

## DIETA ARTIFICIAL PARA LARVAS DE *Lutzomyia umbratilis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)

Cleide Karoline Pereira da SILVA<sup>1</sup>  
Vera Margarete SCARPASSA<sup>2</sup>  
Ronildo Baiatone ALENCAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM; <sup>2</sup>Orientador CBIO/INPA; <sup>3</sup>Co-orientador

### INTRODUÇÃO

A criação de flebotomíneos em laboratório, entre outras finalidades, é fundamental para investigar aspectos dos seus ciclos de vida, compreender as dinâmicas da transmissão de *Leishmania* spp. e susceptibilidade a repelentes e inseticidas (Escovar *et al.* 2004; Yaghoobi-Ershadi *et al.* 2007; Mascari *et al.* 2007).

Embora algumas espécies tenham sido criadas e mantidas com sucesso em vários laboratórios (Killick-Kendrick *et al.* 1977; Killick-Kendrick e Killick-Kendrick 1991; Lawyer *et al.* 1991), a grande maioria é de difícil criação, em virtude, principalmente, da limitação imposta pelo pouco ou nenhum conhecimento das condições microambientais dos criadouros naturais (Montoya-Lerma *et al.* 1998). Uma dessas limitações é a necessidade de dietas apropriadas para as larvas, sendo este um requerimento básico e fundamental para manter uma colônia vigorosa (Hertig e Johnson 1961; Modi e Tesh 1983; Wermelinger e Zanuncio 2001). Diversos tipos de produtos já foram testados na criação das larvas, principalmente de *L. longipalpis*, espécie vetora de *Leishmania chagasi* e, relativamente, de fácil criação em laboratório. Dentre estes, destacam-se matéria orgânica vegetal em decomposição, fezes bovinas desidratadas, fezes de coelho, pó de fígado, ração de peixes (Sherlock e Sherlock 1959; Sherlock e Sherlock 1972; Killick-Kendrick *et al.* 1977). No entanto, a exigência alimentar das larvas pode variar de acordo com a espécie (Wermelinger e Zanuncio 2001), sendo esta, uma das razões pelas quais diversas dietas têm sido testadas (Sherlock e Sherlock 1972; Killick-Kendrick e Killick-Kendrick 1991; Souza *et al.* 1999).

A dificuldade de criação, manutenção ou baixa produtividade de flebotomíneos em laboratório, prejudica a realização de bioensaios em que, normalmente, utiliza-se grande quantidade de insetos. Entre as espécies de flebotomíneos de difícil criação, destaca-se *Lutzomyia umbratilis*, a qual é amplamente distribuída na região Amazônica (Young e Duncan 1994), e onde tem sido considerada a principal responsável por casos humanos de Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Lainson *et al.* 1979). De acordo com Justiniano *et al.* (2004), tentativa de criação desta espécie foi realizada utilizando ração composta de matéria orgânica de bases de árvores + ração de peixe, contudo sem sucesso para o estabelecimento de colônia. De acordo com os resultados destes autores, o tempo de desenvolvimento das larvas desta espécie é de quarenta e dois dias em média. Além disso, foi observado também que uma fêmea ovipositar cerca de 70 ovos. Contudo, até o presente momento nenhuma colônia dessa espécie foi estabelecida em condições de laboratório. Visando aumentar os conhecimentos da biologia de flebotomíneos e o aprimoramento de técnicas de criação mais específicas e eficientes, este estudo investigou alternativas de dietas alimentares para larvas de *L. umbratilis*, com o principal objetivo de aumentar a produtividade dessa espécie em laboratório.

Tendo por objetivo geral desenvolver uma dieta artificial para larvas de *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) com potencial para criação e manutenção de colônia em condições de laboratório. E como objetivos específicos testar diversos tipos de dietas artificiais para a criação de larvas de *Lutzomyia umbratilis* em condições de laboratório; verificar a produtividade larval para cada dieta testada e investigar a influência das diferentes dietas larvais no tempo de desenvolvimento total e para cada estágio larval.

### MATERIAL E MÉTODOS

As larvas utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de ovos de fêmeas grávidas selvagens de *L. umbratilis* coletadas no Fragmento Florestal do Campus da UFAM, município de Manaus, Amazonas. Onde obtemos um grande número de adultos de *L. umbratilis* além de ser um local próximo do Laboratório de Triatominae, Phlebotominae e Fauna Nidícola (LTPFN) da Coordenação de Biodiversidade do INPA. Por se tratar de uma espécie dendrobática, ou seja, os adultos são normalmente encontrados em grande quantidade em troncos de árvores em floresta primária (Ready *et al.* 1986), as capturas foram realizadas mediante o uso de armadilhas do tipo CDC "miniatura" (Hausherr'sMachine Works, New Jersey, EUA) adaptadas para coletas de sucção sobre os troncos próximo ao nível do chão.

Os flebotomíneos foram coletados e conduzidos até o LTPFN, onde cada fêmea grávida foram triada e mantida em pequenos tubos de vidro com papel filtro umedecido. Para cada fêmea foi oferecida uma solução de glicose para mantê-las vivas até a realização das oviposturas. Após as oviposturas e morte das fêmeas, estas foram identificadas de acordo com a chave de identificação de Young e Duncan (1994). Os ovos obtidos foram todos transferidos para um

único pote e após a eclosão as larvas de primeiro estágio foram contabilizadas e posteriormente transferidas para potes de criação, onde foram adicionadas as rações a serem testadas (biosensaio).

Desenvolvimento das dietas alimentares (rações)

Foram produzidos e avaliados quatro tipos de dietas desenvolvidas previamente no LTPFN, sendo elas: Ração de hamster + fezes de coelho (RH); Ração de peixe (industrializado) + fezes de Coelho (RP); Aveia + fezes de coelho (AV); Farinha de peixe (“piracui”) + fezes de coelho (FP). Outras misturas também foram testadas como farinha láctea + fezes de coelho e matéria orgânica (serrapilheira) + fezes de coelho, mas sem sucesso. Todas as rações testadas tiveram como produto base fezes de coelho. Este material foi desidratado por um processo lento de secagem na estufa à 50° C durante três dias. Em seguida foi moída e misturada em uma proporção de 1:1 com cada um dos produtos anteriormente citado. O material misturado foi homogeneizado em um recipiente de vidro e distribuído uniformemente em uma fina camada no fundo de uma bandeja de plástico. Este material foi, em seguida, umedecido com jatos de água destilada e vedada com uma sacola plástica para passar por um processo de envelhecimento por uma média de 15 dias, durante o qual a mistura é fungada. Após esse período o recipiente foi transferido para um novo saco plástico contendo uma tela de proteção, permitindo a entrada de ar durante cinco dias. Cada ração envelhecida foi colocada para secar na estufa à 50°C durante dois dias.

Antes de serem oferecidas às larvas, todas as rações foram moídas e peneiradas para a obtenção de diferentes granulações. As granulações mais finas são oferecidas preferencialmente às larvas de primeiro estágio, enquanto as granulações mais grossas aos demais estádios.

Para verificar o efeito de cada dieta no período de desenvolvimento e na taxa de sobrevivência larval, duas replicatas de 3 potes com 30 larvas em cada (total = 180) foram utilizadas para cada tipo de dieta previamente desenvolvida. Estes potes foram devidamente etiquetados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura (± 27°C) em um recipiente fechado em seu fundo contendo areia esterilizada e umedecido com água destilada para manter a umidade (± 90% UR) no insetário do LTPFN. As rações foram adicionadas em cada pote de criação imediatamente após a primeira eclosão do conjunto de 30 larvas. Preferencialmente, todas as rações foram testadas simultaneamente no mesmo período. Para isso, foram consideradas as larvas com mesma data de eclosão ou com diferença de no máximo três dias entre uma eclosão e outra. Os potes de criação foram monitorados diariamente para registrar mudanças de estádios larvais e mortalidades. Cada novo estágio foi transferido para novos potes de criação sob as mesmas condições. Cada pote de criação consistiu de um recipiente plástico cilíndrico medindo 4,5 cm de altura por 3,5 de largura, lacrado com tecido de malha fina, para evitar a fuga das larvas. Além disso, removeu-se o fundo e substituiu-o por gesso. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Excel® 2010.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os dados obtidos da criação de imaturos de *Lutzomyia umbratilis* referentes à taxa de produtividade (=taxa de sobrevivência) e tempo de desenvolvimento para cada tipo de ração estão apresentados e comparados na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2.

Tabela 1. Tempo de desenvolvimento em dias (média) e taxa produtividade (%) dos estádios/estágios imaturos de *Lutzomyia umbratilis* criados com quatro tipos de rações em condições de laboratório.

Estádio / Estágio	Rações											
	RH			RP			AV			FP		
	M	N	%	M	N	%	M	N	%	M	N	%
Larva 1	9,1	128	71	10,3	41	46	8,4	67	74	8,0	81	90
Larva 2	7,2	108	60	6,6	37	41	5,8	58	64	5,3	75	83
Larva 3	8,5	83	46	7,6	32	36	5,3	50	56	8,2	67	74
Larva 4	18,8	47	26	21	25	28	14,6	25	28	20,0	54	60
Pupa	11,3	40	<b>22</b>	12,3	20	<b>22</b>	11	24	<b>27</b>	11,2	46	<b>51</b>
<b>Total</b>	<b>54,9</b>			<b>57,8</b>			<b>45,1</b>			<b>52,7</b>		

M = Média, N = Total de imaturos com desenvolvimento completo. RH = fezes de coelho + ração de hamster; RP = fezes de coelho + ração de peixe; AV = fezes de coelho + aveia e FP = fezes de coelho + farinha de peixe.

O tempo médio do desenvolvimento total entre a eclosão dos ovos (início do desenvolvimento de larva de primeiro estágio) e emergência do adulto (final do desenvolvimento de pupa) de *L. umbratilis* variou consideravelmente entre as rações RP (fezes de coelho + ração de peixe) e AV (fezes de coelho + aveia), com 57,8 e 45,1 dias, respectivamente. Tendo em vista que todas as rações foram testadas, na medida do possível, sobre as mesmas condições de temperatura e umidade é possível que tal diferença (cerca de 13 dias) esteja relacionada ao tipo de ração oferecida. As demais rações apresentaram tempo de desenvolvimento acima de 50 dias (Tabela 1 e Figura 1).

Comparativamente, Justiniano *et al.* (2004) observou um período de desenvolvimento entre 60,5 e 66,6 dias (de L1 até pupa) para mesma espécie, a qual foi mantida em condições semelhantes as realizadas neste estudo. Este resultado é ligeiramente similar ao obtido para os imaturos criados com a ração RP (57,8 dias). Porém, muito superior ao observado para a ração AV (45,1 dias). O tempo reduzido do ciclo de desenvolvimento de um organismo é um fator importante em estudos experimentais, pois permite rapidez na obtenção de imaturos e adultos, bem nas respostas dos experimentos realizados. Neste sentido a ração AV é uma boa candidata para a criação de *L. umbratilis* em condições de laboratório. Contudo, foi apenas a segunda em produtividade.

Para todas as rações testadas, os três primeiros estádios larvais se desenvolveram em menos de 10 dias, com exceção das larvas de primeiro estágio criadas com a ração RP (10,3 dias) (Figura 1). As larvas de segundo estágio apresentaram o menor tempo de desenvolvimento geral, com destaque para as que foram criadas com a ração FP (fezes de coelho + farinha de peixe) que se desenvolveram em 5,3 dias, o menor tempo de desenvolvimento entre todos os estádios larvais e pupa.

As larvas de quarto estágio apresentaram o maior tempo de desenvolvimento geral e também a maior variação entre as rações testadas, sendo de 14,6 dias para a ração 3 e 21 dias para a ração 2. Por outro lado, o tempo de desenvolvimento das pupas, para todas as rações, foi ligeiramente homogêneo e intermediário entre o os três primeiros estádios larvais e o quarto estágio larval, variando entre 11 dias (ração AV) e 12,3 dias (ração RP).

O longo tempo de desenvolvimento do quarto estágio larval é aparentemente característico das larvas de flebotomíneos (Montoya-Lerma *et al.* 1998; Ferro *et al.* 1998; Andrade-Filho *et al.* 2004). Possivelmente isto se deve ao fato de ser o último estágio em que os imaturos se alimentam e, portanto, a fase em que há maior concentração de reserva nutricional para as fases seguintes.

Para todas as rações testadas foram verificadas diminuição na taxa de sobrevivência de uma fase de imaturos para outra subsequente. Tal resultado reflete a taxa de mortalidade ocorrida em cada uma dessas fases. Considerando que a produtividade de imaturos é representada pelo número de imaturos que sobreviveram até a próxima fase, então a taxa de sobrevivência representa também a taxa de produtividade de imaturos em relação ao número conhecido de imaturos recém-eclodidos desde o início da criação com cada ração. Dessa forma, a taxa de sobrevivência de pupa representa a taxa de sobrevivência geral da fase imatura, uma vez que esta é o último estágio desta fase.

A taxa de produtividade de geral dos imaturos variou significativamente entre as quatro rações testadas para a criação dos imaturos de *L. umbratilis* (Tabela 1 e Figura 2). Dentre estas, a ração FP foi a mais produtiva com uma taxa de sobrevivência de cerca de 50% (ver taxa de sobrevivência de pupa). Este resultado foi similar ao obtido por Justiniano *et al.* (2004) para esta mesma espécie, cuja a produtividade variou entre 43,4 e 55,2%. No entanto, neste último caso, o tempo de desenvolvimento foi superior (> 60 dias) ao observado para a ração FP (52,7 dias).

As taxas de produtividade das demais rações foram muito baixas, sendo inferior (RH [fezes de coelho + ração de hamster] e RP) ou igual (ração AV) a metade da produtividade registrada para a ração FP. Segundo Bergo *et al.* (1990) um dos critérios de seleção de uma dieta larval seria a taxa de sobrevivência elevadas. Neste sentido, a ração FP é a mais apropriada para a criação em massa dos imaturos e conseqüentemente para a obtenção dos adultos de *L. umbratilis*.

Para todas as rações testadas, a produtividade diminuiu gradativamente de L1 para Pupa (Figura 2). Apesar disso, é importante ressaltar que a mortalidade de larvas de primeiro estágio foi relativamente elevada, particularmente para a ração RP, na qual apenas cerca de 45% completaram o seu desenvolvimento e passaram para o estágio seguinte. Por outro lado, cerca de 90% das larvas de primeiro estágio alimentadas com ração FP sobreviveram até o estágio subsequente. Este resultado refletiu diretamente na produtividade geral dos imaturos, tendo em vista que a rações FP e RP foram a mais e menos produtivas, respectivamente (Figura 2).

Desse resultado é possível inferir que L1 representou a fase crítica na criação de imaturos de *L. umbratilis*, uma vez que, após esta fase, a taxa de mortalidade tornou-se gradativa. Possivelmente, o tipo de ração pode ter influenciado nesta dinâmica. Contudo, é possível inferir também que, além disso, maiores cuidados nas fases iniciais de desenvolvimento garantem a maior passagem de imaturos para as fases posteriores, aumentando assim a produtividade geral dos imaturos e conseqüentemente de adultos.

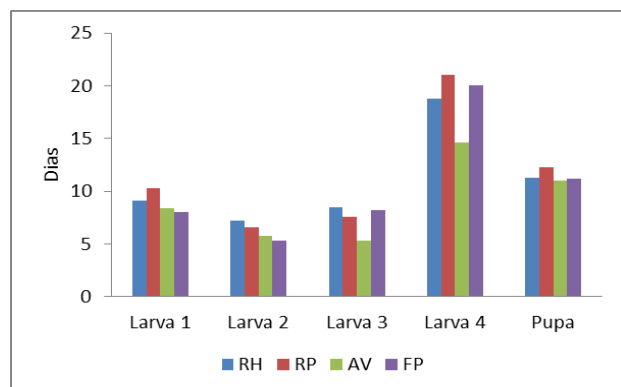


Figura 1. Tempo médio de desenvolvimento em dias dos estádios/estágios imaturos de *Lutzomyia umbratilis* criados com quatro tipos de rações em condições de laboratório. RH = fezes de coelho + ração de hamster; RP = fezes de coelho + ração de peixe; AV = fezes de coelho + aveia e FP = fezes de coelho + farinha de peixe.

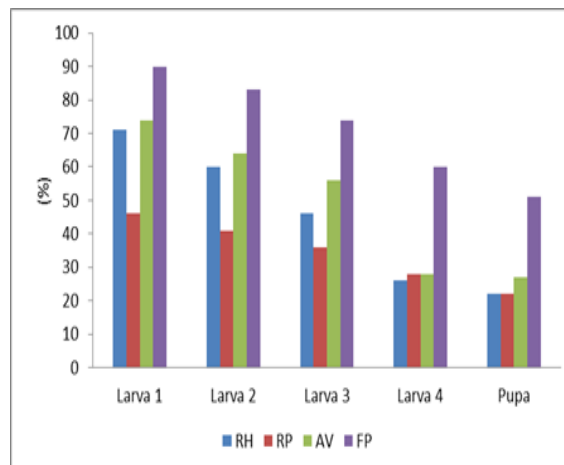


Figura 2. Produtividade (= sobrevivência) dos estádios/estágios imaturos de *Lutzomyia umbratilis* criados com quatro tipos de rações em condições de laboratório. RH = fezes de coelho + ração de hamster; RP = fezes de coelho + ração de peixe; AV = fezes de coelho + aveia e FP = fezes de coelho + farinha de peixe.

## CONCLUSÃO

A ração produzida com fezes de coelho e aveia foi a dieta cujos imaturos se desenvolveram mais rapidamente, sendo considerada uma ração de possível aplicação na criação de imaturos de *L. umbratilis*. Além disso, foi a segunda em produtividade total de imaturos.

A ração produzida com fezes de coelho mais farinha de peixe foi a dieta que rendeu a maior produtividade total de imaturos, sendo por isso considerada a melhor ração para a criação em massa dos imaturos de *L. umbratilis*.

Independentemente do tipo de ração, aparentemente, o cuidado com as larvais no primeiro estágio parece ser um fator fortemente relevante para a criação e estabelecimento de uma colônia de flebotomíneos.

## REFERÊNCIAS

- Andrade-Filho, J.D.; Bianchi-Galati, E A.; Lima-Falcão, A. 2004. Biology of the First Generation of a Laboratory Colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz e Neiva 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto 1926) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6): 597-601.
- Bergo, E.S.; Buralli, M.G.; Gurgel, M. S. 1990. Avaliação do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratório sob diferentes dietas. *Revista de Saúde Pública da USP*, 24(2): 95-100.
- Escovar, J.; Bello, F.J.; Morales, A.; Moncada, L.; Cárdenas, E. 2004. Life tables and reproductive parameters of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6): 603-607.
- Ferro, C.; Cárdenas, E.; Corredor, D.; Morales, A.; Munstermann, L. E. 1998. Life Cycle and Fecundity Analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera:Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(2): 195-199.
- Hertig, M.; Johnson, P.T. 1961. The rearing of *Phlebotomus* sand flies (Diptera: Psychodidae). I. Technique. *Annals of the Entomological Society*, 54: 753-764.
- Justiniano, S.C.B.; Chagas, A.C.; Pessoa, F.A.C.; Queiroz, R.G. 2004. Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Brazilian Journal Biology*, 64: 227-235.
- Killick-Kendrick, R.; Leaney, A.L.; Ready, P.D. 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 13: 429-440.
- Killick-Kendrick, M.; Killick-Kendrick, R. 1991. The initial establishment of sandfly colonies. *Parassitologia*, 33: 315-320.
- Lainson, R.; Shaw, J.J.; Ward, R.D.; Ready, P.D.; Naiff, R.D. 1979. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará state. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene*, 73: 239-242.

- Lawyer, P.G.; Rowton, E.D.; Perkins, P.V.; Johnson, R.N.; Joung, D.G. 1991. Recent advances in laboratory mass rearing of Phlebotomine sand flies. *Parassitologia*, 33: 361-364.
- Mascari, T.M.; Mitchell, M.A.; Rowton, E.D.; Foil, L.D. 2007. Evaluation of novaluron as a feed-through insecticide for control of immature sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44: 714-717.
- Modi G.B; Tesh, R.B. 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpi* sand *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 20: 568-569.
- Montoya-Lerma, J.; Cadena-Peña, H.; Jaramillo-Salazar, C. 1998. Rearing and colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral *Leishmaniasis* in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 263-268.
- Ready, P.D.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Ward, R. 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward e Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania brasiliensis guyanensis* in north-eastern Amazonia Brazil. *Bulletin of entomological research*, 76: 21-40.
- Sherlock, I.A. e Sherlock, V.A. 1959. Criação e biologia em laboratório do *Phlebotomus longipalpis* Lutz e Neiva 1912 (Diptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 19(3): 229-250.
- Sherlock, I.A.; Sherlock, V.A. 1972. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*, 32: 209-217.
- Souza, N.A.; Andrade-Coelho, C.A.; Vilela, M.L.; Barbosa, A.F.; Rangel, E.F. 1999. A New larval diet for colonization of Phlebotominae Sand Flies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 845-847.
- Wermelinger, E.D.; Zanuncio, J.C. 2001. Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different diets. *Brazilian Journal of Biology*, 61: 405-408.
- Yaghoobi-Ershadi, M.R.; Shirani-Bidabadi, L.; Hanafi-Bojd, A.A.; Akhavan, A.A.; Zeraati, H. 2007. Colonization and biology of *Phlebotomus papatasi*, the main vector of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Iranian J journal Public Health*, 36: 21-26.
- Young, D.G.; Duncan, M.A. 1994. Guide of the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54: 1-881.