5 Conclusões	48
Referências	49
Anexos	65

1 Introdução

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) são insetos presentes em todo o território global, exceto na Antártida (WRBU, 2013), com aproximadamente 3.579 espécies descritas e reconhecidas até o momento (HARBACH, 2020), sendo que no Brasil são encontradas 490 destas espécies (WRBU, 2019). Desse total, 5% estão envolvidas em ciclos de transmissão de agentes etiológicos ao humano (GUEDES, 2012).

Dentre os dípteros de importância, *Culex* é o gênero que agrupa a maior diversidade de espécies entre os culicídeos, com ampla variedade de nichos ecológicos (FORATTINI, 2002). Entre as espécies de interesse à saúde pública destaca-se *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823). Esta espécie é cosmopolita, bem adaptada ao ambiente urbano, desenvolve-se preferencialmente em pequenas coleções de água estagnada ou de baixa vazão, rica em matéria orgânica, suportando inclusive poluição química, cujas fêmeas adultas são endofílicas e fortemente antropofílicas (FORATTINI, 2002). Este inseto é um vetor de agentes infecciosos e parasitários, como as filárias *Dirofilaria immitis* (LABARTHE et al. 1998, LAI et al. 2001) e *Wuchereria bancrofti* (PAVELA et al., 2016), além de ser vetor do vírus da encefalite de Sant Louis (LOPES et al., 2019), vírus do Nilo Ocidental (TURELL, 2012) e recentemente foi apontado como possível vetor do Zika vírus (GUEDES et al., 2017), além de causar desconforto, importunar durante o repouso, irritação e alergia pela picada (TAIPE- LAGOS & NATAL, 2003).

Os adultos, machos e fêmeas, se alimentam de substâncias açucaradas, que contém carboidratos naturais, fundamentais para a manutenção das atividades metabólicas e possibilitam executar funções como: o voo, a dispersão e as múltiplas atividades biológicas (FORATTINI, 2002). Somente as fêmeas realizam a hematofagia, que é importante para desencadear a vitelogênese e dar continuidade à ovogênese (CLEMENTS, 1992). No sangue ingerido há vários componentes como proteínas, lipídios, carboidratos, sais, vitaminas e minerais (FARLEY, HENDRY e

MCLAFFERTY, 2012) essenciais para a manutenção do ciclo biológico destes insetos (ROSALES-RONQUILLO et al., 1973).

Para realizar a hematofagia, as fêmeas captam pistas bioquímicas para encontrar recursos essenciais tais como hospedeiros, parceiros e locais adequados para colocar seus ovos (ZWIEBEL, et al., 2004). Através de suas estruturas olfativas altamente sensíveis, identificam hospedeiros a partir de produtos químicos presentes na respiração, suor e pele (MUKABANA, et al., 2002). Exemplos destes produtos quimiotáticos atrativos incluem o dióxido de carbono (CO₂), ácido L-láctico e a amônia, (QIU 2005, SMALLEGANGE et al., 2005). Muitos destes odores são facilmente sintetizados *in vitro* e, portanto, eles podem ser reformulados para produzir misturas que imitem a presença de hospedeiro para atrair mosquitos (LOGAN et al., 2007).

O interesse quanto ao desenvolvimento e comportamento destes insetos tem crescido cada vez mais entre os pesquisadores. A capacidade de produzir e manter insetos em condições adequadas e controladas é necessária para auxiliar nas pesquisas sobre o entendimento do comportamento, a fisiologia e as interações inter e intraespecíficas, controle ambiental, testes de novos inseticidas químicos e biológicos e capacidade vetorial (PITTS, 2014; VANÍČKOVÁ et al., 2017; BENELLI, 2018). Tradicionalmente, animais incluindo os humanos são explorados como hospedeiros para fornecer sangue a estes insetos hematófagos em condições controladas (ECKERT, 1997). No entanto, o risco de transmissão acidental de doenças (BAILEY et al., 1978), problemas éticos relacionados ao bem-estar (DENG et al., 2012), bem como a necessidade de manutenção paralela de biotério para fornecimento de animais a serem empregados como fonte alimentar (KASAP et al., 2003), representam um limite restrito para essas pesquisas. Neste contexto, vários sistemas de alimentação artificial vêm sendo desenvolvidos e diferem entre si, no que diz respeito à composição do alimento (sangue), e dietas artificiais (DIEHLMANN 1999), a natureza da membrana (tecido animal, Parafilm-M® e membranas de colágeno) (POTHIKASIKORN et al., 2010) e o método de regulação de temperatura (COSGROVE et al., 1994). No entanto, há grande variação na taxa de ingurgitamento e oviposição nas criações de *Culex sp.* em laboratório (LUO 2014).

Neste estudo foi desenvolvida uma membrana artificial atrativa, para aumentar a taxa de repasto sanguíneo de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* criadas em

laboratório, através de um sistema de hematofagia artificial prático, eficaz e de baixo custo, sem a utilização de animais de experimentação.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar um sistema de hematofagia artificial com membrana atrativa para a criação e manutenção de *Culex quinquefasciatus* em laboratório.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e produzir um biofilme polimérico atrativo para hematofagia artificial de *Cx. quinquefasciatus*;
- Comparar a taxa de ingurgitamento de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas através do sistema de hematofagia artificial com o novo biofilme e com o Parafilm-M®;
- Avaliar os parâmetros biológicos como: taxa de oviposição, desenvolvimento larval, taxa de pupação e emergência de adultos alimentados através do biofilme polimérico atrativo;
- Padronizar um protocolo para a manutenção de colônias de *Cx. quinquefasciatus* em condições laboratoriais;

3 Revisão de Literatura

3.1 *Culex quinquefasciatus* Say 1823

A espécie *Culex quinquefasciatus* pertence à ordem Diptera, Família Culicidae, Subfamília Culicinae, tribo Culicini, gênero e subgênero *Culex* (WRBU, 2013). É conhecida popularmente como pernilongo ou muriçoca e apresenta coloração geralmente marrom ou escurecida (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998). A espécie tem ampla distribuição no meio urbano, entre as faixas equatorial e tropical de todo o mundo (BAR, 1957), ocorrendo nas Américas, Austrália, Ásia, África, Oriente Médio e Nova Zelândia (FORATTINI 2002, FARAJOLLAHI et al., 2011). No Brasil, este mosquito está presente em todo o território nacional, com distribuição e abundância fortemente influenciadas pela presença do homem e associado a áreas de saneamento precário, relacionado às zonas periféricas de habitações humanas (FORATTINI et al., 1993).

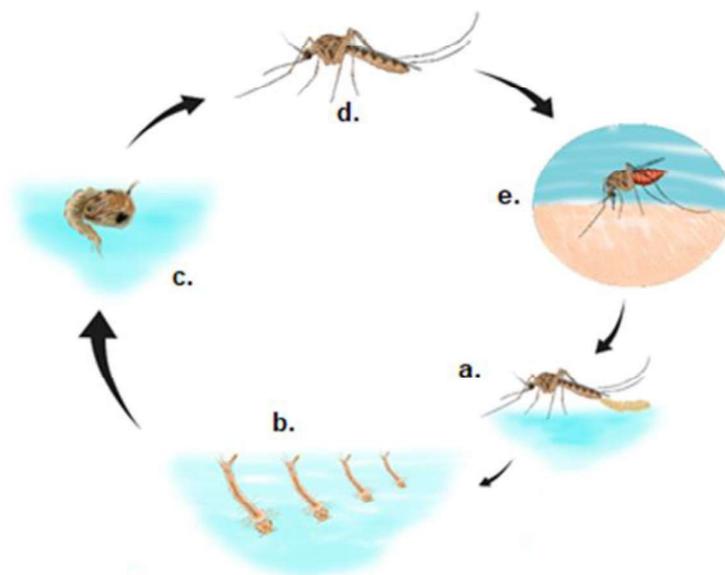


Figura 1 - Ciclo biológico de *Culex quinquefasciatus*. a. Fêmea de *Cx. quinquefasciatus* realizando a postura de ovos. b. Estágios larvais, L1, L2, L3 E L4. c. Pupa. d. Fêmea adulta de *Cx. quinquefasciatus*. e. Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* realizando a hematofagia. Fonte: elaborado pela autora.

Culex quinquefasciatus é um inseto holometábolo, sendo o adulto alado e as formas larvais aquáticas. Seu ciclo biológico (Figura 1) tem duração média entre 10 a

12 dias, desde a eclosão dos ovos até a emergência do adulto, porém a duração do ciclo depende de fatores como disponibilidade de alimento, temperatura, luz e umidade. Os ovos são depositados agrupados, em forma de jangada com 150 a 250 ovos (Figura 2) (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). As formas larvais e pupas podem ser encontradas em água estagnada acumulada no solo, como em poças d'água, valas de drenagem de águas e fossas, ou em recipientes como latas e bebedouros de animais. Esta água é geralmente poluída, rica em matéria orgânica em decomposição, muitas vezes turva e malcheirosa, onde as larvas se alimentam do microplâncton presente nesses ambientes (FORATTINI, 2002).



Figura 2 - Fêmea de *Cx. quinquefasciatus* realizando a oviposição em condição laboratorial. Fonte: elaborado pela autora.

Machos e fêmeas adultos dependem da ingestão de carboidratos para manter seu metabolismo energético, o que influencia em suas atividades e longevidade (NAYAR e SAUERMAN, 1973). A disponibilidade de fontes alimentares pode aumentar a taxa de sobrevivência dos mosquitos, diminuir o tempo no ciclo gonotrófico e aumentar a capacidade vetorial (GU et al., 2011). As fêmeas de Culicidae, em geral, necessitam realizar hematofagia para maturação de seus oócitos (FORATTINI, 2002). *Cx. quinquefasciatus* possui comportamento de alimentação predominantemente antropofílico e hábito estritamente noturno (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). No entanto, este inseto é oportunista e pode realizar o

repasto sanguíneo em aves e mamíferos disponíveis (JANSEN et al., 2009, MACKAY et al., 2010).

Quando em grandes quantidades, a presença deste mosquito na área urbana gera desconforto ao ser humano, irritabilidade e diminuição da qualidade de vida, devido ao incômodo causado pelas picadas e perturbação noturna (FORATTINI, 2002). Além disso, algumas áreas infestadas por *Cx. quinquefasciatus* são propícias a problemas relacionados com saúde pública, pois esse mosquito é considerado vetor de alguns agentes patogênicos, que podem provocar doenças a população local (MORAIS et al., 2007), como a filária *Wuchereria bancrofti*, (WHO, 1997), com cerca de 40 milhões de pessoas apresentando manifestações clínicas de filariose linfática no mundo (IRVINE; HOLLINGSWORTH, 2018). O vírus do Nilo Ocidental (SARDELIS et al., 2001; GODDARD et al., 2003), sendo que no Brasil, casos de equinos infectados com o vírus já foram registrados (ESPÍRITO SANTO, 2018; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). Também o vírus da encefalite Saint Louis (FORATTINI, 2002), que já foram registrados vários casos no estado de São Paulo (IVERSSON, 1977; IVERSSON; COIMBRA, 1984; ROCCO et al., 2005; MONDINI et al., 2007). E recentemente, estudos realizados por GUO et al. (2016) e GUEDES et al. (2017) demonstraram que *Cx. quinquefasciatus* também possui competência para veicular o vírus Zika. No entanto, *Aedes aegypti* é o principal vetor deste arbovírus.

Além disso, como os mosquitos do complexo *Culex pipiens* possuem comportamento oportunista de alimentação, podem potencialmente transportar arbovírus silvestres de aves migratórias e mamíferos para o homem em territórios urbanos (FONSECA et al., 2004). Corroborando com isso, estudos considerando sistemas de infecção em laboratório demonstraram que *Cx. quinquefasciatus* seria competente para transmitir *Plasmodium relictum* (protozoário causador da malária aviária) (ATKINSON et al., 1995) e o *Hepatozoon breinli*, um parasito intracelular que infecta aves, répteis, anfíbios e roedores (MACKERRAS 1962). Em adição, um estudo realizado por SERRA et al. (2016) alertou sobre a possibilidade de *Cx. quinquefasciatus* estar relacionado na transmissão do emergente vírus Mayaro em centros urbanos.

3.2 Métodos de alimentação artificial em laboratório

A alimentação de mosquitos fêmeas com sangue é uma parte fundamental da colonização e manutenção dos mosquitos, pois é necessária para a produção e

desenvolvimento dos ovos. Colônias de insetos mantidas em laboratório possibilitam a reprodução de diversas espécies em larga escala. A criação em massa eficiente e barata em condições de laboratório é extremamente importante para investigar sobre a biologia (PITTS et al., 2014; BENELLI, 2015a, b, 2018; VANÍČKOVÁ et al., 2017), competência vetorial, novas estratégias de controle (BOURTZIS et al., 2016; Benelli, 2018; BENELLI e PAVELA, 2018; WILKE et al., 2018), bem como resistência a inseticidas (CHANDA et al., 2016). Além disso, o comportamento de alimentação com sangue é particularmente importante para o desenvolvimento de novos repelentes (SCHRECK e MCGOVERN, 1989; COLLINS et al., 1993; KLUN et al., 2003).

A crescente demanda por mosquitos criados em laboratório para fins de pesquisa e controle torna necessário o desenvolvimento de métodos de alimentação eficazes e padronizados, sem a utilização de cobaias para a manutenção da colônia. Embora fosse possível alimentar mosquitos com sangue em voluntários humanos ou hospedeiros vertebrados vivos nos primeiros estudos (BOYD et al., 1935, ROZEBOOM 1936, CROWELL 1940), a transmissão acidental de doenças (BAILEY et al., 1978), a necessidade de manutenção paralela de biotério para fornecimento de animais a serem empregados como fonte alimentar (KASAP et al., 2003), e a conscientização de bem-estar animal (DENG et al., 2012), impulsionaram a busca por novas estratégias éticas, baratas e viáveis. Neste contexto, alimentadores artificiais vêm sendo desenvolvidos e utilizados constantemente em procedimentos para manutenção de mosquitos em laboratório. Nestes sistemas o uso de sangue retirado de mamíferos minimiza a dor e desconforto do animal, além de reduzir os custos associados à manutenção de um biotério em laboratório (ROSS et al., 2019).

Os métodos de alimentação artificial foram desenvolvidos para atender às necessidades de laboratórios específicos, considerando suas condições de estrutura e recursos disponíveis. Os métodos diferem em vários aspectos, como natureza/material da membrana que reveste o reservatório, fonte de calor, origem do sangue e anticoagulante utilizado. (GREENBERG, 1949; RUTLEDGE et al., 1964; BAILEY et al., 1978; KASAP et al., 2003; COSTA-DA-SILVA et al., 2013; LUO, 2014; GUNATHILAKA et al., 2017). Em comum, todos levam em consideração os três princípios de Rs: substituição, redução e refinamento, relacionados ao bem-estar animal (REMFY, 1987). Estes alimentadores normalmente são compostos por um ou mais reservatórios sanguíneos, encobertos por membranas finas (POTHIKASIKORN et al., 2010) que facilitam a penetração das peças bucais das

fêmeas, para o repasto. Além disso, são utilizados métodos de aquecimento para simular a presença de hospedeiro e atrair os mosquitos (ROSS et al., 2019).

A utilização de reservatórios artificiais de sangue, cobertos por membranas, que possibilitam a alimentação dos mosquitos, está cada vez mais aprimorada, eficaz e segura (DENG et al., 2012). De acordo com PHASOMKUSOLSIL et al. (2013), a alimentação artificial facilita a experimentação de forma controlada, reduzindo os riscos de transmissão de patógenos durante a alimentação do mosquito. Historicamente, uma vasta variedade de membranas tem sido usada durante o processo de alimentação artificial com sangue de insetos hematófagos. A seleção de uma membrana apropriada é essencial para o sucesso da alimentação artificial (FRIEND e SMITH 1977).

No passado, era muito comum o uso de tecidos animais, como membrana de pele de coelho, galinha, ratos, e membranas de bexiga e ceco bovino (LUO, 2014). A membrana de revestimento de salsicha de colágeno bovino é uma alternativa barata e fácil de usar (COSGROVE et al. 1994). Em estudos para avaliação de fecundidade e desenvolvimento de formas imaturas de *Ae. aegypti*, DENG et al. (2012) propuseram a utilização de um reservatório membranoso, que é constituído apenas por membranas de colágeno bovino para armazenamento de sangue. Para utilização, as membranas de colágenos bovinos devem ser inseridas em água quente (fervendo) durante o período de uma hora e, em seguida, a gordura presente nela deve ser removida com auxílio de um papel absorvente. Pronta para uso, a membrana é preenchida de sangue com anticoagulante e fechada nas duas extremidades, formando uma espécie de "salsicha de sangue". Este dispositivo deve ser inserido sobre uma superfície com aquecimento, para que o sangue consiga chegar a temperaturas semelhantes a um hospedeiro vivo, fazendo com que, assim, exista uma maior atratividade dos mosquitos (DENG et al., 2012).

Ao longo do tempo, com a melhoria dos sistemas artificiais houve uma maior predileção para utilização de membranas sintéticas como o Parafilm-M®. No entanto, alguns estudos indicam que as membranas de origem animal são superiores às de origem vegetal ou sintética (RUTLEDGE et al., 1964; LYSKI et al., 2011). PINA e FONSECA (1999) usaram membrana de silicone para alimentar *Ae. aegypti* com sangue bovino e obtiveram 30% de fêmeas ingurgitadas. GREENBERG (1949) observaram que a membrana de papel celofane não foi eficaz na alimentação artificial de sangue de *Ae. aegypti*. Este autor também mostrou que as membranas naturais

da pele animal são boas para a alimentação artificial, mas não são fáceis de preparar, principalmente quando é necessário um grande número. CARVALHO (1961) utilizou membranas de borracha para alimentar artificialmente insetos hematófagos oferecendo sangue desfibrinado ou citratado de bovino, humano ou ovino, a uma temperatura de 37 °C.

RUTLEDGE et al. (1964) descreveram e testaram um alimentador de membrana projetado para infecção experimental de mosquitos. O sistema consistia em segmentos cônicos de vidro com uma entrada superior e uma saída inferior conectada a uma tubulação de borracha, por onde circulava água aquecida a $38 \pm 1^\circ\text{C}$. Os autores testaram várias membranas, incluindo intestino bovino, pele de frango e Parafilm-M[®], e consideraram o Parafilm-M[®] uma membrana satisfatória para alimentação de sangue de *Anopheles* spp. A natureza das membranas (por exemplo, tecidos animais, Parafilm-M[®] e membranas de colágeno), é crucial para estimular a resposta de alimentação e garantir a eficácia do alimentador de sangue (FRIEND e SMITH, 1977). Outros trabalhos compararam diferentes membranas utilizando o sistema proposto por RUTLEDGE et al. (1964) como pele de rato, frango, suíno, codorna, intestino de ovelha, preservativos de látex e invólucro de salsicha, os autores constataram que as membranas derivadas de animais são mais eficientes na alimentação artificial de mosquitos (NOVAK et al., 1991; POTHIKASIKOR et al., 2010; LYSKI et al., 2011).

A membrana de revestimento de salsicha de colágeno bovino e o Parafilm-M[®] são produzidas em massa com controle de qualidade sendo, portanto, alternativas baratas e utilizadas rotineiramente em laboratórios (COSGROVE et al. 1994). Segundo estudo de LYSKI et al (2011) a espessura média do Parafilm-M[®] esticado é $59 \pm 2 \mu\text{m}$, enquanto a espessura média da membrana de colágeno bovino embebida em água fervente é $73 \pm 4 \mu\text{m}$. Suas taxas de alimentação não diferiram, embora o uso de membrana de colágeno bovino fosse preferível a Parafilm-M[®]. A membrana Parafilm-M[®] tornou-se seca e quebradiça se deixada na unidade de alimentação por mais de 3 h, enquanto as membranas de colágeno bovino mantiveram seu caráter flexível mesmo quando deixadas durante a noite ou operadas repetidamente. Além disso, a membrana Parafilm-M[®] é difícil de esticar para uma espessura uniforme e é facilmente quebrável quando a espessura é inferior a 25 μm . Os autores ainda relataram que, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* preferiram o colágeno bovino porque está

membrana tinha uma superfície de pega texturizada, no entanto o preparo dessa membrana é trabalhoso e demorado (LYSKI et al. 2011).

TSENG (2003) obteve 53% das fêmeas ingurgitadas ao alimentar *Ae. aegypti* com sangue de ovelha citratado usando Parafilm-M®. DIAS et al. (2021) utilizando a mesma membrana, obtiveram porcentagem de alimentação de 98% para *Ae. aegypti*, 96% para *Anopheles. aquasalis* e 48% para *Cx. quinquefasciatus*. Contudo MOUTAILLER et al. (2007), estudando a transmissão do vírus da febre de Rift Valley, alimentou artificialmente *Cx. quinquefasciatus* usando membrana Parafilm-M®, e obteve apenas 1% das fêmeas ingurgitadas. Estes e outros estudos observaram que, embora várias espécies de culicídeos, como *Ae. aegypti*, se alimentam bem artificialmente, fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* são mais relutantes em se alimentar artificialmente (DIAS et al., 2018; NOVAK et al., 1991; ALLAN et al., 2006a).

Vários fatores podem afetar a alimentação dos culicídeos, como estímulos táteis, visuais, olfativos, temperatura da superfície de alimentação, temperatura do sangue, entre outros (FRIEND & SMITH, 1977). Portanto, métodos que garantem uma boa regulação de temperatura devem ser considerados para atrair os mosquitos (COSGROVE et al., 1994). Para manter a temperatura adequada do sangue nos reservatórios de alimentadores artificiais, e atrair as fêmeas de mosquitos para realizarem o repasto sanguíneo, são necessárias algumas estratégias que podem variar de acordo com a técnica utilizada para este procedimento. O sangue contido no reservatório pode ser mantido aquecido através de equipamentos eletrônicos, como Hemotek Ltd. (2018), um sistema comercial de alimentação de sangue, que alimenta até seis gaiolas de uma vez e é aquecido por um dispositivo elétrico. Outra forma é por meio de dispositivo conectado a uma fonte de energia que emite calor sobre uma base cerâmica do aparato sanguíneo (DENG et al., 2012; DHAR et al., 2019), ou ainda, através de sistemas de circulação de água aquecida (PHASOMKUSOLSIL et al., 2013; DIAS et al., 2018; SIRIA et al., 2018).

Em experimentos para criação de mosquitos, CARVALHO et al. (2014) e GUNATHILAKA et al. (2017) utilizaram placas metálicas como reservatório sanguíneo. Estas placas foram revestidas por membranas, para armazenar o volume de sangue utilizado na alimentação dos mosquitos. Um pacote de malha preenchido capaz de armazenar calor, como a sílica (CARVALHO et al., 2014), foi colocado sobre a placa com sangue, para manter a temperatura ideal e atrair os mosquitos até a fonte de alimento.

COSTA-DA-SILVA et al. (2013) propôs um método simples para alimentar artificialmente *Ae. aegypti*. Um tubo cônico de 50 ml preenchido com 40 ml de glicerol pré-aquecido (50°C) com o topo coberto com filme Dura Seal. A tampa de rosca foi perfurada, então os autores incluíram uma membrana Parafilm-M® (5 cm × 5 cm) previamente atritado na pele humana para melhorar sua atratividade para os mosquitos. Dentro da tampa de rosca perfurada, foram colocados 1,5 ml de sangue pré-aquecido (37°C). O glicerol agia como um reservatório aquecido, mantendo a temperatura do sangue por muito tempo.

De forma menos complexa, o aquecimento do sangue pode ser realizado através de água aquecida adicionada dentro de copos plásticos (ANJOLETTE e MACORIS, 2016; SIRIA et al., 2018). A base externa do copo serve como reservatório sanguíneo e, para manter este sangue aquecido, é adicionada água aquecida (40°C) na parte interna do copo plástico (ANJOLETTE e MACORIS, 2016).

3.3 Substâncias quimiotáticas para *Culex quinquefasciatus*

Várias substâncias químicas são responsáveis por desencadear atividade comportamental em insetos, podendo causar respostas positivas (atrativas) ou negativas (repulsivas) (EIRAS e MAFRA-NETO, 2001). Quando essas substâncias químicas medeiam à comunicação entre indivíduos de espécies diferentes, chamam-se aleloquímicos. A classe de aleloquímicos que provoca uma resposta benéfica ao receptor é denominada cairomônio (VILELA e DELLA LÚCIA, 2001). O termo cairomônio deriva do grego "Kairo", que significa oportunista, e foi proposto por BROWN et al. (1970) para designar substâncias químicas interespecíficas, que desencadeiam uma reação fisiológica ou comportamental beneficiando a espécie receptora. No caso de culicídeos e outros artrópodes hematófagos, exemplos de cairomônios são as substâncias metabólicas voláteis produzidas pelos hospedeiros, que são detectadas por receptores no processo de procura e localização da fonte alimentar, desenvolvendo uma sequência de comportamentos (EIRAS, 2001). Assim, a capacidade de associar um odor com um recurso confere vantagens significativas em relação à utilização de recursos e adaptação local (STEPHENS, 1993; TURLINGS et al., 1993; DUKAS, 2008).

O hábito hematófago das fêmeas de mosquitos estabeleceu uma forte dependência da presença do hospedeiro para sua reprodução, de modo que esses

insetos se especializaram em detectar os cairomônios derivados do ar expirado ou de voláteis emanados da pele dos hospedeiros. Os voláteis emanados dos hospedeiros são percebidos por contato direto ou por dispersão no ambiente (formando plumas de odor carregadas pelo vento), quando entram em contato com receptores olfatórios situados nas sensilas das antenas e palpos dos mosquitos (MEIJERINK et al., 2000). Esses estímulos são captados pelos receptores, transportados para o sistema nervoso central, processados, e traduzidos em respostas comportamentais que o mosquito apresenta diante de um estímulo. Utilizando esses órgãos sensoriais, os mosquitos podem selecionar pessoas mais atrativas através de químicos presentes na respiração, suor e outras emanações da pele, bem como preferir determinadas regiões do corpo de um mesmo hospedeiro (MUKABANA et al., 2002). Exemplos destes produtos químicos atraentes incluem o dióxido de carbono (CO₂), o catabolito dos processos respiratórios dos vertebrados, a amônia, um componente do suor humano, e o ácido L-lático, que é produzido através de glicólise anaeróbica em glândulas écrinas humanas. (BRAKS et al., 2001; GILLIES, 1980; ACREE et al., 1968).

Por ser produzido por todos os animais, o dióxido de carbono pode não levar um determinado inseto ao seu hospedeiro apropriado (MOHR et al., 2011). Portanto, é assumido que outras substâncias importantes na orientação de mosquitos antropófilos, emanam da pele humana e atuam junto com o CO₂, as quais seriam responsáveis por respostas seletivas dos mosquitos a odores específicos (KNOLS, 1996; VERHULST et al., 2011; SMALLEGANGE et al., 2013). Assim, admite-se que o CO₂ é um estímulo para guiar os mosquitos a longas distâncias, porém a curtas distâncias, outros estímulos estariam envolvidos e determinariam a especificidade do inseto para seu hospedeiro (VERHULST et al., 2009).

Além disso, um estudo na África Ocidental demonstrou que o CO₂ é mais atraente para mosquitos zoofílicos do que para espécies de mosquitos antropofílicos (COSTANTINI et al., 1996), sugerindo que espécies de mosquitos antropofílicos dependem em maior medida de odores da pele, do que CO₂ para se orientar na busca de hospedeiros (DEKKER e TAKKEN 1998, KNOLS e TAKKEN, 1998). Corroborando com isso, quase 60% das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* de uma colônia originária do Sri Lanka que foram liberados individualmente em um olfatômetro de dupla escolha, foram atraídas dentro de três minutos, para meias de poliamida que foram usadas por um voluntário humano por cerca de 48-60 horas (MBOERA et al., 1998).

Outro estudo concluiu que lavar as mãos e pés humanos com etanol eram atraentes a mosquitos fêmeas (BRAKS et al., 1999). Esses resultados demonstram que *Cx. quinquefasciatus* é atraído por fontes de voláteis presentes na pele humana.

Embora centenas de componentes tenham sido identificados de odores humanos, apenas alguns compostos foram testados individualmente e provaram ser atraentes para os mosquitos (BERNIER et al., 2000, 2002; HEALY et al., 2002). Um desses componentes é a amônia, substância presente no suor humano, e relatado repetidamente como atraente em estudos olfatométricos (GEIER et al., 1999, BRAKS et al., 2001, SMALLEGANGE et al., 2005). A atração de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae*, ao suor humano incubado foi demonstrado estar relacionado principalmente à presença de amônia, produzida por meio de atividade microbiana na pele (BRAKS e TAKKEN, 1999; GEIER et al., 1999).

O ácido L-lático (LA), por sua vez, é um dos principais voláteis secretados pelas glândulas sudoríparas écrinas da pele e expiração, presente em todos os hospedeiros vertebrados, considerado ter papel importante na atratividade de mosquitos, apesar de possuir baixa volatilidade. Esta foi a primeira substância isolada e identificada de lavados do corpo humano que possuía efeito atrativo para mosquitos em testes de comportamento em laboratório (ACREE et al., 1968). Além disso, a atratividade diferencial de hospedeiros humanos para os mosquitos foi atribuída à quantidade de ácido L-lático presente na pele do hospedeiro (DEKKER et al., 2002; STEIB et al., 2001). Como o ácido L-lático tem baixa volatilidade, as emanações corporais desse composto estão ligadas à sua alta concentração no suor (DERBYSHIRE et al., 2012). O ácido L-lático é majoritariamente produzido nas glândulas sudoríparas écrinas, cuja densidade na superfície da pele humana é maior do que em todos os outros mamíferos (BEST et al., 2019; MONTAGNA, 1985). Comparando as quantidades de emissões de LA da superfície da pele de humanos e de vários outros mamíferos, DEKKER et al. (2005) encontraram concentrações de ácido L-lático pelo menos cinco vezes maiores em amostras de humanos do que nas de outros mamíferos.

Estudos de olfatômetro de dupla escolha demonstraram que *Cx. quinquefasciatus* foi atraído pelo ácido L-lático (ALLAN et al., 2006a, BRAKS et al., 1999). Já o dióxido de carbono tem pouco ou nenhum efeito atraente sobre essa espécie, inclusive, em altas concentrações é considerado repelente. Além disso,

nenhum efeito sinérgico de CO₂ em combinação com emanções da pele foi observado (ALLAN et al., 2006b, BRAKS et al., 1999, MBOERA et al., 1998).

Substâncias estimulantes como ATP (GALUN 1967), ácido L-láctico (DAVIS e SOKOLOVE 1976), e ligantes de odor natural da pele humana (GHANINIA et al., 2008, COSTA-DA-SILVA et al., 2013) resultam em melhorias na taxa de alimentação. CLEMENTS (1999) observou que uma fêmea de mosquito é capaz de ingerir mais de três vezes o seu próprio peso de sangue em um curto período de tempo. O volume de sangue ingerido é bem estabelecido como um parâmetro crucial de fecundidade em muitos mosquitos. DIAS et al. (2018) compararam a alimentação artificial e em cobaia para três espécies; *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* e *An. aquasalis*, os mosquitos estudados aumentaram seu peso em média 1,61 a 2,37 vezes quando alimentados artificialmente e 2,2 a 3,1 vezes quando alimentados diretamente em porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*). Segundo os autores, as menores médias de peso observadas na alimentação artificial sugerem que sem os componentes atrativos do animal vivo, as fêmeas de mosquito passam menos tempo se alimentando e conseqüentemente ingerem menor quantidade de sangue quando alimentadas artificialmente.

Odores corporais têm sido usados com sucesso para atrair mosquitos (QIU et al., 2006). A maneira como respondem a tais odores é de grande interesse para o desenvolvimento de dispositivos eficientes para captura de mosquitos (SCHMIED et al., 2008). Odores que atraem ou repelem mosquitos podem ser a base das novas tecnologias para o futuro combate aos vetores de patógenos (MABASO et al., 2004), visto que esses sinais medeiam importantes interações entre vetores e homem, que estão associados com a transmissão de doenças (ZWIEBEL e TAKKEN, 2004; PICKETT et al., 2010). Dessa forma, estas substâncias também podem ser empregadas em tecnologias que melhorem a atratividade de mosquitos aos modelos de alimentação artificial utilizados em laboratório.

4 Manuscrito

4.1 Novo sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo para manutenção de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em laboratório

Formatado de acordo com as normas de submissão da revista *Parasites & Vectors*

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/submission-guidelines>

1 **Novo sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo**
2 **para manutenção de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em**
3 **laboratório**

4
5 **Angelita Milech^{1†*}, Caroline Quintana Braga^{1†}, Carolina dos Santos Bermann^{1†},**
6 **Jaqueline Ferreira de Souza^{2†}, André Ricardo Fajardo^{2†}, Élvia Silveira Vianna^{1†} and**
7 **Camila Belmonte Oliveira^{1†}**

8
9 † Angelita Milech, Caroline Quintana Braga, Carolina dos Santos Bermann, Jaqueline
10 Ferreira de Souza, André Ricardo Fajardo, Élvia Silveira Vianna and Camila Belmonte
11 Oliveira contributed equally to this work

12
13 ¹ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal
14 de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

15 ² Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de
16 Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

17
18 *Correspondence: angelitamilech@gmail.com

19
20 AM: angelitamilech@gmail.com

21 CQB: carolineqbraga@hotmail.com

22 CSB: carolbermann@hotmail.com

23 JFS: jferreirasouza93@hotmail.com

24 ARF: drefajardo@hotmail.com

25 ESV: elviavianna@gmail.com

1 CBO: camilabelmontevet@yahoo.com.br

2 **Abstract**

3 **Background:** A manutenção de colônias de mosquitos em laboratório implica na necessidade
4 de suprimento de sangue para que as fêmeas possam amadurecer seus oócitos e realizar a
5 oviposição. Neste estudo, foi desenvolvido e testado um novo sistema de hematofagia
6 artificial para a colonização e manutenção de *Cx. quinquefasciatus* em laboratório.

7 **Methods:** Desenvolvemos um biofilme polimérico atrativo com ácido L-lático 25% em sua
8 composição, para ser utilizado como membrana no sistema de hematofagia artificial e
9 comparamos a taxa de alimentação das fêmeas com Parafilm - M[®]. Também avaliamos a taxa
10 de oviposição, sobrevivência larval, e emergência de adultos das fêmeas alimentadas através
11 do biofilme atrativo.

12 **Results:** A porcentagem média de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas através do
13 biofilme atrativo foi de 87%, enquanto apenas 20% ingurgitaram com Parafilm - M[®] ($p <$
14 $0,0001$). A alimentação através do biofilme atrativo por nós elaborado, foi capaz de produzir
15 altas taxas dos parâmetros biológicos avaliados, a porcentagem de postura das fêmeas que
16 realizaram hematofagia artificial através do biofilme foi de 90%, com média de 158 ovos por
17 jangada. Destes ovos, houve a eclosão de 97% das larvas, as quais, 95% atingiram o estágio
18 de pupa. A taxa de emergência de adultos correspondeu a 93% das pupas.

19 **Conclusions:** O biofilme atrativo foi superior ao Parafilm - M[®] em relação a taxa de
20 ingurgitamento. Além disso a alimentação com o biofilme garantiu taxas significativas dos
21 parâmetros biológicos avaliados e não houve interferência dos componentes do biofilme nos
22 parâmetros biológicos.

23 **Keywords:** Mosquitoes, Blood feeding, Attractive membrane, *Cx. quinquefasciatus*.

24

25 **Background**

1 O mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) é um importante
2 vetor de patógenos, como a filária *Wuchereria bancrofti* e o vírus do Nilo Ocidental [1]. É
3 também um potencial vetor de arbovírus responsável pela encefalite de Saint Louis [2] e
4 recentemente no Brasil, foi detectado que espécimes deste inseto de ambientes urbanos
5 estavam infectados com ZIKV, sugerindo participação em um novo ciclo deste arbovírus [3-
6 4]. Esta espécie de mosquito tem ampla distribuição geográfica em áreas urbanas e
7 suburbanas de zonas tropicais a temperadas. Além disso, apresenta comportamento
8 oportunista de alimentação sanguínea em diferentes hospedeiros, e sua capacidade de
9 transmitir agentes zoonóticos de doenças, representa um risco para o possível cruzamento
10 entre arbovírus silvestres de pássaros e propagação para o homem, especialmente em áreas
11 urbanas [5].

12 As fêmeas de Culicidae, em geral, precisam realizar hematofagia para a maturação de
13 seus oócitos e posterior desenvolvimento dos ovos [6]. Assim, o fornecimento de sangue de
14 vertebrados é uma etapa essencial e representa o maior desafio para a colonização e
15 manutenção destes insetos em laboratório. Frequentemente, são utilizados animais de
16 laboratório como fonte de sangue, no entanto, há uma série de restrições e limitações éticas
17 neste método, além do alto custo e a necessidade de profissional especializado para
18 mantimento dos animais no biotério [7]. A manutenção de espécies de mosquitos em
19 laboratório, assim como outros artrópodes de importância em saúde pública, é fundamental
20 para estudos sobre biologia, comportamento e desenvolvimento de técnicas de controle.

21 Alimentadores artificiais vêm sendo desenvolvidos e utilizados rotineiramente em
22 procedimentos para manutenção de mosquitos em ambiente laboratorial [8]. Estes
23 alimentadores normalmente, são compostos por um ou mais reservatórios sanguíneos,
24 geralmente encobertos por membranas finas de tecido animal, Parafilm - M[®] ou colágeno [9]
25 que facilitam a penetração das peças bucais das fêmeas para a sua alimentação. Para simular

1 a presença de hospedeiro e atrair os mosquitos são utilizados métodos de aquecimento [8].
2 Neste contexto, no presente estudo foi desenvolvido e testado um sistema de hematofagia
3 artificial para a colonização e manutenção de *Cx. quinquefasciatus* em laboratório, utilizando
4 como membrana um biofilme polimérico atrativo, o qual contém ácido L-lático em sua
5 composição para aumentar a atração e indução do repasto sanguíneo.

6

7 **Methods**

8 *Estabelecimento e manutenção da colônia*

9 Para estabelecimento da colônia de *Cx. quinquefasciatus* em laboratório, inicialmente
10 foi realizada uma coleta a campo de ovos de *Culex* spp, dispostos em forma de jangada sob a
11 lâmina da água, com auxílio de concha entomológica e recipientes de vidro. A coleta foi
12 realizada na área urbana da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil (31°46'28.4" S/
13 52°21'07.0" W). Posteriormente, as amostras passaram por triagem e as jangadas de ovos
14 foram alocadas em bandejas, contendo água declorada, mantidas em temperatura de 25°C para
15 eclosão das larvas. Estas foram identificadas por amostragem de cada bandeja por chave
16 dicotômica [6-10]. Após a confirmação da espécie, as larvas foram alimentadas com ração
17 úmida para gatos filhotes (0,5 a 1 grama/bandeja) a cada dois dias e houve troca da água uma
18 vez durante o estágio larval. Após atingirem o estágio de pupa, foram transferidas para gaiolas
19 identificadas com a espécie, data e número de geração (F.0 para espécimes coletados a
20 campo) para controle da colônia. As gaiolas utilizadas foram confeccionadas de material
21 plástico com telas na parte superior e lateral, para circulação de ar, e presença de abertura
22 superior com acesso ao aparato alimentar. Após emergência de adultos foi adicionado solução
23 açucarada a 10%, *ad libitum*.

1 Em todas as etapas, o ambiente foi mantido em condições controladas de fotoperíodo
2 claro/escuro de 12h, umidade relativa (UR) 60% a 70%, temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sistema de
3 exaustão telado.

4 5 *Preparo do biofilme polimérico*

6 O biofilme foi preparado pelo método de *casting* com algumas modificações [11].
7 Inicialmente, preparou-se uma solução aquosa de gelatina 1,3% (m/v), a qual foi mantida sob
8 agitação magnética a temperatura ambiente por 1 h. Paralelamente uma solução aquosa de
9 poli (vinil álcool) (PVA) 1,3% (m/v) também foi preparada e mantida sob agitação magnética
10 por 1 h à 80°C . Em seguida, as duas soluções foram misturadas e homogeneizadas por 30 min
11 à temperatura ambiente. Logo após, uma quantidade de glicerol equivalente à 40% da massa
12 dos polímeros foi adicionada à mistura, para agir como plastificante. Para tornar o biofilme
13 atrativo para os insetos hematófagos, ácido L-lático (25% em relação à massa total do
14 sistema) foi adicionado à solução filmogênica. Por fim, a solução resultante deste processo foi
15 vertida em uma placa de *Petri* e transferida para uma estufa a 37°C até a completa
16 evaporação do solvente e formação do biofilme. O biofilme polimérico atrativo faz parte do
17 sistema de hematofagia artificial que elaboramos e produzimos, e este encontra-se sob pedido
18 de patente junto ao INPI (BR 10 2021 015280 0).

19 20 *Análise das propriedades mecânicas do biofilme*

21 As propriedades mecânicas do biofilme preparado (força de ruptura, elasticidade
22 máxima e módulo de Young) foram determinadas a partir de ensaios de tensão conforme
23 descrito por Voss et al. [12]. Os ensaios foram realizados em um equipamento texturômetro
24 (Stable Microsystems TA.XT2 texturometer, Reino Unido) utilizando corpos de prova
25 retangulares (26mm comprimento, 76mm largura e 0,18mm espessura). Os parâmetros de

1 análise seguiram a norma ASTM D882-12 e os testes foram realizados com 4 replicatas (n =
2 4) utilizando amostras antes e após a exposição à solução de EDTA (1% m/v).

3

4 *Sistema de hematofagia artificial*

5 O sistema de hematofagia artificial, foi baseado no método descrito por Rutledge et al.
6 [13], composto por um copo plástico com uma pequena cavidade externa ao seu fundo, para
7 alojar o sangue e encoberto com o biofilme ou Parafilm - M[®] formando a superfície de
8 alimentação. Para a utilização do biofilme (Fig. 1a) foi necessário imergir o mesmo em
9 solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 1% por 1 minuto, (Fig. 1b) para deixar
10 o biofilme impermeável e hidrofóbico, de forma que este não pudesse absorver o sangue e
11 fosse uma barreira física entre o alimento e o inseto. O sangue foi coletado de bovino
12 estabulado nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Pelotas
13 (HUV/UFPel) por punção da veia jugular em tubo BD Vacutainer[®] com EDTA K2.
14 Aproximadamente 2 mL da amostra sanguínea foi transferida para a cavidade externa do
15 copo, com uso de pipeta. Em seguida o biofilme foi estendido sobre a cavidade, ficando em
16 contato com o sangue, e fixado à lateral externa do copo com fita dupla face (Fig. 1c). Na
17 cavidade interna do copo foi adicionada água a 37 °C, para manter o sangue em temperatura
18 ideal para a realização da hematofagia (Fig. 1d). Para validação deste sistema, o aparato
19 também foi feito com o método utilizando Parafilm - M[®], o qual, foi friccionado em pele
20 humana para adesão de ligantes de odores naturais [14].

21

22 *Ensaio*

23 Para o teste de hematofagia artificial foram realizados 2 tratamentos divididos nos
24 seguintes grupos: **A** (sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico com ácido L-
25 láctico 25%) e **B** (sistema de hematofagia artificial com Parafilm - M[®]). O teste foi realizado

1 em triplicata, em cada tratamento foram utilizadas 60 fêmeas, divididas em três gaiolas (n =
2 20) com idade média de 5 dias. As mesmas procederam de uma gaiola contendo machos. A
3 alimentação teve duração de 1 h em ambiente escuro com temperatura controlada (25°C). Três
4 dias após a realização da hematofagia foi colocado um recipiente escuro com água declorada
5 no interior de cada gaiola para que as fêmeas realizassem a postura dos ovos.

6

7 *Avaliação dos parâmetros biológicos*

8 A taxa de ingurgitamento foi avaliada pelo número de mosquitos fêmeas com o
9 abdome distendido e escuro após o repasto sanguíneo. A taxa de oviposição foi avaliada
10 contando o número de jangadas e dividindo-o pelo número de fêmeas ingurgitadas. Para
11 avaliar os demais parâmetros biológicos foram selecionadas aleatoriamente 5 jangadas de
12 cada gaiola do tratamento com biofilme (n = 15). A média de número de ovos produzidos por
13 fêmea foi obtida através da contagem de ovos por jangada com auxílio de estereomicroscópio.
14 Posteriormente, estes ovos foram transferidos para bandejas com água declorada para eclosão
15 dos ovos. As larvas foram alimentadas diariamente com ração úmida para filhotes de gato
16 macerada. Passadas 48 h, as larvas foram quantificadas, bem como as pupas oriundas dessa
17 prole. Posteriormente, estas pupas foram transferidas para gaiolas para se avaliar a taxa de
18 emergência dos adultos.

19

20 *Análise estatística*

21 A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 9.0 para
22 Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, EUA). A análise de variância (ANOVA)
23 unilateral seguida do teste de Tukey foi utilizada para determinar se havia diferenças
24 estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os métodos de alimentação artificial de sangue.

25

1 **Results**

2 O biofilme polimérico apresentou translucidez, e quando esticado a espessura variou
3 de 0,10 e 0,12 mm, demonstrando boa flexibilidade e estabilidade. Após ser imerso em
4 solução de EDTA 1% (m/v) e estendido novamente, notou-se que a espessura média reduziu
5 para 0,05 a 0,07mm. Contudo, não foram observadas modificações visuais no biofilme.
6 Comparativamente, o biofilme com EDTA apresentou boas propriedades mecânicas, onde a
7 tensão máxima de ruptura e o módulo de Young foram ligeiramente superiores se comparado
8 a amostra sem EDTA (Table 1). Com relação à elasticidade, não foram observadas mudanças
9 estatisticamente significantes para ambas as amostras (com ou sem EDTA). Notamos que o
10 filme com EDTA também se mostrou mais hidrofóbico o que pode ser uma vantagem com
11 relação ao manuseio e praticidade de aplicação.

12 A porcentagem média de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas artificialmente
13 com sistema utilizando biofilme atrativo foi de 87%, enquanto que apenas 20% ingurgitaram
14 com Parafilm - M[®]. Houve diferença estatística significativa entre as diferentes membranas
15 utilizadas ($p < 0,0001$), e os dados são apresentados na figura 2. No grupo A foi avaliado a
16 taxa de produção de ovos, viabilidade dos mesmos em relação à eclosão e desenvolvimento
17 das larvas, pupas e adultos. A taxa de postura das fêmeas que realizaram hematofagia
18 artificial através do biofilme foi de 90% com média de 158 ovos por jangada. A porcentagem
19 de larvas que eclodiram foi de 97% sendo que destas, 95% atingiram o estágio de pupa. A
20 taxa de emergência de adultos correspondeu a 93% das pupas.

21

22 **Discussion**

23 A manutenção de colônias de mosquitos em laboratório requer um suprimento de
24 sangue para que as fêmeas possam amadurecer seus oócitos e desenvolvimento dos ovos [6].
25 Devido aos parâmetros bioéticos atuais, o uso direto de animais está sendo substituído pela

1 alimentação artificial de sangue. Laboratórios de criação em larga escala de mosquitos
2 utilizam o Hemotek[®], um equipamento específico para alimentação artificial com sangue
3 (Hemotek Ltd., Blackburn, Reino Unido) [15]. Este método possui alto custo de execução,
4 além de exigir infraestrutura e inspeção [16]. O presente estudo é inovador pois descreve o
5 desenvolvimento e aplicabilidade de uma membrana atrativa aos insetos hematófagos, capaz
6 de atrair e induzir o repasto sanguíneo artificial de *Cx. quinquefasciatus* em condições
7 laboratoriais com custo mais baixo.

8 Diferentes membranas têm sido utilizadas em procedimentos de alimentação artificial
9 na tentativa de simular a pele de animais vertebrados. Alguns estudos indicaram a predileção
10 dos mosquitos por membranas naturais, mas há registros de que outras membranas sintéticas,
11 como colágeno intestinal e Parafilm - M[®], foram bem sucedidas com algumas espécies de
12 culicídeos [13,17-18]. O biofilme polimérico desenvolvido neste estudo é composto de
13 materiais que garantem sua funcionalidade e aplicação. Os polímeros utilizados foram
14 escolhidos de acordo com as suas características. A gelatina, por exemplo, é um biopolímero
15 derivado do colágeno e possui propriedades relevantes como atoxicidade, biodegradabilidade
16 e biocompatibilidade [19]. O PVA, por sua vez, é um polímero sintético, biodegradável e de
17 baixa toxicidade, que possui excelentes propriedades filmogênicas [20]. Já o ácido L- láctico é
18 um dos principais voláteis secretados pelas glândulas sudoríparas écrinas de vertebrados, e
19 possui papel importante na atratividade de mosquitos. Esta foi a primeira substância isolada e
20 identificada que possuía efeito atrativo para mosquitos em testes de comportamento em
21 laboratório [21]. Em estudos com olfatômetro de dupla escolha, *Culex quinquefasciatus* foi
22 atraído pelo ácido L-láctico [22-23].

23 Na exposição do biofilme ao EDTA o biofilme mantém as propriedades mecânicas
24 observadas para o filme sem EDTA, contudo, um ligeiro aumento da rigidez foi observado.
25 Provavelmente, a interação do anticoagulante com a matriz polimérica do filme explique esse

1 comportamento. Ainda, o biofilme com EDTA preserva uma alta elasticidade o que facilita o
2 seu manuseio durante a aplicação. Essa característica permite que o mesmo seja esticado sob
3 o sangue formando uma barreira física entre este alimento e o inseto. Por fim, notou-se que
4 durante o uso do biofilme com EDTA não houve absorção do sangue contido no reservatório.
5 Sugere-se que isso tenha ocorrido devido ao aumento na hidrofobicidade na superfície do
6 mesmo, causado pela presença da substância.

7 Outra vantagem desse sistema é o fato de que o biofilme é produzido a partir de
8 polímeros biodegradáveis, o que permite que sua degradação seja rápida, minimizando o dano
9 ao meio ambiente. Portanto, após seu uso o mesmo pode ser autoclavado e descartado.

10 Vários fatores podem influenciar a alimentação dos culicídeos, como estímulos táteis,
11 visuais, olfativos, temperatura da superfície de alimentação, temperatura do sangue, entre
12 outros [24]. A forma comumente utilizada para atrair as fêmeas para dispositivos artificiais é
13 simulando a presença de hospederio pelo calor, através do aquecimento do sangue confinado
14 no reservatório, principalmente através de sistemas de circulação de água [16,25,26-27].
15 Dispositivos que não possuem circulação de água mantêm o sangue aquecido através do
16 abastecimento em compartimentos internos com líquido aquecido [14], bolsa térmica [28],
17 cerâmica com conexão elétrica para aquecimento [29] ou equipamento eletrônico com placa
18 metálica [30]. Baseados em estudos com olfatômetro de dupla escolha, *Cx. quinquefasciatus*
19 foi atraído pelo ácido L-láctico [22-23]. Assim, o biofilme que produzimos contém este
20 composto químico em sua composição que funciona como atrativo aos mosquitos, simulando
21 a presença de hospedeiro. Desta forma, sugere-se que o biofilme que desenvolvemos pode
22 atrair e influenciar as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* a realizarem o repasto sanguíneo,
23 garantindo altas taxas de ingurgitamento, em laboratório. (Fig. 2). Número bastante superior
24 aos encontrados na literatura, Moutailler et al. [31] estudando a transmissão do vírus da febre
25 de Rift Valley, alimentou artificialmente *Cx. quinquefasciatus* usando membrana Parafilm-M

1 [®], e obteve apenas 1% das fêmeas ingurgitadas. Em experimentos realizados com *Cx.*
2 *quinquefasciatus* através do uso de dispositivos com circulação de água para aquecimento do
3 sangue, houve uma variação da taxa média de alimentação entre 45,0 à 48,0% [26].
4 Novak et al. [32], comparando diferentes tipos de membranas para alimentação
5 artificial de mosquitos, observou que fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* são mais relutantes em
6 se alimentar por meio de membranas artificiais do que diretamente em animais vivos. Dias et
7 al., [33] avaliaram a eficiência de diferentes membranas, sendo elas, colágeno, látex e
8 Parafilm - M[®] na alimentação deste culídeo e obtiveram porcentagens de fêmeas alimentadas
9 de 65%, 60% e 80% respectivamente, porém a taxa de fecundidade foi de apenas 55 a 80
10 ovos, sendo o Parafilm - M[®] o que apresentou maior taxa de fecundidade. Dias et al. [26]
11 avaliaram fontes sanguíneas de alimentação artificial para *Cx. quinquefasciatus*, e observaram
12 que o sangue de coelho citratado apresentou o melhor resultado com média de 44 ovos em
13 comparação ao sangue de ovelha citratado (média de 39 ovos), sangue de ovelha desfibrinado
14 (média de 30 ovos) e sangue de coelho desfibrinado (média de 36 ovos). A média de
15 alimentação direta em cobaia foi ligeiramente maior (55 ovos). Em nosso trabalho a taxa de
16 postura de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas utilizando biofilme foi de 90% com média de
17 158 ovos por jangada com sangue bovino anticoagulado, portanto, além de garantir altas taxas
18 de alimentação o biofilme também não interfere na fecundidade, permitindo grande produção
19 de ovos pelas fêmeas.

20 Além da fecundidade ser satisfatória utilizando o biofilme, este método também
21 garantiu altas taxas de eclodibilidade atingindo 97%, as larvas se desenvolveram sem maiores
22 perdas, e 95% atingiram o estágio de pupa. A taxa de emergência de adultos correspondeu a
23 93%, portanto, não foi observado interferência dos componentes do biofilme em nenhum
24 estágio de desenvolvimento do ciclo de *Cx. quinquefasciatus*. Laboratórios que produzem
25 mosquitos em larga escala necessitam de protocolos atualizados, com alternativas para

1 melhoria das colônias, como rapidez no processo de alimentação dos insetos, menor
2 perda de mosquitos adultos, maior produtividade de ovos após repasto sanguíneo, e
3 conseqüentemente, maior produção de mosquitos [25]. Nosso processo de hematofagia
4 artificial com biofilme polimérico atrativo é capaz de garantir altas taxas de produção de ovos
5 férteis de *Cx. quinquefasciatus* com porcentagem bastante expressiva atingindo o estágio
6 adulto. Atualmente nossa colônia de *Cx. quinquefasciatus* está na geração F.9, os insetos
7 encontram-se aclimatados e o processo de hematofagia artificial otimiza a manutenção do
8 ciclo biológico em laboratório.

9

10 **Conclusions**

11 As fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas artificialmente com sistema utilizando o
12 biofilme polimérico atrativo, preparado nesse estudo, apresentaram uma taxa de ingurgimento
13 superior ao Parafilm - M[®]. O biofilme polimérico possui propriedades mecânicas adequadas à
14 sua aplicação e seu caráter hidrofóbico assegurou a estabilidade do mesmo durante o período
15 de teste. Além disso, o mesmo foi produzido a partir de polímeros biodegradáveis, o que
16 permite que sua degradação seja rápida, minimizando o dano ao meio ambiente. Pode-se
17 concluir que não há interferência dos componentes do biofilme em nenhum estágio de
18 desenvolvimento do ciclo e nos parâmetros biológicos avaliados como a fecundidade, taxa de
19 eclodibilidade dos ovos, desenvolvimento das larvas em pupas e taxa de emergência de
20 adultos. Este estudo contribui significativamente para pesquisas que envolvam a manutenção
21 do ciclo biológico de *Cx. quinquefasciatus* em laboratório. O sistema de hematofagia artificial
22 com biofilme polimérico atrativo é eficaz, prático e pode ser utilizado para outras espécies de
23 insetos hematófagos. Assim, também poderá contribuir com pesquisas sobre o
24 comportamento, interações inter e intraespecíficas, controle ambiental e capacidade vetorial.

25 **Supplementary information**

1 *Acknowledgment*

2 The present work was carried out with the Coordination of Improvement of Higher Education
3 Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

4

5 *Abbreviations*

6 ZIKV: Zika virus; INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial; ASTM: American
7 Society for Testing and Materials; EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid; PVA: Polyvinyl
8 acetate.

9

10 **Declarations**

11 *Ethics approval and consent to participate*

12 The Committee of Ethics in the use of Animals of the Federal University of Pelotas, under the
13 protocol 23110. 009653/2021-45 approved this research.

14

15 *Competing interests*

16 The authors declare that they have no competing interests.

17

18 **References**

19 1. Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. Rev Saúde
20 Pública. 2016;50:36.

21 2. Monath TP, Tsai TF, 1987. St Louis encephalitis: lessons from the last decade. Am J Trop
22 Med Hyg. 1987;37:40S–59S.

23 3. Ayres CFJ, Guedes DRD, Paiva MHS, Morais-Sobral MC, Krokovsky L, Machado LC, et
24 al. Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during
25 the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. Parasit Vectors. 2019;12:220.

- 1 4. Guedes DR, Paiva MH, Donato MM, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWDS, et al. Zika
2 virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect.*
3 2017;6:e69.
- 4 5. Lopes RP, Lima JBP, Martins AJ. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say,
5 1823 in Brazil: a review. *Parasit Vectors.* 2019;12:591.
- 6 6. Forattini OP. Espécie de *Culex* (*Culex*). In: Forattini OP, editor. *Culicidologia Médica*. São
7 Paulo: Editora Universidade de São Paulo; 2002. p. 693–722.
- 8 7. Zhou G, Miesfeld R. Differential utilization of blood meal amino acids in mosquitoes. *J*
9 *Insect Physiol.* 2009;1:1-12.
- 10 8. Ross PA. Does membrane feeding compromise the quality of *Aedes aegypti* mosquitoes?
11 *Plos One.* 2019;14:e0224268.
- 12 9. Pothikasikorn J, Boonplueang R, Suebsaeng C, Kaengraeng R, Chareonviriyaphap T.
13 Feeding response of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* using out-of- date human blood in
14 membrane apparatus. *J Vector Ecol.* 2010;35:149-155.
- 15 10. Consoli RAGB, Oliveira RL. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*.
16 Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1998.
- 17 11. Fakhouri FM, Martelli SM, Caon T, Velasco JI, MeiL HI. Edible films and coatings based
18 on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red
19 Crimson grapes. *Postharvest Biol Tech.* 2015;109:57-64.
- 20 12. Voss GT, Gularte MS, Oliveira RL, Luchese C, Fajardo AR, Wilhelm EA. Biopolymeric
21 films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: promising devices to treat
22 chronic skin diseases. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;114:111074.
- 23 13. Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ. Studies on the feeding response of mosquitoes to
24 nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq News.* 1964;24:407–419.

- 1 14. Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Costa M, Ioshino RS, Azevedo
2 DS, et al. Glytube: a conical tube and parafilm M-based method as a simplified device to
3 artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. PLoS One. 2013;8:e53816.
- 4 15. Benedict MQ, Knols BG, Bossin HC, Howell PI, Mialhe E, Caceres C, Robinson AS.
5 Colonisation and mass rearing: Learning from others. Malar J. 2009;8:S4.
- 6 16. Gunathilaka N, Ranathunge T, Udayanga L, Abeyewickreme W. Efficacy of blood
7 sources and artificial blood feeding methods in rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)
8 for sterile insect technique and incompatible insect technique approaches in Sri Lanka.
9 Biomed Res Int. 2017;2017:3196924.
- 10 17. Bailey DL, Dame DA, Munroe WL, Thomas JA. Colony maintenance of *Anopheles*
11 *albimanus* Wiedemann by feeding preserved blood through natural membrane. Mosq News.
12 1978;38:403–408.
- 13 18. Kasap H, Alptekin D, Kasap M, Güzel AI, Lüleyap U. Artificial bloodfeeding of
14 *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. J Am Mosq Control Assoc. 2003;19:367–
15 370.
- 16 19. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled
17 release of bioactive molecules. J Control Rel. 2005;109:256-274.
- 18 20. Oyeoka HC, Ewulonu CM, Nwuzor IC, Obele CM, Nwabanne JT. Packaging and
19 degradability properties of polyvinyl alcohol/gelatin nanocomposite films filled water
20 hyacinth cellulose nanocrystals. Journal of Bioresources and Bioproducts. 2021;6:168-185.
- 21 21. Acree FJ, Tuner RB, Gouck HK, Beroza M, Smith CNL. Lactic acid: a mosquito
22 attractant isolated from humans. Science. 1968;161:1346-1347.
- 23 22. Allan SA, Bernier UR, Kline DL. Attraction of mosquitoes to volatiles associated with
24 blood. J Vector Ecol. 2006;31:71-78.

- 1 23. Braks MAH, Koenraadt CJM, Briet OJT, Takken W. Behavioural responses of *Culex*
2 *quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) to human odour, carbon dioxide and lactic acid. InProc
3 Exp Appl Entomol.1999;10:91-97.
- 4 24. Friend WG, Smith JJ. An apparatus for exchanging diets rapidly during artificial feeding
5 of sucking insects. Can Entomol. 1977;109:15-20.
- 6 25. Luo YP. A novel multiple membrane blood-feeding system for investigating and
7 maintaining *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. J Vector Ecol. 2014;39:271-277.
- 8 26. Dias LS, Bauzer LG, Lima JB. Artificial blood feeding for culicidae colony maintenance
9 in laboratories: Does the blood source condition matter? Rev Inst Med Trop. 2018;60:45.
- 10 27. Dhar I, Akther T, Bashar K, Tabassum S, Howlader AJ, Munshi SU. Development of a
11 cheap and simple artificial feeding device for studying dengue virus transmission in *Aedes*
12 *aegypti* mosquito at the resource-poor setups. Int J Mosq Res. 2019;6:57-62.
- 13 28. Carvalho DO, Nimmo D, Naish N, McKemey AR, Gray P, Wilke AB, Marrelli MT,
14 Virginio JF, Alphey L, Capurro ML. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti*
15 for field releases in Brazil. J Vis Exp. 2014;83:e3579.
- 16 29. Deng L, Koou SY, Png AB, Ng LC, Lam-Phua SG. A novel mosquito feeding system for
17 routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Trop Biomed. 2012;29:169–
18 174.
- 19 30. Damians D, Soliban SM, Balestrino F, Alsir R, Vreysen MJ, Gilles JR. Different blood
20 and sugar feeding regimes affect the productivity of *Anopheles arabiensis* colonies (Diptera:
21 Culicidae). J Med Entomol. 2013;50:336-43.
- 22 31. Moutailler S, Bouloy M, Failloux AB. Short report: efficient oral infection of *Culex*
23 *pipiens quinquefasciatus* by Rift Valley fever virus using a cotton stick support. Am J Trop
24 Med Hyg. 2007;76:827-829.

- 1 32. Novak MG, Berry WJ, Rowley WA. Comparison of four membranes for artificially blood
2 feeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 1991;7:327-9.
- 3 33. Dias LS, Caldeira JC, Bauzer LGSR, Lima JBP. Assessment of synthetic membranes for
4 artificial blood feeding of culicidae. *Insects.* 2021;12:15.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

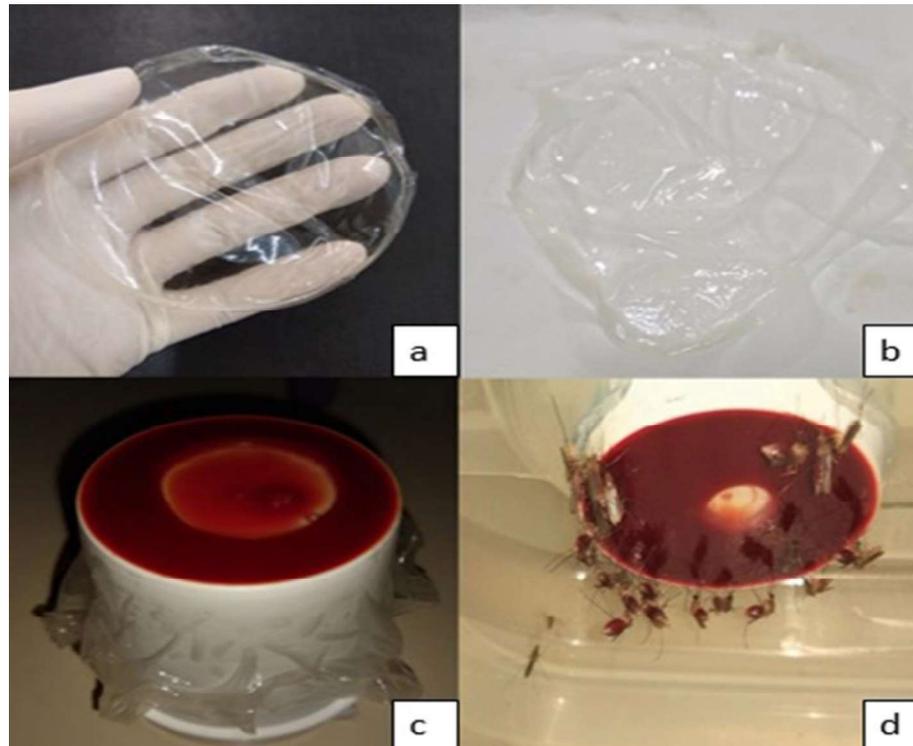
22

23

24

25

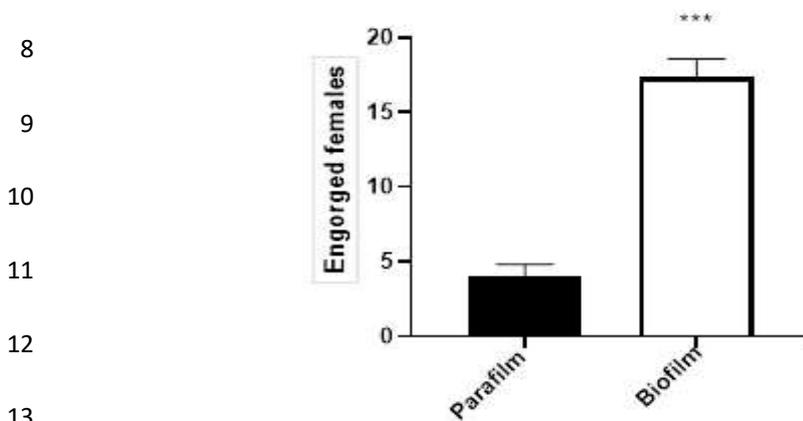
1



2

3 **Fig. 1** Processo de montagem e utilização do sistema de hematofagia artificial **(a)** biofilme
 4 polimérico atrativo **(b)** biofilme polimérico atrativo após ser tratado com EDTA 1% **(c)**
 5 sistema de hematofagia artificial preparado para utilização **(d)** fêmeas de *Culex*
 6 *quinquefasciatus* realizando o repasto sanguíneo através do biofilme.

7



13

14 **Fig. 2** Número de fêmeas ingurgitadas depois da hematofagia artificial em biofilme e Parafilm
 15 - M[®]. O * mostra diferença estatística pelo teste ANOVA seguido por Teste de Tukey ($p <$
 16 0,0001).

1 **Table 1** Propriedades mecânicas determinadas a partir do ensaio de tração para amostras de
 2 biofilme antes e após a exposição à solução de EDTA 1% (m/v).

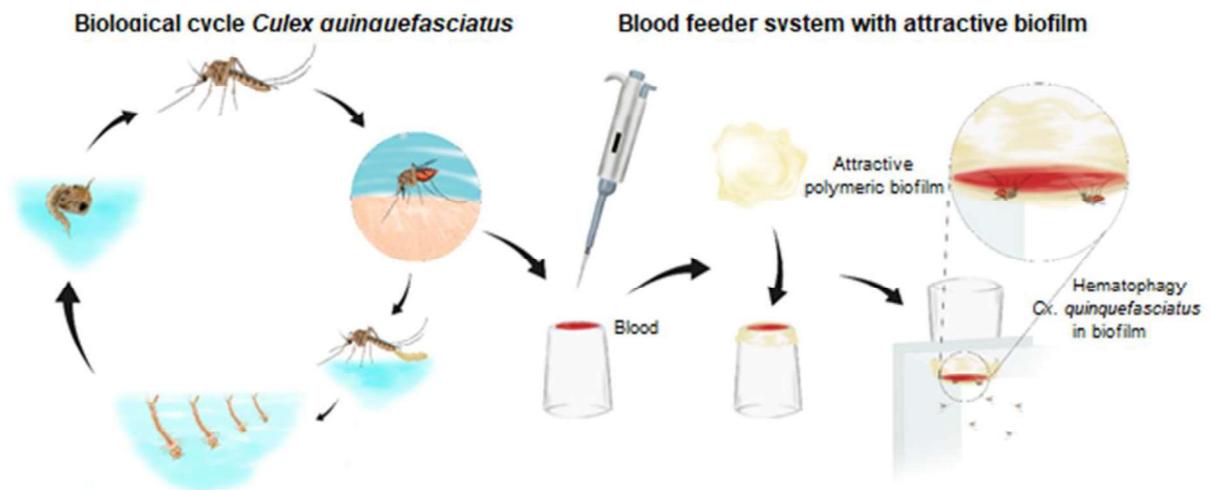
Amostra	Força de ruptura (N)	Elongação máxima (%)	Módulo de Young (kPa)
Biofilme sem EDTA	$1,1 \pm 0,1$	$63,42 \pm 8,03$	$3,84 \pm 0,16$
Biofilme com EDTA	$2,2 \pm 0,8$	$70,32 \pm 12,34$	$6,38 \pm 0,27$

3

4

5 Graphical abstract

6



7

8

9

5 Conclusões

- O sistema de hematofagia artificial com biofilme polimérico atrativo desenvolvido por nosso grupo se mostrou eficiente, capacitou à manutenção e preservação de uma colônia de mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* em laboratório.

- A hematofagia artificial com o biofilme desenvolvido apresentou maiores taxas de ingurgitamento se comparado à membrana sintética Parafilm-M®. Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas através do biofilme atrativo produziram taxas de oviposição, desenvolvimento larval, pupação e emergência de adultos significativas.

- O biofilme polimérico atrativo desenvolvido neste estudo foi eficiente em relação às propriedades físicas (elasticidade e resistência) e químicas (quimiotaxia de mosquitos) o que possibilitou a hematofagia de *Cx. quinquefasciatus*.

- Por fim, o biofilme atrativo se mostrou eficaz, prático e pode ser utilizado para outras espécies de insetos hematófagos, sendo, portanto, um avanço e contribuirá para pesquisas sobre o comportamento, interações inter e intraespecíficas, controle ambiental e capacidade vetorial.

Referências

ACREE, F.J.; TUNER, R.B.; GOUCK, H.K.; BEROZA, M. & SMITH, C.N. L. Lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. **Science**, Washington, v. 161, p. 1346-1347, 1968. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5673445/>

ALLAN, S.A.; BERNIER, U.R.; KLINE D.L. Attraction of mosquitoes to volatiles associated with blood. **Journal of Vector Ecology**, USA, v. 31, n. 1, 2006a. Available at: [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2006a\)31\[71:AOMTVA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2006a)31[71:AOMTVA]2.0.CO;2).

ALLAN, S.A.; BERNIER, U.R.; KLINE D.L. Laboratory evaluation of avian odors for mosquito (Diptera: culicidae) attraction. **Journal of Medical Entomology**, Gainesville, Flórida, v. 43, n. 2, 2006b. Available at: <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.2.225>.

ANJOLETTE, A. F., MARCORIS, M. L. G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.13, n. 156, p. 19-29, 2016. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2016/ses-34229/ses-34229-6334.pdf>. Aceso em: 05/02/2021.

ATKINSON, C.T.; WOODS, K.L.; DUSEK, R.J. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected iiwi (*Vestiaria coccinea*). **Parasitology**, USA, v. 111, p. 59-69, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1017/S003118200007582X>.

AYRES, C.F.J. *et al.* Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 220, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3461-4>.

BAILEY, D. L.; DAME, D. A.; MUNROE, W. L.; Thomas, J. A. Colony maintenance of *Anopheles albimanus* Wiedemann by feeding preserved blood through natural membrane. **Mosquito News**, [s.l.], v. 38, n. 3, p. 403-408, 1978.

BARR, A.R. The distribution of *Culex p. pipiens* and *Culex p. quinquefasciatus* in North America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, USA, v. 6, n. 1, p. 153-164, 1957.

BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology research**, Berlin, v. 114, n. 8, p. 2801-2805, 2015a. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-015-4586-9>.

BENELLI, G. The best time to have sex: mating behaviour and effect of daylight time on male sexual competitiveness in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 114, p. 887-894, 2015(b). Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-014-4252-7>.

BENELLI, G. Mating behavior of the West Nile virus vector *Culex pipiens* – role of behavioral asymmetries. **Acta Tropica**, v. 179, p. 88–95, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.024>.

BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks – a systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47–54, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.025>.

WILKE, A.B.B.; BEIER, J.C.; BENELLI, G. Transgenic mosquitoes – fact or fiction? **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 34, ed. 6, p. 456-465, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.003>.

BENEDICT, M.Q.; KNOLS, B.G.; BOSSIN, H.C.; HOWELL, P.I.; MIALHE, E.; CACERES, C, Robinson AS. Colonisation and mass rearing: Learning from others. **Malar Journal**, v. 8, n. S4, 2009. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2875-8-S2-S4>.

BERNIER, U. R., KLINE, D. L.; SCHRECK, C. E.; YOST, R. A.; BARNARD, D. R. Chemical analysis of human skin emanations: comparison of volatiles from humans that differ in attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s.l.], v. 18, n. 3, 2002. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12322940/>.

BEST, A.; LIEBERMAN, D.E.; KAMILAR, J.M. Diversity and evolution of human eccrine sweat gland density. **Journal of Thermal Biology**, [s.l.], v. 84, p. 331–338, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.024>.

BOURTZIS, K.; LEES, R. S.; HENDRICHS, J.; VREYSEN, M. J. More than one rabbit out of the hat: Radiation, transgenic and symbiont-based approaches for sustainable management of mosquito and tsetse fly populations. **Acta Tropica**, v. 157, p. 115-130, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.009>.

BOYD, M. F.; STRATMAN-THOMAS, W. K.; KITCHEN, S. F. On the Relative Susceptibility of *Anopheles quadrimaculatus* to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. s1-15, 4th ed., p. 485-493, 1935. Available at: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1935.s1-15.485>

BRAKS M.A.H.; KOENRAADT C.J.M.; BRIET O.J.T.; TAKKEN W. Behavioural responses of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to human odour, carbon dioxide and lactic acid. **Proceedings of Experimental and Applied Entomology**, N.E.V., Amsterdam, v. 10, p. 91-97, 1999.

BRAKS, M.A.H.; MEIJERINK, J.; TAKKEN W. The response of the malária mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and L-lactic acid, in an olfactometer. **Physiol Entomol**, v. 26, p. 142–148, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2001.00227.x>

BROWN, A.W.A.; EISNER, T. & WHITTAKER, R.H. Allomones and kairomones: transpecific chemical messengers. **BioScience**, Washington, v. 20, p. 21-22, 1970. Available at: <https://doi.org/10.2307/1294753>

CARVALHO, D.O.; NIMMO, D.; NAISH, N.; MCKEMEY, A.R.; GRAY, P.; WILKE, A.B.; MARRELLI, M.T.; VIRGINIO, J.F.; ALPHEY, L.; CAPURRO, M.L. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. **Journal of visualized Experiments**, v. 83, p. 1-10, 2014. Available at: <https://www.jove.com/video/3579>.

CARVALHO, G. Método indireto para alimentação de insetos hematófagos. **Revista Brasileira Biologia**, v. 21, p. 193-196, 1961.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. Volume 1: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall, 1992.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 1994. 228p.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, RICARDO L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998. 224p.

COSTANTINI, C.; GIBSON, G.; N. SAGNON, A. D. T.; BRADY, J.; COLUZZI, M. Mosquito responses to carbon dioxide in a West African Sudan savanna village. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 10, p. 220-227, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00734.x>

COLLINS, D. A.; BRADY, J. N.; CURTIS, C. F. Assessment of the efficacy of quwenling as a mosquito repellent. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 17-20, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1002/ptr.2650070106>.

COSGROVE, J. B.; WOOD, R. J.; PETRIĆ, D.; EVANS, D. T.; ABBOTT, R. H. A convenient mosquito membrane feeding system. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 10, n. 3, p. 434-436, 1994. Available at: <https://europepmc.org/article/med/7807091>.

COSTA-DA-SILVA, A.L. *et al.* 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**, v. 8, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053816>.

CHANDA, E. *et al.* An operational framework for insecticide resistance management planning. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 773, 2016. Available at: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/5/15-0984_article.

CLEMENTS, A. N. *et al.* **The biology of mosquitoes**, n. 2: sensory reception and behaviour. CABI publishing, 1999.

CROWELL, R. L. Insectary Rearing of *Anopheles quadrimaculatus* (A preliminary Report). **American Journal of Hygiene**, v. 32, n. 1, p. 12-20, 1940. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19401000489>.

DAMIENS, D.; SOLIBAN, S.M.; BALESTRINO, F.; ALSIR, R.; VREYSEN, M.J.; GILLES, J.R. Different blood and sugar feeding regimes affect the productivity of *Anopheles arabiensis* colonies (Diptera: Culicidae). **Journal Medical Entomology**, v. 50, 2th ed., p. 336-343, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1603/ME12212>.

DAVIS, E. E.; SOKOLOVE, P. G. Lactic acid-sensitive receptors on the antennae of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Comparative Physiology. A**, v. 105, p. 43-54, 1976.

DEKKER, T.; TAKKEN, W. Differential responses of mosquito sibling species *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* to carbon dioxide, a man or a calf. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, p.136-140,1998. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00073.x>

DEKKER, T.; STEIB, B.; CARDE, R.T.; GEIER, M. L-Lacti acid: a humansignifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 16, p. 91-98, 2002. Available at: [10.1046/j.0269-283x.2002.00345.x](https://doi.org/10.1046/j.0269-283x.2002.00345.x)

DEKKER, T.; GEIER, M.; CARDÉ, R. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2963-2972, 2005. Available at: [10.1242/jeb.01736](https://doi.org/10.1242/jeb.01736).

DENG, L.; KOOU, S. Y.; PNG, A. B.; NG, L. C.; Lam-Phua, S. G. A novel mosquito feeding system for routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Tropical Biomedicine**, v. 29, n. 1, p. 169-174, 2012. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22543617/>

DERBYSHIRE, P. J.; BARR, H.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. Lactate in human sweat: a critical review of research to the present day. **The journal of physiological sciences**, v. 62, n. 6, p. 429-440, 2012. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22678934/>

DIAS, L.S.; CALDEIRA, J.C.; BAUZER, L.G.S.R.; LIMA, J.B.P. Assessment of Synthetic Membranes for Artificial Blood Feeding of Culicidae. **Insects**, v. 12, 15th ed., 2021. Available at: <https://www.mdpi.com/2075-4450/12/1/15>.

DIAS, L.S.; BAUZER, L.G.; LIMA, J.B. Artificial blood feeding for culicidae colony maintenance in laboratories: Does the blood source condition matter? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 60, 45th ed., p. 1-11, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860045>.

DIEHLMANN, H. **Laboratory rearing of mosquitoes using a Hemotek feeding system**. Proc. 3rd Int. Conf. Urban Pests, 1999. p. 668.

DUKAS, R. Evolutionary biology of insect learning. **The Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 145–160, 2008. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17803459/>

DHAR, I *et al.* Development of a cheap and simple artificial feeding device for studying dengue virus transmission in *Aedes aegypti* mosquito at the resource-poor setups. **International Journal of Mosquito Research**, v. 6, n. 5, p. 57-62, 2019.

DREYER, G. *et al.* Paradigm shift in bancroftian filariasis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 355-362, 2009.

ECKERT, J. Alternatives to animal experimentation in parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2-3, p. 99-120, 1997. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9261973/>

ESPÍRITO SANTO. Secretaria de Estado da Saúde. **Núcleo Especial de Vigilância Epidemiológica**. Nota Técnica 01/2018: Informações e procedimentos para a vigilância de Febre do Nilo Ocidental. Vitória, 2018. Disponível em: <URL>. Acesso em: 20/10/2020.

EIRAS, A.E. **Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos de doenças médico-veterinárias**. In: VILELA, E.F. & DELLA- LÚCIA, T.M.C. (Eds.), *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. Ribeirão Preto: Editors Holos. 2001. cap. 12, p. 99-112.

EIRAS, A.E. & MAFRA-NETTO, A. **Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento dos insetos**. In: VILELA, E.F. & DELLA- LÚCIA, T.M.C. (Eds.), *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. Ribeirão Preto: Editors Holos. 2001. cap 3, p. 27-40.

FARAJOLLAHI. A.; FONSECA, D.M.; KRAMER, L.D.; KILPATRICKD A.M. “Bird biting” mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, 7th ed., p. 1577–85, 2011. Available at: <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=24628512>.

FARLEY, A.; HENDRY, C.; MCLAFFERTY, E. Blood components. **Nursing Standard**, v. 27, n. 13, p. 35-42, 2012. Available at: <https://journals.rcni.com/nursing-standard/blood-components-ns2012.11.27.13.35.c9449>.

FAKHOURI, F.M.; MARTELLI, S.M.; CAON, T.; VELASCO, J.I.; MEIL, H.I. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biol Tech**, 2015, v. 109, p. 57-64.

FORATTINI, O.P. **Espécie de Culex (Culex)**. In: Forattini OP, editor. *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo; 2002. p. 693–722.

FORATTINI, F.; KAKITANI, I.; MASSAD, E.; MARUCCI, D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4 – Survey of resting adults and synanthropic behavior in south – Eastern, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 398-411, 1993.
FONSECA, D.M. *et al.* Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. **Science**, v. 303, p. 1535–1538, 2004. Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1094247>.

FRIEND, W.G.; SMITH, J.J. An apparatus for exchanging diets rapidly during artificial feeding of sucking insects. **The Canadian Entomologist**, v. 109, p. 15-20, 1977. Available at: <https://doi.org/10.4039/Ent10915-1>.

GALUN, R. Feeding stimuli and artificial feeding. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 36, n. 4, p. 590, 1967. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2476402/>

GHANINIA, M.; LARSSON, M.; HANSSON, B.S.; IGNELL, R. Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 3020-3027, 2008. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18775939/>

GEIER, M.; BOSCH, O. J.; BOECKH, J. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Chemical Senses**, v. 24, n. 6, p. 647-653, 1999. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10587497/>

GILLIES, M.T. The role of Carbon dioxide in host finding by mosquitoes (Diptera: culicidae): A review. **Bulletin of Entomological**, v. 70, p. 525–532, 1980. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007485300007811>.

GODDARD, L.B. *et al.* Vertical transmission of West Nile virus by three California *Culex* mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 40, p.743-746, 2003. Available at: <https://academic.oup.com/jme/article/40/6/743/833865>.

GU, W. *et al.* Natural plant sugar sources of Anopheles mosquitoes strongly impact malaria transmission potential. **PLoS One**, v. 6, n. 1, 2011. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/articleid=10.1371/journal.pone.0015996>.

GUEDES, M.L.P. Culicidae (Diptera) No Brasil: Relações Entre Diversidade, Distribuição E Enfermidades. **Oecologia Australis**. v. 16, n. 2, p. 283–296, 2012. Available at: <https://doi.org/10.4257/oeco.2012.1602.07>.

GUEDES, D. R. D. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, New York, v. 6, n. 8, 69th ed., p. 1-1169, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59>.
GUNATHILAKA, N.; RANATHUNGE, T.; UDAYANGA, L.; ABEYEWICKREME, W. Efficacy of blood sources and artificial blood feeding methods in rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for sterile insect technique and incompatible insect technique approaches in Sri Lanka. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-7, 2017. Available at <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/3196924/>

GUO, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging microbes & infections**, New York, v. 5, n. 9, 1st ed., p. 1-5, 2016. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2016.102>.

GREENBERG, J. A method for artificially feeding mosquitoes. **Mosquito News**, v. 9, n. 2, p. 48-50, 1949. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19502900792>.

HARBACH, R.E. Mosquito Taxonomic Inventory. **Mosquito Taxonomic Inventory**. Valid Species List 1–60, 2020.

HEALY, T. P.; COPLAND, M.J.W.; CORK A. Landing responses of *Anopheles gambiae* elicited by oxocarboxylic acids. **Medical and Veterinary Entomology**, v.16, 2th ed., p. 126-132, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2002.00353.x>

HEMOTEK Ltd Starter pack – 6 feeders with 3 ml reservoirs. <http://hemotek.co.uk/starter-pack-6-feeders-with-3ml-reservoirs/> (accessed: October 02th 2021), 2018.

IVERSSON, L. B. Encephalitis outbreak in the southern region of the State of S.Paulo in 1975 and 1976 — Aspects concerning chronological and geographical distribution of the cases. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 375-388, 1977. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19782901004>.

IVERSSON, L. B.; COIMBRA, T. L. M. Encephalitis in the Ribeira Valley (S. Paulo, Brazil) in the post-epidemic period of 1978-1983: a discussion on aspects of etiological diagnosis and epidemiological characteristics. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 18, p. 323 – 332, 1984. Available at: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/S3qdqmRvW5S4jq9wRFCJPnt/?lang=pt>.

IRVINEA, M. A.; HOLLINGSWORTH, T. D. Kernel-density estimation and approximate Bayesian computation for flexible epidemiological model fitting in **Python. Epidemics**, Amsterdam, v. 25, p. 80-88. 2018. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1755436518300185>.

JANSEN, C.C.; WEBB, C.E.; GRAHAM, G.C.; CRAIG S.B.; ZBOROWSKI, P.; RITCHIE, S.A.; RUSSELL, R.C.; VAN DEN HURK A.F. Blood sources of mosquitoes collected from urban and peri-urban environments in eastern Australia with species-specific molecular analysis of avian blood meals. **American Journal of Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 849-857, 2009. Available at: [doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0008](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0008).

KASAP, H.; ALPTEKIN, D.; KASAO, M.; GUZEL A.I.; LULEYAP U. Artificial blood feeding of *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.19, n. 4, p. 367-370, 2003. Available at: <https://europepmc.org/article/med/14710738>.

KLUN, J. A.; KHRIMIAN, A.; MARGARYAN, A.; KRAMER, M.; DEBBOUN, M. Synthesis and repellent efficacy of a new chiral piperidine analog: comparison with deet and bayrepel activity in human-volunteer laboratory assays against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, 3th ed., p. 293-299, 2003. Available at: <https://academic.oup.com/jme/article/40/3/293/876434?login=true>.

KNOLS, B.G.J. **Odour-mediated host seeking behaviuor of the Afro-tropical malaria vector *Anopheles gambiae* Giles**. 1996. Tese (Doutorado) - Department of Entomology, Wageningen Agricultural university, the Netherlands and The National Institute for Medical Research, v. 213, 1996.

LABARTHE, N.V.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine *Dirofilariasis* area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 145-54, 1998.

LAI, C.H.; TUNG, K.C.; OOI, H.K.; WANG, J.S. Susceptibility of mosquitoes in Central Taiwan to natural infections of *Dirofilaria immitis*. **Medical Veterinary Entomology**, v. 15, n. 1, p. 64- 67, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00280.x>.

LIMA-CAMARA, T.N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 36, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006791>.

LOGAN, J.G.; BIRKETT, M.A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science**, v. 63, 7th ed., p. 647–657, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1002/ps.1408>.

LOPES, R.P.; LIMA, J.B.P.; MARTINS, A.J. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: a review. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 591, 2019. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13071-019-3850-8>.

LUO, Y. P. A novel multiple membrane blood-feeding system fo investigating and maintaining *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Journal of Vector**

Ecology, v. 39, 2th ed., p. 271-277, 2014. Available at:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvec.12101>.

LYSKI, Z.L.; SAREDY, J.J.; CIANO, K.A.; STEM, J.; BOWERS, D.F. Blood feeding position increases success of recalcitrant mosquitoes. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, 8th ed., p. 1165–1171, 2011. Available at:
<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2010.0164>.

MABASO, M.L.H.; SHARP, B.; LENGELER, C. Historical review of malaria control in southern Africa with an emphasis on the use of indoor residual house-spraying. **Trop Med Int Health**, v. 9, 8th ed., p. 846–856, 2004. Available at:
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01263.x>.

MACKAY, A.J.; KRAMER, W.L.; MEECE, J.K.; BRUMFIELD, R.T.; FOIL, L.D. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in east Baton Rouge Parish, Louisiana. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, 2th ed., p. 238-248, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1093/jmedent/47.2.238>.

MACKERRAS, M.J. The life history of a Hepatozoon (Sporozoa: Adeleidea) of varanid lizards in Australia. **Australian Journal Zoology, Australia**, v. 10, p. 35–44, 1962. Available at: <https://www.publish.csiro.au/ZO/ZO9620035>.

MEIJERINK, J.; BRAKS, M.A.H.; A. A. BRACK, ADAM, W.; DEKKER, T.; M. A. POSTHUMUS, VAN BEEK, T. A.; VAN LOON, J.J.A. Identification of Olfactory Stimulants for *Anopheles gambiae* from Human Sweat Samples. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 1367-1382, 2000. Available at:
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005475422978>.

MOHR, R.M.; MULLENS, B.A.; GERRY, A.C. Evaluation of ammonia, human sweat, and bovine blood as attractants for the female canyon fly, *Fannia conspiciua* (Diptera: Muscidae), in southern California. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, n. 1, p. 55-58, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00140.x>

MONATH, T.P.; TSAI, T.F.. St Louis encephalitis: lessons from the last decade. **The American journal of tropical medicine and Hygiene**, v. 37, p. 40–59, 1987. Available at: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.40S>.

MONDINI, A. *et al.* Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology, Amsterdam**, v. 40, n. 1, p. 84–86, 2007. Available at:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17658293/>

MONTAGNA, W. The anatomy of sweat glands. **J Human Evol**, v. 14, p. 3–22.

MORAIS, S. A. *et al.* O mosquito *Culex quinquefasciatus* (diptera: culicidae) em município cortado por rio com elevada carga poluidora. **Revista brasileira de ciências ambientais**, n. 6, p. 21-26, abr. 2007.

MOUTAILLER, S.; BOULOY, M.; FAILLOUX, A.B. Short report: efficient oral infection of *Culex pipiens quinquefasciatus* by Rift Valley fever virus using a cotton stick support. **American Journal of Hygiene**, v. 76, n. 5, p. 827-9, 2007. Available at: <https://hal-pasteur.archives-ouvertes.fr/pasteur-01697387>.

MUKABANA, W.R.; TAKKEN, W.; COE, R.; KNOLS, B.G.J. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malar J** 1, 2002. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2875-1-17>.

MBOERA L.E.G.; KNOLS, B.G.J.; TAKKEN, W.; HUISMAN, P.W.T. Olfactory responses of female *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in a dual-choice olfactometer. **J Vector Ecol**, v. 23, p.107-113, 1998.

NAYAR, J. K.; SAUERMAN, D. M. A comparative study of flight performance and fuel utilization as a function of age in females of Florida mosquitoes. **Journal of insect physiology**, v. 19, 10th ed., p. 1977-1988, 1973. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022191073901923>.

NOVAK, M.G.; BERRY, W.J.; ROWLEY, W.A. Comparison of four membranes for artificially bloodfeeding mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 2, p. 327–329, 1991. Available at: <https://europepmc.org/article/med/1680153>.

OYEOKA, H.C.; EWULONU, C.M.; NWUZOR, I.C.; OBELE, C.M.; NWABANNE, J.T. Packaging and degradability properties of polyvinyl alcohol/gelatin nanocomposite films filled water hyacinth cellulose nanocrystals. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 6, 2th ed., p. 168-185, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.02.009>.

PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, n. 4, p. 467-474, 2011. Available at: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/16681>.

PAVELA, R.; VRCHOTOVÁ, N.; TRÍSKA, J. Larvicidal activity of extracts from *Ammi visnaga* Linn, (Apiaceae) seeds against *Culex quinquefasciatus* Say, (Diptera:

Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 51-57, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.016>.

PICKETT, J.A.; BIRKETT, M.A.; DEWHIRST, S.Y.; LOGAN, J.G.; OMOLO, M.O.; TORTO, B.; PELLETIER, J.; SYED, Z.; LEAL, W.S. Chemical ecology of animal and human pathogen vectors in a changing global climate. **Journal of Chemical Ecology**, v, 36, n. 1, p. 113-121, 2010. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-010-9739-9>.

PINA, I.G.; FONSECA, A.H. Comportamento de *Aedes aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae) alimentados artificialmente com sangue de diferentes espécies de doadores. **Revista Patologia Tropical**, v. 28, p. 64-71, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59>.

PITTS, R. J., MOZŪRAITIS, R., GAUVIN-BIALECKI, A., LEMPÉRIÈRE, G. The roles of kairomones, synomones and pheromones in the chemically-mediated behaviour of male mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 132, p. 26-34, 2014. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X13002404>.

POTHIKASIKORN, J.; BOONPLUEANG, R., SUEBSAENG, C.; KAENGRAENG, R.; CHAREONVIRIYAPHAP, T. Feeding response of *Aedes aegypti* and *Anophele dirus* using out-of- date human blood in membrane apparatus. **Journal of Vector Ecology**, v. 35, 1th ed., p. 149-155, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00071.x>

PHASOMKUSOLSIL, S. *et al.* Maintenance of mosquito vectors: effects of blood source on feeding, survival, fecundity, and egg hatching rates. **Journal of vector Ecology**, v. 38, n, 1, p. 38-45. 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12006.x>

QIU, Y. T. **Sensory and behavioural responses of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* to human odours**. 2005, p. 208.

QIU, Y.T.; SMALLEGANGE, R.C.; VAN LOON, J.J.; TER BRAAK, C.J.; TAKKEN, W. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s.s. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, 3th ed., p. 280-287, 2006. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2915.2006.00627.x>.

REMFRY, J. **Ethical aspects of animal experimentation**. In: Tuffery AA, editor. *Laboratory animals: an introduction for new experimenters*. New York: John Wiley & Sons, 1987. p.5-19.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A. Brasil, 2001.

ROCCO, I. M. *et al.* St. Louis encephalitis vírus: first isolation from a human in São Paulo state, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 281-285, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000500008>.

ROSALES-RONQUILLO, MARIA C.; SIMONS, R. W.; SILVERMAN, P. H. Aseptic rearing of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, 5th ed., p. 949-954, 1973. Available at: <https://doi.org/10.1093/aesa/66.5.949>.

ROSS, P.A. Does membrane feeding compromise the quality of *Aedes aegypti* mosquitoes? **Plos One**, v. 14, n. 11, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224268>.

ROZEBOOM, L. E. The rearing of *Anopheles albimanus* Wiedemann in the laboratory. **American journal of tropical medicine and Hygiene**, v. 16, n. 4, p. 471-478, 1936. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19372900148>.

RUTLEDGE, L.C.; WARD, R.A.; GOULD, D.J. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosquito News**, v. 24, p. 407-419, 1964.

SARDELIS, M. R. *et al.* Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, p. 1018-1022, 2001. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631924/>

SERRA, O.P.; CARDOSO, B.F.; RIBEIRO, A.L.M.; DOS SANTOS, F.A.L.; SLHESSARENKO, R.D. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20–9, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760150270>.

SIRIA, D.J. *et al.* Evaluation of a simple polytetrafluoroethylene (PTFE)-based membrane for blood-feeding of malaria and dengue fever vectors in the laboratory. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 236-246, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2823-7>.

SCHRECK, C. E.; MCGOVERN, T. P. Repellents and other personal protection strategies against *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 5, n. 2, p. 247-250, 1989.

SMALLEGANGE, R. C.; QIU, Y. T.; VAN LOON, J.J.A.; TAKKEN, W. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). **Chemical Senses**, v. 30, 2th ed., p. 145-152, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1093/chemse/bji010>.

SMALLEGANGE, R.C. *et al.* Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor. **PLoS One**, v. 8, n. 5, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063602>.

SCHMIED, W. H.; TAKKEN, W.; KILLEEN, G.F.; KNOLS, B.G.J.; SMALLEGANGE, R.C. Evaluation of two counterflow traps for testing behaviour-mediating compounds for the malaria vector *Anopheles gambiae s.s.* under semi-field conditions in Tanzania. **Malaria Journal**, v. 8, p. 230, 2008. Available at: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-7-230>.

STEPHENS, D.W. **Learning and behavioral ecology: incomplete information and environmental predictability.** In: Papaj DR, Lewis AC, eds. *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*. New York, NY: Chapman & Hall. 1993, p.195–218.

STEIB, B.M.; GEIER, M.; BOECKH, J. The Effect of Lactic Acid on Odour-Related Host Preference of Yellow Fever Mosquitoes. **Chemical Senses**, v. 26, 5th ed., p. 523–528, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1093/chemse/26.5.523>.

TAIPE-LAGOS, C.B.; NATAL, D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 275-9, 2003.

TURLINGS, T.C.J. *et al.* **Learning of Host-Finding Cues by Hymenopterous Parasitoids.** In: Papaj DR, Lewis AC, eds. *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*. New York, NY: Chapman & Hall. 1993, p. 51–78.

TURELL, M. J. Members of the *Culex Pipiens* Complex as Vectors of viruses. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 28, n. 4, p. 123–26, 2012. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401952/>.

TSENG K, M. A simple parafilm M-based method for blood-feeding *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 40, 4th ed., p. 588-589, 2003. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14680132/>

VANIČKOVÁ, L.; CANALE, A.; BENELLI, G. Sexual chemoecology of mosquitões (Diptera, Culicidae): Current knowledge and implications for vector control programs. **Parasitology International**, v. 66, 2th ed., p. 190-195, 2017. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27692501/>

VERHULST, N.O. *et al.* Composition of Human Skin Microbiota Affects Attractiveness to Malaria Mosquitoes. **PLoS One**, v. 6, n. 12, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028991>.

VERHULST, N.O. *et al.* Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 8, n. 302, 2009. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2875-8-302>.

VILELA, E.F., DELLA-LUCIA, T.M.C. **Introdução aos semioquímicos e terminologia**. In: VILELA, E.F. & DELLA- LÚCIA, T.M.C. (Ed.), *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. Ribeirão Preto: Editors Holos. 2001. cap. 1, p. 9-12.

VOSS, G.T.; GULARTE, M.S.; OLIVEIRA, R.L, Luchese C, Fajardo AR, Wilhelm EA. Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: promising devices to treat chronic skin diseases. **Materials Science & Engineering**, v. 114, n. 111074, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111074>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Vector control- Methods for use by individuals and communities**. Geneva, 1997.

WRBU - Walter reed biosystematics Unit. **Systematic Catalog of Culicidae**. Whashington, USA, 2013.

WRBU - Walter reed biosystematics Unit. **Systematic Catalog of Culicidae**. Whashington, USA, 2019.

YOUNG, S.; WONG, M.; TABATA, Y.; MIKOS, A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal Controlled Release**, v. 109, 1-3th ed., p. 256-274. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.023>.

ZHOU, G.; MIESFELD, R. Differential utilization of blood meal amino acids in mosquitoes. **Journal Insect Physiol**, v. 1, p. 1-12, 2009. Available at: <https://www.proquest.com/openview/b5bc4301540bf73638f7717ad26bc835/1?pq-origsite=gscholar&cbl=3933327>.

ZWIEBEL, L.J.; TAKKEN, W. Olfactory regulation of mosquito–host interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, 7th ed., p. 645–652, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.017>.

Anexos



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 015280 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92242080000100

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

Pafs: Brasil

Telefone: (53) 3284 4086

Fax:

Email: cit.ufpel@gmail.com

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): SISTEMA DE HEMATOFAGIA ARTIFICIAL COM BIOFILME POLIMÉRICO ATRATIVO, PARA CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE INSETOS HEMATOFAGOS EM LABORATÓRIO

Resumo: A presente invenção refere-se a um sistema de hematofagia artificial para alimentar insetos hematófagos em laboratório, através de um biofilme polimérico atrativo constituído a base de gelatina, Poli(álcool vinil) (PVA) e ácido láctico. O sistema inclui uma base com cavidade para alocar o alimento, um biofilme polimérico atrativo encobrindo e em contato com o alimento, formando a superfície de alimentação e uma estrutura lateral de fixação do biofilme. O biofilme é o componente bioativo do sistema e tem a função de atrair e induzir os insetos hematófagos a realizarem o repasto sanguíneo através dele. A presente invenção pertence ao setor técnico de entomologia, saúde médico veterinária, saúde pública, criação de insetos e alimentadores biológicos.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: CAMILA BELMONTE OLIVEIRA

CPF: 99262746091

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av, Domingos de Almeida 1755/casa 115

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96087-470

País: BRASIL

Telefone: (55) 999 038779

Fax:

Email: camilabelmontevet@yahoo.com.br

Inventor 2 de 4

Nome: ANGELITA MILECH

CPF: 03630911064

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Pedro Moacyr, 112, travessa um. Bairro três vendas

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96020-550

País: BRASIL

Telefone: (53) 981 016163

Fax:

Email: angelitamilech@gmail.com

Inventor 3 de 4

Nome: ANDRÉ RICARDO FAJARDO

CPF: 05842622998

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 4229 - apto 406, Centro, Pelotas

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96105-560

Pafs: BRASIL

Telefone: (53) 999 110618

Fax:

Email: drefajardo@hotmail.com

Inventor 4 de 4

Nome: JAQUELINE FERREIRA DE SOUZA

CPF: 03023751048

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Salvador Balreira, 1053

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96075-620

Pafs: BRASIL

Telefone: (53) 991 590258

Fax:

Email: jferreirasouza93@hotmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pdf
Resumo	Resumo_corrigido..pdf
Relatório Descritivo	Relatorio_descritivo_corrigido.pdf
Reivindicação	Reivindicacoes_corrigido.pdf
Desenho	Desenhos_corrigido.pdf
Procuração	PROCURAÇÃO_DIGITAL.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.