



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Israel Martins Moreira

Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) do Distrito Federal
à inseticidas e seu controle de qualidade químico

Brasília – 2018

Israel Martins Moreira

**Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) do Distrito Federal
à inseticidas e seu controle de qualidade químico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Lorena Carneiro Albernaz

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM838a Martins Moreira, Israel
Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do Distrito Federal à inseticidas e seu controle de qualidade químico / Israel Martins Moreira; orientador Laila Salmen Espindola; co orientador Lorena Carneiro Albernaz. -- Brasília, 2018.
130 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2018.

1. Arboviroses. 2. *Aedes aegypti*. 3. Controle do vetor.
4. Resistência. 5. Análise química de inseticidas. I. Salmen Espindola, Laila, orient. II. Carneiro Albernaz, Lorena, co orient. III. Título.

Israel Martins Moreira

Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do Distrito Federal à inseticidas e seu controle de qualidade químico

Dissertação realizada no Laboratório de Farmacognosia com o apoio do Ministério da Saúde no âmbito do Projeto ArboControl (TED 74/2016 e TED 42/2017) e aprovada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Laila Salmen Espindola

Presidente/Orientadora
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rodrigo Gonçalves Gurgel

Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a minha
mãezinha querida. Que me
ensinou a caminhar, a viver. Mas,
que ao partir discretamente numa
bela tarde de sol, levou um
pedaço de mim.

Anseio, mãezinha, anseio por lhe encontrar
novamente. Por enquanto, no vazio que ficou, nós
dois conhecemos a saudade profunda e sem fim.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, por colocar em meu caminho muitos desafios e oportunidades, alegrias e tristezas, por permitir que nesta caminhada eu encontrasse tantas pessoas especiais.

Aos meus amores Marília e João Paulo, pelo carinho, apoio, paciência, por compreenderem as minhas ausências nestes últimos anos. Amo vocês!

Ao meu pai, meus irmãos, cunhados e sobrinhos pelo carinho e apoio.

À Rafaelly, minha querida sobrinha, por sempre, insistentemente, me encorajar.

À professora Laila Espindola, por ter aceitado me orientar nesta caminhada acadêmica, pelos ensinamentos, conselhos, questionamentos e apoio.

À professora Lorena Albernaz, minha co-orientadora, pelo apoio, conselhos, opiniões e ajuda, inclusive, nos infindáveis ensaios realizados.

À professora Mariana (colaboradora!) pelo apoio e encorajamento.

Aos professores Marcos Obara, Rodrigo Gurgel e Aline Oliveira por aceitarem o convite para compor a banca examinadora.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia pelo convívio, especialmente, à Laís e Heidi, pelo apoio, pela ajuda, desde os primeiros testes.

Ao Renato pelo apoio e ajuda no insetário.

À Renata Dusi pelo apoio, pelas importantes contribuições, questionamentos e debates que me estimularam a refletir sobre as várias etapas deste trabalho.

Ao Luis Eduardo por realizar as análises de RMN.

Ao Bruno Carvalho pelo apoio, pela troca de ideias e experiências.

Aos servidores da secretaria da Pós-Graduação por sempre serem gentis e solícitos.

Aos técnicos do Laboratório de Entomologia Médica da DIVAL pelo apoio na realização de ensaios e manutenção das colônias.

Aos colegas e amigos da DIVAL/SES, especialmente, as biólogas Franciene, Camila, Milena, Vilma, Anne, Gabriela, Kênia, Giselle e Naissa, pela amizade, apoio e pelas palavras certas de encorajamento em momentos de agústia.

À Lorrainy, pela amizade, por me ajudar com seus questionamentos, suas opiniões sinceras, conselhos e críticas.

Aos servidores dos Núcleos Regionais de Vigilância Ambiental em Saúde de Brazlândia, Guará e Sobradinho pela ajuda na instalação de armadilhas.

Aos servidores da Central de UBV pelo apoio e cooperação.

Aos gestores da DIVAL, Divino Valero, Denilson Magalhães, Rafael Almeida, Édson Rocha, Alessandro dos Santos, José Aparecido, Edi Xavier por reconhecerem a importância deste trabalho.

Enfim, sou grato a todos pela ajuda, de forma direta ou indireta, nesta fase de minha vida que finalmente concluo!

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	1
Lista de figuras	4
Lista de tabelas	7
Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução.....	10
1.1. Vetores de doenças	10
1.2. A transmissão das arboviroses	11
1.3. Origens da espécie <i>Aedes aegypti</i>	12
1.4. Biologia do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	14
1.5. Principais arboviroses transmitidas pelo <i>Ae. aegypti</i> no Brasil e suas vacinas	15
1.5.1. Dengue	15
1.5.2. Febre Chikungunya	19
1.5.3. Febre Zika	20
1.5.4. Vacina contra as arboviroses	21
1.6. Evolução dos programas de controle do <i>Ae. aegypti</i> no Brasil	22
1.7. Monitoramento e controle do vetor <i>Ae. aegypti</i> em Brasília/DF.....	26
1.8. Uso de inseticidas para o controle do <i>Ae. aegypti</i> no Brasil e o monitoramento das populações resistentes	30
1.9. Algumas classes de inseticidas utilizados no controle do <i>Aedes aegypti</i> ..	36
1.9.1. Inseticidas inorgânicos e orgânicos naturais	36
1.9.2. Inseticidas orgânicos sintéticos	37
1.9.2.1. Organoclorado (OC).....	37
1.9.2.2. Organofosforado (OF) e Carbamatos (CA).....	37
1.9.2.3. Piretroides (PI)	38

1.9.2.4. Reguladores de crescimento dos insetos (<i>IGR, Insect Growth Regulator</i>).....	38
1.10. Resistência aos inseticidas e seus mecanismos.....	41
1.10.1. Resistência metabólica	43
1.10.2. Resistência por alteração do sítio-alvo.....	45
1.10.3. Resistência cuticular.....	46
1.10.4. Resistência comportamental.....	46
1.10.5. Resistência cruzada e multiresistência	46
1.10.6. Resistência em populações de mosquitos <i>Aedes</i>	47
1.11. Controle de qualidade químico de inseticidas	48
2. Justificativa.....	50
3. Objetivos.....	52
3.1. Objetivo Geral.....	52
3.2. Objetivos específicos	52
4. Metodologia	53
4.1. Populações de mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	53
4.2. Formação das colônias.....	57
4.3. Soluções inseticidas	61
4.3.1. Temefós (Grau Técnico)	61
4.3.2. Piriproxifeno.....	61
4.3.2.1. Grau Técnico	61
4.3.2.2. Formulação comercial (Sumilarv [®] 0,5 G)	61
4.3.3. Deltametrina e Matationa (Grau Técnico)	61
4.4. Determinação da Concentração Letal (CL ₅₀ e CL ₉₉)	62
4.4.1. Atividade Larvicida.....	62
4.4.2. Larvicida - Efeito residual do Sumilarv [®] 0,5 G (piriproxifeno)	64
4.4.3. Adulticidas	66

4.5.	Análise dos inseticidas utilizados no PNCD e no DF.....	69
4.5.1.	Materiais e reagentes	70
4.5.2.	Obtenção e preparo das amostras	70
4.5.3.	Obtenção e processamento dos espectros de RMN.....	71
4.5.4.	Cálculo da pureza	72
4.6.	Análise estatística	72
5.	Resultados.....	73
5.1.	Identificação das espécies de <i>Aedes</i> coletadas.....	73
5.2.	Ensaio em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	73
5.2.1.	Estudo da atividade do temefós em larvas	73
5.2.2.	Estudo da atividade do piriproxifeno em larvas.....	75
5.2.2.1.	Ensaio de dose-resposta.....	75
5.2.2.2.	Ensaio semi-campo.....	77
5.3.	Ensaio em adultos do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	78
5.3.1.	Estudo da atividade de malationa em mosquito	78
5.3.2.	Estudo da atividade de deltametrina em mosquito.....	80
5.4.	Controle de qualidade químico por Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq).....	81
6.	Discussão	82
7.	Conclusão	94
9.	Recomendações.....	97
10.	Referências	98
	Anexo I – Nota Informativa Nº 103, de 2017/CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS	113
	Anexo II – Linha do tempo – emprego de inseticidas no PNCD – Parte da apresentação proferida pelo Ministério da Saúde na reunião sobre “Monitoramento da Resistência do <i>Aedes aegypti</i> aos Inseticidas Utilizados pelo PNCD”.....	120

Lista de abreviaturas e siglas

ACS	Agente Comunitário de Saúde
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
AVAS	Agente de Vigilância Ambiental em Saúde
BRZ	Linhagem Brazlândia
CA	Carbamato
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CIE ₅₀	Concentração de inibição de emergência de 50% dos mosquitos
CIE ₉₉	Concentração de inibição de emergência de 99% dos mosquitos
CL	Concentração Letal
CL ₅₀	Concentração letal para 50% dos indivíduos
CL ₉₉	Concentração letal para 99% dos indivíduos
Cn	Enésima concentração
CGPNCMD	Coordenação Geral dos Programas Nacionais de Controle e Prevenção da Malária e das Doenças Transmitidas pelo <i>Aedes</i>
DD	Dose diagnóstica
DDT	Diclorodifeniltricloreto
DENV	Vírus da Dengue
DF	Distrito Federal
DIVAL	Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPCD	Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle da Dengue
DNSP	Departamento Nacional de Saúde Pública
ECSA	Linhagem da África Central, Sul e Leste
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional
EST	Esterase
FAU	Febre Amarela Urbana
Fn	Enésima geração
FR	Fundação Rockefeller
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GRA	Linhagem Guará
GST	Glutathione S-transferase
IC	Intervalo de Confiança

IE	Inibição da Emergência
IGR	<i>Insect Growth Regulator</i>
IOL	Linhagem do Oceano Índico
<i>kdr</i>	Resistência <i>knock-down</i>
LV ₁₋₄	Estádios larvais
MFO	Esterases e oxidases de função mista
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MoReNAa	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do <i>Aedes aegypti</i> aos inseticidas
MS	Ministério da Saúde
<i>Na_v</i>	Gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem
OMS	Organização Mundial de Saúde
OF	Organofosforado
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OV	Ovitampa
PACS	Programa de Agentes Comunitários de Saúde
PAHO	Organização Pan-americana da Saúde
PEAa	Programa de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
PI	Piretroide
PIACD	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue
PIB	Produto Interno Bruto
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PSF	Programa de Saúde da Família
RA	Região Administrativa
RCK	Linhagem Rockefeller
Rn	Enésima replicata
RR	Razão de resistência
RR ₅₀	Razão de resistência 50%
SBR	Linhagem Sobradinho
SES-DF	Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Subsecretaria de Vigilância à Saúde
TD	Tempo diagnóstico
UBV	Ultra Baixo Volume
WA	Linhagem da África Ocidental
ZIKV	Vírus da Zika

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	15
Figura 2. Número médio de casos de dengue e casos graves de dengue informados à OMS.	17
Figura 3. Classificação dos depósitos e ações preconizadas pelas Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Fonte: Brasil (2009)	28
Figura 4. Linha do tempo da utilização de inseticidas das classes organofosforado (OF), regulador de crescimento (IGR), piretroide (PI), larvicida bacteriano (LB), espinosinas (E) e carbamato (CA) no Programa Nacional de Controle da dengue (PNCD), de São Paulo e Brasília.	36
Figura 5. Fórmula estrutural do inseticida organoclorado.....	39
Figura 6. Fórmula estrutural dos inseticidas orgnofosforado, carbamato e piretroide utilizados pelo Programa Nacional do Controle da Dengue / Ministério da Saúde no Brasil no Distrito Federal.. ..	40
Figura 7. Fórmula estrutural dos inseticidas reguladores de crescimento de insetos utilizados pelo Programa Nacional do Controle da Dengue / Ministério da Saúde no Brasil no Distrito Federal.. ..	41
Figura 8. Exemplo teórico ilustrando a seleção de população de insetos resistentes.....	42
Figura 9. Ligações ésteres (fosfotriester, éster carbâmico e carboxiester) nos inseticidas utilizados no controle do <i>Ae. aegypti</i>	44
Figura 10. Locais de instalação de armadilhas para coleta de ovos de <i>Aedes aegypti</i> nas Regiões Administrativas (polígonos amarelos) de Brazlândia (A), Guará (B) e Sobradinho (C).....	54
Figura 11. Ovitampa instalada em um imóvel.	55
Figura 12. Acondicionamento das palhetas recolhidas dos imóveis para transporte ao laboratório.....	56
Figura 13. Palhetas preparadas para eclosão dos ovos coletados do campo.	58
Figura 14. Gaiolas entomológicas para criação de colônias.....	58
Figura 15. Materiais de captura dos mosquitos adultos: capturador elétrico, frasco de acrílico e capturador tipo Castro.	59

Figura 16. A - Materiais para preparação da placa de alimentação: placa de alimentação, filme de parafina plástica e bolsa com sangue equino. B - Placa de alimentação preparada. Vista interna da gaiola com fêmeas se alimentando. C - Pote com água quente para aquecimento da placa de alimentação.....	60
Figura 17. A - Recipiente para oviposição com papel filtro. B - Papel filtro seco com ovos de <i>Aedes aegypti</i>	60
Figura 18. Esquema de realização dos ensaios com larvicidas para estimativa das concentrações letais. R1 a R4: replicatas; C1 (controle) e C2 a C10 (concentração seriada do inseticida). ...	63
Figura 19. A - Copos com larvas previamente contadas; B – Copos com preparação finalizada	63
Figura 20. Bioensaio de efetividade e persistência. Os baldes estão protegidos com tela e abrigados do sol e chuva.....	65
Figura 21. Aparato para confinamento de pupas e adultos.....	66
Figura 22. Esquema do ensaio com mosquitos adultos. Em cada teste foi utilizado uma garrafa controle e quatro com inseticidas (R1 a R4).....	67
Figura 23. Garrafa controle e replicatas impregnadas com inseticida.....	68
Figura 24. Gaiola livre de inseticida para a leitura de 24 horas após os ensaios com deltametrina.	69
Figura 25. Tambor com o inseticida Komvektor® 440 EW (malationa) em uso na Unidade de Controle /DIVAL.....	71
Figura 26. Mortalidade percentual das larvas L3 da espécie <i>Aedes aegypti</i> tratadas com temefós para a linhagem suscetível Rockefeller (RCK) e para as populações de Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR).....	74
Figura 27. Curva de inibição da emergência percentual de adultos – %IE de larvas L3 tratadas com piriproxifeno, para a linhagem suscetível Rockefeller (RCK) e populações de Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR).	76
Figura 28. Inibição da emergência percentual (%IE) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> da linhagem suscetível (RCK) em ensaio semi-campo.....	77
Figura 29. Mortalidade percentual de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> da linhagem suscetível Rockefeller (RCK) submetidas a malationa (45 e 50 µg) e a deltametrina (8 e 10 µg).	78

Figura 30. Mortalidade de adultos de *Aedes aegypti* de populações suscetível Rockefeller (RCK), e do campo Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) expostos a 50 µg de malationa por garrafa..... 79

Figura 31. Mortalidade de adultos de mosquitos *Aedes aegypti* das populações do campo Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) e controle Rockefeller (RCK), expostos a 10 µg por garrafa com deltametrina..... 81

Lista de tabelas

Tabela 1. Larvicidas e adulticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde conforme a finalidade de controle.....	33
Tabela 2. Quantidade de ração utilizada para a alimentação diária por larva de <i>Aedes aegypti</i> em miligramas (mg).....	57
Tabela 3. Principais parâmetros de aquisição utilizados na obtenção dos espectros de RMN.	71
Tabela 4. Concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₉) e razão de resistência (RR ₅₀) estimadas para as larvas de populações de <i>Aedes aegypti</i> Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR).....	75
Tabela 5. Concentrações de inibição da emergência de adultos (CIE ₅₀ e CIE ₉₉) e razão de resistência (RR ₅₀) estimada para as populações de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR)	76
Tabela 6. Ensaio com fêmeas adultas de populações de <i>Aedes aegypti</i> Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) expostas à 50 µg* de malationa por garrafa.....	79
Tabela 7. Ensaio com fêmeas adultas de populações de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) expostas à 10 µg* de deltametrina por garrafa.....	80
Tabela 8. Teor de ingrediente ativo declarado e teor determinado por Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq) para os inseticidas utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue e no Distrito Federal.....	81

Resumo

O controle químico é uma das principais estratégias para impedir a disseminação de arboviroses. Entretanto, o uso contínuo e indiscriminado dos inseticidas é responsável pela seleção de populações de *Aedes aegypti* resistentes, tornando o controle de vetores de doenças um desafio. Conhecer o perfil de resistência das populações de *Aedes aegypti* do Distrito Federal (DF) é imprescindível para conter a transmissão de doenças. Foi avaliada a suscetibilidade de 3 populações de mosquitos do DF aos inseticidas temefós, piriproxifeno, deltametrina e malationa. Ensaio com larvicidas, com a dose-resposta, e adulticidas, com a dose diagnóstica, demonstraram o perfil de resistência das populações de *Aedes aegypti* de Brazlândia, Guará e Sobradinho, localidades com histórico de alta incidência de dengue. Avaliou-se o efeito residual do Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxifeno). Também foi realizado o estudo quantitativo por Ressonância Magnética Nuclear (RMNq) dos princípios ativos dos inseticidas de formulação comercial usados no controle vetorial: Sumilarv[®] 0,5 G, Komvektor[®] 440 EW (malationa), Vectron[®] 10 SC (etofenproxi) e Ficom[®] VC (bendiocarbe). Todas as populações testadas apresentaram resistência moderada à alta para temefós: RR(razão de resistência)₅₀ (Sobradinho) = 8,6; RR₅₀ (Brazlândia) = 10,3; RR₅₀ (Guará) = 12,0. Para o piriproxifeno, as populações apresentaram suscetibilidade: RR₅₀ (Sobradinho) = 1,42; RR₅₀ (Brazlândia) = 1,85; RR₅₀ (Guará) = 2,21. Apenas a linhagem do Guará demonstrou resistência a malationa (mortalidade de 60,8% em 45 min.) e Brazlândia, suscetibilidade alterada a deltametrina (mortalidade de 91,7% em 24 h). A formulação comercial do piriproxifeno apresentou efeito residual sobre as larvas com eficácia de 100% de inibição da emergência até 30 dias após o tratamento. A avaliação do teor de princípio ativo revelou 31,5% de malationa acima do valor declarado pelo fabricante para Komvektor[®] 440 EW. Já o produto Vectron[®] 10 SC (etofenproxi) o teor obtido foi 12,0% menor que o valor declarado. A utilização de malationa deve ser criteriosa para evitar o desenvolvimento ou agravamento do *status* de resistência das populações. As alterações nos teores de princípio ativo dos inseticidas podem contribuir para preparações equivocadas de emulsões e soluções de inseticidas com doses subletais ou supra letais. Desta forma, avaliações periódicas da qualidade dos inseticidas armazenados e cuidados com o seu preparo podem evitar falhas no controle do vetor. É imperativo que o monitoramento da resistência aos inseticidas seja uma atividade de vigilância entomológica permanente.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; arboviroses; controle do vetor; resistência; análise química de inseticidas.

Abstract

Chemical control is one of the main strategies to avoid arboviruses dissemination. However, indiscriminate and continuous use of insecticides is responsible for the selection of resistant *Aedes aegypti* populations. These practices implicate challenges to control this vector of diseases. Awareness of the profile of resistant populations of *Aedes aegypti* at Distrito Federal (DF) is fundamental to contain the transmission of infections. In that context, this study assessed the susceptibility of 3 populations of mosquitos from DF to the insecticide temephos, pyriproxyfen, deltamethrin e malathion. Trials with larvicides using dose response and adulticides with diagnostic dose demonstrated the resistance profile of *Aedes aegypti* populations. Samples were collected from localities with a historical high incidence of dengue - Brazlândia, Guar and Sobradinho. The residual effect of Sumilarv® 0.5 G (pyriproxyfen) was evaluated. In addition, this study performed a quantitative analysis, using Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR), of the active principles of commercial formulas of the insecticides used for vector control: Sumilarv® 0.5 G, Komvektor® 440 EW (malathion), Vectron® 10 SC (ethofenproxy) e Ficam® VC (bendiocarb). All populations tested presented moderate to high resistance to temephos: RR (resistance ratio)₅₀ (Sobradinho) = 8.6; RR₅₀ (Brazlândia) = 10,3; RR₅₀ (Guar) = 12.0. For pyriproxyfen, susceptibility results were: RR₅₀ (Sobradinho) = 1.42; RR₅₀ (Brazlândia) = 1.85; RR₅₀ (Guar) = 2.21. Only Guar's sample presented resistance to malathion (mortality of de 60.8% within 45 min.) and Brazlândia, altered susceptibility to deltamethrin (mortality 91.7% within 24 h). The commercial formulation of pyriproxyfen showed 100% efficacy to inhibit emergence of adults until 30 days after treatment. Assessment of active principle constituent quantification at the insecticides revealed malathion was 31.5% above the valued declared by the manufacturer Komvektor® 440 EW. As for Vectron® 10 SC (ethofenproxy) products, the concentration obtained was 12.0% below the declared value. Use of malathion must be prudent in order to avoid the development or increase resistance status of *Aedes aegypti* populations. Differences of the constituent quantification of active principle presented by the manufactured and this study results may contribute to misleading preparations of emulsions and solutions of insecticides with under lethal or over lethal doses. Therefore, periodical evaluations of quality of insecticides and preparation caution may avoid fails of vector control. It is imperative to monitor insecticide resistance as a permanent entomological surveillance activity.

Key-words: *Aedes aegypti*; arboviruses; vector control; resistance; chemical analysis of insecticide

1. Introdução

1.1. Vetores de doenças

As principais doenças transmitidas por vetores no mundo representam 17% de todas as doenças infecciosas (WHO, 2017a). São doenças causadas por patógenos, tais como, protozoários, vírus e bactérias as quais são disseminadas por artrópodes, atuando como vetores, por exemplo, mosquitos, carrapatos e barbeiros (Gubler, 2009). Outros animais, porém, têm papel importante na cadeia de transmissão, comportando-se como hospedeiros e reservatórios: diversas espécies de vertebrados e invertebrados. Ocorrem em vários países das regiões tropical e subtropical onde as condições ambientais favorecem a propagação dos vetores e, conseqüentemente, das doenças (WHO, 2017a).

Entre os vetores mais importantes, destacam-se os mosquitos hematófagos. A capacidade destes vetores de disseminar patógenos adquiridos durante a realização da alimentação sanguínea, causa o adoecimento de centenas de milhões de pessoas e a morte de milhares por ano (WHO, 2017b).

Anualmente, em todo o mundo, mais de 700 mil pessoas perdem a vida em razão das doenças como malária, dengue, leishmaniose, entre outras (WHO, 2017a). Malária, dengue, Chikungunya e Zika são as principais doenças transmitidas por mosquitos e representam um grave problema de saúde pública em escala global (Paixão, 2018; Wells, Huijsduijnen, & Voorhis, 2015)

Apenas a malária, em 2015, foi responsável pela morte de cerca de 438.000 pessoas em 95 países e territórios onde cerca de 3,2 bilhões de pessoas viviam em área de risco (WHO, 2017a). Em 2017, a maioria dos casos (92%) e dos óbitos (93%) estava concentrada na África subsaariana.

Dengue, Chikungunya e Zika, apesar de juntas não superarem a morbimortalidade estorrecedora causada pela malária, afetam milhões de pessoas. A estimativa anual, apenas para dengue é de 390 milhões de casos (Bhatt et al., 2013a), com ampla distribuição pelo mundo (Kraemer et al., 2015).

O impacto econômico promovido pelas arboviroses impressiona. Para dengue, por exemplo, estima-se que o gasto médio anual com o tratamento, internações e perda de produtividade tenha sido de 2,1 bilhões de dólares para o período de 2000 a 2007 nas Américas (Shepard et al., 2011). No Brasil, estima-se que o custo total com as arboviroses, incluindo o

combate ao vetor, custos indiretos (absenteísmo no trabalho) e custos médicos diretos tenha sido cerca de 655 milhões de dólares em 2016 (Teich, Arinelli, & Fahham, 2017).

Com relação a febre Zika, os impactos também são severos. Estimativas iniciais da perda de renda (PIB) para a região da América Latina e Caribe alcançaram o valor entre 7 a 18 bilhões de dólares para o período de 2015 a 2017, com repercussões sérias para os sistemas de saúde e de bem-estar social (PNUD, 2017).

Muito maior que os números estimados, é o impacto humano que atinge as crianças com a síndrome congênita do Zika, que abrange a microcefalia, uma condição rara associada com o desenvolvimento incompleto do cérebro, e outros distúrbios neurológicos e oculares (PNUD, 2017). O isolamento social, falta de apoio social, estigmatismo, tensão conjugal, ausência de acesso a informações ou cuidados de saúde apropriados, incertezas das consequências da síndrome congênita da zika, entre outras, são alguns dos desafios impostos às crianças e suas famílias (Bailey & Ventura, 2018).

1.2. A transmissão das arboviroses

Os vírus transmitidos por mosquitos (Culicidae) e outros artrópodes, como carrapatos (Ixodidae e Argasidae), mosquitos-palha (Psychodidae), borrachudos (Simuliidae) e mosquitos-pólvora (Ceratopogonidae) são comumente conhecidas como arbovírus (*arthropod-borne virus*) (Gubler, 2009).

Atualmente, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) nos Estados Unidos da América mantêm catalogados 537 arbovírus (CDC, [s.d.]). Mais de 130 arbovírus estão relacionados com a ocorrência de arboviroses em humanos e alguns são responsáveis por importantes epidemias emergentes e reemergentes nestas últimas décadas (Dash et al., 2013). A maioria destes vírus pertencem às famílias Flaviviridae (flavivírus da dengue e Zika), Togaviridae (vírus da Chikungunya) e Bunyaviridae (vírus da Oropouche) (Gubler, 2002).

Os arbovírus se mantêm em circulação por meio da transmissão entre vetores artrópodes e os vertebrados como pássaros, primatas e pequenos mamíferos. Estes animais servem como hospedeiros, reservatórios e/ou amplificadores no ambiente silvestre, pois são fontes importantes de vírus. A maior parte da transmissão de arbovírus ocorre horizontalmente, durante a alimentação sanguínea nos vertebrados e com menor frequência, por via sexual ou venérea, durante a cópula (Coffey, 2013). Alguns arbovírus também podem ser transmitidos verticalmente dos progenitores infectados para a prole pela via transovariana (Gubler, 2002). É possível que tanto a transmissão vertical quanto transmissão sexual tenham um papel

importante na manutenção de alguns arbovírus nos períodos inter-epidêmicos de arboviroses (Cruz et al., 2015; Mavale et al., 2010).

Após a ingestão de vírus obtidos de um vertebrado na viremia, ou seja, no período de presença de vírus no sangue circulante, os vírus infectam as células do intestino médio do vetor e, em seguida, as cavidades e das glândulas salivares do artrópode. Nos repastos sanguíneos subsequentes, poderá ocorrer a transmissão viral por meio da saliva contaminada (Coffey et al., 2013).

A transmissão para o homem e/ou animais domésticos é acidental e ocorre após eventos complexos de “*spillover*”, por transposição da barreira de espécies hospedeiras (Weaver & Reisen, 2010). Este processo infectante consiste na passagem de um agente infeccioso para uma espécie de vertebrado hospedeiro não afetada anteriormente. A ampliação do espectro de hospedeiros de um determinado agente infeccioso é um mecanismo comum na emergência de novas arboviroses humanas (Confalonieri, 2010).

Os vírus da Dengue e Chikungunya, atualmente não dependem dos ciclos enzoóticos e ocorrem como extensas epidemias em várias regiões do globo ano após ano (Dash et al., 2013). O temor é a ocorrência de outras arboviroses e crescimento da expansão geográfica em razão de vários fatores como crescimento da população humana e de atividades que aumentam a exposição a infecção, como o turismo ecológico, por exemplo (Weaver, 2013).

Outro elemento perturbador surgiu recentemente. Pesquisadores brasileiros observaram a infecção natural em primatas não humanos pelo vírus da ZIKA, algo documentado apenas no continente africano. Esta evidência é preocupante, pois sustenta a hipótese de que os primatas não humanos possam ser os hospedeiros responsáveis pela manutenção do ZIKV, sendo importante para circulação e transmissão em ambientes urbanos tropicais (Terzian et al., 2018).

1.3. Origens da espécie *Aedes aegypti*

Os mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente das espécies *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), são os principais vetores de arboviroses no mundo (Lopes, Nozawa, & Linhares, 2014; Pancetti et al., 2015; Pialoux et al., 2007; Weaver et al., 2016). No Brasil, o mosquito *Ae. aegypti* é o vetor responsável pela transmissão das três mais importantes arboviroses na atualidade (Valle, Pimenta, & Aguiar, 2016; Vasconcelos, 2015).

Várias pesquisas procuram desvendar as origens do mosquito *Ae. aegypti*. Acredita-se, que o seu ancestral seja a subespécie *Ae. aegypti formosus*, um mosquito silvestre, zoofílico

que ainda hoje habita a região da África Subsaariana (Urdaneta-Marquez & Failloux, 2011). É provável que a distribuição dos mosquitos tenha sido maior no continente africano. Mas a formação do Saara, há 4000-6000 anos, talvez tenha provocado o isolamento de populações, e diferenças na disponibilidade de recursos, tenha permitido caminhos diversos de evolução para formação da subespécie sinantrópica *Aedes aegypti aegypti*.

A escassez de água e fonte alimentar tornaram os locais onde haviam aglomeração de humanos promissores para os mosquitos devido a presença de água acumulada, essencial para a formação de criadouros, e a farta quantidade de alimentação sanguínea. Estes são fatores que podem ter contribuído para a domiciliação inicial do vetor (Powell & Tabachnick, 2013).

Outro elemento que provavelmente pode ter favorecido tanto para disseminação de mosquitos quanto para a domiciliação foram as Grandes Navegações e o comércio de escravos. Os mosquitos sinantrópicos ou mesmo a forma silvestre podem ter sido transportados passivamente para o Novo Mundo no trânsito frequente de navios. (Powell & Tabachnick, 2013).

Em um estudo prévio, a análise de marcadores moleculares permitira verificar a distância genética entre populações de mosquito de algumas regiões pelo mundo (Brown et al., 2011). Dois grupos distintos foram identificados: um abrangendo todas as populações sinantrópicas fora da África e outro com as populações sinantrópicas e florestais do continente africano. Isto sugere que a domiciliação ocorreu não como evento único na África, mas também em outras regiões do mundo.

Utilizando DNA mitocondrial de mosquitos, Silva et al. (2012) avaliaram os padrões de fluxo gênico em escala continental e subcontinental (bacia amazônica) de populações americanas de *Ae. aegypti*. Os autores encontraram evidências que sustentam a hipótese de disseminação de mosquitos pelo homem de forma passiva, um dos principais determinantes da estrutura genética das populações. Foi observado que o fluxo gênico é maior entre populações subjacentes quando se considera a escala continental. Na bacia amazônica, os dados sugerem o extenso fluxo gênico entre as principais cidades da região, o que poderia permitir maior disseminação de mutações vantajosas, como, por exemplo, resistência à inseticidas (Silva et al., 2012).

A forma sinantrópica *Ae. aegypti* é uma espécie amplamente distribuída em várias regiões do mundo, onde as condições ambientais favorecem o seu desenvolvimento e proliferação, principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical (Kraemer et al., 2015).

1.4. Biologia do mosquito *Ae. aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* é classificado taxonomicamente como um inseto díptero pertencente à família Culicidae, subfamília Culicinae e tribo Aedini (Forattini, 2002). É uma espécie hematófaga, antropofílica que vive em íntima associação com seres humanos, principalmente em áreas urbanas e suburbanas, onde os hospedeiros estão mais acessíveis (Christophers, 1960; Delatte et al., 2010; Harrington, Edman, & Scott, 2001). Considerado um mosquito de hábitos diurnos, o *Ae. aegypti* apresenta dois picos de atividade: um no início da manhã, e outro no final da tarde (Christophers, 1960; Delatte et al., 2010). Esse artrópode possui comportamento endofílico, ou seja, tem preferência de se abrigar dentro de casas e ambientes fechados. Apresenta o hábito alimentar no ambiente interno (endofagia), bem como no externo (exofágico) das habitações humanas (Christophers, 1960; Delatte et al., 2010).

Apenas as fêmeas alimentam-se de sangue cujas proteínas são essenciais para a produção dos ovos. Entretanto, a fonte energética principal para estes mosquitos são os carboidratos obtidos da seiva, flores e frutos (Consoli & Oliveira, 1994). Após a digestão sanguínea e maturação dos ovos as fêmeas buscam locais com água parada disponível para realizar a oviposição. A colocação dos ovos ocorre nas paredes dos recipientes próxima à água para que possam ser, eventualmente, recobertos e permitir a eclosão (Consoli & Oliveira, 1994).

O *Ae aegypti* apresenta ciclo de vida caracterizado pela metamorfose completa (holometabolia). Quatro fases compõem o ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Apenas o estágio larval é dividido em 4 estádios (LV): LV1, LV2, LV3 e LV4 (Bar & Andrew, 2013).

O desenvolvimento do ovo ao adulto é rápido (7 a 10 dias) e depende de diversos fatores ambientais tais como: temperatura, disponibilidade de alimento, características físico-químicas da água, densidade larval, luminosidade, período de quiescência, temperatura, entre outros (Beserra, Fernandes, & Ribeiro, 2009; Beserra, 2009; Silva & Silva, 1999).

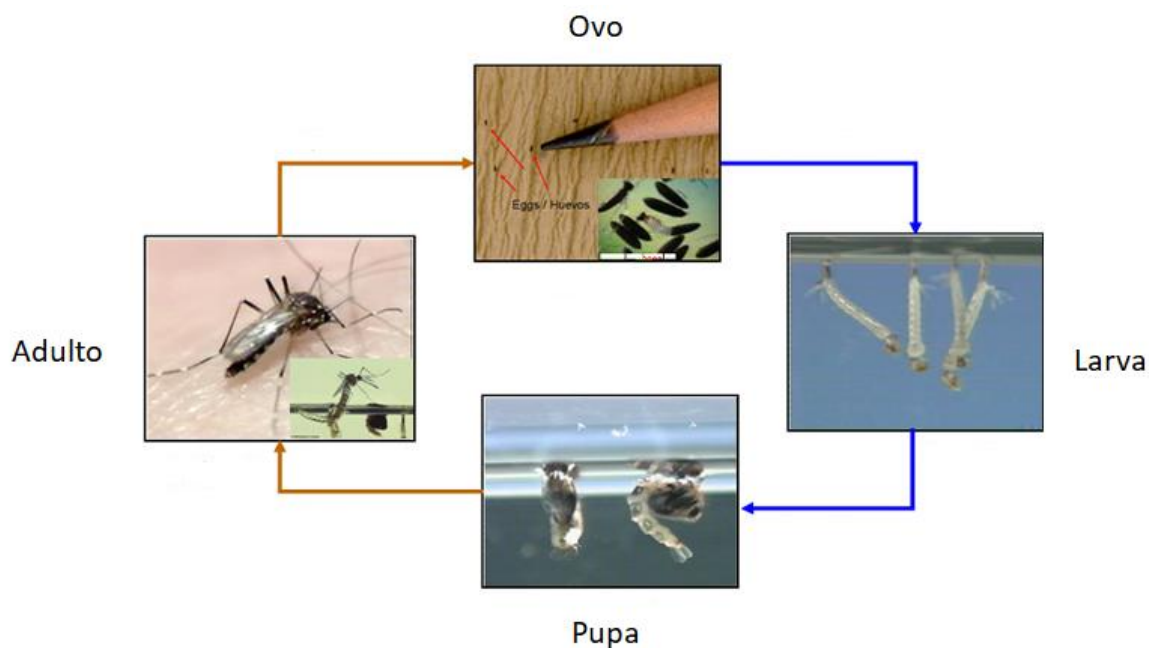


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: CDC

Em estudo realizado por Silva & Silva (1999) foi demonstrado que o ciclo biológico pode sofrer alteração quando as condições ambientais são desfavoráveis. O decréscimo da temperatura e da umidade relativa são alguns dos fatores que podem provocar a interrupção do desenvolvimento do ovo, fenômeno conhecido quiescência. Esta capacidade garante à espécie sucesso na sobrevivência quando há a melhora das condições, além de permitir a dispersão no ambiente por meio dos ovos aderidos a diferentes recipientes inservíveis (Diniz et al., 2017).

1.5. Principais arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* no Brasil e suas vacinas

1.5.1. Dengue

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda que pode afetar pessoas de todos os sexos e idades, causando um espectro de manifestações leves às formas mais severas, a dengue hemorrágica e síndrome do choque. Quatro sorotipos do vírus dengue DENV (DENV-1 a DENV-4) provocam a doença, sendo que a infecção por um sorotipo confere imunidade permanente. Os vírus da dengue pertencem ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e são transmitidos principalmente durante a picada da fêmea infectada do mosquito *Ae. aegypti* (Lopes, Nozawa, & Linhares, 2014).

No Brasil, o mosquito *Ae. aegypti* é o vetor responsável pela transmissão dos vírus que provocam a doença. Contudo, *Ae. albopictus* também representa uma grande ameaça à saúde

pública. A espécie está amplamente distribuída no país e já foi demonstrado em laboratório que as populações brasileiras apresentam competência vetorial substancial para arbovírus como da Dengue e Chikungunya. No entanto, não há registro da transmissão realizada por este mosquito no Brasil (Pancetti et al., 2015).

Em 2012, a OMS considerou a dengue como a principal doença viral transmitida por mosquito. Mais importante que a malária, inclusive, em termos de morbidade e impacto econômico gerado (WHO, 2012). A dengue está presente em países de clima tropical e subtropical, principalmente, em áreas urbanas e periurbanas das regiões da África, das Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (WHO, 2018a). Em áreas subtropicais e temperadas, o risco potencial de transmissão da doença aumenta, especialmente no período de verão (Schaffner & Mathis, 2014).

A dengue é endêmica em 128 países onde 3,9 bilhões de pessoas, mais da metade da população global está sob risco de contrair a doença (Brady et al., 2012). Nos últimos 50 anos, dramaticamente, a incidência cresceu mais de 30 vezes (Figura 2) e o número de casos, mais de 140 (WHO, 2012). A quantidade de casos reportados à OMS pelos seus Estados-membros cresceu de 2,2 milhões em 2010 para 3,2 milhões em 2015. Este crescimento acentuado pode ser explicado não apenas pela expansão da doença, mas também, parcialmente, pela maior notificação da ocorrência (WHO, 2018a).

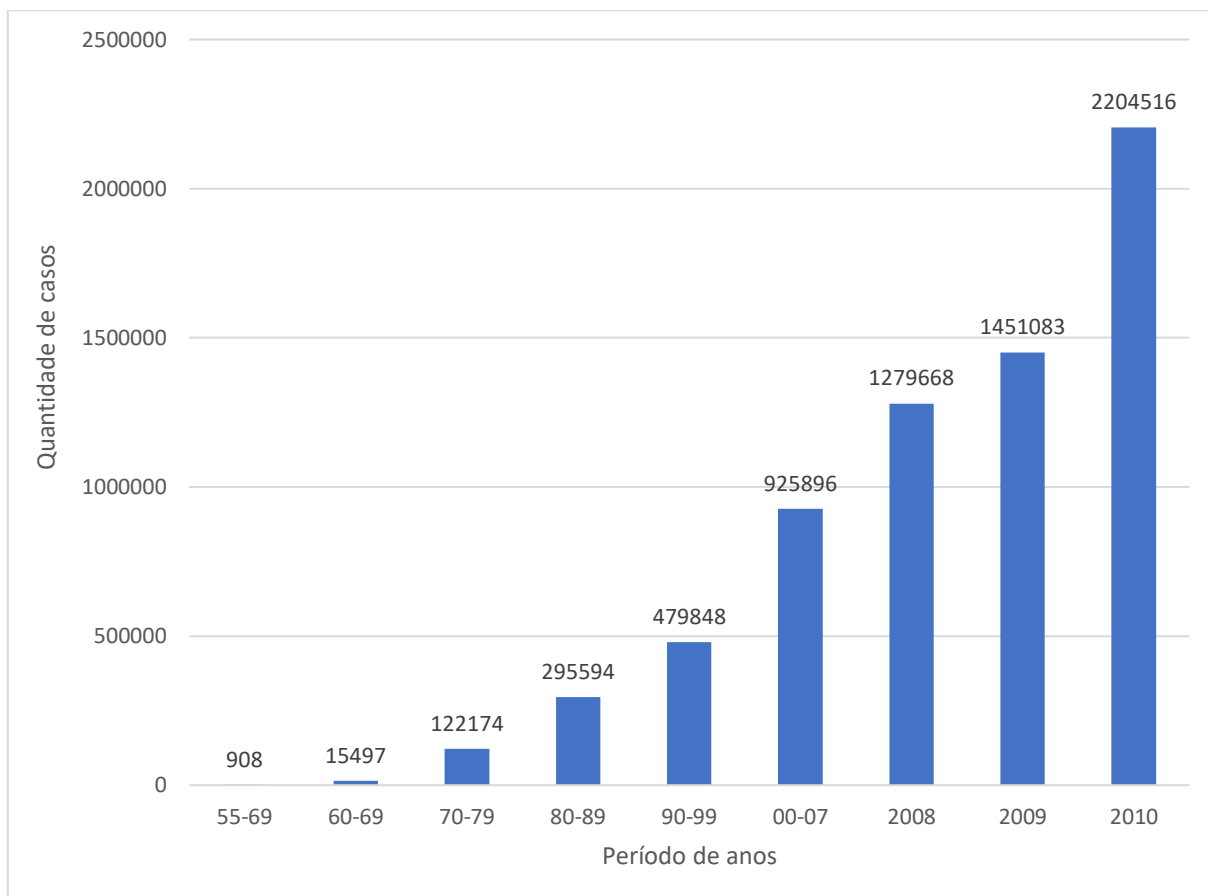


Figura 2. Número médio de casos de dengue e casos graves de dengue informados à OMS (WHO, 2012)

Anteriormente, a estimativa anual de casos adotada pela OMS era de 50 – 100 milhões casos (Shepard et al., 2011). Estimativas recentes, usando abordagem cartográfica, indicam a ocorrência anual de 390 milhões de casos (IC95% 284 – 528 milhões) e que 96 milhões (67 – 136 milhões) manifestam sintomas em algum nível de gravidade da doença (Bhatt et al., 2013b), o que representa mais que 3 vezes o quantitativo estimado pela OMS. Stanaway et al. (2016) justificam a disparidade entre os as estimativas com a ocorrência da subnotificação de casos nos sistemas oficiais de vigilância e por até 70% dos doentes não procurarem atendimento médico ou tratamento.

Nas últimas décadas, a disseminação da dengue nas Américas foi crescente, atingindo números alarmantes em 2015. De acordo com a Organização Pan-americana da Saúde (PAHO), foram notificados pouco mais de 2,4 milhões de casos, com a incidência de 385,5 casos por 100.000 habitantes e 1365 óbitos. Apenas o Brasil, contribuiu com cerca de 68% dos casos e

63% das mortes notificadas, alcançando uma taxa de incidência de 809,7 por 100.000 habitantes uma das maiores taxas na América do Sul (PAHO, 2016).

Segundo Gubler (2011), o crescimento da expansão geográfica dos vírus e do vetor nas regiões tropicais do mundo foi acompanhado pelo aumento da frequência e magnitude da epidemia de dengue. Além do clima favorável para o desenvolvimento dos mosquitos, vários outros fatores contribuíram para o cenário de condições ecológicas ideais para a manutenção e proliferação destes insetos nas cidades destas regiões. Os principais são: 1 – mudanças demográficas; 2 – urbanização não planejada; 3 – o crescimento do sistema de transporte global e 4 – a falta de controle efetivo do mosquito (Gould, 2011; Tauil, 2001; Vasconcelos et al., 1999).

A partir da década de 60, nos países em desenvolvimento, houve grande fluxo migratório da população rural para os centros urbanos. O crescimento das cidades, muitas vezes, não foi acompanhado pela oferta suficiente e adequada de habitação ou de serviços como o saneamento básico e coleta de lixo. O fornecimento intermitente e o armazenamento inapropriado de água em recipientes acessíveis às fêmeas dos mosquitos, permitem o desenvolvimento do ciclo de vida do vetor (Tauil, 2001). O mesmo ocorre quando há destinação inadequada de lixo em terrenos baldios, quintais e em vias públicas, especialmente, de materiais não biodegradáveis, intensamente utilizados nos bens de consumo, que podem acumular a água ou transportar passivamente ovos, larvas e pupas do mosquito, tais como copos, latas, embalagens, pneumáticos entre outros (Vasconcelos et al., 1999).

Além disso, a modernização do sistema de transporte e o desenvolvimento da indústria do turismo, intensificados pela globalização da economia mundial, tornou as viagens mais rápidas e numerosas. Estas mudanças contribuíram para a expansão geográfica das doenças em razão da maior mobilidade de mosquitos e de pessoas infectadas que passaram a transitar de um continente a outro em questão de horas (Cleton, Koopmans, Reimerink, Godeke, & Reusken, 2012).

Gubler (2011) argumentou que as frequentes epidemias mostram que há falhas importantes nas ações de controle do vetor nas últimas décadas. Após o sucesso do programa de erradicação da espécie *Ae. aegypti* alcançado nas Américas nas décadas de 50 e 60, houve o redirecionamento de recursos que resultou na deterioração da infraestrutura de controle, substituída pelo uso exacerbado de aplicação espacial de inseticidas na ocorrência de casos de dengue. Esta estratégia teve alta visibilidade e era muito popular. No entanto, apresentou

pouca eficácia porque os mosquitos adultos, alvos do inseticida, normalmente encontram local de descanso no interior das casas onde não são alcançados pelo inseticida (Scott et al., 2000).

1.5.2. Febre Chikungunya

A febre Chikungunya é uma doença artrítica debilitante causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV) do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. A infecção é comumente caracterizada pela febre aguda, cefaleia, mialgia e frequente artralgia persistente no estágio crônico da doença (Donalisio & Freitas, 2015). O vírus foi primeiramente identificado num surto ocorrido na região Makonde, no sul da Tanzânia em 1952-53. A presença de fortes sintomas articulares explica a origem do nome da doença, pois, no idioma africano local, a palavra chikungunya significa “aquele que se curva”. Geralmente a doença é auto-limitante, mas em alguns pacientes a dor articular pode permanecer por anos (Burt et al., 2017).

Dois ciclos de transmissão do CHIKV têm sido descritos. Um silvestre e periurbano na África no qual estão envolvidos mosquitos do gênero *Aedes* e primatas não humanos. E outro urbano (homem-mosquito-homem) na Ásia, Oceano Índico, África, Europa e nas Américas. Os vetores principais envolvidos na transmissão são *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, este desde de 2006, em razão de uma mutação no genoma viral que permitiu maior replicação viral no mosquito (Donalisio & Freitas, 2015; Thiberville et al., 2013). Análises filogenéticas revelaram a existência de 4 genótipos com antigenicidade e características genotípicas distintas: 1 – África Ocidental (WA), 2 – África Central, Sul e Leste (ECSA), 3 – Ásia e 4 – Linhagem do Oceano Índico (IOL) (Wahid, 2017).

Após o primeiro isolamento do CHIKV em 1953 na Tanzânia, surtos esporádicos têm sido registrados em vários países da África e Ásia. Desde de 2004, milhões de casos da doença foram notificados na região do Oceano Índico e Índia; a expansão do CHIKV para novas áreas tem ocorrido, incluindo a Europa, Oriente Médio e região do Pacífico (Morrison, 2014).

A chegada do CHIKV nas Américas ocorreu no Caribe em 2013 (Teixeira et al., 2015). Desde então, vem causando vários surtos, espalhando-se rapidamente em 45 países e territórios, com mais de 2,9 milhões de casos suspeitos e confirmados e 296 óbitos até o fim de julho de 2016. A falta de imunidade prévia da população ao vírus explica a ocorrência dos grandes surtos. Além disso, as áreas onde já ocorrem outras arboviroses (dengue, febre amarela, por exemplo) estão sob risco, pois os arbovírus circulantes compartilham ecologia e ciclos de transmissão vetorial semelhantes com o CHIKV, podendo provocar surtos explosivos (Yactayo et, 2016).

No Brasil, os primeiros casos autóctones de febre Chikungunya foram confirmados no segundo semestre de 2014 nos estados do Amapá e Bahia. A expansão da doença, recentemente, alcançou todas as unidades da federação onde casos autóctones foram registrados (Brasil, [s.d.]). De 2016 a 2018, houve declínio da quantidade de casos prováveis e incidência da doença: em 2016, (277.882 casos prováveis; incidência de 134,8 casos/100 mil habitantes); em 2017, (184.694 casos prováveis; incidência de 88,6 casos/100 mil habitantes) e em 2018 (85.221 casos prováveis; incidência de 40,9 casos/100 mil habitantes) (Brasil, 2018).

1.5.3. Febre Zika

A febre Zika é uma doença febril aguda, autolimitada, causada pelo vírus Zika (ZIKV). O ZIKV, como o DENV, também pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (Paixão et al., 2018). Foi identificado em macacos na floresta Zika de Uganda em 1947 e após alguns anos, em 1952, em humanos naquele mesmo país e na Tanzânia. A infecção por ZIKV tipicamente causa erupção cutânea, conjuntivite, dores musculares e nas articulações, mal-estar ou dor de cabeça. A doença até 2006 era restrita a poucos casos raros, esporádicos na África e Ásia (WHO, 2018c).

O primeiro surto envolvendo milhares de pessoas foi identificado fora da África e Ásia em 2007, em Yap, uma ilha dos Estados Federados da Micronésia. Estima-se que 73% dos residentes de três anos de idade ou mais, cerca de 5005 pessoas, tenham sido infectados pelo ZIKV (Duffy et al., 2009). Em 2013, a doença afetou aproximadamente 28.000 pessoas (11% da população) da Polinésia francesa. Neste mesmo surto, a Síndrome de Guillain-Barré, doença autoimune que afeta os nervos, foi pela primeira vez associada ao ZIKV. Também obteve-se evidências de risco de transmissão da doença pela transfusão sanguínea (Hennessey, 2016) e foi detectada a presença do vírus no sêmen, saliva e urina (Weaver et al., 2016).

Os primeiros casos autóctones de febre Zika nas Américas foram detectados no Brasil em abril de 2015, na região nordeste (Brasil, 2015a), e posteriormente em outros países da América do Sul, Central e Caribe (Hennessey, 2016). No Brasil, foram registrados, de 2015 até a semana epidemiológica nº 36 de 2018, cerca de 271 mil casos prováveis da doença, sendo que apenas no ano de 2016, quase 80 % destes casos foram notificados (Brasil, 2018; Brasil, 2018a; Faria et al., 2016). De acordo com a PAHO, foram notificados 583.451 casos suspeitos de infecção por ZIKV de 2015 até 04 de janeiro de 2018 (Mitchell, 2018). Os dados revelam a dimensão e a importância da epidemia de Zika ocorrida no Brasil em 2016. No entanto, o MS estimou que tenham ocorrido entre 497.593 e 1.482.701 casos de infecção por ZIKV na

epidemia de 2015 e que a maior parte destes não procuraram ajuda médica por apresentar quadro assintomático ou oligossintomático (Brasil, 2016).

Meses após a ocorrência dos primeiros casos autóctones de febre Zika, o Brasil registrou o crescimento incomum do número de recém-nascidos, apresentando microcefalia, uma malformação congênita em que o cérebro não se desenvolve adequadamente (WHO, 2018b). Em outubro de 2015, a Secretaria de Estado de Saúde de Pernambuco informou ao Ministério da Saúde sobre o aumento da prevalência de microcefalia no estado. Em outros estados, principalmente da região nordeste, o crescimento dos casos de microcefalia também foi detectado. Uma das principais hipóteses sob investigação era a relação com a infecção por ZIKV (Brasil, 2016; Brasil, 2015b).

Em novembro de 2015, o MS confirmou esta hipótese a partir de resultados de exames de pacientes. Também decretou a Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) em razão do crescimento do número de casos de microcefalia no país.

O potencial epidêmico do ZIKV e o crescimento da ocorrência de microcefalia e de casos de Síndrome de Guillain-Barré, associados com ZIKV, conduziu a OMS a decretar Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional em fevereiro de 2016 (Panchaud, 2016).

Nos anos seguintes, várias evidências científicas têm reforçado a relação causal entre a infecção por ZIKV na gravidez e a síndrome congênita do Zika, que inclui a microcefalia e outras malformações congênitas (Paixão et al., 2018).

Desde o início da ESPIN, até a semana epidemiológica 40/2018 (06/10/2018) foram notificados 16.735 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento, possivelmente relacionados à infecção pelo ZIKV e a outras etiologias infecciosas. Dos casos considerados confirmados (3.267), com alterações no crescimento e desenvolvimento, 569 casos foram classificados como prováveis confirmados para a transmissão congênita durante a gestação (Brasil, 2018b).

1.5.4. Vacina contra as arboviroses

Até o momento não há fármacos antivirais disponíveis para o tratamento das três arboviroses, nem vacinas licenciadas contra o ZIKV e CHIKV, apenas para DENV (Silva & Harris, 2018; Garg, Mehmetoglu-Gurbuz, & Joshi, 2018; A. Powers, 2018; Powers, 2018b).

No caso da febre Zika, os esforços dos pesquisadores estão voltados para obtenção de uma vacina que previna a transmissão vertical do vírus para o feto (Durham et al., 2018). No

presente, há mais de 30 vacinas candidatas em desenvolvimento, das quais 11 estão na fase I do estudo clínico, que é a etapa em que são feitos os primeiros testes em seres humanos para avaliar a segurança (Diamond, Ledgerwood, & Pierson, 2018; Durham et al., 2018; Escosteguy, 1999).

Em razão do aumento global da ocorrência de Chikungunya e do número substancial de doentes que desenvolveram sintomas crônicos, vários estudos estão em busca de uma vacina para prevenção da doença. A vacina candidata com estudos mais avançados está na fase II dos ensaios clínicos na qual é avaliado o efeito, envolvendo um pequeno número de indivíduos. Os resultados são promissores e já há preparativos para a fase III (avaliação do efeito em larga escala) ((Escosteguy, 1999; A. Powers, 2018; Reisinger et al., 2018).

Para a Dengue, três vacinas estão em estágio mais avançado nas pesquisas. Uma delas, produzida pela Sanofi-Aventis que está licenciada desde 2016 e vem sendo utilizada em várias regiões do mundo e no Brasil, onde a aquisição é feita somente por meio de clínicas particulares. As demais, uma produzida pela Takeda Pharmaceutical Company Limited e a outra, pela parceria entre o National Institutes of Health (EUA) e o Instituto Butantan, estão em fase III de ensaios clínicos (Silva & Harris, 2018; Precioso et al., 2015).

As vacinas terão papel fundamental na prevenção destas arboviroses. Contudo, há um consenso sobre a necessidade de combinar a vacinação com estratégias de combate ao vetor. Isto porque as vacinas apresentam limitações quanto a sua eficácia, além disso, em programas de vacinação pode haver falhas importantes na cobertura vacinal influenciada por crenças religiosas, desconfiança da população, entre outros problemas como vem ocorrendo em relação a outras doenças infecciosas como sarampo e poliomielite, por exemplo. Assim, estes fatores contribuem para manter a importância da estratégia de controle do vetor (Christofferson & Mores, 2015; Londono-Renteria, Troupin, & Colpitts, 2016).

1.6. Evolução dos programas de controle do *Ae. aegypti* no Brasil

As primeiras iniciativas institucionais com ações sistematizadas destinadas ao combate do mosquito *Ae. aegypti* estavam relacionadas ao controle da transmissão da febre amarela urbana (FAU) na primeira metade do século XX (Braga & Valle, 2007a). Em 1907, Oswaldo Cruz iniciou a campanha de combate à FAU com a criação da brigada sanitária para eliminar focos de *Ae. aegypti* e detectar casos da doença (Braga & Valle, 2007a).

Campanhas intensivas executadas pela Fundação Rockefeller (FR), instituição norte-americana, com o objetivo de erradicar o vetor foram desenvolvidas em vários países das

Américas. A partir de um acordo firmado entre o governo brasileiro, por intermédio do Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), a FR desenvolveu ações no norte e nordeste do país. As operações de erradicação consistiam principalmente na eliminação de larvas, de recipientes e outros locais com água disponível, colocação de camada de óleo (procedimento chamado de petrolização) em pequenos recipientes não passíveis de remoção e uso de peixes larvófagos (Löwy, 1999).

Enquanto as ações da FR foram centradas em medidas antilarvárias, as ações do DNSP buscavam atingir as formas adultas do mosquito com o uso de inseticidas por meio fumigações, isto é, aplicações por volatilização ou por combustão. Isto desencadeou divergências técnicas importantes entre as duas instituições que repercutiram no controle da FAU (Benchimol, 2001). No entanto, as ações da FR começaram rapidamente a apresentar resultados importantes com a redução da infestação do vetor e da ocorrência de casos de febre amarela. Os especialistas da FR acreditavam que a eliminação de focos de mosquitos nas cidades era uma medida suficiente para a eliminação gradual da FAU em todo o país. Este pensamento ficou conhecido como a teoria do foco-chave que mais tarde se mostrou limitada para impedir a ocorrência de casos da doença (Löwy, 1999).

A partir de 1940, com a recente criação do Serviço Nacional de Febre Amarela, o controle do vetor passou a ser exclusividade de sanitaristas brasileiros (Benchimol, 2001). A erradicação do mosquito somente foi atingida em 1955 como resultado da implementação do Plano de Erradicação do *Ae. aegypti* no Hemisfério Oeste, uma iniciativa da Organização Pan-Americana da Saúde e da Organização Mundial da Saúde iniciada em 1947 para todos os países da América Latina (Braga & Valle, 2007a; Dick et al., 2012). O advento do inseticida residual diclorodifeniltricloreto (DDT) foi um elemento importante nestas campanhas tanto como uma estratégia de controle vetorial eficaz, quanto no incentivo ao movimento continental de erradicação do vetor (Teixeira & Barreto, 1996).

No Brasil, em 1956, foi criado Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu) que passou a executar as ações de controle da FAU e malária em substituição ao Serviço Nacional de Febre Amarela. Em 1967, as autoridades sanitárias identificaram, no Maranhão, novos focos de *Ae. aegypti* até então erradicado no país (Braga & Valle, 2007). Embora, a eliminação do vetor tenha sido bem-sucedida em vários países do continente americano em 1962, outros países não alcançaram êxito como os Estados Unidos, Cuba, Venezuela e diversos países do Caribe, tornando-se importantes fontes de risco para promover reinfestações de países vizinhos (Dick et al., 2012).

O DENERu foi substituído, em 1969, pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) que assumiu as ações de controle e mais uma vez o vetor foi erradicado em 1973 (Benchimol, 2001). Entretanto, novas reinfestações foram detectadas já em 1976 em razão de falhas na vigilância epidemiológica e do crescimento das cidades com a urbanização acelerada e desordenada. Como não houve sucesso na eliminação destes novos focos, ocorreu a disseminação dos mosquitos para várias localidades. A instituição ainda coordenou o Programa Nacional de Controle da Febre Amarela e Dengue (Braga & Valle, 2007a).

Vários fatores contribuíram para impedir a erradicação do vetor *Ae. aegypti* nas últimas décadas do século XX, são eles: a perda de importância política da erradicação nos países livres do vetor; redução gradual da vigilância, tornando-se incapaz de detectar pequenos focos; demora da ação de controle de reinfestações em razão da centralização de programas; expansão rápida das cidades, com condições sanitárias precárias; transporte passivo do vetor em viagens domésticas e internacionais; resistência ao DDT e outros inseticidas organoclorados; altos custos com pessoal e insumos; baixa participação da sociedade (Dick et al., 2012).

Sem registros de casos de dengue desde 1923, a doença reemergeu em 1982 em Boa Vista, Roraima, onde ocorreram cerca de 11 mil casos. A epidemia foi rapidamente contida o que não permitiu a disseminação para outras áreas do país. Outro fator que contribuiu para que não houvesse a propagação da doença foi a distribuição ainda restrita do vetor no território nacional. No entanto, cinco anos mais tarde, a doença reaparece em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, e dissemina-se para municípios vizinhos. Em 1987, surtos e epidemias são registrados em diversos estados (Teixeira, Barreto, & Guerra, 1999). Os anos seguintes foram registradas epidemias em diversas regiões do país quase que ininterruptamente (Denise Valle et al., 2016). Este novo cenário, foi determinante para mudanças importantes nos programas posteriores de controle do mosquito *Ae. aegypti*.

Em 1990, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) foi criada e incumbida da coordenação do controle da dengue. Em 1996, O MS reviu a estratégia de controle centralizada executada pela FUNASA. Várias falhas como o uso exacerbado de inseticida, falta de participação popular (apesar de fundamental), baixa integração interinstitucional e pequeno uso do instrumental epidemiológico tornaram a instituição incapaz de conter a expansão do vetor, muito menos de erradicá-lo (Brasil, 2002).

No mesmo ano, o MS lançou o Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) alterando a forma de gestão centralizada e verticalizada do combate ao vetor, característica

presente até então nas campanhas nacionais, de estrutura militar, fortemente marcada pela disciplina e hierarquia (Brasil, 2002; Tauil, 2002). Passou a vigorar a descentralização de ações de controle de endemias e de recursos federais, sendo diretamente repassados para os estados e municípios (Brasil, 2002). Isto representou um alinhamento aos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS) fundado pela Lei Orgânica da Saúde em 1990 (Brasil, 1990): descentralização, universalidade, integração em nível executivo das ações de saúde, entre outros.

Estas mudanças apesar de representarem importante avanço para o fortalecimento do controle vetorial, as ações de prevenção permaneceram focadas, quase que exclusivamente, nas atividades de campo com uso de inseticidas (Brasil, 2002). O principal objetivo do PEAa foi impedir o crescimento dos casos de dengue hemorrágica responsável pela ocorrência de óbitos. O plano previa ação interinstitucional de vários ministérios e celebração de convênios com os municípios para execução das ações de controle e prevenção, alcançando o total de 3701 municípios conveniados em 1999. Foi investido mais de 1 bilhão de reais pelo MS para aquisição de insumos, veículos e equipamentos, contratação e capacitação de pessoal nos municípios. O PEAa, no entanto, não alcançou o objetivo de reduzir o quantitativo de municípios infestados pelo vetor. Em lugar disso, ocorreu o contrário: o aumento da dispersão do vetor e do número de casos de dengue (Braga & Valle, 2007a).

O crescimento de casos de dengue hemorrágica, a tendência de aumento da incidência de dengue e a ameaça de circulação do sorotipo DENV-3, o que poderia provocar novas epidemias, fizeram com que o MS implementasse, em 2001, o Plano de Intensificação de Ações de Controle da Dengue (PIACD). O plano ampliou os recursos federais destinados ao controle vetorial, mantendo a descentralização das ações e inovou ao incorporar a participação comunitária e mobilização social (Brasil, 2002).

O MS abandonou a meta de erradicação e por meio do PIACD elegeu 657 municípios como prioritários para acompanhamento e intensificação das ações. Os municípios considerados prioritários foram aqueles que atenderam os seguintes critérios: ocorrência de transmissão de dengue no ano 2000/2001; ser capital do Estado; possuir população igual ou superior a 50.000 habitantes; ser receptivo a introdução de novos sorotipos, ou seja, ser municípios de fronteiras, portos, núcleos de turismo, etc (Braga & Valle, 2007; Ferreira, 2009).

Ajustes do PIACD foram realizados e muitos dos seus elementos passaram a compor o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) lançado em 2002, entre eles, a ênfase em municípios prioritários. O PNCD pretendia reduzir a infestação vetorial, a incidência da dengue

e a letalidade por febre hemorrágica de dengue. Foi concebido como um programa de ações permanentes, tendo em vista a falta de evidências técnicas que sustentem a viabilidade da erradicação do vetor (Brasil, 2002).

Ao PNCD foram incorporadas experiências nacionais e internacionais de controle do vetor, mas com mudanças essenciais quanto aos seguintes aspectos: 1 - o desenvolvimento de campanhas de informação e de mobilização das pessoas, de maneira a se criar uma maior responsabilização de cada família na manutenção de seu ambiente doméstico livre de potenciais criadouros do vetor; 2 - o fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica para ampliar a capacidade de predição e de detecção precoce de surtos da doença; 3- a melhoria da qualidade do trabalho de campo de combate ao vetor; 4 - a integração das ações de controle da dengue na atenção básica, com a mobilização do Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e Programa de Saúde da Família (PSF); 5 - a utilização de instrumentos legais que facilitem o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas, etc.; 6 - a atuação multissetorial por meio do fomento à destinação adequada de resíduos sólidos e a utilização de recipientes seguros para armazenagem de água; e 7 - o desenvolvimento de instrumentos mais eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios (Brasil, 2002).

O PNCD foi implantado considerando 10 componentes que envolvem os aspectos citados anteriormente. Cabem aos estados e municípios a elaboração de planos regionais contemplando suas especificidades locais, mas alinhados com o programa nacional (Brasil, 2002).

Em 2009, o MS lançou as Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle da Dengue (DNPCD), um importante documento que forneceu maiores subsídios para a elaboração de planos regionais, além de atualizar os parâmetros, conceitos, métodos, ações preconizadas para o controle vetorial, bem como as atribuições e competências do agente comunitário de saúde, agente de controle de endemias e supervisores (Brasil, 2009).

1.7. Monitoramento e controle do vetor *Ae. aegypti* em Brasília/DF

De acordo com as DNPCD (2009), os municípios podem ser categorizados em dois estratos: estrato I – municípios infestados, isto é, com dispersão e manutenção do vetor nos domicílios; estrato II – municípios não infestados, aqueles em que não foi detectada a presença disseminada do vetor nos domicílios ou, nos municípios anteriormente infestados, que permanecerem 12 meses consecutivos sem a presença do vetor.

Brasília é considerada município infestado, pois os levantamentos amostrais da densidade populacional de *Ae. aegypti* realizados nos últimos anos têm detectado a presença do vetor em várias Regiões Administrativas (RA) (Brasília, 2016a, 2017a). Conforme o último Levantamento Rápido de Índices para o *Ae. aegypti* (LIRAA) (Brasil, 2013), realizado em novembro de 2018, 96,8% das 31 RA's pesquisadas, apresentaram imóveis com larvas do vetor (Brasília, 2018). Para os municípios infestados, são previstas ações de monitoramento e controle da infestação do vetor, de educação em saúde e de bloqueio da transmissão das doenças (Brasil, 2009).

Segundo o DNPCD, os agentes de controle de endemias (em Brasília, são chamados de agentes de vigilância ambiental em saúde - AVAS), devem realizar visitas nos domicílios e em outros imóveis para inspeção ambiental, com a participação do proprietário/morador. Também atuam de forma integrada os Agentes Comunitários de Saúde (ACS), um outro ator importante na promoção e prevenção na saúde. O objetivo é identificar condições ambientais de risco que permitem a proliferação do vetor, como a presença de depósitos naturais (plantas que acumulam água, ocos de árvores, etc.) e depósitos artificiais (objetos, estruturas e recipientes, com ou sem água acumulada) que possam servir para a deposição de ovos do mosquito (Figura 3)(Brasil, 2009).

Grupo	Subgrupo	Típos de Recipiente / depósitos	Ações Intersetoriais	Ação Imediata
Grupo A Armazenamento de água	A1	Caixa d' água elevada ligada à rede pública e/ou sistema de abastecimento particular (poço, cisterna, mina)	Articulação com a empresa de abastecimento de água visando ampliar a rede e regularizar o fornecimento.	Orientar quanto à cobertura ou vedação. Em caso de reincidência, notificar. Tratar como última alternativa.
	A2	Depósitos em obras e horta. Depósitos ao nível do solo para armazenamento doméstico: tonel, tambor, barril, tina, depósitos de barro (filtros, maringas, potes) cisternas, caixa d'água, captação de água (poço, cacimba).	Articulação com a empresa de abastecimento de água visando ampliar a rede e regularizar o fornecimento.	Quando indispensáveis, orientar quanto à cobertura, vedação e lavagem, caso contrário descartar. Em caso de reincidência, notificar. Tratar como última alternativa.
Grupo B Pequenos depósitos móveis		Vasos/frascos com água, prato, pingadeira, recipiente de degelo de refrigeradores, bebedouros, pequenas fontes ornamentais.	Articulação com o setor de comunicação para elaboração de campanhas locais de educação em saúde.	Orientar para vistoria/lavagem com frequência; proteção, colocação de areia. Não tratar.
Grupo C Depósitos fixos		Calhas, ralos, sanitários (em desuso), tanques em obras/borracharias, máquinas/equip. em pátios, piscinas e fontes ornamentais, floreiras em cemitérios, cacos de vidro em muros.	Articulação com a Secretaria de Urbanização e Legislativo para garantir a elaboração e aprovação de código de postura municipal que oriente a construção de imóveis protegidos dos fatores que propiciam a infestação por <i>Aedes Aegypti</i> .	Orientar para conserto de calhas/lages e toldos, vedação de sanitários e ralos em desuso, lavagem com frequência; proteção; preenchimento com areia. Tratar em última alternativa.
Grupo D Depósitos passíveis de remoção	D1	Pneus e outros materiais rodantes (câmara de ar, manchões).	Garantir o cumprimento das resoluções Conama 258/99 e 301/02 e articular com as empresas produtoras o recolhimento dos pneumáticos inservíveis.	Instruir para que sejam encaminhados para descarte adequado, se indispensáveis, proteger. Tratar como última alternativa.
	D2	Lixo (recipientes plásticos, latas) sucatas em pátios e ferro velhos, entulhos.	Articulação com o serviço de Limpeza Urbana a ampliação e regularização da coleta de resíduos de sólidos.	Lixo/entulho: instruir sobre destino adequado. Não tratar. Sucatas em PE e pátios, se indispensáveis, proteger sob cobertura. Tratamento químico conforme indicado.
Grupo E Depósitos naturais		Folhas de bromélias, ocos em árvores, buracos em rochas, restos de animais (cascas, carapaças).	Articulação com o setor de comunicação para elaboração de campanhas locais de educação em saúde. Articular com o serviço de Limpeza Urbana o pronto recolhimento dos restos de animais.	Instruir para evitar acúmulo de água em folhas. Tampar buracos em árvores. Encaminhar para destino adequado. Não tratar.

Figura 3. Classificação dos depósitos e ações preconizadas pelas Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Fonte: Brasil (2009)

Após identificar depósitos e criadouros é realizado o controle mecânico. Este consiste na adoção de práticas capazes de impedir a procriação do vetor, tendo como principais atividades a proteção, a destruição ou a destinação adequada de criadouros, que devem ser executadas sob a supervisão do AVAS, prioritariamente, pelo próprio morador/proprietário (Ações imediatas, Figura 3) (Brasil, 2009).

Em algumas situações, quando não é impossível realizar o controle mecânico, é realizado o controle químico. Esta estratégia consiste no tratamento de focos, isto é, aplicação de larvicida (inseticida que atua eliminando as larvas). A aplicação de larvicida obedece a critérios estabelecidos pelo MS que contemplam os cuidados com a manipulação do inseticida pelo AVAS (uso de equipamento de proteção individual, por exemplo), avaliação da dosagem necessária por meio do cálculo do volume do total de capacidade do recipiente (procedimento conhecido como cubagem) e a aplicação propriamente dita do inseticida (realização da medida da quantidade necessária por meio de dosadores, conforme tabela padronizada) (Brasil, 2001). Estes procedimentos compõem uma etapa crítica no controle vetorial, pois a realização inadequada, especialmente falhas na medida da quantidade de inseticida a ser aplicado, pode

resultar em sub ou superdosagem do produto, contribuindo para a seleção de populações de mosquitos resistentes.

Na visita domiciliar, também são coletados dados sobre a quantidade e o tipo de depósito utilizado pelo vetor na formação de criadouros, além da coleta de amostras das larvas para posterior identificação da espécie biológica em laboratório. São contabilizadas as quantidades de imóveis pesquisados e imóveis positivos (aqueles com presença de larvas de *Ae. aegypti* confirmada em laboratório). Todas estas variáveis coletadas na pesquisa, comumente chamada de pesquisa larvária, são utilizadas para compor indicadores entomológicos que apontam áreas prioritárias para intensificação de ações de prevenção e controle (Brasil, 2009).

Inicialmente, as DNPCD previam visitação bimestral em 100% dos imóveis do município, mas a meta foi modificada para 4 ciclos anuais de visitação de 80% dos imóveis (Brasil, 2018b). Além destes ciclos de visitas, ao menos 4 levantamentos amostrais de índice (LIRAA) devem ser realizados durante o ano (Brasil, 2018b). O LIRAA é um método de amostragem de domicílios para obtenção de indicadores entomológicos, de maneira rápida com o intuito de promover o fortalecimento das ações de controle vetorial em períodos que antecedem a maior transmissão das arboviroses (Brasil, 2009; Brasil 2013).

Além de imóveis residenciais, locais como cemitérios, borracharias, ferros-velhos, depósitos de sucatas e outros que podem contribuir com a grande produção de mosquitos são considerados pontos estratégicos para visitação quinzenal pelo AVAS. Nestes locais é aplicado larvicida mensalmente ou quando é detectada focos do mosquito (criadouros). Nas imediações do foco (perifocal), também é aplicado adulticida (inseticida que age sobre a forma adulta) de ação residual nas superfícies de recipientes utilizados para pouso ou colocação de ovos pelos mosquitos (Brasil, 2001; Brasil, 2009).

Na ocorrência de transmissão das arboviroses e acúmulo espacial de casos das doenças, configurando surtos ou epidemias, o controle químico da forma adulta do vetor deve ser realizado para conter a disseminação das doenças, procedimento conhecido como bloqueio de transmissão. Essa ação integra o conjunto de atividades emergenciais adotadas nessas situações e seu uso deve ser concomitante com todas as demais ações de controle, principalmente a diminuição de fontes de mosquito. É necessária uma avaliação das atividades de rotina para correção de falhas, devendo as ações de controle focal serem priorizadas (Brasil, 2009).

A aplicação do adulticida consiste no tratamento aeroespacial em Ultra Baixo Volume (UBV) no qual o inseticida é fragmentado, formando aerossóis (Zara, 2016). A aspersão pode

ser feita em equipamento acoplado em veículos, conhecido popularmente como carro fumacê, ou por equipamento portátil costal, comumente chamado de UBV costal. Como no caso dos larvicidas, a aplicação dos aduicidas obedece a critérios técnicos definidos pelo MS. A inobservância dos protocolos estabelecidos pode acarretar aplicação de preparações de inseticidas com sub ou superdosagens, representando fonte de riscos ocupacionais, ineficácia do controle, seleção de populações de mosquitos resistentes, podendo impactar também a fauna.

Outras formas de controle do vetor são preconizadas pelas DNPCD. O controle biológico com uso de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) foi adotado, por muitas vezes, em substituição ao temefós em localidades cujas as populações de *Ae. aegypti* apresentavam resistência comprovada por ensaios com larvas realizados pela Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa) (Braga & Valle, 2007; Brasil, 2009).

Em algumas circunstâncias, para garantir a saúde coletiva, é necessária a utilização de normas de conduta regulamentadas por instrumentos legais de apoio às ações de controle das arboviroses (Brasil, 2009). O objetivo é responsabilizar o morador/proprietário pela manutenção e limpeza dos imóveis e terrenos baldios, permitir o acesso do AVAS no interior de imóveis abandonados e naqueles onde houve a recusa da inspeção (Brasil, 2009).

1.8. Uso de inseticidas para o controle do *Ae. aegypti* no Brasil e o monitoramento das populações resistentes

No início do século XIX, com a ocorrência de casos FAU, vários produtos naturais e inorgânicos foram utilizados para repelir ou eliminar os mosquitos. Na campanha de Oswaldo Cruz (1903-1907) as casas das pessoas doentes eram recobertas por imensos panos de algodão para receberem, em seguida, aplicações de vapores de enxofre e de piretro, um inseticida natural obtido de flores e sementes de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Benchimol, 2001; Casida, 1980). Este procedimento conhecido como expurgo ou fumigação era muito comum na época, sendo realizado por equipes do Serviço de Profilaxia da Febre Amarela (Franco, 1976).

Nas primeiras décadas do século XIX, além da petrolização, também foi utilizado no controle das larvas do vetor o produto Verde de Paris (arsenito de cobre), um inseticida químico sintético altamente tóxico desenvolvido entre os anos 1867 e 1868, muito utilizado nas lavouras de batata para o controle de besouros (Homma, 2014; Soper, 1965).

A partir de 1947, o combate ao mosquito *Ae. aegypti* ganhou um novo aliado: o inseticida organoclorado (OC) diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Franco, 1976). O DDT foi o primeiro inseticida orgânico sintético, tornando-se bastante popular a partir da década de 1940

com a utilização por militares americanos para prevenção de doenças tropicais em suas ações. O baixo custo, a eficiência e alto efeito residual, permanecendo ativos por meses, fizeram do DDT um dos mais promissores inseticidas do século XIX, sendo prontamente utilizado nas campanhas contra vetores de endemias. O seu uso permitiu que o Brasil erradicasse, pela primeira vez o vetor da FAU em 1955 (Braga & Valle, 2007b; D'Amato, Torres, & Malm, 2002).

Na década de 1960, falhas no controle químico pelo DDT permitiram a disseminação do vetor, deixando evidente a ocorrência de populações de mosquitos resistentes. O DDT foi substituído pelos inseticidas organofosforados (OF), o larvicida temefós e adulticida fenitrotona (Franco, 1976). Desde de 1967, os principais inseticidas utilizados contra o vetor *Ae. aegypti* pertencem à classe dos OF's. Seu uso, no entanto, não impediu a ocorrência da reemergência e as epidemias de dengue na década de 80, mostrando, assim, sinais de comprometimento da sua eficácia (Franco, 1976; Lima et al., 2003). Apesar disso, a utilização de OF's contra larvas e adultos (aplicações por UBV e perifocal) do vetor se intensificaram como medida para conter o avanço a dengue no país (Braga, 2004).

Os primeiros ensaios que detectaram a alteração da suscetibilidade do *Ae. aegypti* ao temefós foram realizados pela Superintendência de Controle de Endemias do Governo do Estado de São Paulo em 1995. Resultados de testes simulados de campo realizados pelo Núcleo de Entomologia do Estado do Rio de Janeiro e FUNASA também revelaram alterações na suscetibilidade. Estes dados demonstram a importância do monitoramento da evolução da resistência em populações de mosquitos país, tendo em vista o longo período de uso dos OF's (Braga & Valle, 2007b).

Como ainda não havia estrutura para a realização dos ensaios no país, amostras de populações de mosquitos de São Paulo, Rondônia, Minas Gerais e Rio de Janeiro foram enviadas para especialista estrangeira em avaliação da resistência, Dr^a Janet Hemingway, em 1999. Os resultados demonstraram alterações de suscetibilidade aos OF's em uso no Brasil: temefós, malationa e fenitrotona. Também foi verificada o aumento da atividade de diversas enzimas relacionadas ao metabolismo de inseticidas. A partir destes resultados técnicos do programa de controle de vetores da FUNASA e especialistas nacionais e internacionais em resistência de vetores recomendaram a substituição do malationa por inseticidas piretroide (PI) e a manutenção do uso do temefós (Braga & Valle, 2007b).

Com a criação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa) em 1999, iniciou-se o monitoramento das populações de mosquitos

para os inseticidas temefós, malationa e fenitrotiona. Foram realizados ensaios de dose diagnóstica, dose-resposta com larvas e adultos do vetor em amostras de vários municípios escolhidos de acordo com o elevado número de casos de dengue ou alta de infestação (Lima et al., 2003). Ambas situações modulam a aplicação de inseticida e, portanto, a pressão seletiva (Braga et al., 2004).

Uma primeira avaliação realizada em 1999, analisou sete municípios do Rio de Janeiro e três do Espírito Santo e detectou resistência ao temefós em todas as mostras testadas. Também foi avaliada a suscetibilidade aos adulticidas malationa e fenitrotiona. Apenas um município apresentou resultados compatíveis com suscetibilidade a OF (Lima et al., 2003). Na segunda etapa, em 2001, amostras do Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas foram avaliadas, totalizando 11 municípios. Todas as amostras foram consideradas resistentes para temefós (Braga et al., 2004).

Esses resultados foram fundamentais para que a FUNASA promovesse a substituição do temefós pelo biolarvicida *Bti*, em 2001, e os adulticidas OF's por cipermetrina (PI), em 1999, nos municípios críticos. Esta foi uma estratégia de manejo da resistência que visava utilizar inseticidas de modo de ação diferentes para larvas e adultos. A decisão foi baseada nas evidências de que a troca de um inseticida por outro de modo de ação diferente pode reduzir a resistência ou postergar seu desenvolvimento (Braga et al., 2004; Lima et al., 2003).

A suscetibilidade à cipermetrina das populações do Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas também foi analisada nos anos seguintes por Da-Cunha et al. (2005) em colônias formadas a partir de ovos coletados com armadilhas no período de 2001 a 2003. O ensaios com mosquitos adultos revelaram o rápido decréscimo da suscetibilidade, especialmente no Rio de Janeiro, apesar do início da utilização do piretroide ser recente (Da-Cunha et al., 2005).

Em estudo realizado por Montella et al. (2007), o *status* de suscetibilidade ao temefós foi verificado em populações das regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil. Também foram realizados ensaios bioquímicos para avaliar atividade de enzimas relacionadas à resistência. Os resultados demonstraram que embora tenha sido interrompido o uso do temefós, as populações avaliadas apresentar discreto decréscimo do nível de resistência e em outras localidades, o aumento. Foram verificadas alterações na atividade de enzimas, possivelmente relacionada a utilização da cipermetrina (Montella et al., 2007).

Chediak et al. (2016) realizaram avaliação espaço-temporal da propagação da resistência ao temefós a partir da reunião dos dados obtidos no monitoramento da suscetibilidade de 133 municípios da MoReNAa no período de 1999 a 2011. Os autores concluem que a resistência está disseminada no país e há poucas áreas onde a eficácia do

inseticida consegue atingir 80% de mortalidade das larvas. Isso torna inviável a reutilização do temefós no PNCD.

Estes resultados deixaram clara a necessidade substituição do temefós em todo o país. A partir de 2009, iniciou a substituição do larvicida OP pelo diflubenzuron, um inseticida regulador do crescimento dos insetos (Bellinato et al., 2016). Neste mesmo ano, também foi iniciada a substituição da a cipermetrina pelo malationa (Brasil, 2016). Em 2013, apenas diflubenzuron e novaluron (outro regulador de crescimento) estavam sendo utilizados no país (Brasil, 2014a).

Em abril de 2012, a SVS/MS realizou o II Seminário Internacional para Avaliação de Ações de Controle Químico de *Aedes aegypti* no Brasil, com especialistas no controle de vetores do MS, instituições de pesquisa e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Nesta reunião, foi recomendada substituição imediata da cipermetrina nas regiões prioritárias 1 (estados da região sudeste, centro-oeste, sul e o estado da Bahia) e prioritárias 2 (região norte e o restante da região nordeste) (Brasil, 2012). Esta foi uma estratégia de manejo para reverter a resistência aos piretroides para um eventual uso futuro, tendo em vista que há apenas o malationa como outra opção para o controle de mosquitos adultos em aplicações a UBV. Também foi recomendada a substituição dos larvicidas no prazo máximo de 4 anos dentre os recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tabela 1).

Tabela 1. Larvicidas e adulticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde conforme a finalidade de controle.

Finalidade	Inseticida	Grupo
Larvicidas – Controle focal	<i>Bacillus thuringiensis israelenses</i> , cepa AM 65-52 (<i>Bti</i>)	Larvicido bacteriano
	Diflubenzuron	Benzoilureas
	Novaluron	Benzoilureas
	Piriproxifeno	Análogo do hormônio juvenil
	Espinosade	Espinosinas
	Temefós	Organofosforado

(continua)

(conclusão)

Finalidade	Inseticida	Grupo
Adulticidas – Aplicação a UBV (costal e acoplado a veículos)	Deltametrina	Piretroide
	Lambdacialotrina d-d, transcifenotrina	
	Malationa	
Adulticidas – Controle perifocal – Aplicação residual	Bendiocarb	Carbamato
	Propoxur	Organoclorado
	DDT	
	Fenitrotiona	
	Malationa	Organofosforado
	Pririmifós-metil	Piretroide
	Bifentrina	
	Ciflutrina	
	Deltametrina	
	Etofenprox	
Lambdacialotrina	Piretroide	
Alfacipermetrina		

Fonte: adaptado de Controle de Vetores (Brasil, 2014b)

Bellinato et al. (2016) investigaram a suscetibilidade de populações de mosquitos de um total de 12 municípios dos estados Roraima, Pará, Rio Grande do Norte, Espírito Santo e Goiás para os inseticidas temefós, deltametrina (PI) e diflubenzuron. As amostras de ovos foram coletadas entre os anos 2010 e 2012. Os autores verificaram altos níveis de resistência para temefós e deltametrina nas populações amostradas. Todas as populações apresentaram suscetibilidade ao diflubenzuron.

Em 2014, os larvicidas diflubenzuron e novaluron foram substituídos por outro regulador de crescimento, um análogo do hormônio juvenil, o piriproxifeno. (Brasil, 2014a).

Em 10 de maio de 2017, após cerca de 3 anos de utilização piriproxifeno, o MS promoveu um evento intitulado “Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* aos Inseticidas Utilizados pelo PNCD”, no Rio de Janeiro, com a participação de especialistas da Fundação Oswaldo Cruz, técnicos do MS e das secretarias estaduais de saúde. O objetivo do evento foi apresentar a nova proposta de monitoramento da resistência a ser implantada no país

e treinar os participantes para a coleta de amostras de ovos de populações de mosquitos de campo (Nota Informativa nº 103 – Anexo I).

Esta nova fase de monitoramento, propunha a realização de ensaios de suscetibilidade ao piriproxifeno, malationa e genotipagem das mutações *kdr* V1016I e F1534C relacionadas a resistência a piretroides. Foram selecionados 145 municípios de acordo com os seguintes critérios: 1 – distribuição espacial dos municípios representativa do território nacional; 2 – índice de infestação pelo vetor suficiente para obtenção de ovos; 3 – histórico de dengue de importância; 4 – regiões em fronteiras com outros estados e 5 – capacidade operacional do Programa Municipal de Controle da Dengue para realizar as coletas de ovos. Ainda não há publicações sobre este monitoramento (Nota Informativa nº 103 – Anexo I).

Os inseticidas utilizados nos programas de controle de vetores de doenças são considerados insumos estratégicos fornecidos aos estados e Distrito Federal pelo Governo Federal por meio do Ministério da Saúde, conforme a Portaria nº 1378, de 9 de julho de 2013. Contudo, a aquisição de inseticidas pelos estados é facultada. O estado de São Paulo desenvolve em seus municípios o programa próprio de monitoramento da resistência de forma sistemática. Isto lhe permite realizar a substituição de inseticidas de maneira mais precisa.

Em Brasília, embora não haja o acompanhamento como estratégia de vigilância, foi realizada a aquisição de inseticidas em 2016 como mais uma opção no controle do vetor, são eles: etofenproxi e espinosade. Também em 2016 e 2017 foi utilizado o larvicida *Bti*. Em 2007, o *Bti* foi utilizado na RA de São Sebastião, como parte de um projeto (Monnerat, Soares, et al., 2012). A Figura 4, apresenta a linha do tempo da utilização de inseticidas pelo PNCD e por São Paulo e Brasília.

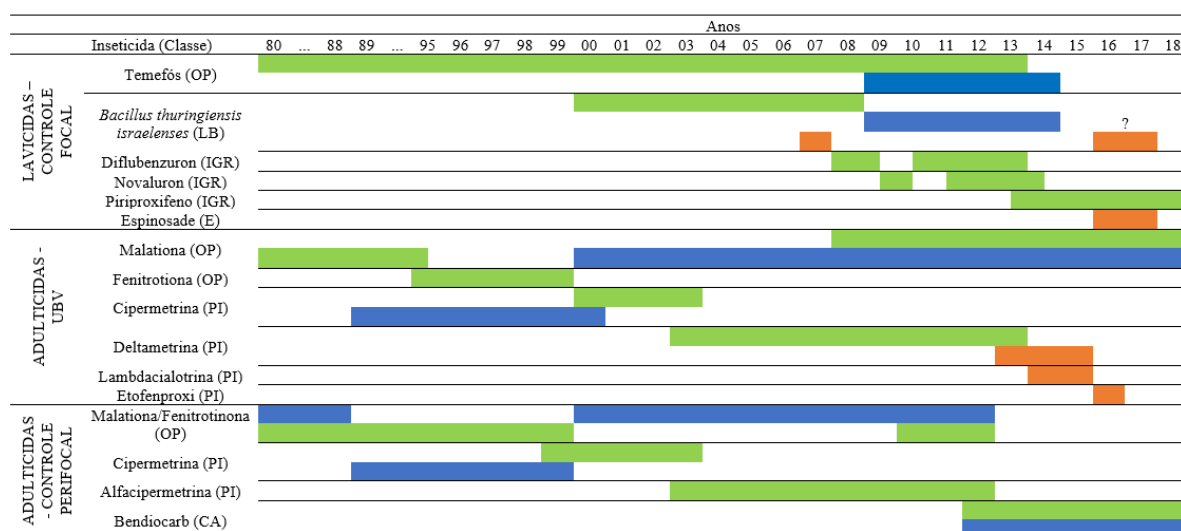


Figura 4. Linha do tempo da utilização de inseticidas das classes organofosforado (OF), regulador de crescimento (IGR), piretroide (PI), larvicida bacteriano (LB), espinosinas (E) e carbamato (CA) no Programa Nacional de Controle da dengue (PNCD), de São Paulo e Brasília. Fonte: adaptado de Campos (2017) (Anexo II); Agrotóxico utilizados em programas de saúde (Observatório Saúde Ambiental, [s.d.]), Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL)/SES-DF. Legenda: Barras verdes: uso do inseticida no Brasil; barras azuis: uso do inseticida em São Paulo; barras laranjas: usos de inseticidas em Brasília; (?) dados indisponíveis.

1.9. Algumas classes de inseticidas utilizados no controle do *Aedes aegypti*

1.9.1. Inseticidas inorgânicos e orgânicos naturais

As primeiras substâncias utilizadas pela humanidade para o controle de pragas agrícolas foram os inseticidas inorgânicos, tais como, o enxofre inorgânico (uso desde ano 1000 a.C), arsênio (900 d.C) e, depois, arseniato de chumbo, ácido bórico, entre outros (John E. Casida & Quistad, 1998). E por esta razão, alguns destes inseticidas também foram os primeiros a serem utilizados no controle do *Ae. aegypti*, como o enxofre e o composto arseniato de cobre (Verde de Paris) (Benchimol, 2001; Soper, 1965).

Os inseticidas orgânicos naturais surgiram em seguida, diferenciando-se por apresentar estrutura complexa, alta potência e seletividade. No entanto, eram limitados em quantidade, sendo geralmente muito caros e sensíveis a luz. O piretro, obtido de flores e sementes de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, é um dos representantes mais importantes. Outros como a

nicotina e rotenona também se destacaram pelo seu grande uso no Brasil, especialmente na agricultura (Casida, 1980; Moraes & Marinho-Prado, 2016).

1.9.2. Inseticidas orgânicos sintéticos

São inseticidas de ação neurotóxica utilizados nos programas de controle de vetores de diversas doenças. Compõe esta classe os organoclorados (OC), organofosforados (OF), carbamatos (CA) e piretroides (PI) (Braga & Valle, 2007b).

1.9.2.1. Organoclorado (OC)

No início do século XIX, no período de grande desenvolvimento de produtos sintéticos, a era química, surgiram os primeiros inseticidas orgânicos sintéticos: os organoclorados. São inseticidas compostos por carbono, hidrogênio e cloro (Figura 5), sendo classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos (Braga & Valle, 2007b).

Destacam-se no controle de vetores em Saúde Pública, os grupos difenil-alifáticos, tendo como mais importante representante o DDT, cuja atividade inseticida foi descoberta em 1939, e os hexaclorociclohexanos, especialmente o benzenohexacloro, conhecido como BHC. Estes inseticidas são neurotóxicos. Atuam nos canais de sódio da membrana dos axônios, mantendo-os abertos, o que elimina o equilíbrio de íons sódio e potássio e, por consequência, impede a transmissão normal do impulso nervoso em insetos. Desta forma, ocorrem contínuos impulsos nervosos, provocando contração muscular, convulsão, paralisia e morte (Braga & Valle, 2007b; Costa, 2008).

Os OC's apresentam longo efeito residual, permanecendo por meses nas superfícies tratadas, mas também no ambiente. Por ser de difícil degradação e por se acumular em tecidos de humanos e outros animais, o uso de OC's está proibido no Brasil e em grande parte dos países. Apesar disso, atualmente, o DDT ainda é indicado pela OMS para o controle de vetores (Braga & Valle, 2007b; D'Amato et al., 2002).

1.9.2.2. Organofosforado (OF) e Carbamatos (CA)

São inseticidas constituídos por fósforo derivados do ácido fosfórico (Figura 6). Os OF's são muito utilizados em Saúde Pública nos programas de controle de vetores. Os primeiros OF's começaram a surgir em 1938. Em 1952, surgiu a malationa, utilizada até hoje no controle do mosquito *Ae. aegypti*. Este adulticida pertence ao subgrupo dos alifáticos. Outros dois

subgrupos compõem a classe dos OF's, os derivados de fenil, por exemplo, o fenitrothion, e os heterocíclicos, como clorpirifos. Os OF's apresentam algumas vantagens em relação aos OC's: são biodegradáveis, e não se acumulam em tecidos animais e humanos. Por outro lado, possuem efeito residual menor que os OC's, exigindo uma frequência maior de aplicações (Braga & Valle, 2007b; Casida & Quistad, 1998). Outro importante OF para a Saúde Pública é o temefós, considerado o larvicida mais utilizado no mundo contra o *Ae. aegypti* (George et al., 2015).

Os OF's têm como alvo no sistema nervoso a enzima acetilcolinesterase. O inseticida fosforila a enzima, causando a sua inatividade irreversível e, por conseguinte, o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica (junção entre os neurônios) que acarreta a contínua estimulação do sistema nervoso, levando o inseto à paralisia e à morte (Costa, 2008).

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbônico (Figura 6). Os primeiros CA's surgiram na década de 1950, sendo o carbaril mais utilizado. Os CA's apresentam o mesmo mecanismo de ação dos OF's, no entanto, a ligação estabelecida entre o inseticida e a acetilcolinesterase é transitória. Possuem efeito residual limitado como OF e de ação letal rápida. Atualmente, no Brasil, o bendiocarbe é o CA de ação residual utilizado pelo PNCD para o controle perifocal.

1.9.2.3. Piretroides (PI)

Estes inseticidas são modificações estruturais de um dos mais antigos agentes de controle de insetos: as piretrinas (Casida, 1980). Os piretroides sintéticos são biodegradáveis, não cumulativos, fotoestáveis e possuem alta potência inseticida. Por outro lado, são produtos de custo alto. O modo de ação destes inseticidas é similar ao do DDT, ou seja, atuam sobre o canal de sódio. Os efeitos da intoxicação no inseto incluem contrações musculares, convulsões, paralisia momentânea (efeito *knock-down*), evoluindo para morte. Cipermetrina, deltametrina e lambdacialotrina são alguns exemplos deste tipo de inseticida (Figura 6) (Braga & Valle, 2007b).

1.9.2.4. Reguladores de crescimento dos insetos (*IGR, Insect Growth Regulator*)

Esses inseticidas não são necessariamente tóxicos para o alvo, como ocorre com os inseticidas OC e OF, por exemplo, mas atuam de forma seletiva, provocando várias anomalias que prejudicam a vida do inseto. Diferentemente das demais classes de inseticidas utilizadas no controle do mosquito *Ae. aegypti*, os IGR's são de ação lenta (Dhadialla, Retnakaran, & Smagghe, 1985; Tunaz & Uygun, 2004).

Os IGR's regulam a metamorfose, impedindo que as formas imaturas cheguem ao estágio adulto, ou interferem na reprodução dos insetos adultos ao produzirem alterações morfológicas que reduzem o potencial reprodutivo. Os insetos adultos afetados pelo IGR's podem ser estéreis ou apresentarem alterações no desenvolvimento da genitália que interferem no acasalamento ou na produção de descendentes férteis (Slama, 2013; Tunaz & Uygun, 2004).

Conforme o modo de ação, os IGR's são classificados em 2 grupos: os inibidores de síntese e deposição de quitina (ICS, *chitin synthesis inhibitors*); e os análogos do hormônio juvenil ou juvenóides (JHA, *juvenile hormone analogs*) (Braga & Valle, 2007b).

O exoesqueleto do inseto é composto do polissacarídeo quitina. No crescimento do inseto, os ICS's interferem na síntese de quitina que é uma fase essencial no processo de troca de exoesqueleto. No PNCD, já foram utilizados o ICS's diflubenzuron e novaluron (Figura 5). Os JHA's, por sua vez, assim como o hormônio juvenil natural do inseto, atuam inibindo a metamorfose. Em condições normais, haveria a redução da quantidade de hormônio juvenil no interior do inseto, ao final do estágio imaturo que antecede a metamorfose. A exposição constante ao JHA inibe o processo metamorfose mantendo o inseto com características juvenis. Atualmente, é utilizado pelo PNCD o JHA piriproxifeno é utilizado no controle focal (Braga & Valle, 2007b; Ohba et al., 2013; Tunaz & Uygun, 2004).

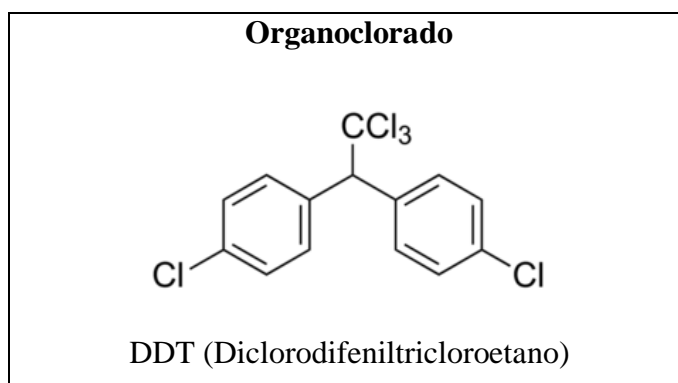


Figura 5. Fórmula estrutural do inseticida organoclorado. Fonte: Sigma-Aldrich.

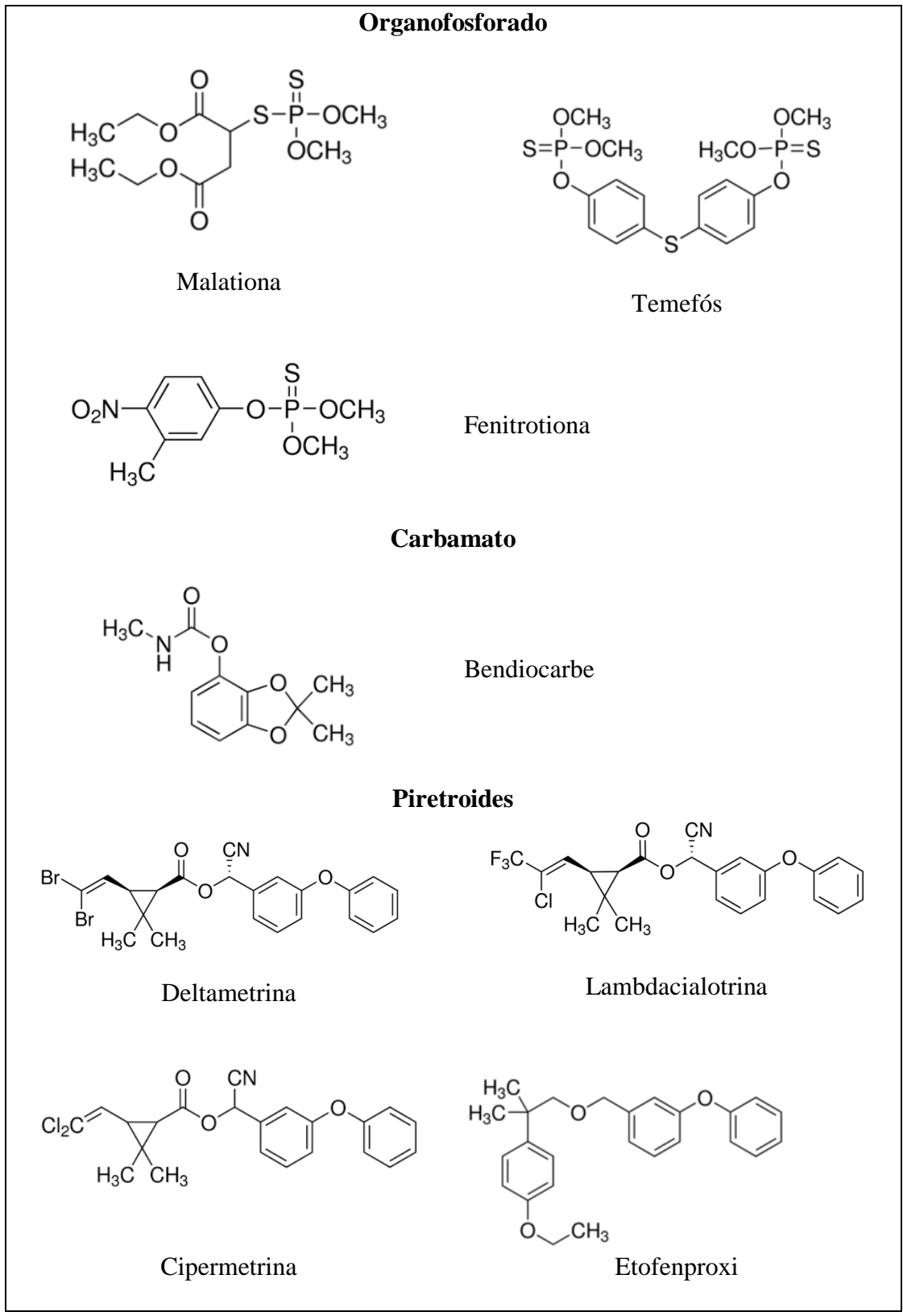


Figura 6. Fórmula estrutural dos inseticidas orgnofosforado, carbamato e piretroide utilizados pelo Programa Nacional do Controle da Dengue / Ministério da Saúde no Brasil no Distrito Federal. Fonte: Sigma-Aldrich.

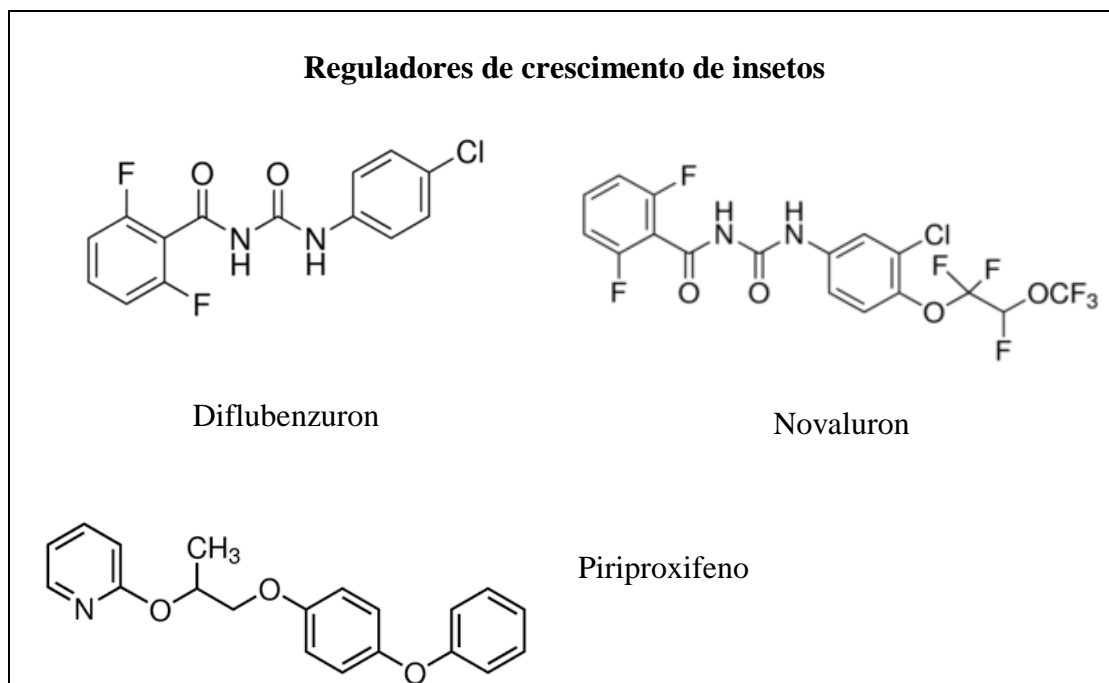


Figura 7. Fórmula estrutural dos inseticidas reguladores de crescimento de insetos utilizados pelo Programa Nacional do Controle da Dengue / Ministério da Saúde no Brasil no Distrito Federal. Fonte: Sigma-Aldrich.

1.10. Resistência aos inseticidas e seus mecanismos

Existem diversas definições de resistência. A OMS defini a resistência como sendo o desenvolvimento de uma habilidade em uma linhagem de algum organismo para tolerar doses de um produto tóxico que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie (WHO, 1957). Outras definições mais completas incorporam o aspecto hereditário da resistência. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, por exemplo, defini a resistência como sendo uma característica genética que permite ao organismo sobreviver à exposição de uma dose de inseticida que normalmente seria letal para a maioria dos indivíduos de uma população (FAO, 2012). Enquanto, para Whalon et al. (2008) a resistência é o processo microevolutivo pelo qual a adaptação genética, através da seleção por pesticidas, resulta em populações de artrópodes que apresentam, frequentemente, desafios de gerenciamento mais difíceis. Independentemente das definições consideradas, a resistência é um grave problema na Saúde Pública e na agricultura, provocando aumento da ocorrência de doenças e perdas econômicas na produção de alimentos.

A ocorrência dos genes que conferem a resistência é um evento natural, entretanto é frequentemente baixa. O uso repetido de inseticidas seleciona indivíduos com genes da resistência que passam a reproduzir-se com maior sucesso, alterando a frequência dos genes da

resistência na população (Figura 8). A resistência corresponde, assim, a um extremo da resposta à pressão seletiva, comparando com a susceptibilidade, um outro extremo. Há vários graus entre estes dois extremos que podem estar relacionados ao uso de inseticidas ou a variações naturais na população resultantes de mutações (Robertson et al., 2007).

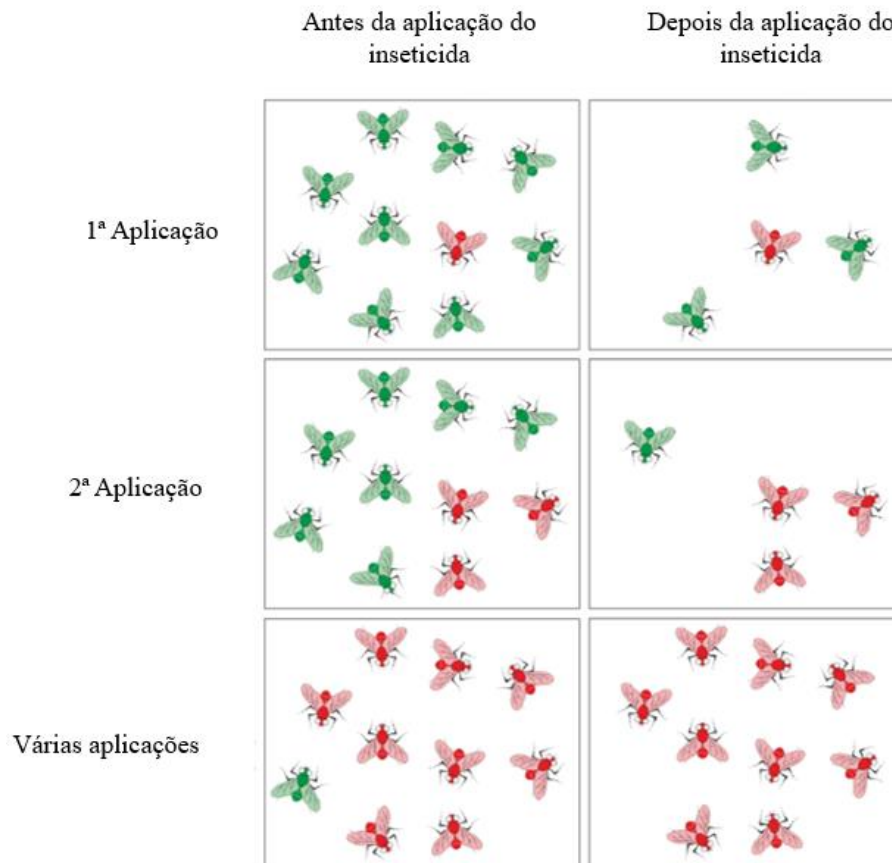


Figura 8. Exemplo teórico ilustrando a seleção de população de insetos resistentes. Alguns indivíduos (vermelhos) com características genéticas que lhes permitem sobreviver em aplicações de inseticidas podem se reproduzir. Se a pressão seletiva é frequente, estas características se tornam parte preponderante na população após várias gerações. Fonte: Panini et al. (2016).

Segundo Georghiou e Taylor (1986), são vários os fatores que podem influenciar na formação de uma população resistente: 1 - fatores genéticos (a dominância, frequência de alelos resistentes), 2 - fatores biológicos (por exemplo, o número de gerações por ano), e 3 – fatores operacionais (tempo de uso do inseticida, persistência, modo de aplicação). Reconhecer e manipular alguns destes fatores que podem ajudar a retardar a resistência deve ser parte integrante de qualquer programa de controle de vetores de doenças.

Estudos das últimas décadas demonstram que os mecanismos responsáveis pela expressão do fenótipo da resistência na população de insetos podem ser classificados em quatro tipos principais: mutações pontuais em genes de sítio-alvo de inseticidas (resistência por alteração de sítio-alvo); a superexpressão ou mutações nas regiões codificadoras de enzimas de detoxificação (resistência metabólica); superexpressão ou mutações em genes envolvidos na formação de cutícula (resistência cuticular) e alterações no comportamento (resistência comportamental (Montella, Schama, & Valle, 2012; Ranson et al., 2011). Estes mecanismos que conferem proteção ao inseto podem coexistir na população e ocasionar falhas importantes no seu controle (Hemingway et al., 2004; Seixas et al., 2017).

Os mosquitos e outros insetos possuem naturalmente um sistema de enzimas responsável por diversas funções: digestão, crescimento, desenvolvimento, reprodução, biossíntese e degradação de compostos como feromônio, hormônios, eliminação de substância tóxicas internas e externas (xenobióticos), detoxificação de compostos endógenos, entre outras, que asseguram sua sobrevivência (Liu et al., 2015; Montella et al., 2012). Na resistência metabólica, as enzimas EST's, MFO's e GST's estão em maior quantidade ou maior atividade para realizar a detoxificação/sequestro de moléculas de inseticidas (Panini et al., 2016). A avaliação da atividade destas enzimas em populações do campo é um importante requisito para o monitoramento da resistência e deve ser realizada junto aos ensaios de suscetibilidade aos inseticidas (Montella et al., 2012)

1.10.1. Resistência metabólica

As enzimas no inseto resistente se encontram em maiores quantidades ou com maior atividade devido ao aumento da transcrição ou da amplificação de genes. A intensificação da atividade das enzimas permite o inseto metabolizar o agente tóxico mais rapidamente transformando-o em um composto menos tóxico e/ou em uma forma adequada para rápida excreção (Panini et al., 2016). O processo de detoxificação pode ser dividido em duas etapas: Fase I (funcionalização), na qual as MFO's e EST's promovem a hidrolização e oxidação do inseticida, formando um substrato para próxima fase; na Fase II (conjugação), a GST conjuga composto que tornarão mais solúveis o inseticida para posterior excreção (Panini et al., 2016; Reddy et al., 2012).

As EST's são enzimas muito importantes no metabolismo de compostos endógenos e exógenos. Vários inseticidas como OF's, CA's e PI's apresentam nas suas estruturas químicas ligações ésteres (Figura 9) que são o alvo da hidrólise pelas EST's (carboxiesterase). As EST's

também podem sequestrar o inseticida OF's, reduzindo a quantidade de inseticida ativo que atingiria o local alvo (Poupardin et al., 2014).

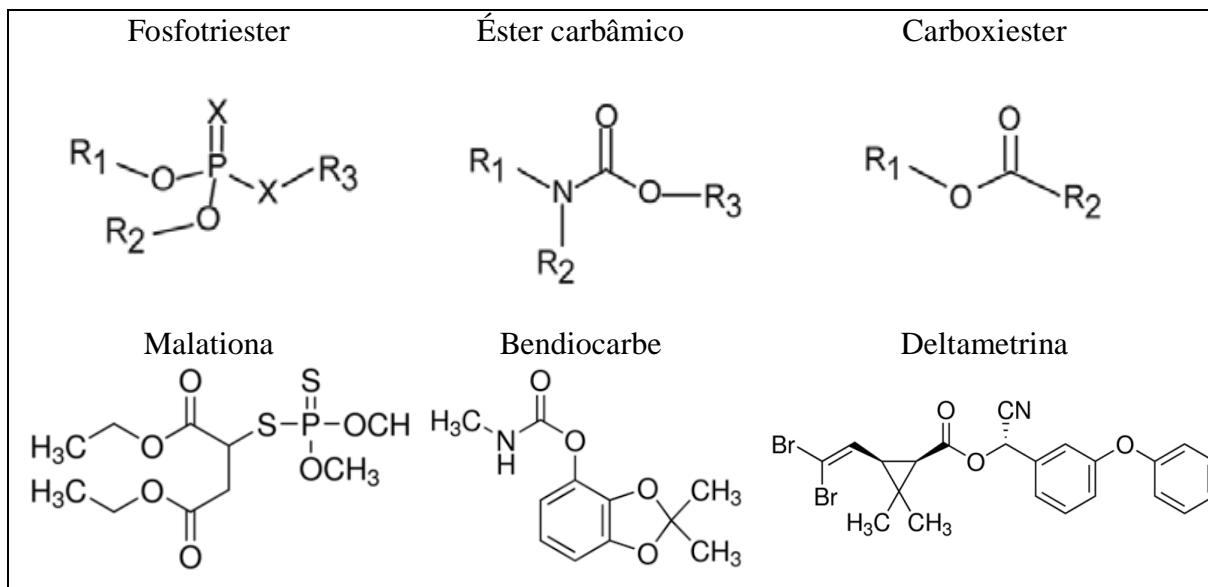


Figura 9. Ligações ésteres (fosfotriester, éster carbâmico e carboxiester) nos inseticidas utilizados no controle do *Ae. aegypti*.

As MFO's, também conhecidas como monoxigenases ou enzima citocromo P450, entre outras denominações, desempenham diversas funções biológicas, tais como, regulação de títulos de diversos compostos endógenos, biossíntese e degradação feromônios, 20-hidroxiecdisona e hormônio juvenil, ácido graxo, etc (Liu et al., 2015). A superexpressão destas enzimas está relacionada a resistência dos insetos a vários inseticidas: PI, OF, OC, CA, IGR (Panini et al., 2016; Smith, Kasai, & Scott, 2016). Em um artigo de revisão, Smith et al. (2016) identificou que a associação das MFO's com a resistência aos PI's em *Ae. aegypti* é bastante documentada em várias regiões do mundo.

As enzimas GST's estão envolvidas transporte intracelular, biossíntese de hormônios e proteção contra o estresse oxidativo. Elas catalisam a conjugação da glutationa com substratos, tornando-os mais solúveis para a excreção subsequente. Agem sobre substratos formados pelas MFO's ou diretamente em compostos exógenos como os inseticidas. A elevada atividade de GST, resultante da amplificação do gene ou mais comumente por meio do aumento da taxa de transcrição, tem sido implicada na resistência a várias classes de inseticidas (Hemingway et al., 2004; Pavlidi, Vontas, & Leeuwen, 2018). As GST's catalizam reações de desidrocloração, transformando DDT em um substrato menos tóxico. Também são importantes

no metabolismo de piretróide, protegendo o inseto, inclusive, por meio de sequestro do inseticida (Enayati, Ranson, & Hemingway, 2005; Hemingway et al., 2004).

1.10.2. Resistência por alteração do sítio-alvo

Os inseticidas neurotóxicos (OC, PI, OF e CA) têm como alvo primário moléculas receptoras no sistema nervoso central dos insetos, são elas: as proteínas dos canais de sódio, a acetilcolinesterase e o ácido gama-aminobutírico (GABA)(Nauen, 2007).

Os PI's e OC (DDT), ligam-se às proteínas dos canais de sódio das células nervosas. Em insetos resistentes, as mutações no sítio de ligação causam a resistência, tornando-os insensíveis aos inseticidas. Esta resistência é referida como resistência *knock-down* (*kdr*), em referência à habilidade dos insetos com estes alelos de resistirem prolongada exposição sem ser derrubados (Ranson et al., 2011).

Nos insetos PI-resistentes, as mutações com trocas de aminoácidos em genes específicos, que codificam os sítios-alvo nos canais de sódio, provocam alterações, impedindo a ligação do inseticida. Já foram identificadas diversas mutações *kdr* para *Ae. aegypti* (G923V, L982W, S989P, S989G, S989C, V1016G, V1016P, V1016I, I1011V, I1011M, T1520I, F1534C, D1763Y) e para *Ae. albopictus* (F1534C, F1534I, F1534S e I1532T) em várias regiões do mundo (Moyes et al., 2017). Os insetos resistentes com canais de sódio alterados também são insensíveis, por resistência cruzada, aos inseticida DDT e seus análogos (Davies et al., 2007)

Dois genes (*ace-1* e *ace-2*) codificam a enzima acetilcolinesterase em mosquitos, o alvo dos inseticidas OP e CA. Mutações que alteram o sítio-alvo na enzima ainda não foram detectadas para *Ae. aegypti*. No entanto, nos mosquitos *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens* e *Culex tritaeniorhynchus* mutações no gene *ace-1* tem sido relacionada à resistência aos OF's.

O receptor do neurotransmissor GABA nos canais de cloro é alvo dos inseticidas ciclodienos (OC) como, por exemplo, o dieldrin. A ligação do inseticida inibe a ação do neurotransmissor, impedindo a entrada de íons cloreto no neurônio. As mutações no gene *Rdl* (resistência à dieldrin) A302S foi descrita para inicialmente *Ae. aegypti* (Hemingway et al., 2004).

1.10.3. Resistência cuticular

Alguns estudos observaram o aumento da expressão de genes que codificam proteínas da cutícula em linhagens resistentes de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Anopheles stephensi* e *Culex pipiens pallens*, *Culex quinquefasciatus*, entre outros mosquitos (Ishak et al., 2016; Vontas et al., 2007). As alterações no espessamento da cutícula do inseto e/ou revestimentos do trato digestivo contribuem para retardar a absorção ou penetração de inseticidas (Ranson et al., 2011).

1.10.4. Resistência comportamental

A resistência comportamental pode ser definida como a alteração da resposta comportamental que permite o inseto evitar o contato com inseticidas (Ranson et al., 2011).

A literatura atual sugere que alterações comportamentais e de espécies podem estar surgindo, mas os dados são esparsos e, às vezes, pouco convincentes. Parte da razão para a falta de informação sobre resistência comportamental é que é mais difícil investigá-la usando ensaios de exposição relativamente simples (Gatton et al., 2013).

Apesar disso, novos estudos continuam a surgir. Por exemplo, Stone et al. (2016) avaliaram, por meio de modelo matemático, o efeito das variáveis ambientais (disponibilidade de alimento e uso de redes de cama) sobre a alteração da periodicidade de busca do *Anopheles sp.* pelo hospedeiro para repasto, do período noturno para o crepúsculo ou amanhecer. Os autores observaram que estes fatores ambientais podem interferir na taxa em que a resistência comportamental emerge.

1.10.5. Resistência cruzada e multiresistência

A resistência cruzada ocorre quando um mecanismo de resistência permite que insetos resistentes a um inseticida, também apresentem resistência a outro. O mesmo pode ocorrer entre inseticidas de diferentes classes químicas (Ranson et al., 2011). Tem sido documentada a resistência para *Ae. aegypti* cruzada entre PI e OP (Rodríguez et al., 2002) entre PI e OC (DDT) (Bregues et al., 2003).

Por outro lado, na resistência múltipla, diferentes mecanismos podem se combinar para conferir resistência a diversas classes de inseticida (Ranson et al., 2011). Por exemplo, em estudo recente, Seixas et al. (2017) identificaram resistência aos PI, OP e CA em população de *Ae. aegypti* em Portugal. Os autores observaram a participação de vários mecanismos de

resistência: mutações nos canais de sódio (F1534C e V1016I), superexpressão de enzimas (P450, carboxilesterase e GST) e espessamento da cutícula.

1.10.6. Resistência em populações de mosquitos *Aedes*

A resistência em populações de mosquitos *Aedes* tem sido bastante estudada no mundo, o que revela a importância das falhas no controle do vetor e sinaliza a grande preocupação da comunidade científica com o problema.

Em uma revisão da literatura, Moyes et al. (2017) demonstraram o panorama da distribuição geográfica da resistência dos mosquitos no mundo para as quatro classes de inseticidas sintéticos (OC, OF, PI e CA). Os autores verificaram que tem sido detectada a resistência a todas as classes de inseticidas sintéticos utilizadas no controle do mosquito em vários países das Américas, África e Ásia. Entre os principais mecanismos envolvidos estão a superexpressão de enzimas e alterações de sítios-alvo, ambos com registro de diversas mutações.

No Brasil, em várias estados das cinco Regiões, diversos estudos verificaram resistência aos OF's (Diniz et al., 2015; Bellinato et al., 2016; Braga et al., 2004; Carvalho et al., 2004; Chediak et al., 2016; Garcia et al., 2018; Lima et al., 2003; Montella et al., 2007) e aos PI's (Bellinato et al., 2016; Brito et al., 2013; Chediak et al., 2016; Da-Cunha et al., 2005; Garcia et al., 2018; Macoris et al., 2005; Macoris et al., 1995; Macoris et al., 2018; Martins et al., 2009; Montella et al., 2007).

Ensaio de dose-diagnóstica, dose-resposta, bioquímicos e moleculares com larvas e adultos do mosquito *Ae. aegypti* foram realizados. Os autores observaram que populações brasileiras de mosquito apresentam suscetibilidade alterada com o aumento da atividade das EST's, GST's e MFO's relacionadas à resistência aos PI, além da ocorrência dos alelos mutantes V1016I, F1534C e I1011M. Também foi verificado que as EST's estiveram associadas à detoxificação de OF's, entretanto não foi observado o aumento acetilcolinesterase nas populações resistentes a temefós.

Bellinato et al. (2016) avaliaram a suscetibilidade de populações do vetor *Ae. aegypti* de doze municípios de cinco estados (Roraima, Pará, Rio Grande do Norte, Espírito Santo e Goiás) ao diflubenzuron (*IGR*) e observaram que todas as populações foram suscetíveis ao inibidor de síntese de quitina. Em estudo anterior, Silva & Mendes (2007) também encontraram suscetibilidade ao diflubenzuron em Uberlândia no Estado de Minas Gerais. Em outros países

como Cabo Verde (Rocha et al., 2015) e Arábia Saudita (Alsheikh et al., 2016) foram encontrados resultados semelhantes.

Poucos estudos avaliaram, no Brasil, a suscetibilidade a outro *IGR*, o piriproxifeno. No Distrito Federal, populações de campo testadas com a formulação comercial do piriproxifeno (Sumilarv[®] 0,5 G) e grau técnico (97%, Rogama Neogenv[®] Company) não observaram alteração de suscetibilidade em várias amostras (Carvalho, 2018; Monnerat et al., 2012). Andrighetti et al. (2008) analisaram o efeito do piriproxifeno em populações temefós-resistentes dos Estados da Bahia (Salvador e Barreiras) e de São Paulo (Bauru). As populações apresentaram suscetibilidade alterada a este análogo de hormônio juvenil corroborando com o estudo realizado por Marcombe et al. (2011) na Martinica e com Ochipinti et al. (2014) na Venezuela.

1.11. Controle de qualidade químico de inseticidas

No processo de fabricação de produtos, o controle de qualidade é uma etapa fundamental na cadeia produtiva de diferentes tipos de indústria. Na indústria farmacêutica, por exemplo, o controle de qualidade visa assegurar a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos produzidos, sendo realizado de acordo com os preceitos das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (Amorim, 2013; Rocha & Betoni, 2014). Com relação aos inseticidas, outras normas também são impostas como a Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976 e a Orientação de Serviço nº 49 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 1976, 2018). Entre as várias atividades que compõe o controle de qualidade, a análise química é uma importante etapa que garante a qualidade final do produto, desde o café que tomamos aos inseticidas usados na agricultura ou em Saúde Pública (Tavares & Ferreira, 2006; Valle, 2015).

Na análise química, o estudo quantitativo por Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq) é um dos métodos mais difundidos nas pesquisas acadêmica e industrial que permite determinar a quantidade relativa de grupos moleculares em misturas (Malz & Jancke, 2005). A RMNq é utilizada em diversas áreas, tais como, avaliação de drogas, vacinas, produtos naturais, alimentos, bebidas, entre outras, tornando-se também um importante método na análise de pureza (Holzgrabe, 2010).

Em Saúde Pública, os inseticidas utilizados no controle de endemias são armazenados, preparados para aplicação e distribuídos pelas unidades de saúde conhecidas como Centrais de UBV (Brasil, 2002a). Como as condições de armazenagem e preparo das soluções inseticidas

podem interferir diretamente na eficácia do controle dos vetores das arboviroses, é importante realização de análise química periódica dos insumos utilizados.

2. Justificativa

A tendência de crescimento da ocorrência de casos de dengue nos últimos 50 anos tem sido motivo de grande preocupação para os países em todo o mundo. Aliado a isto, a reemergência de arboviroses como a chikungunya e zika, provocando grandes epidemias, evidencia que as práticas adotadas para o controle dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* não tem alcançado êxito nos países endêmicos.

Atualmente não há medicamentos que permitam o controle destas viroses e apesar dos esforços da comunidade científica ainda não temos uma vacina em pleno uso. Assim, a principal estratégia de prevenção do controle destas doenças permanece centrada na redução da população dos vetores em níveis que impeçam a transmissão dos arbovírus.

O controle dos vetores tem se baseado fortemente no uso de inseticidas sintéticos, muitas vezes de maneira indiscriminada. A falta de novas moléculas que permitam ampliar o arsenal disponível para o combate ao vetor tem levado ao uso contínuo dos inseticidas por longos períodos. Tal prática tem favorecido a seleção de populações resistentes a diferentes grupos de inseticidas. Conhecer precocemente o *status* da resistência em uma população de mosquitos é fundamental para intervir na sua evolução e preservar as poucas classes de inseticidas disponíveis.

No Brasil, o monitoramento da resistência do mosquito *Aedes aegypti* foi realizado nos últimos 20 anos de forma sistemática. Seus resultados têm subsidiado a Coordenação Geral dos Programas Nacionais de Controle e Prevenção da Malária e das Doenças Transmitidas pelo *Aedes* – Ministério da Saúde (CGPNCMD/MS) nas decisões de manejo da resistência por substituição de inseticidas em sistema de revezamento. Como não é possível realizar o monitoramento em todos os municípios, em razão das dimensões continentais do nosso país, a CGPNCMD/MS adota a estratégia de seleção de cidades, conforme critério epidemiológico, para a realização de coleta de amostras de ovos das populações de mosquitos destinadas a realização de ensaios biológicos de resistência.

Esta metodologia apresenta limitações por não permitir acompanhar a dinâmica da alteração do perfil de suscetibilidade das populações no nível estadual, nem tão pouco no nível municipal. Brasília é um dos municípios selecionados para monitoramento, no entanto, desde 1999, quando começaram as avaliações da suscetibilidade, poucos dados estão disponíveis sobre o perfil de suscetibilidade da região.

Realização do monitoramento em nível municipal é primordial para a detecção precoce da resistência e, assim, viabilizar ações de manejo quando ainda há baixos níveis de perda da

suscetibilidade. Também é importante conhecer o nível da resistência das populações de mosquitos aos inseticidas que tiveram seu uso descontinuado a fim de avaliar a progressão da reversão da resistência pela ausência da pressão seletiva. Estes dados permitem avaliação da viabilidade do retorno da utilização do inseticida.

Esperamos que os resultados obtidos possam subsidiar decisões técnicas sobre o uso dos inseticidas no Distrito Federal e assegurar a maior eficácia do controle do vetor.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a susceptibilidade de 3 (três) populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* no Distrito Federal aos inseticidas utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) do Ministério da Saúde

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Avaliar o nível de susceptibilidade de população de campo de *Aedes aegypti* aos larvicidas temefós e piriproxifeno.
- 3.2.2. Avaliar o nível de susceptibilidade de população de campo de *Aedes aegypti* aos adulticidas malationa e deltametrina.
- 3.2.3. Realizar bioensaios em condições semi-campo com o Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxifeno) utilizado no Distrito Federal para o controle do *Aedes aegypti*.
- 3.2.4. Realizar o controle de qualidade químico dos inseticidas utilizados no Distrito Federal.

4. Metodologia

4.1. Populações de mosquito *Ae. aegypti*

A Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL), órgão da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), realiza o monitoramento e controle das populações de *Ae. aegypti*. Durante todos os meses do ano, a instalação de armadilhas para captura de mosquitos adultos é realizada, permitindo a avaliação da densidade populacional de mosquitos nas Regiões Administrativas (RA's) do DF.

As amostras das populações de mosquitos avaliadas nesse trabalho, foram obtidas de três RA's do DF (Figura 10) com uso de piriproxifeno e malationa nos últimos anos e histórico de epidemias em anos anteriores: Brazlândia, com população de 51.816 habitantes; Sobradinho, com 62.763 habitantes e Guará, com 133.171 habitantes (Brasília, 2015a, 2015b, 2015c). São regiões que sofreram surtos e epidemias e apresentaram alta incidência de dengue (valores acima de 300 casos da doença por 100.000 habitantes) entre os anos de 2013 e 2016. As taxas de incidência acumulada de Brazlândia variaram de 393,5 a 2.938,7 casos por 100.000 habitantes; para Sobradinho, a variação foi de 400,8 a 772,9 casos por 100.000 habitantes e para Guará, 311 a 399,5 casos por 100.000 habitantes. No DF, em sua totalidade, todos os anos do período foram considerados como epidêmicos, registrando a incidência de 322,4 a 600,1 casos por 100.000 habitantes. Em 2017 e 2018, apenas São Sebastião e a cidade Estrutural apresentaram taxas acumuladas que configuram alta incidência (Brasília, 2013, 2016b, 2017b, 2018; Filho, 2014).

Como a ocorrência de surtos e epidemias exige ações emergenciais de controle por meio de inseticidas para impedir a disseminação das arboviroses, as populações de mosquitos destas RA's sofreram maior pressão seletiva em razão da maior aplicação de inseticidas, quando comparadas com as áreas onde incidência de dengue e outras arboviroses foi menor. Presumivelmente, são áreas onde a ocorrência de mosquitos resistentes é mais frequente.

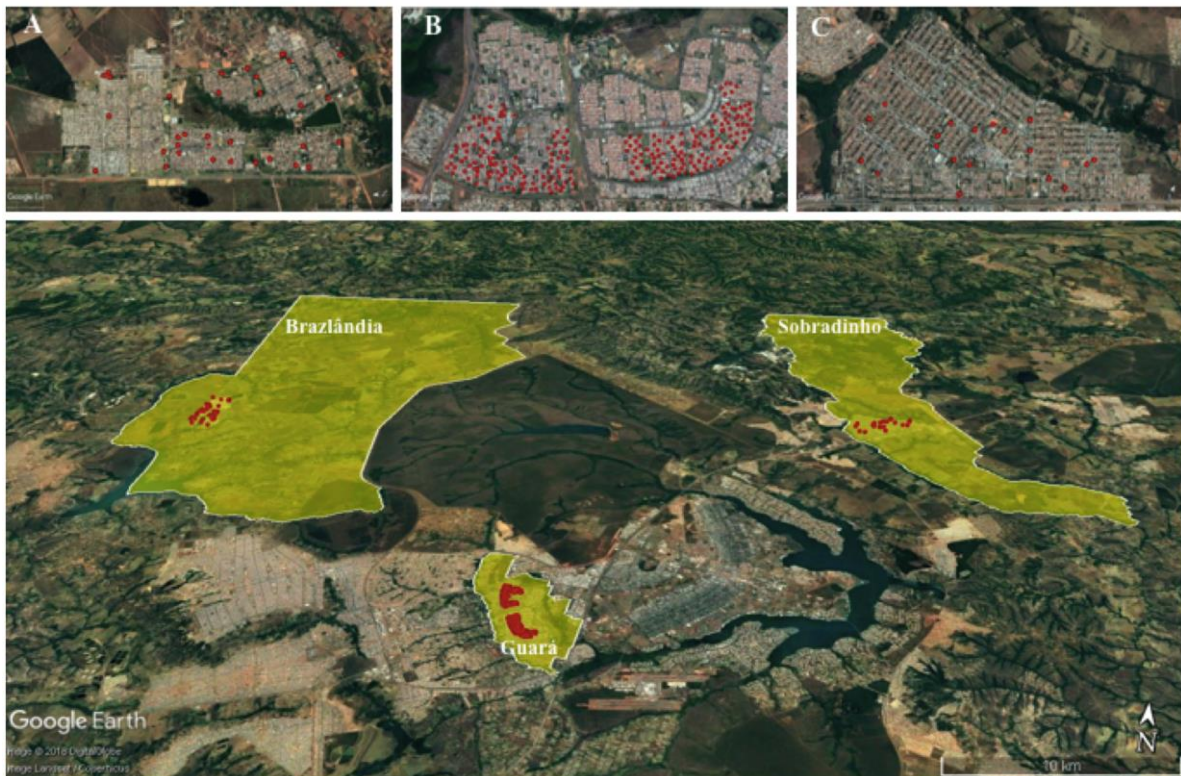


Figura 10. Locais de instalação de armadilhas para coleta de ovos de *Aedes aegypti* nas Regiões Administrativas (polígonos amarelos) de Brazlândia (A), Guará (B) e Sobradinho (C). Os pontos vermelhos representam as ovitrampas georreferenciadas.

Com o objetivo de formar colônias de mosquitos do campo para obtenção de larvas, foram realizadas as inclusões das armadilhas ovitrampas (OV) (Figura 11) na rotina de monitoramento do vetor pela DIVAL. Isto também permitiu a instituição reunir informações adicionais importantes que contribuiriam para avaliação da infestação considerando outro estágio do mosquito. As coletas ocorreram no período de novembro de 2017 a junho de 2018, durante a estação chuvosa e parte da estação seca.



Figura 11. Ovitampa instalada em um imóvel.

As OV's, armadilhas que simulam o ambiente ideal para oviposição das fêmeas do mosquito (Fay & Eliason, 1966), foram confeccionadas utilizando recipientes de plástico (500 mL) da cor preta e um anteparo de eucatex (palheta) nas dimensões de 12,5x2,8x0,4 cm onde as fêmeas pousam para a oviposição. Para intensificar a atração das fêmeas de *Ae. aegypti*, utilizou-se uma solução aquosa de levedo de cerveja a 0,04% (da Costa et al., 2018).

Em Brazlândia, a cidade foi dividida em 2 áreas e 40 imóveis foram monitorados. As OV's foram instaladas quinzenalmente. Em Sobradinho, 20 locais foram monitorados por semana. A distância entre as OV's foi sempre superior a 300 metros. As armadilhas foram instaladas em imóveis denominados especiais, isto é, os ambientes de relevância epidemiológica na transmissão das arboviroses. Estes locais se caracterizam pela aglomeração e circulação de grande quantidade de pessoas, tais como, escolas, unidades de saúde e outras repartições públicas (Brasil, 2002).

O procedimento de coleta dos ovos, no Guará, foi realizado em duas áreas, de 1 Km² no Guará I e II, que foram divididas em 4 subáreas cada. Em uma semana, 1 subárea do Guará I e outra do II receberam 32 OV's, totalizando 64 armadilhas/semana. As subáreas seguintes receberam, consecutivamente, as mesmas armadilhas da subárea anterior, de maneira que ao fim de um mês foram instaladas 256 armadilhas em sistema de revezamento. Nesta RA, apenas as residências receberam OV's. A distância entre as residências escolhidas variou entre 100 a 200 metros.

Em todos imóveis das três localidades, a instalação das OV's foi sempre precedida de explicações ao responsável pelo imóvel sobre a função e importância da armadilha, cuidados e periodicidade da visita. Realizou-se a instalação em locais sombreados, protegidos da chuva e

de animais domésticos. No momento da instalação, as palhetas foram devidamente identificadas e presas aos potes com clips. A maioria das OV's foram instaladas na área externa dos imóveis. Também foi realizado o georreferenciamento de cada OV com a coleta das coordenadas geográficas, utilizando um receptor *Global Positioning Systems* (GPS), (Garmin®, modelo Montana 650).

A diferença metodológica da instalação das OV's entre as cidades avaliadas é resultante dos planos amostrais adotados pela DIVAL. No entanto, algumas palhetas foram gentilmente cedidas pela coordenação de um projeto de pesquisa em execução no Guará.

As OV's ficaram expostas nos imóveis por 5 a 7 dias, quando foram substituídas por novas e encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica da DIVAL para contagem dos ovos. Cada substituição de palheta foi precedida por lavagem do recipiente (com água, escova e detergente) e renovação da solução atrativa. As palhetas recolhidas foram acondicionadas em grupos de sete unidades em potes específicos, na posição vertical, presas à borda com o uso de clips e transportadas para o laboratório (Figura 12).

As palhetas positivas permaneceram armazenadas à temperatura ambiente no insetário da DIVAL, não excedendo o prazo de 1 mês, até momento da eclosão dos ovos para a formação das colônias, geração F0.



Figura 12. Acondicionamento das palhetas recolhidas dos imóveis para transporte ao laboratório.

4.2. Formação das colônias

Para garantir uma melhor representatividade da população de mosquitos das localidades, optou-se por escolher de 5 a 10 palhetas positivas por semana para a etapa de eclosão das larvas.

Cerca 20 palhetas positivas, por RA, com quantidade de ovos conhecida foram colocadas em bandejas de polipropileno identificadas e previamente preparadas com antecedência de 24 h, contendo 3 litros de água declorada e com adição de solução de ração de gato (Purina[®], Lote L80328561A4), 10 mg/L para permitir a eclosão sincronizada das larvas (Figura 13) (WHO, 2005). As bandejas foram mantidas em câmara úmida a temperatura de 28 ± 5 °C, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas (WHO, 2005). Após 24 h, as palhetas foram retiradas das bandejas e inspecionadas em microscópio estereoscópico (Opton[®], modelo TIM2B) para avaliação do percentual de eclosão e obtenção da quantidade aproximada de larvas. A quantidade de ração necessária para a alimentação foi calculada conforme a quantidade diária por larva sugerida por Carvalho et al. (2014) na Tabela 2. As larvas foram alimentadas até a formação de pupas com ração de gato triturada adicionada às bandejas.

Após a etapa de eclosão, submeteu-se as palhetas ao processo de lavagem (com escova, água e sabão) para reutilização. A limpeza das palhetas foi precedida da colocação das mesmas no freezer por 24 h para a eliminação de ovos não eclodidos. Este procedimento de segurança também foi adotado com o papel filtro utilizado para a coleta de ovos, bandeja e outros materiais.

Tabela 2. Quantidade de ração utilizada para a alimentação diária por larva de *Aedes aegypti* em miligramas (mg).

Dia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ração por larva (mg)	0,06	0,08	0,16	0,31	0,64	0,32	0,32	0,32	0,16	0,08	0,06

Fonte: Carvalho et al. (2014).



Figura 13. Palhetas preparadas para eclosão dos ovos coletados do campo.

As pupas foram retiradas diariamente das bandejas, transferidas para recipiente contendo água de clorada e colocadas em gaiola 30x30x30 cm (Figura 14) devidamente nomeadas como: Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR). Nas gaiolas, as pupas se desenvolveram até a forma alada, formando a colônia, denominada F0.



Figura 14. Gaiolas entomológicas para criação de colônias.

Como a OV não é uma armadilha específica para *Ae aegypti*, podendo coletar também ovos de *Ae. albopictus*, todos os mosquitos da geração F0 foram identificados um a um, quanto à espécie e sexo.

Os mosquitos adultos foram capturados, utilizando aspirador automático e mantidos em um frasco de acrílico (Figura 15). Em seguida, com uso de um capturador tipo Castro

(Figura 15), foram aspirados, de 3 em 3 indivíduos, para a identificação taxonômica em microscópio estereoscópico (Opton[®], modelo TIM2B), de acordo com a chave dicotômica de identificação de espécies de *Aedes* que ocorrem no Brasil (Consoli & Oliveira, 1994). As espécies identificadas foram colocadas em gaiolas separadas mantendo machos e fêmeas juntos. Os mosquitos da espécie *Ae. albopictus* foram congelados e, posteriormente, descartados.



Figura 15. Materiais de captura dos mosquitos adultos: capturador elétrico, frasco de acrílico e capturador tipo Castro.

Ae. aegypti adultos foram alimentados com solução açucarada a 10% *ad libitum*. A alimentação sanguínea artificial com sangue equino, cedido pelo Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, foi realizada duas vezes por semana por 6 a 8 horas. Foram utilizadas placas de alumínio (10x10 cm) envolvidas por filme de parafina plástica (Parafilm[®]) (Figura 16. A-B). As placas, com 5 mL de sangue, foram dispostas nas gaiolas e, recipientes com 150 mL de água quente foram colocadas (Figura 16. C) sobre elas. A cada hora, a água foi reaquecida, com o objetivo de manter o sangue com a temperatura ideal para o repasto sanguíneo (38-42°C) (Maïga et al., 2017; Carvalho et al., 2014).

Para oviposição foram colocados recipientes com 100 mL de água declorada e papel filtro (Figura 17.A), devidamente identificado, revestindo a parede interna. Os papéis (Figura 17.B) com os ovos (geração F1) foram retirados após 3 dias e mantidos no insetário para secagem e armazenados até a utilização nos ensaios. Novos recipientes foram colocados no interior das gaiolas para nova oviposição. Em alguns casos também foi necessário desenvolver

colônias F1 para obtenção de maior quantidade de ovos (geração F2) destinados a realização dos ensaios.

A cepa susceptível aos inseticidas empregados nos ensaios foi a Rockefeller denominada “RCK” (Kuno, 2010) e foi obtida e mantida no insetário da DIVAL desde 1997 (Carvalho et al., 2004b).

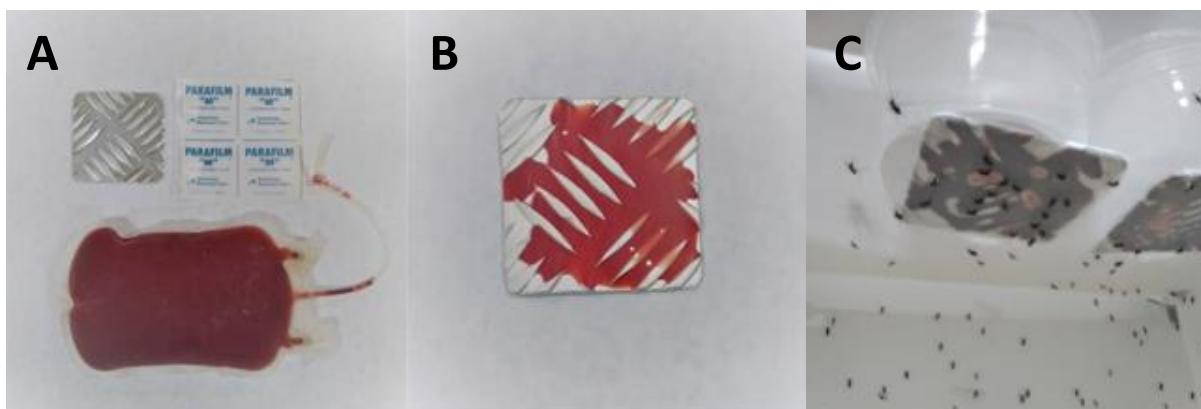


Figura 16. A - Materiais para preparação da placa de alimentação: placa de alimentação, filme de parafina plástica e bolsa com sangue equino. B - Placa de alimentação preparada. Vista interna da gaiola com fêmeas se alimentando. C - Pote com água quente para aquecimento da placa de alimentação.

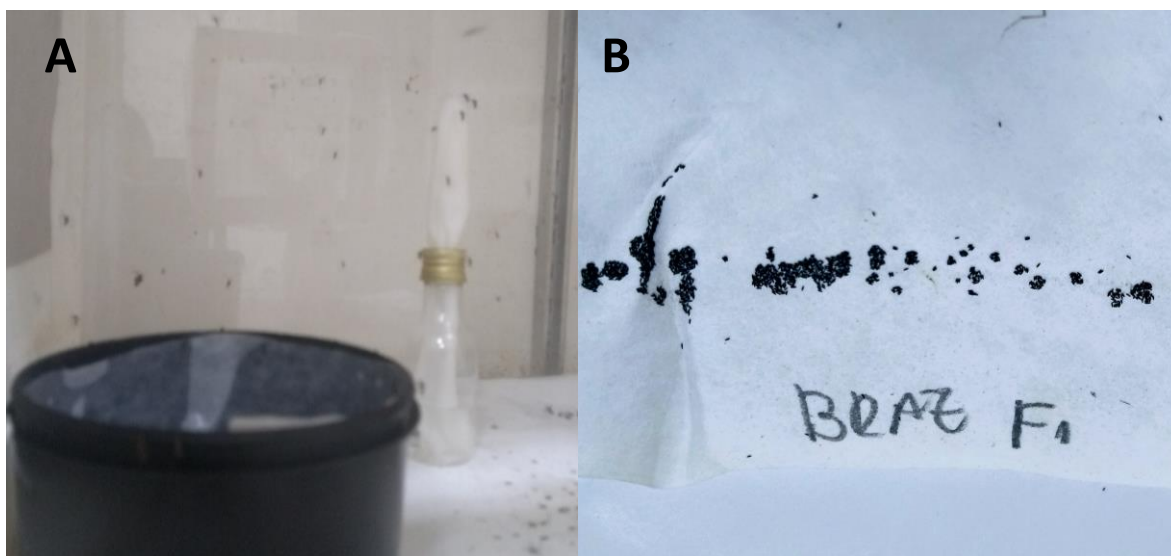


Figura 17. A - Recipiente para oviposição com papel filtro. B - Papel filtro seco com ovos de *Aedes aegypti*.

4.3. Soluções inseticidas

4.3.1. Temefós (Grau Técnico)

Foi preparada a solução estoque a 1 mg/mL (1000 ppm) de temefós (Sigma[®], lote BCBV2878) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO Sigma[®]). Em seguida, a solução foi dividida em alíquotas de 100 µL em criotubos para armazenamento na geladeira.

A solução do inseticida foi preparada no momento do teste para a população RCK na concentração de 0,01 mg/L (10 ppm). A partir desta, foi retirado o volume necessário para atingir concentração final seriada: 0,0005 ppm; 0,001 ppm; 0,002 ppm; 0,004 ppm; 0,006 ppm; 0,008 ppm; 0,012 ppm; 0,016 ppm e 0,032 ppm. Nas populações do campo foram utilizadas as concentrações de 0,01 ppm; 0,025 ppm; 0,035 ppm; 0,05 ppm; 0,07 ppm; 0,09 ppm; 0,1 ppm; 0,11 ppm e 0,12 ppm.

4.3.2. Piriproxifeno

4.3.2.1. Grau Técnico

Foi preparada a solução estoque a 1 mg/mL (1000 ppm) de piriproxifeno (Sigma[®], lote BCBT3748) diluído em DMSO. A solução foi preparada imediatamente antes do uso na concentração de 0,001 mg/mL (1 ppm). Em seguida, foi pipetado a quantidade necessária para atingir as concentrações finais dos testes com a cepa RCK e linhagens do campo: 0,01 ppb; 0,05 ppb; 0,2 ppb; 0,5 ppb; 1 ppb; 2 ppb; 8 ppb; 10 ppb e 30 ppb.

4.3.2.2. Formulação comercial (Sumilarv[®] 0,5 G)

As soluções para os testes foram preparadas com o inseticida piriproxifeno Sumilarv[®] 0,5 G (Sumitomo Chemical; lote 6602F4; validade: junho/2021), cedido pela DIVAL. Esse inseticida é fornecido periodicamente pelo MS aos estados e municípios. Foi utilizada a dose sugerida pelo fabricante, 0,01 ppm de ingrediente ativo (Sumitomo Chemical, 2012).

4.3.3. Deltametrina e Matationa (Grau Técnico)

Os ensaios com adultos foram realizados em garrafas de vidro borossilicato de 250 mL (Scott) com a superfície interna recoberta com inseticida. Foram preparadas soluções estoque dos inseticidas deltametrina (Sigma[®], lote BCBS3148V) e malationa (Sigma[®], lote BCBS8709V) ambos diluídos em acetona a 10 mg/mL. As soluções foram preparadas antes da

impregnação das garrafas nas concentrações de 8 e 10 µg/mL de deltametrina e 45 e 50 µg/mL de malationa).

4.4. Determinação da Concentração Letal (CL₅₀ e CL₉₉)

4.4.1. Atividade Larvicida

Os testes com larvicidas foram realizados utilizando o protocolo estabelecido pela OMS para detectar a presença da resistência na população de larvas de mosquito. Inicialmente, os ensaios foram feitos para a determinação da linha de base, utilizando a linhagem susceptível, pois não sofreram exposição prévias aos inseticidas (WHO, 1981). A população susceptível utilizada foi a RCK (Kuno, 2010).

Com o objetivo de alcançar uma maior taxa de eclosão das larvas e melhor uniformidade do estágio de desenvolvimento, utilizamos o método descrito por Maíga et al., (2017). Foram adicionados 550 mL de água previamente fervida em uma garrafa de vidro borosilicato. Após a redução da temperatura da água a 28 °C foi adicionado 0,03 g de fermento biológico seco (Fleishmann[®], lote 03/04) e o papel filtro contendo cerca de 1500 ovos colhidos nas colônias (Fn) das linhagens estudadas (F1 ou F2). Os ovos permaneceram submersos por 2 horas. As larvas do estágio L1 foram transferidas para bandejas até atingirem o estágio L3.

Em cada ensaio, 720 larvas L3 foram expostas aos inseticidas (Figura 18 e Figura 19). Os três experimentos independentes, utilizando lotes diferentes de larvas, foram realizados em quadruplicata. Em copos descartáveis com capacidade de 300 mL, foram colocados 200 mL de água declorada e o volume da solução inseticida de uso necessário para atingir a concentração desejada. Em seguida foi realizada a homogenização da solução com bastão de vidro. Vinte larvas de L3 foram separadas em copos descartáveis com capacidade de 50 mL, contendo 20 mL de água declorada (Figura 19. A) e depois transferidas para cada copo contendo a solução do inseticida (Figura 19. B). O volume final foi de 220 mL. O controle negativo usado foi o DMSO.

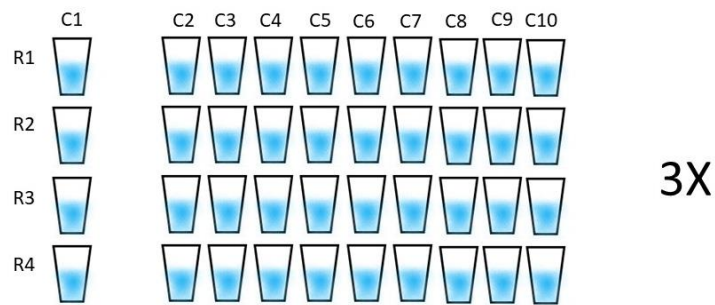


Figura 18. Esquema de realização dos ensaios com larvicidas para estimativa das concentrações letais. R1 a R4: replicatas; C1 (controle) e C2 a C10 (concentração seriada do inseticida).

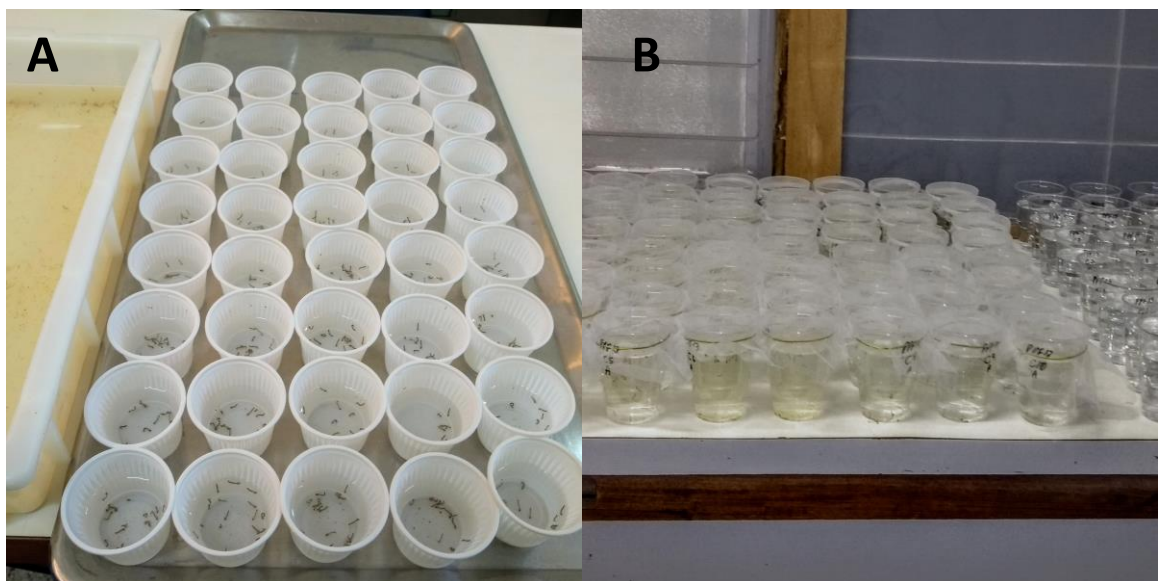


Figura 19. A - Copos com larvas previamente contadas; B – Copos com preparação finalizada

A leitura do temefós foi realizada após 24 horas de exposição. Já para o piriproxifeno, procedeu-se com a leitura a cada 2 ou 3 dias até que as larvas e pupas dos controles morressem ou se tornassem adultos (WHO, 2016b). Nos testes com piriproxifeno, as larvas de cada copo foram alimentadas em dias alternados com 0,5 mL de solução de ração de gato a 10% (Andrighetti, 2008).

Na leitura da mortalidade do temefós, a quantidade de larvas moribundas foi considerada. Larvas moribundas são aquelas incapazes de subir a superfície ou que não mostram reação de fuga quando a água é perturbada. As larvas mortas são as que não se movem ao serem induzidas com toques no sifão ou na região cervical (WHO, 2005).

A ocorrência de mais de 10% de pupas no experimento, inviabiliza o teste. Na mortalidade do controle entre 5 e 20%, o percentual de mortalidade nos grupos tratados foi corrigido utilizando a fórmula de Abbott, abaixo, onde X é porcentagem de sobreviventes no controle e Y é a porcentagem de sobreviventes tratados (WHO, 2005; WHO, 2016).

$$Mortalidade(\%) = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

Nos testes com piriproxifeno, foi avaliado o percentual de inibição da emergência de mosquitos (% IE). Todas as larvas e pupas moribundas e mortas, além de adultos que se mantiveram presos à exúvia da pupa foram considerados na leitura. O cálculo do % IE foi feito pela fórmula abaixo, onde T é a porcentagem de sobreviventes ou adultos no grupo tratado e C é a porcentagem de sobreviventes ou adultos no grupo controle (WHO, 2016b):

$$\%IE = 100 - \left(\frac{T - 100}{C} \right)$$

Se a emergência de adultos no grupo controle apresentasse valor menor do que 90%, o experimento era descartado e repetido. Quando a porcentagem apresentou valor entre 91% e 99% os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott descrita anteriormente.

Os dados da mortalidade e inibição da emergência obtidos nos ensaios foram analisados com o programa Graphpad Prism. Obteve-se estimativas da concentração letal (CL) e a concentração de inibição da emergência (CIE) necessária para obter 50% (CL₅₀ e IE₅₀) e 99% (CL₉₉ e IE₉₉) de mortalidade e inibição da emergência. A razão de resistência (RR), medida quantitativa para avaliar o status da resistência de uma população, foi calculada a partir da razão entre os valores das CL's e IE's obtidas para as populações de Brazlândia (BRZ), Sobradinho (SBR) e Guará (GRA) pelos respectivos valores obtidos para a linhagem RCK, conforme a fórmula a abaixo:

$$RR = \frac{CL_{50\text{teste ou CIE50 campo}}}{CL_{50\text{ RCK ou CIE50 RCK}}$$

Os valores de RR foram avaliados a partir dos critérios estabelecidos pela OMS (WHO, 2016): quando RR é menor que 5, a população é considerada susceptível; valores entre 5 e 10 classificam a população de resistência moderada e valores acima de 10, resistência alta.

4.4.2. Larvicida - Efeito residual do Sumilarv® 0,5 G (piriproxifeno)

Para investigar a efetividade e persistência do larvicida Sumilarv® 0,5 G (piriproxifeno), grupos de 25 larvas L3 foram colocadas em baldes de capacidade de 15 L,

contendo 10 L de água de clorada, totalizando 125 larvas (Figura 20). Após 2 horas de aclimatação, foram acrescentados 20 mg do inseticida como único tratamento. A concentração final do princípio ativo foi de 0,01 ppm, que é a recomendada pelo fabricante. As larvas foram alimentadas conforme procedimentos utilizados para o teste com piriproxifeno descrito anteriormente. O teste foi realizado em quintuplicada e o controle negativo foi apenas água.



Figura 20. Bioensaio de efetividade e persistência. Os baldes estão protegidos com tela e abrigados do sol e chuva.

Cada balde recebeu um "aparato" para acondicionar as pupas e os adultos que emergirem (Figura 21). Todos os baldes foram cobertos com uma malha para impedir a fuga de adultos ou a oviposição por mosquitos do ambiente.

Novos grupos de larvas foram adicionados, posteriormente, com a periodicidade de 8, 16, 30, 45 e 65 desde a realização do único tratamento com o larvicida. Os baldes permaneceram abrigados da chuva e do sol. Não houve renovação de água ou reposição da água perdida por evaporação. A mortalidade de larvas e pupas foi registrada e a IE% calculada conforme descrito no item 3.4.1.



Figura 21. Aparato para confinamento de pupas e adultos.

4.4.3. Adulticidas

Os testes adulticidas seguiram a metodologia descrita pelo CDC (CDC, 2010). Esse ensaio permitiu obter a dose diagnóstica (DD) e o tempo diagnóstico (TD) para cada inseticida. A dose diagnóstica é a concentração necessária por garrafa para matar 100% dos mosquitos e o tempo diagnóstico é o intervalo de tempo que o inseticida produz seu efeito (CDC, 2010). Foram feitos três ensaios independentes, em dias diferentes.

Para a obtenção da DD e do TD, para as nossas condições locais, foram realizados os testes para a calibração, utilizando a linhagem susceptível RCK. Foram utilizadas de 10 a 25 fêmeas de *Ae. aegypti* por garrafa, com idade de 3 a 7 dias pós-emergência. Elas foram alimentadas exclusivamente com solução de açúcar a 10% até o dia anterior ao teste.

Nos ensaios com deltametrina, 4 garrafas receberam 1mL de solução a 8 $\mu\text{g/mL}$, cada uma. Para impregnar cuidadosamente toda a sua superfície interna, inclusive da tampa, foram realizados movimentos mantendo as garrafas em diferentes inclinações, conforme técnica recomendada pelo CDC (Figura 22). Uma garrafa foi usada como controle negativo, tendo a sua superfície interna revestida apenas com 1 mL de acetona. A acetona foi evaporada em temperatura ambiente e somente após a secagem de todas as garrafas foram colocados os mosquitos em cada uma delas, utilizando um capturador tipo Castro (CDC, 2010). O mesmo procedimento foi repetido com as garrafas utilizadas para o ensaio na dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ de deltametrina e no ensaio com o inseticida malationa nas doses de 45 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

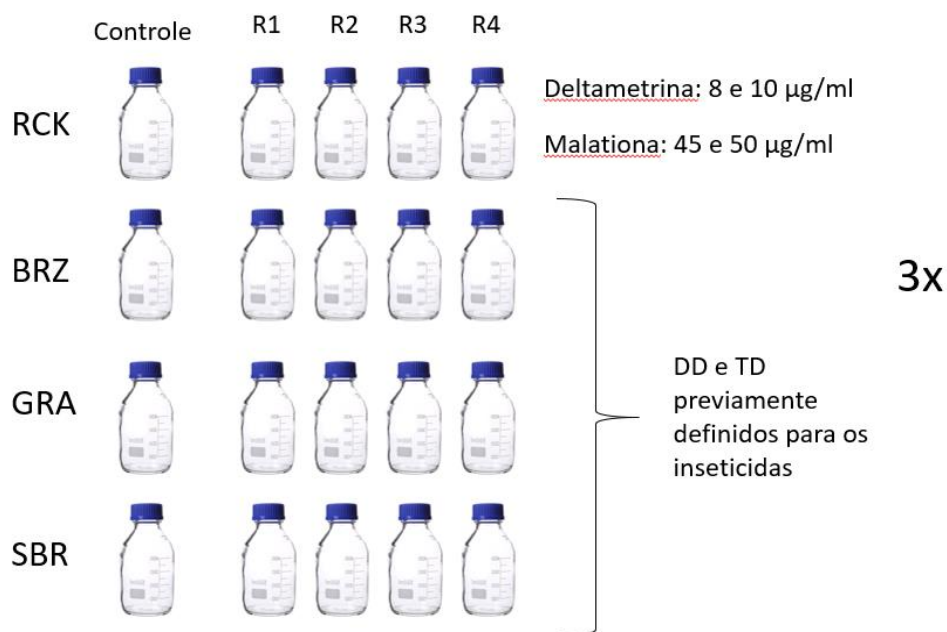


Figura 22. Esquema do ensaio com mosquitos adultos. Em cada teste foi utilizado uma garrafa controle e quatro com inseticidas (R1 a R4).

As garrafas impregnadas com inseticida (Figura 23) foram utilizadas em mais de um teste, com lote de mosquitos diferentes, em um período máximo de 24 horas. Após este tempo, todas as garrafas foram cuidadosamente lavadas com solução do detergente Extran® (Merck) a 20% e água quente. Depois de secas, as garrafas foram reutilizadas em novos testes.

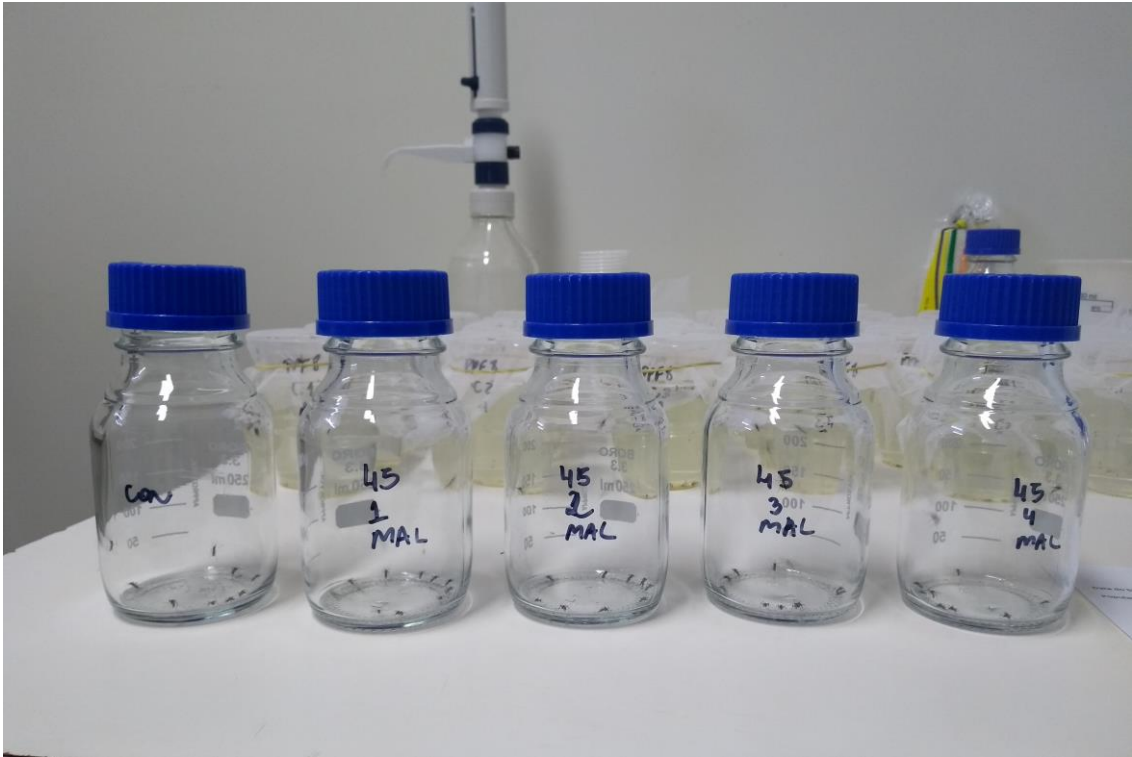


Figura 23. Garrafa controle e replicatas impregnadas com inseticida.

O registro da mortalidade dos mosquitos nas garrafas ocorreu no tempo “zero” (T_0 = quando todas as garrafas já estavam com mosquitos) e com intervalos de 15 minutos até completar 120 minutos. Foram considerados mosquitos “mortos” aqueles que permaneceram imóveis, incapazes de voar ou que não se sustentavam em pé. Os mosquitos com movimentos erráticos, batimento vigoroso das asas, mas sem capacidade de voo não foram considerados como mortos (Brogdon & McAllister, 1998; Da-Cunha et al., 2005).

No final do experimento com a deltametrina, todos os mosquitos foram transferidos para uma gaiola livre de inseticida e com algodão embebido em solução de açúcar (Figura 24). A mortalidade foi avaliada após 24 h. Os mosquitos que aparentemente estavam mortos até 120 minutos foram considerados como “efeito *knock-down*”. Para a malationa, os experimentos foram finalizados após o tempo de 120 minutos de exposição ao inseticida.

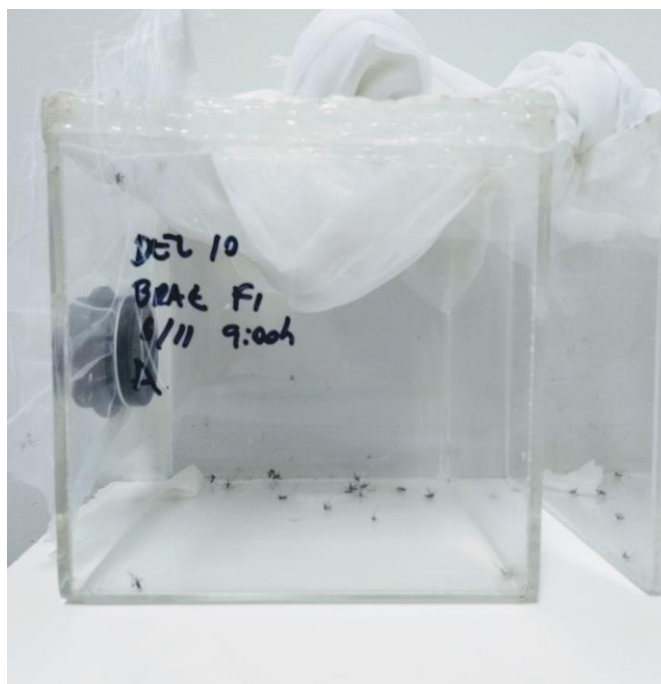


Figura 24. Gaiola livre de inseticida para a leitura de 24 horas após os ensaios com deltametrina.

A dose diagnóstica de cada inseticida foi escolhida como sendo a menor dose que provocou a morte de 100% dos mosquitos no menor tempo de leitura. O teste foi repetido quando a mortalidade dos mosquitos no controle era maior que 10%. Quando a mortalidade alcançou entre 3 e 10%, os resultados foram corrigidos com a fórmula de Abbott (Ocampo, 2011; Brogdon & McAllister, 1998).

Utilizamos os critérios adotados pelo CDC (2010) e consideramos suscetíveis as populações com mortalidade entre 98-100%, abaixo de 80%, são considerados resistentes. Os resultados entre 80-97%, são sugestivos de apresentar resistência e devem ser monitorados com novos testes para confirmação (CDC, 2010).

4.5. Análise dos inseticidas utilizados no PNCD e no DF

Foram analisados produtos inseticidas convencionais baseados nos seguintes ingredientes ativos: Ficom[®] VC, Bayer, validade março/2018 (bendiocarbe); Vectron[®] 10 SC, Rogama, validade fevereiro/2018 (etofenproxi); Komvektor[®] 440 EW, Bayer, validade junho/2019 (malationa) e Sumilarv[®] 0,5 G, Sumitomo Chemical, validade junho/2021 (piriproxifeno). As análises foram realizadas utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq de ¹H) seguindo um método de padrão interno (Malz & Jancke, 2005). O objetivo desta análise foi de verificar se os produtos utilizados

apresentavam teores de princípio ativo compatíveis com os valores declarados pelos fabricantes.

4.5.1. Materiais e reagentes

O material de referência certificado utilizado como padrão interno foi o ácido maleico (AM, 99,99% \pm 0,01%) TraceCERT® da Sigma-Aldrich. Todas as soluções foram preparadas com acetona deuterada 99,9% da Sigma-Aldrich contendo aproximadamente 0,01% de tetrametilsilano (TMS).

4.5.2. Obtenção e preparo das amostras

As amostras foram fornecidas pela Central de UBV/DIVAL. Apenas no caso do Sumilarv® 0,5 G, foi fornecido pela DIVAL uma embalagem lacrada com 100 g de inseticida para análise. As demais amostras foram retiradas a partir de frascos de inseticidas em uso pelos agentes de vigilância na Unidade de Controle Químico. Como o inseticida Komvektor® 440 EW (malationa) é fornecido pelo MS em tambores de 200 L (Figura 25), não foi possível homogeneizar a emulsão antes da coleta da amostra para as análises química. A não homogeneização deste inseticida é um procedimento usual, devido a impossibilidade de manuseio dos tambores pelos agentes de vigilância.

As amostras de produtos sólidos (bendiocarbe e piriproxifeno) foram finamente trituradas e homogeneizadas em almofariz e pistilo. Foram pesados em um eppendorf aproximadamente 20 mg (\pm 0,1 mg) de amostra e 12 mg (\pm 0,1 mg) de ácido maleico e adicionados aproximadamente 0,75 mL de acetona deuterada. As amostras de produtos na forma de suspensão (etofenproxi e malationa) foram agitadas vigorosamente para garantir a homogeneidade da suspensão. Em seguida foram pesados em um eppendorf aproximadamente 30 mg (\pm 0,1 mg) de amostra e 12 mg (\pm 0,1 mg) de ácido maleico e adicionados aproximadamente 0,75 ml de acetona deuterada. Todas as amostras foram agitadas em vórtex por aproximadamente 1 minuto para extração do ingrediente ativo e, em seguida, centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos para separação dos dispersantes. Aproximadamente 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos Norell Standard Series™ 600 MHz de 5 mm e analisados por RMN. Todas as análises foram feitas em triplicata.



Figura 25. Tambor com o inseticida Komvektor® 440 EW (malationa) em uso na Unidade de Controle /DIVAL.

4.5.3. Obtenção e processamento dos espectros de RMN

Os espectros de RMN de Hidrogênio foram obtidos com um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III HD 600 MHz, equipado com sonda do tipo Broadband Observe (BBFO) 5 mm, na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília. Foram realizados os procedimentos usuais de lock, shimming e sintonia das amostras. Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros (Tabela 3) foram escolhidos de modo a garantir a obtenção de um espectro quantitativo e uma relação sinal-ruído adequada para os sinais utilizados na quantificação.

Tabela 3. Principais parâmetros de aquisição utilizados na obtenção dos espectros de RMN.

Parâmetro	Símbolos (Bruker)	Valor
Nº de pontos no domínio de tempo	TD	64k
Largura da janela espectral	SW	20 ppm
Centro da janela espectral	O1	6 ppm
Tempo de espera entre cada transiente	D1	15 s
<i>Dummy scans</i>	DS	8
Número de transientes	NS	16
Ganho do detector	RG	32
Modo de digitalização	DIGMOD	baseopt
<i>Pre-scan delay</i>	DE	10 us
Correção do filtro	FILCOR	1,5 us
Tempo total de experimento	expt	~7 min

Os espectros foram processados com o *software* TopSpin 3.2. Foi aplicada a transformada de Fourier e ajustou-se automaticamente os parâmetros de fase e a linha de base. Pequenos ajustes manuais na fase e na linha de base foram feitos quando necessários. Os espectros foram referenciados em relação ao sinal do TMS (0 ppm) e os intervalos de integração foram definidos manualmente.

4.5.4. Cálculo da pureza

Conforme descrito por Malz (2005), a pureza de um analito em solução pode ser determinada por RMN utilizando-se de um padrão interno, através da seguinte expressão:

$$P_x = \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m} P_{std}$$

Onde os índices x e std referem-se, respectivamente, a amostra e ao padrão, I é a área integrada dos sinais, N é o número de prótons relacionados a um determinado sinal, M a massa molar da substância, m a massa gravimétrica e P refere-se a pureza.

4.6. Análise estatística

As estimativas de concentrações letais, de inibição de emergência, diagnósticas e razões de resistência foram determinadas a partir da equação logística não linear. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 7.0.

5. Resultados

5.1. Identificação das espécies de *Aedes* coletadas

Na identificação dos mosquitos das colônias do campo (geração F0) foi verificada a ocorrência de duas espécies. As colônias SBR e BRZ apresentaram, respectivamente, 0,02% e 1,8% de adultos identificados como da espécie *Ae. albopictus*. Enquanto, todos os mosquitos da colônia GRA foram identificados como *Ae. aegypti*.

5.2. Ensaio em larvas de *Ae. aegypti*

5.2.1. Estudo da atividade do temefós em larvas

Nos ensaios com o temefós, inseticida organofosforado, não foi observado mortalidade de 100% das larvas na concentração diagnóstica de 0,012 ppm (WHO, 1992), que é a concentração utilizada internacionalmente para avaliar o status de resistência das populações de campo (WHO, 1992). A concentração diagnóstica é “o dobro da CL₉₉ da população suscetível”. Nos nossos testes, a concentração que corresponderia a concentração diagnóstica foi estimada em 0,047 ppm em RCK (Rockefeller), linhagem usada como padrão de suscetibilidade.

Enquanto a concentração de 0,016 ppm de temefós foi suficiente para causar mortalidade superior a 90% na linhagem controle RCK, foram necessárias concentrações maiores que 0,09 ppm para causar a mesma mortalidade nas larvas do campo BRZ, GRA e SBR (Figura 26).

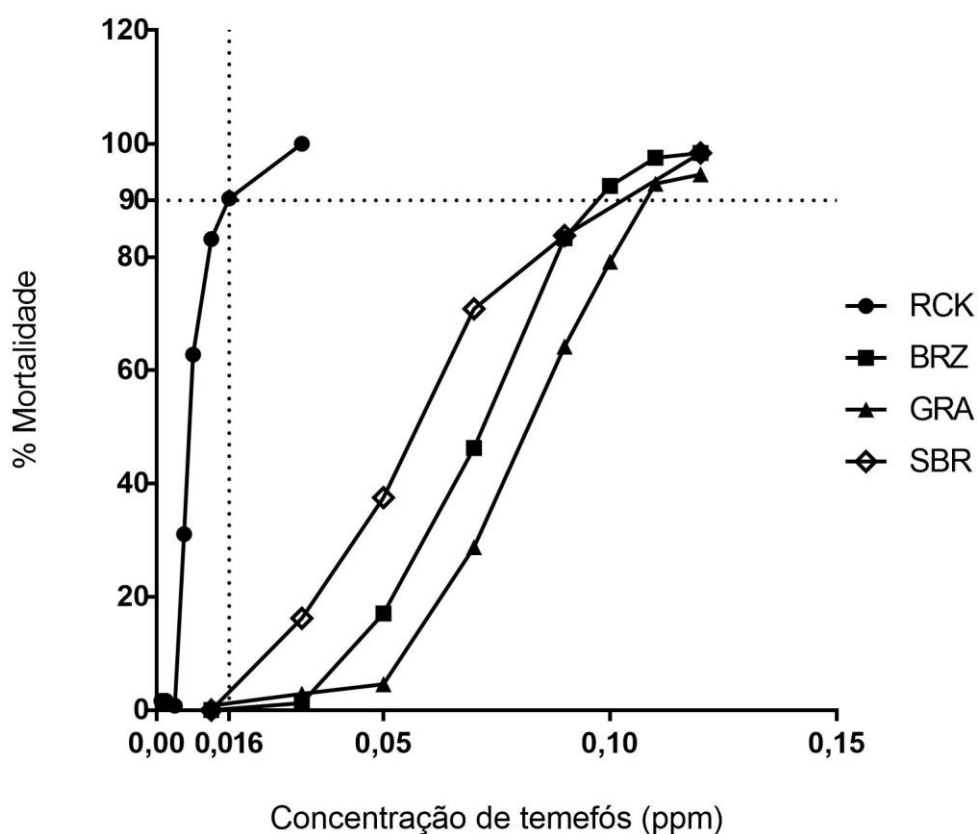


Figura 26. Mortalidade percentual das larvas L3 da espécie *Aedes aegypti* tratadas com temefós para a linhagem suscetível Rockefeller (RCK) e para as populações de Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR).

Na Tabela 4, encontram-se as concentrações letais (CL_{50} e CL_{99}) para o temefós e a razão de resistência (RR_{50}) para cada linhagem do campo. A concentração letal para 99% das larvas L3 foram: GRA $CL_{99} = 0,125$ ppm, BRZ $CL_{99} = 0,098$ ppm e SBR $CL_{99} = 0,087$ ppm. A CL_{99} encontrada para a linhagem suscetível RCK foi de 0,013 ppm.

A RR_{50} expressa a relação entre a CL_{50} das linhagens do campo em relação a linhagem controle e seu valor expressa o grau de resistência da população estudada ao inseticida testado. Segundo critérios estabelecidos pela OMS (2016), quando a RR é menor que 5, a população do campo é considerada suscetível; valores entre 5 e 10 classificam a população como de resistência moderada e valores acima de 10, resistência alta. Neste trabalho, os resultados revelam que as três populações do campo avaliadas, SBR, BRZ e GRA, apresentam resistência moderada a alta para o temefós.

A linhagem GRA demonstrou maior razão de resistência com RR_{50} de 12,0. Esse valor foi inferior para BRZ – RR_{50} de 10,3 e SBR – RR_{50} de 8,6. Na Figura 26, as curvas de

mortalidade das populações do campo estão deslocadas para direita em relação a Rockefeller, demonstrando que existe resposta diferente ao organofosforado temefós.

Tabela 4. Concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₉) e razão de resistência (RR₅₀) estimadas para as larvas de populações de *Aedes aegypti* Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR). As estimativas foram feitas a partir da mortalidade percentual das larvas tratadas com temefós.

População	Geração	n*	CL ₅₀ (IC**) ppm***	CL ₉₉ (IC) ppm	RR ₅₀	Classificação da população
RCK	F _n	2400	0,007 (0,006 a 0,007)	0,013 (0,011 a 0,017)	1	-
BRZ	F1	2400	0,072 (0,069 a 0,078)	0,098 (0,076 a 0,146)	10,3	Resistência alta
GRA	F1	2400	0,084 (0,080 a 0,090)	0,125 (0,106 a 0,155)	12,0	Resistência alta
SBR	F2	1920	0,060 (0,054 a 0,070)	0,087 (0,076 a 0,099)	8,6	Resistência moderada

*Quantidade de larvas expostas; **Intervalo de confiança; ***Partes por milhão

5.2.2. Estudo da atividade do piriproxifeno em larvas

5.2.2.1. Ensaio de dose-resposta

O piriproxifeno, análogo de hormônio juvenil, em uma concentração de 10 ppb em larvas L3 de *Ae. aegypti* causou os seguintes percentuais de inibição da emergência (%IE) de adultos, das linhagens do campo e da suscetível: SBR %IE = 88; BRZ %IE = 99,2; GRA %IE = 100 e RCK %IE = 100. A concentração de 10 ppb é recomendada pelo Ministério da Saúde para o tratamento de criadouros de *Ae. aegypti* domésticos e da água para consumo humano (Brasil, 2014b). Foi também determinada a taxa de mortalidade de formas imaturas tratadas com piriproxifeno. Os resultados mostram alta mortalidade de pupas, com valores variando entre 81,8 e 93,4%, enquanto nas larvas a mortalidade variou de 0,5 a 2,8%.

As curvas de inibição da emergência percentual (%IE) das larvas L3 tratadas com piriproxifeno, obtidas para as populações de *Ae. aegypti* avaliadas neste trabalho, estão apresentadas na Figura 27.

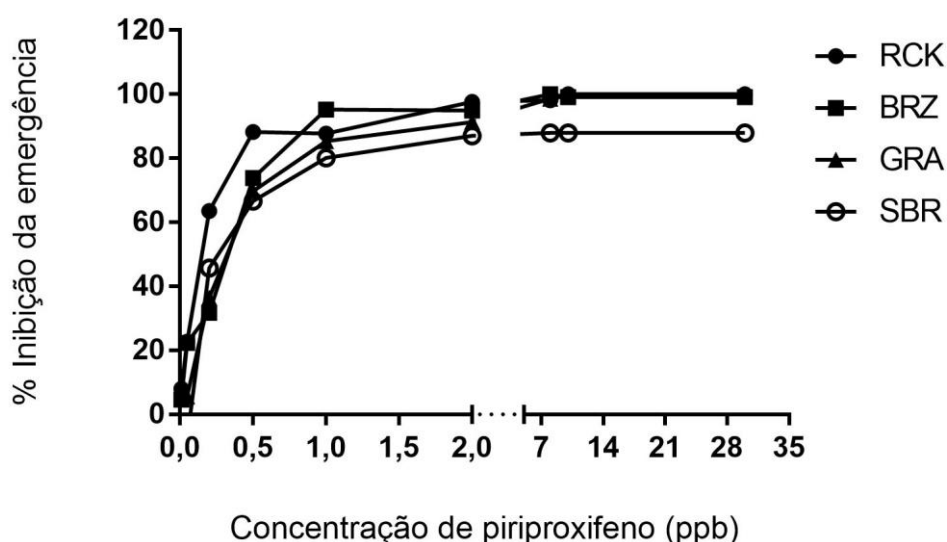


Figura 27. Curva de inibição da emergência percentual de adultos – %IE de larvas L3 tratadas com piriproxifeno, para a linhagem suscetível Rockefeller (RCK) e populações de Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR).

A curva dose-resposta permitiu determinar a inibição de 50% da emergência de adultos – IE₅₀ estimadas para as populações Rockefeller (0,14 ppb), Sobradinho (0,20 ppb), Brazlândia (0,26 ppb) e Guará (0,31ppb). A concentração diagnóstica para o piriproxifeno foi de 7,8 ppb (Tabela 5).

Tabela 5. Concentrações de inibição da emergência de adultos (CIE₅₀ e CIE₉₉) e razão de resistência (RR₅₀) estimada para as populações de mosquitos *Aedes aegypti* Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR). As estimativas foram feitas a partir da inibição da emergência percentual das larvas tratadas com piriproxifeno.

População	Geração	n*	CIE ₅₀ (IC**) ppb***	CIE ₉₉ (IC) ppb	RR ₅₀	Classificação da população****
RCK	Fn	2359	0,14 (0,10 a 0,20)	3,8 (1,30 a 14,60)	1	Suscetível
BRZ	F1	2391	0,26 (0,20 a 0,33)	7,40 (1,40 a 70,12)	1,85	Suscetível
GRA	F1	2387	0,31 (0,25 a 0,40)	6,41 (2,33 a 22,84)	2,21	Suscetível
SBR	F2	2413	0,20 (0,02 a 0,37)	6,72 (#)	1,42	Suscetível

*Quantidade de larvas expostas **Intervalo de confiança; *** Partes por bilhão; #Não estimado

Os resultados dos ensaios com piriproxifeno (Tabela 5) demonstraram que todas as populações avaliadas apresentaram valores baixos de razão de resistência: BRZ $RR_{50} = 1,85$, GRA $RR_{50} = 2,21$ e SBR $RR_{50} = 1,42$. Estes resultados mostram que existe *susceptibilidade* destas populações ao piriproxifeno.

Interessante observar que o piriproxifeno, mesmo sendo um larvicida eficaz, apresentou crescentes valores de razão de resistência, para as diferentes linhagens do campo: $RR_{GRA} (2,21) > RR_{BRZ} (1,85) > RR_{SBR} (1,42)$. A mesma sequência foi observada nas larvas tratadas com temefós - $RR_{GRA} (12,0) > RR_{BRZ} (10,3) > RR_{SBR} (8,6)$, que não é eficaz. Ou seja, independente da eficácia, a linhagem com maior RR_{50} para temefós, GRA, também teve a maior RR_{50} para piriproxifeno, fato observado também nas outras linhagens.

5.2.2.2. Ensaio semi-campo

Os ensaios nas condições de semi-campo permitiram avaliar o efeito residual do Sumilarv® 0,5 G (piriproxifeno). Os resultados estão apresentados na Figura 28. Até o quarto grupo de larvas adicionados aos balde, após 30 dias desde o tratamento, o inseticida foi eficaz, promovendo a inibição da emergência de 100% dos mosquitos. No entanto, a partir do quinto e sexto lotes, houve declínio da inibição para 85,5 e 45,5%, respectivamente.

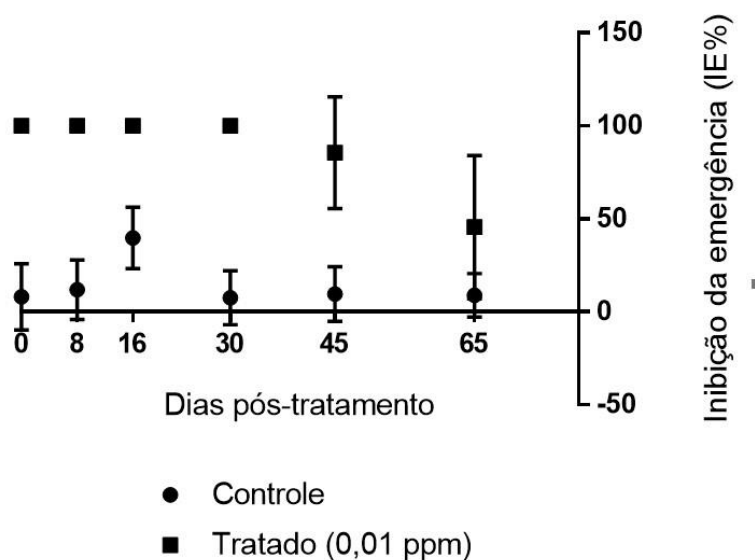


Figura 28. Inibição da emergência percentual (%IE) de larvas de *Aedes aegypti* da linhagem suscetível (RCK) em ensaio semi-campo.

5.3. Ensaio em adultos do mosquito *Ae. aegypti*

Foram realizados testes aduicidas em mosquitos fêmeas, a fim de analisar o efeito do inseticida organofosforado malationa e do inseticida piretroide deltametrina em linhagens de campo de Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) e com a linhagem controle Rockefeller (RCK).

Inicialmente, ensaios com 45 e 50 µg de malationa, e 8 e 10 µg de deltametrina foram realizados com a linhagem RCK para determinar a dose diagnóstica (DD) e o tempo diagnóstico (TD). Na Figura 29, estão apresentados os resultados. A DD de malationa que provocou a mortalidade de 100% dos mosquitos em menor tempo (TD) foi de 50 µg em 45 minutos. Enquanto, para deltametrina, a DD foi de 10 µg em 15 minutos (TD). Esses valores de dose diagnóstica e tempo diagnóstico foram usados para avaliar a suscetibilidade das populações de campo.

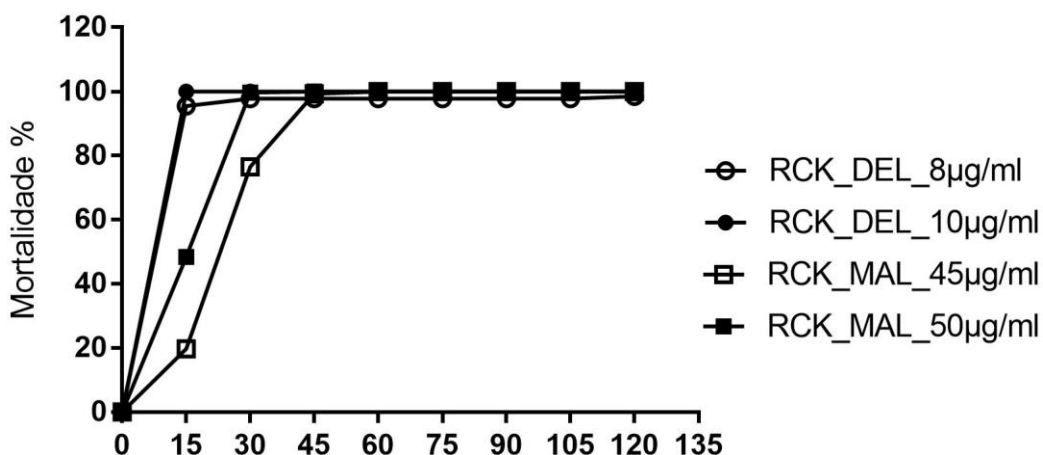


Figura 29. Mortalidade percentual de fêmeas de *Aedes aegypti* da linhagem suscetível Rockefeller (RCK) submetidas a malationa (45 e 50 µg) e a deltametrina (8 e 10 µg).

5.3.1. Estudo da atividade de malationa em mosquito

Nos resultados com malationa, inseticida organofosforado, observamos que os mosquitos da linhagem do Guará (GRA) apresentaram resistência. Importante lembrar, que nossos testes demonstraram resistência das larvas GRA ao temefós, inseticida da mesma classe química. Ou seja, em GRA, a alteração da suscetibilidade foi observada tanto no estágio larval quanto no adulto. As linhagens BRZ e SBR foram classificadas como suscetibilidade alterada, o que pode indicar resistência em desenvolvimento (Tabela 6).

No tempo diagnóstico de malationa (TD = 45 minutos), os insetos adultos de GRA, BRZ e SBR apresentaram mortalidade de 60,8, 80,3 e 87,2%, respectivamente, quando expostas à 50 µg do inseticida no teste em garrafa (Tabela 6). Esses valores confirmam a resistência dos mosquitos de GRA ao inseticida malationa. Por outro lado, SBR apresentou maior suscetibilidade, o que foi também observado no teste com temefós em larvas: menor RR₅₀ para temefós e maior mortalidade no tempo diagnóstico. A mortalidade de 100% da população RCK foi obtida após 45 minutos do início do teste adulticida (Figura 30).

Tabela 6. Ensaios com fêmeas adultas de populações de *Aedes aegypti* Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) expostas à 50 µg* de malationa por garrafa.

População	Ger.	Nº de ensaios	n*	Mortalidade %				Status de suscetibilidade
				30 min.	45 min.**	75 min.	120 min.	
RCK	Fn	3	208	99.6 ± 0.6	100.0 ± 0	100.0 ± 0	100.0 ± 0	Suscetível
BRZ	F1	3	141	55.1 ± 31.1	80.3 ± 2.9	98.5 ± 2.6	#	Suscetibilidade alterada
GRA	F1	3	130	40.1 ± 10.3	60.8 ± 13.5	98.5 ± 2.6	100.0 ± 0	Resistente
SBR	F1	2	94	70.4 ± 10	87.2 ± 0.3	95.6 ± 4.3	#	Suscetibilidade alterada

Legenda: Ger. (geração); *Quantidade de fêmeas adultas expostas; **Tempo diagnóstico; # Mortalidade de 100% de BRZ e SBR em 90 minutos de exposição.

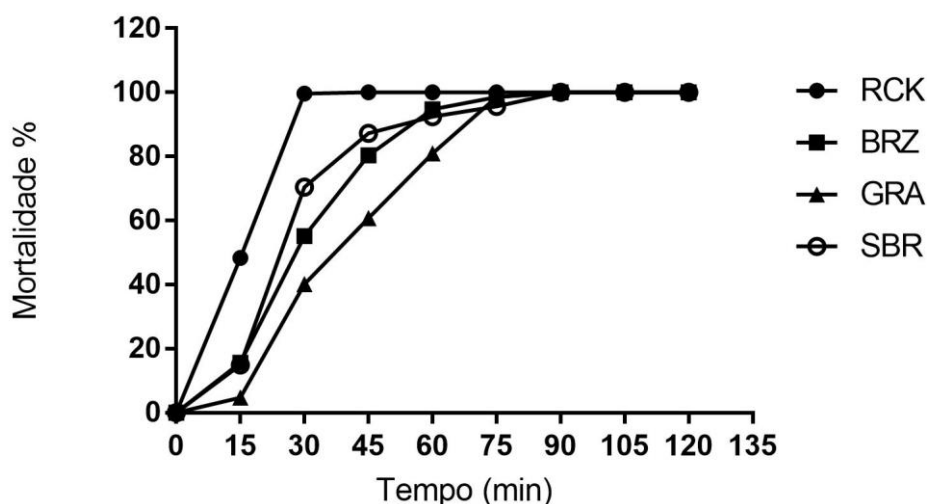


Figura 30. Mortalidade de adultos de *Aedes aegypti* de populações suscetível Rockefeller (RCK), e do campo Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) expostos a 50 µg de malationa por garrafa.

5.3.2. Estudo da atividade de deltametrina em mosquito

Os resultados dos testes adulticidas com a deltametrina, inseticida piretroide, estão apresentados na

Tabela 7. Um total de 10 µg de deltametrina foram utilizados para impregnar cada garrafa. Na linhagem RCK, após 15 minutos, houve a queda de 100% dos mosquitos (Figura 31), queda conhecida como efeito nocaute. Os mosquitos “nocauteados” foram transferidos para a gaiola de observação, livre de inseticida, e apresentaram 100% de mortalidade na última observação, após 24 horas. Nas linhagens do campo, além dos mosquitos nocauteados, os que permaneceram não nocauteados também foram transferidos para a gaiola de observação.

As linhagens do campo no tempo de 15 minutos exibiram efeito nocaute de 53,9, 55,4 e 54,3% para BRZ, GRA e SBR, respectivamente. Após 24 horas em gaiolas de observação, os mosquitos apresentaram suscetibilidade à deltametrina com mortalidade de 98,7% para SBR e 100% para GRA. A população de BRZ apresentou mortalidade de 91,7%, indicando uma pequena alteração na suscetibilidade dos mosquitos (Tabela 7).

Tabela 7. Ensaios com fêmeas adultas de populações de mosquitos *Aedes aegypti* Rockefeller (RCK), Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) expostas à 10 µg* de deltametrina por garrafa

Pop.	Geração	Nº de ensaios	n*	Efeito nocaute (%)			Mortalidade (%)	Status de suscetibilidade
				15 min**	30 min	120 min	24h	
RCK	Fn	2	160	100,0 ± 0	100,0 ± 0	100,0 ± 0	100,0 ± 0	Suscetível
BRZ	F1	3	175	53,9 ± 24,9	66,7 ± 21,8	88,7 ± 10,1	91,7 ± 7,2	Suscetibilidade alterada
GRA	F1/F2	2	93	55,4 ± 7,6	66,9 ± 3,1	90,7 ± 13,1	100,0 ± 0	Suscetível
SBR	F1/F2	3	193	54,3 ± 27,8	73,1 ± 14,0	90,8 ± 2,1	98,7 ± 2,3	Suscetível

Legenda: Pop. (população); * Quantidade de fêmeas adultas expostas; ** tempo diagnóstico.

Na Figura 31, os mosquitos das populações do campo expostos a dose diagnóstica (DD) apresentaram curvas de mortalidade semelhantes entre si, mas divergentes da obtida para a linhagem RCK.

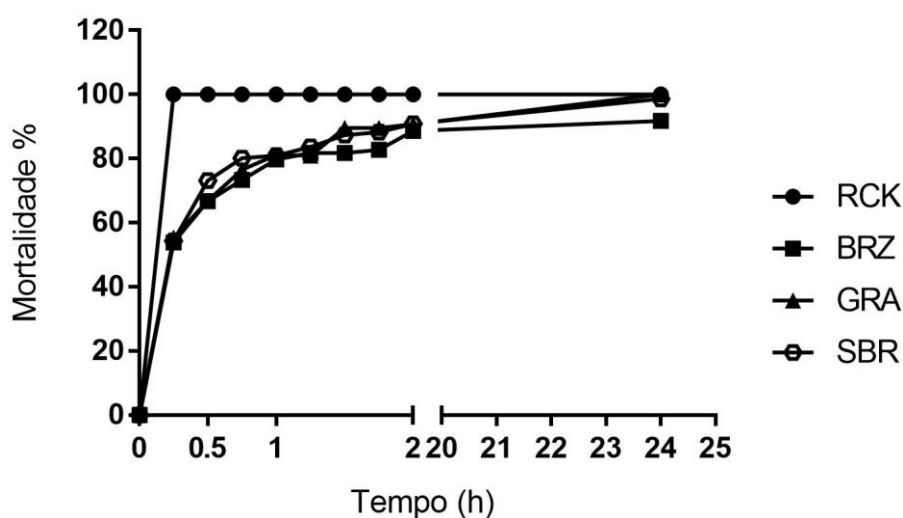


Figura 31. Mortalidade de adultos de mosquitos *Aedes aegypti* das populações do campo Brazlândia (BRZ), Guará (GRA) e Sobradinho (SBR) e controle Rockefeller (RCK), expostos a 10 µg por garrafa com deltametrina.

5.4. Controle de qualidade químico por Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq)

Os valores dos teores determinados, os respectivos valores de desvio-padrão e o intervalo de confiança construído para as amostras de produtos analisadas são apresentados na Tabela 8.

Os resultados mostram que os produtos Ficam[®] VC (bendiocarbe) e Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxi-feno) apresentaram teor determinado compatível com o declarado pelo fabricante. No entanto, os produtos Komvektor[®] 440 EW (malationa) e Vectron[®] 10 SC (etofenproxi) apresentaram valores divergentes do declarado, respectivamente, 31,5% acima e 12,0% abaixo.

Tabela 8. Teor de ingrediente ativo declarado e teor determinado por Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq) para os inseticidas utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue e no Distrito Federal.

Nome do produto	Princípio ativo	Teor declarado % (m/m)*	Teor determinado % (m/m)	IC % (95% de confiança)
Ficam [®] VC	Bendiocarbe	80,0	80,1,5±2,7	77,5 - 82,2
Vectron [®] 10 SC	Etofenproxi	10,0	8,8±0,5	8,3 - 9,3
Komvektor [®] 440 EW	Malationa	40,9	53,8±0,8	52,8 - 54,7
Sumilarv [®] 0,5 G	Piriproxi-feno	0,5	0,5±0,02	0,48 - 0,52

* m/m: massa/massa.

6. Discussão

A aplicação de inseticidas no ambiente, principalmente em criadouros, é uma das principais estratégias utilizadas pelos serviços de vigilância entomológica no controle do mosquito *Aedes aegypti* (Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013). O uso contínuo e intenso dos inseticidas favorece a seleção de populações de *Aedes aegypti* resistentes. A realização periódica do monitoramento da resistência é uma importante ação de vigilância, que permite avaliar a dinâmica da resistência e fornecer elementos para o seu manejo. A finalidade é detectar precocemente e impedir o progresso da alteração da suscetibilidade a um inseticida, a propagação de populações de vetores e, conseqüentemente, dos agentes causadores de doenças por eles transmitidos.

No Brasil o uso de organofosforados (OF), como o temefós, iniciou na década de 1960 (Franco, 1976), porém os primeiros estudos de detecção de resistência ocorreram somente a partir de 1995 (Macoris, 1995). A ausência desses dados por muitos anos (década de 1960 até 1995) não permitiu uma avaliação técnica que sugerisse a substituição destes inseticidas por outros, com mecanismos de ação diferentes, ou a adoção de outras estratégias para o controle. Vários estudos realizados detectaram elevados níveis de resistência ao larvicida temefós (OF) em populações de vetores coletados em diferentes municípios brasileiros (Bellinato et al., 2016; Chediak et al., 2016; Lima et al., 2006; Braga et al., 2004a; Lima et al., 2003; Macoris et al., 1999), acarretando grande prejuízo no controle do vetor *Ae. aegypti*.

A concentração de 0,012 ppm, recomendada pela OMS para bioensaios qualitativos para temefós e utilizada por Carvalho et al. (2004) em estudo anterior no DF, não foi adequada para identificar populações resistentes em nosso estudo, já que a mortalidade da linhagem suscetível foi inferior a 100% nesta concentração. Macoris et al. (2005) discutiram a importância da padronização dos bioensaios e da estimativa da concentração diagnóstica nas condições locais. Segundo os autores, estes procedimentos, permitiriam uma maior distinção dentre as diferentes linhagens testadas e impediriam sub ou superestimar a resistência. De fato, a concentração diagnóstica de 0,012 ppm foi considerada muito sensível para os bioensaios qualitativos em nossas condições experimentais e corroboram com Macoris et al. (2005) acerca da necessidade de se estabelecer a concentração diagnóstica local. A concentração diagnóstica estimada no nosso estudo foi de 0,047 ppm, o equivalente a 2 vezes a CL_{99} . Isto significa que se usássemos a concentração diagnóstica proposta pela OMS de 0,012 ppm, a linhagem suscetível também teria sido considerada resistente em nossos testes qualitativos.

Nos testes preliminares desse estudo foram observados diferentes percentuais de mortalidade por temefós para a linhagem suscetível numa mesma concentração, quando houve variação dos recipientes. Copos plásticos opacos com ranhuras diminuem a mortalidade das larvas quando comparados com copos plásticos translúcidos sem ranhuras. A interferência do tipo de material do copo também foi discutida por Mbare (2013) para o inseticida piriproxifeno. Desta forma, é importante que os experimentos de determinação da concentração diagnóstica na linhagem suscetível sejam realizados nos mesmos tipos de recipientes em que serão feitos os testes com as linhagens do campo

Vários trabalhos utilizaram a concentração diagnóstica do temefós para qualificar a resistência das populações locais de mosquitos (Braga, 2004b; Carvalho et al., 2004; Gambarra et al., 2013; Lima et al., 2003; G. Macoris et al., 2005; Montella et al., 2007). O ensaio qualitativo pode ser a primeira etapa de avaliação da suscetibilidade, permitindo selecionar as populações para a posterior quantificação da resistência por meio da RR's (razão de resistência). A variação da concentração diagnóstica observada na literatura para a mesma linhagem suscetível, ainda que utilizados iguais procedimentos, sugere que esta não seja uma boa medida de comparação da resistência com dados publicados. Por outro lado, a RR é uma medida equiparável, uma vez que relaciona a resposta de uma linhagem de campo com resistência desconhecida à resposta da linhagem sabidamente suscetível, sendo ambas testadas sob as mesmas condições.

Em nosso trabalho, os ensaios quantitativos com as larvas L3 demonstraram a intensidade da resistência aos larvicidas temefós e piriproxifeno em três populações de *Ae. aegypti* do Distrito Federal. Nas linhagens GRA (Guará), BRZ (Brazlândia) e SBR (Sobradinho) deste estudo, as RR₅₀ para temefós foram 12,0; 10,3 e 8,6 respectivamente. Segundo critérios da OMS (WHO, 2016), as populações GRA e BRZ são altamente resistentes e SBR, moderadamente resistente. Em estudo anterior, Carvalho et al. (2004) avaliou a suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* de 8 RA's do Distrito Federal utilizando uma concentração diagnóstica de 0,012 ppm para o temefós. Sete populações foram identificadas como resistentes, dentre elas, as oriundas do Guará e Sobradinho que também apresentaram resistência a temefós em nosso estudo. No estudo de Carvalho et al. (2004), porém, não foram estudadas linhagens provenientes de BRZ.

Os nossos resultados demonstraram, portanto, a intensidade das alterações da suscetibilidade nas populações avaliadas, sendo GRA e BRZ com maior nível de resistência para o temefós. Mas, também observamos a persistência das linhagens resistentes (GRA e

SBR), mesmo após mais de 7 anos da substituição deste larvicida organofosforado por produtos com modo de ação distintos (Brasil, 2014; Lasneaux, 2013). Como não há dados prévios sobre a intensidade da resistência nas RA's (Regiões Administrativas) do DF, mas apenas o status da resistência, não é possível avaliar se a alta resistência detectada em nosso estudo representa uma tendência de declínio lento e gradual de uma RR prévia mais elevada.

No Brasil, vários estudos já mostraram municípios com intensidade das resistências variando de baixa a alta para o temefós, como por exemplo em São Gonçalo/RJ com uma RR₉₀ de 12,41 (Lima et al., 2003), em Pacaraima/RR com uma RR₉₅ de 4,0 e em São Miguel do Araguaia/GO uma RR₉₅ de 27,1 (Bellinato et al., 2016). Alguns autores já relataram importantes alterações da suscetibilidade a este larvicida organofosforado em países como a Índia (Bharati & Saha, 2018), Malásia (Ishak, 2015), Caribe (Wirth & Georghiou, 1999), Colômbia (Grisales et al., 2013) e Martinica (Marcombe et al., 2012).

A preservação desta característica fenotípica, referente a resistência, mesmo após a descontinuidade no uso do inseticida, em 2011, pode estar relacionada a ausência da pressão seletiva, por ser relativamente recente ou pela ocorrência da resistência cruzada com o uso da malationa. Segundo Wirth & Georghiou (1999), a resistência ao temefós parece ser reversível na população. Os autores observaram em Tortola, uma das Ilhas Virgens Britânicas, que o nível de resistência sofreu redução gradual de 46,8 vezes (Georghiou et al., 1987) para 6,3 vezes (Rawlins, 1998) em 10 anos, sendo que a pressão seletiva foi cessada apenas 2 anos antes da avaliação do estudo. Este resultado sugere que a reversão da resistência é lenta e gradual em populações do campo.

Melo-Santos et al. (2010), em um estudo para avaliar a reversão da resistência ao temefós, observaram o efeito da ausência da pressão seletiva utilizando uma linhagem de Araripina-PE, com RR₉₀ inicial igual a 7. Após pressão seletiva e amplificação da resistência em condições laboratoriais, RR₉₀ passou a ser de 125, mas após cessar a exposição dos mosquitos ao inseticida, a RR₉₀ diminuiu a 8,7 após 9 gerações, ou seja, uma redução de 14 vezes. Esses resultados confirmam que a resistência ao temefós é reversível.

Em um outro estudo recente, Garcia e colaboradores (2018), avaliando a dinâmica de suscetibilidade ao temefós de 4 municípios brasileiros (Santarém-PA, Parnamirim-RN, Duque de Caxias-RJ e Campo Grande-MS), observaram que a redução das RR₉₅ dos municípios foi compatível com a interrupção do uso do larvicida. A ausência desta pressão seletiva teve impacto direto no decréscimo das RR₉₅ já no mesmo ano da interrupção, em 2009, e decaiu nos anos seguintes até 2012, ano final de avaliação. Durante o estudo, a redução RR₉₅ variou entre

15% e 50%. Esta variação sugere que talvez alguns fatores tenham influenciado de maneira diferente tanto no aumento, quanto no declínio da frequência dos alelos que conferem a resistência. São considerados fatores relevantes no surgimento e desaparecimento dos alelos de resistência, os operacionais (quantidade, periodicidade de aplicação de inseticida, etc.), os bióticos (imigração) e a frequência de alelos inicial, entre outros (Georghiou & Taylor, 1977).

É possível que nas populações por nós testadas, o período desde a substituição do inseticida não tenha sido suficiente para o restabelecimento da suscetibilidade, inclusive por meio da dinâmica populacional. A imigração de mosquitos suscetíveis de áreas próximas, por exemplo, é um importante fator neste processo de reversão da resistência. Novos indivíduos contribuem para tornar a população mais heterogênea, reduzindo a frequência de alelos de resistência (Georghiou & Taylor, 1977).

Melo-Santos et al. (2010) avaliaram a influência do genótipo suscetível na reversão da resistência. Para simular a imigração, formaram colônias com mosquitos resistentes e percentuais diferentes de mosquitos suscetíveis. Observaram que no cruzamento da cepa resistente ($RR_{90}=125$) com 50% de indivíduos suscetíveis, introduzidos a cada nova geração, a suscetibilidade foi restabelecida de maneira integral na terceira geração consecutiva.

Apesar da imigração de mosquitos suscetíveis ter um papel importante na reversão da resistência, Chediak et al. (2016) alertaram para o fato de que o uso indiscriminado do temefós no Brasil resultou na resistência amplamente disseminada no país. Sendo assim, é possível que a menor frequência de mosquitos suscetíveis ou a imigração de mosquitos resistentes contribuam para a manutenção da resistência. Os autores ainda ressaltaram que a alta frequência de indivíduos resistentes representa um importante entrave no restabelecimento da suscetibilidade, mesmo diante do alto custo biológico que é imposto aos mosquitos resistentes. A dispersão territorial de mosquitos resistentes no DF, observada em linhagens provenientes de regiões espacialmente distantes, sugere que, na prática, a introdução de linhagens suscetíveis pode ter pouco impacto na reversão da resistência. Este é um dos fatores que torna cada vez mais difícil a reutilização do temefós no âmbito do Programa Nacional de Controle da Dengue.

Adicionalmente, a utilização de outros inseticidas organofosforados ou de classes com o mesmo mecanismo de ação constitui outro fator potencialmente responsável pela manutenção de indivíduos resistentes nas populações de mosquitos (Kumar, Prasad, & Prakash, 2009; Wirth & Georghiou, 1999).

No Distrito Federal, a adoção de outro larvicida a partir de 2001 já era necessária como indicado pelos resultados de Carvalho et al. (2004). Embora os insumos de controle do vetor

sejam garantidos pelo governo federal, por meio do Ministério da Saúde (Portaria nº 1378/2013), o próprio município poderia ter realizado a aquisição de outro larvicida, por exemplo, um biolarvicida, como ocorreu em 2016. O manejo da resistência poderia ter evitado a evolução ou persistência da resistência nas RA's do DF.

Muitas classes de inseticidas apresentam modo de ação semelhante, o que dificulta a escolha de um substituto. Para contornar a resistência disseminada em todo país, o Ministério da Saúde iniciou em 2009 a substituição do temefós por uma classe de larvicida conhecida como reguladores de crescimento de inseto ou IGR – (*Insect Growth Regulator*) cujo alvo de ação é diferente dos organofosforados (Garcia et al., 2018).

Atualmente, o piriproxifeno (IGR) é o larvicida utilizado no DF. Em nosso trabalho, o piriproxifeno alterou o desenvolvimento das larvas das populações de *Ae. aegypti* avaliadas. A inibição da emergência obtida foi acima de 88% em todas as populações resistentes a temefós, sendo a mortalidade maior no estágio de pupa. Estes dados corroboram com os obtidos por Darriet & Corbel (2006), por Ochipinti et al. (2014), Carvalho (2018) e também aos de Resende et al. (2006) que, diferentemente, utilizaram o inseticida na formulação comercial em várias concentrações.

A concentração diagnóstica do piriproxifeno estimada nos bioensaios foi de 7,8 ppb. Esta concentração poderá ser adotada como uma referência para o monitoramento futuro do perfil de suscetibilidade das populações de *Ae. aegypti* do DF, utilizando o mesmo método e condições deste estudo. Deve-se frisar, porém, que é importante o estabelecimento de concentração diagnóstica se a avaliação da resistência for realizada por outros laboratórios ou utilizando métodos diferentes.

Após quatro anos de utilização do piriproxifeno no Distrito Federal, não foi detectada resistência nas amostras das populações avaliadas de acordo com o critério da OMS (WHO, 2016). Entretanto, as RR_{50} de GRA e BRZ (2,21 e 1,85, respectivamente) são sugestivas de resistência incipiente, o que reforça a importância da realização periódica de novos ensaios para monitorar a dinâmica da alteração da suscetibilidade. Em estudo anterior, Carvalho (2018) analisou a suscetibilidade de seis populações de *Ae. aegypti* do DF ao piriproxifeno e também constatou a suscetibilidade em todas as amostras coletadas das Regiões Administrativas da Asa Norte, do Lago Norte, do Varjão e de Brasília (B. L. Carvalho, 2018). Apesar de escassos, diferentes estudos avaliaram as populações de mosquitos do campo e encontraram não apenas a suscetibilidade, mas também resistência incipiente e, em alguns poucos casos, populações resistentes (Andrighetti, Macoris, 2008; Lau, 2015; Marcombe, 2014; Monnerat et al., 2012).

Outros trabalhos documentaram que as populações de vetores de arboviroses resistentes a temefós também apresentam níveis variados de alteração da suscetibilidade ao piriproxifeno. No Brasil, Andrighetti et al. (2008) investigaram a suscetibilidade ao piriproxifeno de 3 populações de mosquitos temefós-resistentes (Salvador/BA, Barreira/BA e Bauru/SP), mas sem exposição prévia ao piriproxifeno. Segundo os autores, as populações resistentes ao temefós, exibiram também resistência ao piriproxifeno. Resultados semelhantes foram relatados por Marcombe et al. (2011) em populações de mosquitos multirresistentes na Martinica.

Apesar de não termos encontrado resistência ao piriproxifeno, as populações resistentes ao temefós apresentaram discreta alteração na suscetibilidade. Foi observada a gradação $RR_{GRA} > RR_{BRZ} > RR_{SBR}$ para ambos larvicidas. Monnerat et al. (2012), avaliando diferentes inseticidas em condições simuladas de campo verificaram mudanças na inibição da emergência por piriproxifeno em uma população resistente ao temefós no Distrito Federal.

Estas alterações relacionadas ao piriproxifeno nas populações avaliadas como temefós-resistentes são sugestivas de resistência cruzada. Braga et al. (2005) avaliaram a eficácia do metoprene, um outro análogo do hormônio juvenil, em populações resistentes ao larvicida organofosforado. Os autores observaram pequena alteração do status de suscetibilidade e elevada atividade das enzimas esterases e oxidases de função mista (MFO). Estas enzimas estão envolvidas na resistência metabólica em outros grupos de insetos (Karatolos et al., 2012) e, possivelmente, em *Anopheles* (Yunta et al., 2016). Em estudo similar com populações de mosquitos da Flórida (USA), Marcombe et al. (2014) também encontraram alta atividade destas enzimas, inclusive, da glutathione S-transferase (GST) em uma população resistente a malationa que exibiu resistência significativa para metoprene e piriproxifeno.

No caso dos adulticidas, apenas três classes estão disponíveis para o uso nos serviços de saúde: os organofosforados (OF), piretroides (PI) e carbamatos (CA), sendo que os 2 primeiros são utilizados na aplicação aeroespacial a Ultra Baixo Volume para o controle de surtos e epidemias; e o último, no tratamento residual, sendo um complemento do controle mecânico (Brasil, 2012). Para reverter ou retardar o desenvolvimento da resistência, e, assim, preservar o uso destes inseticidas, o Ministério da Saúde tem adotado, como estratégia, a rotatividade de inseticidas. Atualmente, a malationa (OF) é o inseticida de escolha no Brasil, uma vez que já foram detectados casos de resistência aos piretróides (PI) (Brasil, 2012, 2014a, Garcia et al., 2018; Maciel-de-Freitas et al., 2014; Da-Cunha et al., 2005). Neste trabalho foi descrita a suscetibilidade das três populações estudadas aos adulticidas deltametrina (PI) e malationa (OF).

No Distrito Federal, a malationa está em uso, atualmente, para aplicação espacial, durante surtos e epidemias das principais arboviroses. A avaliação da suscetibilidade das populações à malationa revelou que GRA é resistente, enquanto BRZ e SBR demonstraram alteração na suscetibilidade. Esses resultados são preocupantes, pois revelam que o controle químico pode não conter a disseminação das arboviroses para estas áreas com história recente de alta incidência de dengue no período de 2013 a 2016. A cidade de Brazlândia atingiu a alarmante incidência de 2938,73 casos/100 mil habitantes e Guará, 399,44 casos/100 mil habitantes em 2016. Em Sobradinho, a incidência da dengue foi maior em 2014, 1322,47 casos/100 mil habitantes (Brasília, 2013, 2016, 2017; Filho, 2014). Novas epidemias nestas áreas podem acelerar a seleção de populações resistentes, não somente para o organofosforado em uso, mas também para piriproxifeno, por resistência cruzada. Isso reforça a necessidade do uso criterioso e racional do inseticida.

A Região Administrativa de Brazlândia deve ser avaliada com cautela pelas autoridades de saúde. Isto porque a amostra de mosquitos avaliada desta região apresentou suscetibilidade alterada também para deltametrina. Estes resultados são compatíveis com o destaque desta cidade na incidência da dengue em anos recentes.

Em outros municípios brasileiros também foi detectada a resistência aos piretroides. Da-Cunha et al. (2005) realizaram o monitoramento da resistência de 2001 a 2003 em 25 localidades de três estados (Sergipe, Alagoas e Rio de Janeiro) por meio de garrafas impregnadas com cipermetrina. Observaram resistência em 17 populações, sendo a mortalidade também avaliada após 24 horas. Segundo os autores, estes resultados indicam que a resistência ao piretróide se desenvolveu rapidamente, tendo em vista que a cipermetrina começou a ser utilizada a partir de 2001.

A rápida resistência aos piretroides foi também observada por Francis et al. (2017) na Jamaica. Os autores avaliaram o perfil de suscetibilidade à permetrina com garrafas impregnadas com 15 µg/garrafa e tempo diagnóstico de 30 minutos. Todas as cinco populações testadas foram classificadas como resistentes. O trabalho também encontrou o aumento da atividade de enzimas envolvidas na resistência metabólica e mutações *kdr* no gene *Nav*, com a frequência de alelos resistentes variando de moderada a alta.

Em nosso trabalho, a mortalidade de 100% dos mosquitos da população RCK alcançada em 15 minutos de exposição, sugere que a dose de 10 µg/garrafa de deltametrina pode ter sido excessiva para a avaliação das populações. Uma dose menor provavelmente teria melhor discriminado o perfil de resistência das populações estudadas. Foram realizados testes prévios

para a definição da dose diagnóstica em que foram testados 8 µg/garrafa, mas só houve mortalidade de 100% após mais de 60 minutos. A continuidade dos testes poderia ter selecionado uma dose intermediária mais adequada para o diagnóstico.

Outros autores avaliaram a resistência para deltametrina, mas por meio do protocolo preconizada pela OMS, utilizando o papel filtro impregnado com inseticida. Belinato et al. (2016) detectaram altos níveis de resistência em populações de 12 municípios brasileiros das regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste coletadas entre 2010 e 2012. Todas as amostras das populações foram altamente resistentes com valores de RR_{95} variando de 13,1 a 78,6. Uma vantagem da metodologia utilizada por este trabalho foi a quantificação da resistência por dose-resposta. Foram utilizados nos ensaios papéis impregnados com doses variadas do inseticida, diferentemente, da metodologia utilizada por nós, que se restringiu à classificação das populações, ao impregnar as garrafas apenas com uma dose.

Garcia et al. (2018), adotando o mesmo protocolo da OMS, obtiveram RR_{95} para deltametrina semelhantes a Belinato et al. (2016). As amostras das populações de mosquitos foram coletadas em 2010/11 em municípios distintos, porém nas mesmas regiões do estudo de Belinato et al. (2016). Em conjunto, os resultados demonstram disseminação espacial da resistência à deltametrina nos estados avaliados.

Macoris et al. (2018) realizaram análise temporal do status de suscetibilidade de várias populações de mosquitos no estado de São Paulo, durante dez anos, a partir da interrupção da aplicação de adulticida piretroide. Utilizando papel impregnado com deltametrina avaliaram as populações por meio da dose diagnóstica e dose-resposta. Todas as populações de vetores dos municípios avaliados permaneceram resistentes ao piretroide. Os autores observaram também, em todas as localidades, o aumento das frequências de alelos *kdr*, que conferem a resistência. Isto sugere que a pressão seletiva por piretroide ainda permanece atuando. Segundo os autores, esta persistência, provavelmente, deve-se a fontes adicionais de pressão seletiva. O uso indiscriminado de inseticidas domésticos, composto por piretroides, geralmente se intensifica quando há aumento da população de vetores no interior das residências. As notícias de surtos e epidemias veiculadas pela mídia também podem influenciar no comportamento das pessoas na utilização de inseticidas. Além disso, é possível que o uso de inseticidas piretroides por outros programas de vigilância e controle de vetores de outras endemias, leishmanioses, por exemplo, contribua para a seleção de populações de mosquitos resistentes.

Em estudo realizado em Pelotas (RS), Diel et al. (2003) identificaram que em 90% dos domicílios pesquisados, os moradores usaram inseticidas para o controle de pragas urbanas, tais

como: baratas, mosquitos, cupins, entre outros. O principal inseticida utilizado pelos moradores foram os aerossóis de piretroides, seguido por organofosforados.

Recentemente, Gray et al. (2018) quantificaram o efeito da pulverização de inseticidas domésticos aerossolizados na frequência de alelos e fenótipos da resistência à piretroides em uma cidade no México. Observaram que, em ensaios de pulverização espacial com inseticidas domésticos a frequência de homozigotos I1016 *kdr* aumentou significativamente, demonstrando a importância destes inseticidas como pressão seletiva.

Se a utilização indiscriminada de aerossóis tem papel importante como fonte adicional na seleção de populações de mosquito resistentes, é preciso considerar as causas que levam ao uso intenso destes produtos. No Equador, Heydari et al. (2017) verificaram que as falhas ou ausência de intervenções efetivas no controle do vetor pelo serviço de saúde, quer seja pela pouca eficácia dos inseticidas utilizados contra mosquitos resistentes, quer seja por limitações no acesso da população aos serviços prestados, contribuem para a adoção de iniciativas individuais que visam controlar os mosquitos nas residências. Entre as práticas comumente adotadas e observadas pelo estudo está o uso de inseticidas.

Estes estudos anteriores reforçam a hipótese de que provavelmente a alteração da suscetibilidade à deltametrina constatada na população BRZ esteja relacionada, em parte, ao uso excessivo de inseticidas domésticos. Cabe ressaltar que 2015 foi o último ano de utilização desta classe de inseticida, fornecida pelo MS: a lambdacialotrina. No entanto, em 2016, a SES/DF adquiriu e um inseticida de mesmo mecanismo de ação dos piretroides, o etofenproxi. Este foi aplicado a UBV nas Regiões Administrativas no mesmo ano.

Certamente, o uso de inseticidas domésticos é um dos fatores a ser considerado pelas autoridades de saúde quando pretende-se realizar o manejo da resistência para preservar a efetividade de uma classe de inseticidas ou agir sobre a reversão da resistência. Vale ressaltar que há apenas 2 classes de inseticidas disponíveis para o controle de mosquitos adultos em situações de surtos e epidemias: os piretroides e organofosforados.

As populações avaliadas também demonstraram alteração da suscetibilidade para malationa. A linhagem GRA foi resistente, enquanto o resultado para BRZ foi muito próximo ao limiar da resistência (80,3% em 45 minutos) e SBR apresentou indicação de desenvolvimento da resistência (87,2% em 45 minutos).

Ocampo et al. (2011) avaliou a suscetibilidade da população do vetor de 10 localidades na Colômbia com garrafas impregnadas e vários inseticidas, entre eles a malationa. Utilizando a dose de 100 µg e tempo diagnóstico de 30 minutos, observaram, como em nosso trabalho,

alteração da suscetibilidade. No entanto, apenas 2 populações entre as avaliadas. Na Jamaica, Francis et al. (2017) também utilizaram o protocolo do CDC e mesma dosagem do presente trabalho (50 µg/garrafa), mas com o tempo diagnóstico de 30 minutos. Os autores observaram suscetibilidade alterada em quatro das cinco populações testadas com a mortalidade variando entre 84 e 90%. Em nosso estudo, em 30 minutos de exposição, as populações apresentaram mortalidade suficiente para classificá-las como resistentes. Entretanto, a mortalidade da população suscetível não alcançou 100% nesse tempo, o que ocorreu apenas após 45 minutos de exposição, que definiu esse como o tempo diagnóstico adotado.

Lima et al. (2003), utilizando garrafas impregnadas com malationa, avaliaram a resistência de populações de mosquitos de 10 municípios do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Os autores não observaram mortalidade inferior a 80% em nenhum dos municípios após 45 minutos de exposição, utilizando garrafas impregnadas com 400 µg. No entanto, foram identificadas 3 localidades com resistência incipiente.

Em nosso trabalho, assim como em Lima et al. (2003), foram realizados testes prévios, com diferentes concentrações do inseticida a fim de padronizar a dose a ser utilizada na impregnação das garrafas (dose diagnóstica) e o tempo necessário para matar 100% dos mosquitos (tempo diagnóstico). As diferenças nas doses utilizadas nestes trabalhos reforçam a necessidade de padronização prévia dos testes nas condições locais, conforme indicado no protocolo do CDC (CDC, 2010).

Durante a triagem de indivíduos para estabelecimento das linhagens de campo, os mosquitos foram separados entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Aproximadamente 1% dos mosquitos identificados era da espécie *Aedes albopictus*, e foram, portanto, descartados. É importante frisar a presença desta outra espécie nas áreas urbanas do DF em que foram feitas as coletas.

O estudo quantitativo dos princípios ativos usados no controle vetorial do *Ae. aegypti* revelou que os inseticidas Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxi) e Ficom[®] VC (bendiocarbe) apresentaram teor compatível com o declarado pelo fabricante. Porém, os outros apresentaram variações: o Komvektor[®] 440 EW (malationa) apresentou teor de 31,5% acima do declarado e o Vectron[®] 10 SC (etofenproxi), apresentou teor de 12% abaixo do declarado. A formulação de malationa adquirida para uso no Brasil e no DF é uma emulsão entregue em grandes bombonas plásticas de 200 litros. Para utilização, na DIVAL, a embalagem fica posicionada horizontalmente e é instalada uma torneira na base do recipiente para saída do material. No momento da diluição da amostra para uso, a torneira é aberta e a quantidade de inseticida

necessária é retirada. Por ser uma emulsão (mistura de dois líquidos imiscíveis), deve-se sempre homogeneizar o conteúdo antes de retirar a alíquota para uso. Devido ao tamanho e posicionamento dos grandes tonéis, é impraticável a homogeneização do líquido antes que seja retirado da embalagem. Supomos, desta forma, que a amostra retirada para análise contém maior quantidade de princípio ativo precipitado, que poderá faltar nas preparações posteriores. Os serviços reponsáveis pelo controle das arboviroses podem estar utilizando concentrações equivocadas de malationa, resultando em falhas no controle do vetor. A falta de manejo adequado das preparações pode desencadear o desenvolvimento da resistência, toxicidade ao operador, à população e ao meio ambiente.

A realização do controle de qualidade dos inseticidas deve ser entendida como uma atividade fundamental para garantir a eficácia no controle do vetor, impedindo a progressão das arboviroses. É importante que este procedimento seja adotado de forma permanente, quer seja durante a realização dos processos de aquisição dos produtos, quer seja na avaliação daqueles que se encontram estocados.

O ensaio semi-campo com o inseticida Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxifeno) demonstrou efeito residual semelhante ao obtido por Resende et al. (2006). Os autores executaram os ensaios em condições parecidas, ou seja, dosagem de 0,01 ppm, sem renovação de água ou reposição da água perdida por evaporação e em baldes de plástico. Os autores observaram que o quinto e sexto lotes de larvas da linhagem suscetível utilizados para repovoar os baldes após 45 e 60 dias, respectivamente, apresentaram declínio gradual do percentual de inibição de emergência para 79,5% e 25%. Em nosso estudo, a queda foi de 85,5% e 45,5%, respectivamente 45 e 65 dias pós-tratamento.

Nossos resultados também corroboram com os obtidos por pesquisadores da Secretaria de Vigilância em Saúde/MS e Fundação Oswaldo Cruz/RJ que avaliaram a eficácia e o efeito residual de vários inseticidas reguladores de crescimento, entre eles o piriproxifeno. Os pesquisadores realizaram ensaios em condições semi-campo para avaliar a viabilidade do uso dos inseticidas dentro do contexto do Programa Nacional de Controle da Dengue. Observaram que o produto Adeal[®] 0,5 G (piriproxifeno) apresentou efeito residual de 35 dias em baldes e em caixas d'água, com eficácia de 100%. Em nosso estudo, este mesmo nível de eficácia foi alcançado até 30 dias (Brasil, 2005).

Contudo, em estudo anterior, Monnerat et al. (2012) encontraram redução da atividade do piriproxifeno apenas a partir do lote de larvas colocado nos recipientes com 70 dias pós-tratamento, em caixas d'água de fibra de vidro (250 L), mesmo com a realização de renovação

de 20% de água 3 vezes por semana. Esta divergência entre os resultados pode ser parcialmente explicada pelo volume de solução utilizado e/ou pelo tipo de material que compõe o recipiente do teste. Resende et al. (2006) também testaram o efeito do piriproxifeno em recipientes de vidro (5 L), caixa de cimento (45 L) e balde de plástico (20 L). Os pesquisadores observaram que a solução de inseticida da caixa de cimento e no frasco de vidro, com 60 dias pós-tratamento, apresentaram efeito residual semelhante, respectivamente, 99% e 100% de inibição de emergência, sendo superiores ao obtido no balde (25%). Além disso, ao avaliarem a inibição nos recipientes de vidro em 90 dias pós-tratamento, observaram maior efeito residual com inibição de emergência 99% contra 92,5% da caixa d'água e 41% nos baldes de plástico. Os dados mostram o efeito do material constituinte do recipiente, sobre a emergência.

Estes resultados têm implicações importantes sobre a periodicidade de aplicação de inseticida em depósitos não passíveis de controle mecânico. Dependendo do tamanho do depósito, da frequência de renovação da água e do tipo de material constituinte, a periodicidade de 60 dias preconizada pelo PNCD para uma nova visita aos domicílios e eventual tratamento com o inseticida pelo agente de controle de endemias pode não ser adequada.

O ensaio semi-campo permitiu demonstrar, além da eficácia, o efeito tardio da ação de reguladores de crescimento como o piriproxifeno. Embora este trabalho não tenha coletado dados sobre a percepção dos servidores da DIVAL sobre o conhecimento dos mecanismos de ação e eficácia do piriproxifeno, são frequentes as manifestações de desconfiança sobre o larvicida. Nossos resultados podem contribuir com a gestão da DIVAL para sanar eventuais dúvidas sobre a eficácia do larvicida.

Nas últimas décadas, a diversidade de estudos que avaliaram a suscetibilidade a piretróides e organofosforado em diferentes locais do mundo revelam a importância do tema para a saúde pública. Em todos os estudos, é evidente a necessidade do constante monitoramento da resistência para garantir a eficácia do controle no campo e a preocupação em preservar as únicas classes de adulticidas disponíveis.

O limitado número de opções disponíveis de inseticidas para o controle do vetor e a resistência detectada para OF's e PI's reforçam a necessidade do uso cada vez mais racional destes inseticidas. Indicam também a importância de fortalecer as ações de controle voltadas para o combate as formas imaturas, por meio da mobilização social, para realização do controle efetivo. E ainda, apontam para necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias: inseticidas não convencionais (origem na biodiversidade), mosquitos infectados com *Wolbachia*, mosquitos transgênicos, autodisseminação de inseticida, entre outros.

7. Conclusão

A utilização de inseticidas tem importante papel no controle da disseminação das arboviroses. Contudo, a utilização, ainda que cuidadosa, tem ocasionado seleção de populações de mosquitos *Ae. aegypti* resistentes.

Neste trabalho foi possível detectar que populações do vetor no DF ainda apresentam resistência ao temefós. No entanto, as populações amostradas apresentaram suscetibilidade ao piriproxifeno, larvicida atualmente utilizado no DF e no Brasil. Em relação aos aduicidas testados, as populações também exibiram alterações na suscetibilidade. Especialmente, as amostras do Guará (GRA) apresentaram resistência à malationa, o único aduicida disponibilizado pelo Ministério da Saúde, considerado eficaz para o controle. Os ensaios com a deltametrina mostraram populações suscetíveis, exceto amostras provenientes de Brazlândia que apresentaram alteração da suscetibilidade.

Foi demonstrada a eficácia do Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxifeno) em ensaio semi-campo, com a redução do efeito residual a partir de 30 dias após a realização do tratamento.

O teor dos princípios ativos dos inseticidas Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxifeno) e Ficom[®] VC (bendiocarbe) corresponde ao declarado pelo fabricante. Porém, foram constatadas diferenças para o Komvektor[®] 440 EW (malationa) com teor de 31,5% superior ao declarado; e o Vectron[®] 10 SC (etofenproxi) com teor de 12% inferior ao declarado.

Os resultados obtidos, ao mostrarem o perfil da resistência de populações do vetor aos inseticidas em uso e àqueles utilizados no passado, fornecem importantes subsídios para o manejo da resistência no Distrito Federal. Dados sobre as populações locais de mosquitos dão novas perspectivas de uso dos inseticidas. Atualmente, as decisões de aquisição destes produtos são centralizadas pelo Governo Federal, sendo atribuição do Ministério da Saúde, e se baseiam muitas vezes em dados de outras regiões do país, podendo não se adequar ao real *status* da resistência no DF. Os resultados alcançados contribuem, assim, para o efetivo controle do vetor ao fornecer subsídios que podem nortear a tomada de decisões dos gestores de saúde sobre a aquisição e uso de inseticidas no DF, bem como sobre a melhor estratégia de manejo da resistência a ser adotada.

Embora vários estudos anteriores tenham demonstrado a eficácia do larvicida Sumilarv[®] 0,5 G (piriproxifeno), a realização do ensaio semi-campo nas instalações da DIVAL contribuirá para desmitificar a crença de que este larvicida não apresenta efeito satisfatório. A ação lenta, tardia e atóxica dos análogos do hormônio juvenil é incompreendida, o que favorece, muitas

vezes, dúvidas e comparações com o efeito rápido dos inseticidas neurotóxicos utilizados por décadas como o temefós.

Além disso, a realização da avaliação do teor dos princípios ativos inseticidas em uso na DIVAL favorecerá a revisão das condições de armazenamento dos produtos e de processos de preparo de soluções, especialmente de malationa, para garantir o efetivo controle de surtos e epidemias de arboviroses. Os resultados alcançados, neste sentido, reforçam a função primordial da capacitação dos profissionais responsáveis pela preparação e aplicação dos inseticidas quanto ao modo e tempo de ação dos produtos utilizados.

A realização de ensaios com larvas requer o planejamento minucioso para coordenar a execução da coleta de material do campo, formação de colônias e realização propriamente dita dos testes. É uma etapa laboriosa e demorada em razão, principalmente, do efeito tardio do piriproxifeno. Em nosso estudo houve perda de amostras de ovos do campo, devido ao armazenamento inadequado (agravado pela baixa umidade), ocasionando a desidratação dos ovos e, por consequência, a baixa taxa de eclosão das larvas. Isto teve impacto sobre a execução dos ensaios.

Neste estudo, a amostragem por conveniência utilizada se distanciou da metodologia adotada no Brasil, inclusive pela MoReNAa, segundo a qual a coleta de ovos é realizada com a instalação de ovitrampas em unidades geográficas denominadas quarteirões, considerada a unidade primária de amostragem em levantamentos de infestação. A amostragem adotada pode não ter representado adequadamente a população de mosquitos, pois a distribuição das armadilhas não contemplou toda a área urbana das cidades estudadas.

A avaliação da suscetibilidade das populações de mosquito realizada neste trabalho representa um olhar parcial sobre o fenômeno. Para uma melhor definição do *status* de resistência, estudos complementares devem ser realizados a fim de se compreender, por meio de ensaios bioquímicos, qual é a atividade das enzimas envolvidas na detoxificação, quais são as enzimas responsáveis pela resistência metabólica. E ainda, é fundamental a realização de testes moleculares para identificar quais mutações estão envolvidas em mudanças estruturais dos genes, causando alteração do sítio-alvo que diminuem a ação dos inseticidas. São estudos essenciais para melhor elucidar o perfil de resistência das populações de *Ae. aegypti* no DF.

Em nosso estudo, os parâmetros para avaliação da resistência aos adulticidas como a dose e tempo diagnósticos podem ainda ser melhorados para discriminar mais adequadamente as populações quanto ao seu *status* de resistência. A obtenção da dose diagnóstica para realização dos ensaios qualitativos com larvicidas, por exemplo, deveria ter sido conduzida pela

avaliação estatística do percentual de mortalidade e de inibição de emergência nos três ensaios independentes. Isto contribuiria com a seleção de dados sem diferenças estatísticas significativas, tornando o modelo de estatístico robusto para estimar as concentrações letais e de inibição da emergência.

Esperamos que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir para a compreensão e monitoramento da resistência de populações de *Ae. aegypti* no Distrito Federal. E possam repercutir em ações adequadas de controle da população de vetores de arboviroses em um nível de infestação que não viabilize a ocorrência de surtos e epidemias.

9. Recomendações

1. Monitoramento constante da resistência deve ser realizado por meio de ensaios qualitativos e quantitativos do perfil de resistência das populações de mosquitos. São necessários também ensaios bioquímicos e moleculares para elucidar os mecanismos de resistência metabólica e mutações que alteram os sítios de ligação dos inseticidas.
2. Contínua busca por agentes com diferentes mecanismos de ação para o controle vetorial.
3. Análise química periódica dos inseticidas recebidos e em uso para o controle vetorial.
4. Treinamento e capacitação dos técnicos responsáveis pela preparação de uso dos inseticidas.
5. Aquisição de malationa em uma forma diferente de emulsão ou em recipientes que permitam sua homogeneização antes do uso.

10. Referências

- Alsheikh, A. A., Mohammed, W. S., Noureldin, E. M., Daffalla, O. M., Shrwani, Y. A., Hobani, K. J., ... Bin Saeed, A. A. (2016). Studies on *Aedes aegypti* resistance to some insecticides in the Jazan District, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 240(3298), 1–8.
- Amorim, S. R., Klier, A. H., & de Angelis, L. H. (2013). Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho, 9.
- Andrighetti, M. T. M., Cerone, F., Rigueti, M., Galvani, K. C., & Macoris, M. de L. da G. (2008). Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. Recuperado de <http://www.who.int/iris/handle/10665/170712>
- Diniz, D. F. A., Melo-Santos, M. A. V., Santos, E. M. M., Beserra, E. B., Helvecio, E., de Carvalho-Leandro, D., ... Ayres, C. F. J. (2015). Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites & Vectors*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1276-5>
- Bailey, D. B., & Ventura, L. O. (2018). The Likely Impact of Congenital Zika Syndrome on Families: Considerations for Family Supports and Services. *Pediatrics*, 141(Supplement 2), S180–S187. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-2038G>
- Bar, A., & Andrew, J. (2013). Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Larvae, 21.
- Bellinato, D. F., Viana-Medeiros, P. F., Araújo, S. C., Martins, A. J., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2016). Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2016/8603263>
- Benchimol, J. L. (2001). *Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada*. Editora FIOCRUZ. <https://doi.org/10.7476/9788575413951>
- Beserra, E. B., Fernandes, C. R. M., & Ribeiro, P. S. (2009). Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Neotropical Entomology*, 38(6), 847–852. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000600020>
- Beserra, E. B., Freitas, E. M. de, Souza, J. T. de, Fernandes, C. R. M., & Santos, K. D. (2009). Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia. Série Zoologia*, 99(3), 281–285. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212009000300008>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013a). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013b). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., ... Hay, S. I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>

- Braga, I. A., Lima, J. B. P., Soares, S. da S., & Valle, D. (2004). *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(2), 199–203. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000200015>
- Braga, I. A., & Valle, D. (2007a). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e serviços de saúde*, 16(2), 113–118.
- Braga, I. A., & Valle, D. (2007b). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), 179–293. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>
- Braga, I., & Valle, D. (2007c). *Aedes aegypti*: Vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742007000400007>
- Brasil. (1990, setembro 19). LEI N° 8.080, de 19 de setembro de 1990. Recuperado de http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm
- Brasil. (2012, abril). II Seminário Internacional para Avaliação de Ações de Controle Químico de *Aedes aegypti* no Brasil - Resumo executivo. Recuperado de <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/16/Resumo-Executivo-II-Semin--rio-Aedes-aegypti-final.pdf>
- Brasil, Instituto Oswaldo Cruz (2016, junho 14). NOTA TÉCNICA N.º 4/2016/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA. Recuperado de http://www.fiocruz.br/ioc/media/NT04_2016_IOC_inseticida_aviao_dv_rlo_ppublicacao.pdf
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2018). Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2018, 49(2). Recuperado de <http://portalms.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>
- Brasil, Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. (1976). Recuperado de http://portal.anvisa.gov.br/documents/33864/284972/lei_6360.pdf/5330c06d-1c17-4e1e-8d21-d7e3db4d3ce4
- Brasil, Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Orientação de Serviço nº 49 (2018). Recuperado de <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/O.S+49+Agrot%C3%B3xicos/84c0b4a5-8492-4f46-8557-70bb70bb66c6>
- Brasil, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (2002a). *Diretrizes para projetos de unidades de armazenagem, distribuição e processamento de praguicidas* (Vol. 13). Brasília: Ascom. Recuperado de <http://www.revistas.usp.br/linguaeliteratura/article/view/114570>
- Brasil, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. (2002b). *Programa Nacional de Controle da Dengue*. Brasília.

- Brasil, Ministério da Saúde. (2002). *A sociedade contra a dengue*. Ministério da Saúde. Recuperado de http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sociedade_contra_dengue.pdf
- Brasil, Ministério da Saúde. (2014a). Controle de vetores. Larvicidas. Recuperado 6 de janeiro de 2019, de <http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/controle-de-vetores>
- Brasil, Ministério da Saúde. (2014b, setembro). Controle de vetores. Aplicação espacial de inseticidas. Recuperado 10 de novembro de 2018, de <http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/controle-de-vetores>
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2015a). Boletim epidemiológico nº34. Situação epidemiológica de ocorrência de microcefalias no Brasil, 2015. Recuperado de <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/19/Microcefalia-bol-final.pdf>
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2015b). Boletim epidemiológico nº36. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45, 2015. Recuperado de <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/26/2015-dengue-SE45.pdf>
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2018a). Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 40, 2018, 40(49). Recuperado de <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>
- Brasil, Ministério da Saúde. (2018b, maio 30). PORTARIA Nº 1.520, DE 30 DE MAIO DE 2018. Altera os Anexos XCVIII e XCIX à Portaria de Consolidação nº 5/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, com a inclusão de metas e indicadores do Programa de Qualificação das Ações de Vigilância em Saúde - PQA-VS, a partir de 2018. Recuperado de http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2018/prt1520_06_06_2018.html
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2018c, novembro). Boletim Epidemiológico nº 46. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 40 de 2018.
- Brasil, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. (2001). *Dengue - Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor* (3ª). Brasília’.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. (2016, janeiro 22). Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia. Recuperado de <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/22/microcefalia-protocolo-de-vigilancia-e-resposta-v1-3-22jan2016.pdf>
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. ([s.d.]). Chikungunya. Situação epidemiológica / Dados. Recuperado 30 de setembro de 2018, de <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/chikungunya/situacao-epidemiologica-dados>
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2005). *Avaliação da eficácia de análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina no controle de Aedes aegypti*. Brasília: Ministério da Saúde. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/304627113_Avaliacao_da_eficacia_de_anal

ogos_de_hormonio_juvenil_e_inibidores_da_sintese_de_quitina_no_controle_de_Aedes_aegypti

- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2009). *Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue*. Recuperado de https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/registro/Diretrizes_nacionais_para_a_prevencao_e_controle_de_epidemias_de_dengue/455
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2013). *Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti – LIRAA – para Vigilância Entomológica do Aedes aegypti no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes*. MS.
- Brasília, Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e Gestão. (2015a). *Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios - PDAD - 2015 - Brasília*. Brasília. Recuperado de <http://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/02/PDAD-Bras%20ndia-1.pdf>
- Brasília, Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e Gestão. (2015b). *Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios - PDAD - 2015 - Guará*. Brasília. Recuperado de <http://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/02/PDAD-Guar%C3%A1-1.pdf>
- Brasília, Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e Gestão. (2015c). *Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios - PDAD - 2015 - Sobradinho*. Brasília. Recuperado de <http://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/02/PDAD-Sobradinho-1.pdf>
- Brasília, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (2013). *Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika* (Boletim Epidemiológico). Secretaria de Estado de Saúde do DF. Recuperado de http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/Informe_n_37_divep_2013.pdf
- Brasília, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. (2016a). *Boletim Informativo - Levantamento de Índice Rápido do Aedes aegypti para a Vigilância Entomológica no Distrito Federal* (No. Ano 4, 3). Brasília. Recuperado de http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/LIRAA_Dezembro_2016.pdf
- Brasília, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. (2016b). *Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika* (Boletim Epidemiológico). Secretaria de Estado de Saúde do DF. Recuperado de http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/Informativo_n_01_2016.pdf
- Brasília, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. (2017a). *Boletim Informativo - Levantamento de Índice Rápido do Aedes aegypti para a Vigilância Entomológica no Distrito Federal* (No. Ano 5, 4). Brasília. Recuperado de http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/LIRAA_Novembro_2017.pdf
- Brasília, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. (2017b). *Informativo Epidemiológico de Dengue, Chikungunya e Zika* (Boletim Epidemiológico). Secretaria de Estado de Saúde do DF. Recuperado de http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/Informativo_n_01.2017.pdf

- Brasília, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. (2018). *Informe Entomológico - Levantamento Rápido de Índices para o Aedes aegypti no Distrito Federal - LIRAA* (No. Ano 6, 04). Brasília. Recuperado de http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/04/LIRAA-Novembro-2018_.pdf
- Bregues, C., Hawkes, N. J., Chandre, F., Mccarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., ... Hemingway, J. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1), 87–94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00412.x>
- Brito, L. P., Linss, J. G. B., Lima-Camara, T. N., Belinato, T. A., Peixoto, A. A., Lima, J. B. P., ... Martins, A. J. (2013). Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLOS ONE*, 8(4), e60878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060878>
- Brogdon, W. G., & McAllister, J. C. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(2), 159–164.
- Brown, J. E., McBride, C. S., Johnson, P., Ritchie, S., Paupy, C., Bossin, H., ... Powell, J. R. (2011). Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple ‘domestications’ of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1717), 2446–2454. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2469>
- Burt, F. J., Chen, W., Miner, J. J., Lenschow, D. J., Merits, A., Schnettler, E., ... Mahalingam, S. (2017). Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(4), e107–e117. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30385-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30385-1)
- Campos, K. B. (2017, maio). *Vigilância da resistência do Aedes aegypti aos inseticidas*. Apresentado em Reunião sobre o monitoramento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados pelo PNCD, Rio de Janeiro.
- Carvalho, B. L. (2018). *Análise do perfil de suscetibilidade de seis populações de Aedes aegypti do Distrito Federal ao análogo de hormônio juvenil piriproxifen*. Dissertação de mestrado (Mestrado em Medicina Tropical – Biologia das doenças infecciosas e parasitárias). Universidade de Brasília, Brasília.
- Carvalho, M. do S. L. de, Caldas, E. D., Degallier, N., Vilarinhos, P. de T. R., Souza, L. C. K. R. de, Yoshizawa, M. A. C., ... Oliveira, C. de. (2004). Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 38(5), 623–629. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000500002>
- Casida, J. E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 34, 189–202.
- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual review of entomology*, 43(1), 1–16.
- CDC. (2010). Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay.
- CDC. ([s.d.]). Arbovirus Catalog - CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). Recuperado 1º de setembro de 2018, de <https://wwwn.cdc.gov/Arbocat/VirusBrowser.aspx>

- Chediak, M., Pimenta Jr, F. G., Coelho, G. E., Braga, I. A., Lima, J. B. P., Cavalcante, K. R. L., ... Guedes, R. N. C. (2016). Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(5), 311–321. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150409>
- Christofferson, R. C., & Mores, C. N. (2015). A role for vector control in dengue vaccine programs. *Vaccine*, *33*(50), 7069–7074. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.114>
- Christophers, S. R. (1960). *The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure*. London: Cambridge University Press.
- Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G.-J., & Reusken, C. (2012). *Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers* (Vol. 55).
- Coffey, L. L., Forrester, N., Tsetsarkin, K., Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2013). Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiology*, *8*(2), 155–176. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.139>
- Confalonieri, U. E. C. (2010). Emergência de doenças infecciosas humanas: processos ecológicos e abordagens preditivas. *Oecologia Australis*, *14*(3), 591–602.
- Consoli, R. A. G. B., & Oliveira, R. L. de. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz. Recuperado de <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/2708>
- Costa, L., G. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience*, *13*(13), 1240. <https://doi.org/10.2741/2758>
- Cruz, L. C. de T. A. da, Serra, O. P., Leal-Santos, F. A., Ribeiro, A. L. M., Silhessarenko, R. D., Santos, M. A. dos, ... Santos, M. A. dos. (2015). Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *48*(1), 18–25. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0264-2014>
- Da-Cunha, M. P., Lima, J. B. P., Brogdon, W. G., Moya, G. E., & Valle, D. (2005). Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *100*(4), 441–444. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000400017>
- D'Amato, C., Torres, J. P. M., & Malm, O. (2002). DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. *Química Nova*, *25*(6a), 995–1002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600017>
- Dash, A. P., Bhatia, R., Sunyoto, T., & Mourya, D. T. (2013). Emerging and re-emerging arboviral diseases in Southeast Asia. *Journal of Vector Borne Diseases*, *50*(2), 77–84.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, *59*(3), 151–162. <https://doi.org/10.1080/15216540701352042>
- De Silva, A. M., & Harris, E. (2018). Which Dengue Vaccine Approach Is the Most Promising, and Should We Be Concerned about Enhanced Disease after Vaccination? *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *10*(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029371>
- Delatte, H., Desvars, A., Bouétard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G., & Fontenille, D. (2010). Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, *10*(3), 249–258. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0026>

- Dhadialla, T. S., Retnakaran, A., & Smagghe, G. (1985). Insect Growth- and Development-Disrupting Insecticides. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (Vol. 12). Oxford, Pergamon: G.A. Kerkut and L. I. Gilbert. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/313044176_Insect_growth_regulators
- Diamond, M. S., Ledgerwood, J. E., & Pierson, T. C. (2018). Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges. *Annual Review of Medicine*. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040717-051127>
- Dick, O. B., Martín, J. L. S., Montoya, R. H., Diego, J. del, Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584–593. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>
- Diniz, D. F. A., de Albuquerque, C. M. R., Oliva, L. O., de Melo-Santos, M. A. V., & Ayres, C. F. J. (2017). Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasites & Vectors*, 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2235-0>
- Donalisio, M. R., & Freitas, A. R. R. (2015). Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 18, 283–285. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201500010022>
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Durham, D., Fitzpatrick, M., Ndeffo-Mbah, M., Parpia, A., Michael, N., & Galvani, A. (2018). Evaluating Zika vaccination strategies in the Americas. *Annals of internal medicine*, 168(9), 621–630. <https://doi.org/10.7326/M17-0641>
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>
- Escosteguy, C. C. (1999). Tópicos Metodológicos e Estatísticos em Ensaio Clínicos Controlados Randomizados. *Arq Bras Cardiol*, 72, 5.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012). Guidelines on Prevention and Management of Pesticide Resistance. Recuperado de <https://www.google.com/search?q=Guidelines+on+Prevention+and+Management+of+Pesticide+Resistance&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b>
- Faria, N. R., Azevedo, R. do S. da S., Kraemer, M. U. G., Souza, R., Cunha, M. S., Hill, S. C., ... Vasconcelos, P. F. C. (2016). Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*, aaf5036. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5036>
- Ferreira, B. J., Souza, M. de F. M., Soares Filho, A. M., & Carvalho, A. A. (2009). The historical evolution of dengue prevention and control programs in Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 14(3), 961–972. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232009000300032>
- Filho, D. A., Sallenave, R. N. U., Silva, C. R., Silva, F. S., & Batista, M. H. (2014). *Informativo Epidemiológico de Dengue* (p. 6). Recuperado de http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/Informativo_n_47.pdf
- Forattini, O. (2002). *Culicidologia médica* (Vol. 2). São Paulo: Edusp.

- Franco, O. (1976). História da febre-amarela no Brasil. In *História da febre-amarela no Brasil*. Brasil. Divisão de Cooperação e Divulgação.
- Garcia, G. de A., David, M. R., Martins, A. de J., Maciel-de-Freitas, R., Linss, J. G. B., Araújo, S. C., ... Valle, D. (2018). The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), e0006227. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006227>
- Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., & Joshi, A. (2018). Recent Advances in Zika Virus Vaccines. *Viruses*, 10(11), 631. <https://doi.org/10.3390/v10110631>
- Gatton, M. L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M. J., Ghani, A. C., Godfray, H. C. J., ... Lindsay, S. W. (2013). The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution*, 67(4), 1218–1230. <https://doi.org/10.1111/evo.12063>
- George, L., Lenhart, A., Toledo, J., Lazaro, A., Han, W. W., Velayudhan, R., ... Horstick, O. (2015). Community-Effectiveness of Temephos for Dengue Vector Control: A Systematic Literature Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0004006. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004006>
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., & de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health*, 4, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>
- Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of medical research*, 33(4), 330–342.
- Gubler, D. J. (2009). Vector-borne diseases. *Revue scientifique et technique*, 28(2), 583.
- Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4 Suppl), 3–11. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
- Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 411–422.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
- Hennessey, M. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e1er>
- Holzgrabe, U. (2010). Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 57(2), 229–240.
- Homma, A. (2014). Timbó: expansão, declínio e novas possibilidades para agricultura orgânica. In *Extrativismo vegetal na Amazônia : história, ecologia, economia e domesticação*. Brasília-DF: Embrapa.
- Ishak, I. H., Riveron, J. M., Ibrahim, S. S., Stott, R., Longbottom, J., Irving, H., & Wondji, C. S. (2016). The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in kdr-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Scientific Reports*, 6, 24707. <https://doi.org/10.1038/srep24707>

- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *eLife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Lima, J. B. P., Da-Cunha, M. P., Júnior, R. C. D. S., Galardo, A. K. R., Soares, S. D. S., Braga, I. A., ... Valle, D. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of rio de janeiro and espírito santo, brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(3), 329–333. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.329>
- Liu, N., Li, M., Gong, Y., Liu, F., & Li, T. (2015). Cytochrome P450s – Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.006>
- Londono-Renteria, B., Troupin, A., & Colpitts, T. M. (2016). Arbovirosis and potential transmission blocking vaccines. *Parasites & Vectors*, 9(1), 516. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1802-0>
- Lopes, N., Nozawa, C., & Linhares, R. E. C. (2014). Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5(3), 55–64.
- Löwy, I. (1999). Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 5(3), 647–677. <https://doi.org/10.1590/S0104-59701999000100006>
- Macoris, G., Da, M. de L., Andrighetti, M., Teresa, M., Nalon, R., Cassia, K. de, ... Luiz, A. (2005). Standardization of Bioassays for Monitoring Resistance to Insecticides in *Aedes aegypti*. Recuperado de <http://www.who.int/iris/handle/10665/164040>
- Macoris, M. de L. G., Camargo, M. de F., Silva, I. G. da, Takaku, L., & Andrighetti, M. T. (1995). Modificação da suscetibilidade de *Aedes (stegomyia) aegypti* ao Temephos. Recuperado de <http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/11652>
- Macoris, M. de L., Martins, A. J., Andrighetti, M. T. M., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2018). Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), e0006390. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006390>
- Malz, F., & Jancke, H. (2005). Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(5), 813–823. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.043>
- Marcombe, S., Darriet, F., Agnew, P., Yébakima, A., Etienne, M., Yp-Tcha, M.-M., & Corbel, V. (2011). Field Efficacy of New Larvicide Products for Control of Multi-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Martinique (French West Indies). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(1), 118–126. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0335>
- Martins, A. J., Lins, R. M. M. de A., Linss, J. G. B., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2009). Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 108–115. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.108>
- Mavale, M., Parashar, D., Sudeep, A., Gokhale, M., Ghodke, Y., Geevarghese, G., ... Mishra, A. C. (2010). Venereal Transmission of Chikungunya Virus by *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(6), 1242–1244. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0577>

- Mbare, O., Lindsay, S. W., & Fillinger, U. (2013). Dose–response tests and semi-field evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv®0.5G) for the control of the malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu lato. *Malaria Journal*, 12, 94. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-94>
- Mitchell, C. (2018, janeiro). Casos aculados de Zika - OPAS/OMS. Recuperado 14 de outubro de 2018, de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=es
- Monnerat, R. G., Dumas, V., Ramos, F., Sujji, E., Praça, L., & Vilarinhos, P. (2012). Avaliação de diferentes larvicidas para o controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) em condições simuladas de campo. *BioAssay*, 7(0). Recuperado de <https://www.bioassay.org.br/bioassay/article/view/73>
- Monnerat, R. G., Soares, C. M., dos Anjos Santos, M., Oliveira, C., Cardoso, C., Lima, L. H. C., ... Queiroz, P. R. M. (2012). Controle de larvas de *Aedes aegypti* através da utilização de *Bacillus thuringiensis* em São Sebastião (DF), Brasil. *Universitas: Ciências da Saúde*, 10(2), 115–120.
- Montella, I. R., Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B. P., Braga, I. A., & Valle, D. (2007). Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3), 467–477. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.467>
- Montella, I. R., Schama, R., & Valle, D. (2012). The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 437–449. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001>
- Morais, L., & Marinho-Prado, J. (2016). Plantas com Atividade Inseticida. In *Defensivos agrícolas naturais: usos e perspectivas* (1º ed). Brasília-DF: Embrapa.
- Morrison, T. E. (2014). Re-emergence of chikungunya virus. *Journal of Virology*, JVI.01432-14. <https://doi.org/10.1128/JVI.01432-14>
- Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., ... Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>
- Nauen, R. (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science*, 63(7), 628–633. <https://doi.org/10.1002/ps.1406>
- Observatório Saúde Ambiental. ([s.d.]). Observatório Saúde Ambiental. Agrotóxicos utilizados em programas de saúde. Recuperado 7 de janeiro de 2019, de <http://www.observatoriosaudeambiental.eco.br/o/index.php/2015-09-13-14-35-36/2015-09-13-14-36-27/principais>
- Ochipinti, G. M., Berti, J., Guerra, L. A., Salazar, M., Zuleima, C., & Gómez, J. Á. (2014). Efecto del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de La Pedrera, Maracay, estado Aragua, Venezuela Effect of the growth regulator pyriproxyfen on *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) from La Pedrera, Maracay, Aragua, Venezuela, 12.
- Ohba, S., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., & Takagi, M. (2013). The Effect of Pyriproxyfen as a “Population Growth Regulator” against *Aedes albopictus*

- under Semi-Field Conditions. *PLOS ONE*, 8(7), e67045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067045>
- PAHO. (2016, agosto 26). PAHO WHO | Dengue | Data, Maps and Statistics. Recuperado 16 de setembro de 2018, de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=32910&Itemid=270&lang=en
- Paixão, E. S., Teixeira, M. G., & Rodrigues, L. C. (2018). Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Global Health*, 3(Suppl 1), e000530. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000530>
- Pancetti, F. G. M., Honório, N. A., Urbinatti, P. R., Lima-Camara, T. N., Pancetti, F. G. M., Honório, N. A., ... Lima-Camara, T. N. (2015). Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(1), 87–89. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0155-2014>
- Panchaud, A., Stojanov, M., Ammerdorffer, A., Vouga, M., & Baud, D. (2016). Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 659–694. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-16>
- Panini, M., Manicardi, G. C., Moores, G. D., & Mazzoni, E. (2016). An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 13, 326–335.
- Pavlidis, N., Vontas, J., & Leeuwen, T. (2018). The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.007>
- Pialoux, G., Gaüzère, B.-A., Jauréguiberry, S., & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(5), 319–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)
- PNUD, Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. (2017, abril). UMA AVALIAÇÃO DO IMPACTO SOCIOECONÔMICO DO VÍRUS ZIKA NA AMÉRICA LATINA E CARIBE: Brasil, Colômbia e Suriname como estudos de caso. Recuperado de [http://www.br.undp.org/content/dam/rblac/docs/Research%20and%20Publications/HI V/UNDP-RBLAC-Zika-07-20-2017-Portuguese-WEB.pdf](http://www.br.undp.org/content/dam/rblac/docs/Research%20and%20Publications/HI%20V/UNDP-RBLAC-Zika-07-20-2017-Portuguese-WEB.pdf)
- Poupardin, R., Srisukontarat, W., Yunta, C., & Ranson, H. (2014). Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(3), e2743.
- Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(suppl 1), 11–17. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>
- Powers, A. (2018a). Licensed chikungunya virus vaccine: a possibility? *The Lancet*, 392(10165), 2660–2661. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32809-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32809-5)
- Powers, A. M. (2018b). Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), e00104-16. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-16>

- Precioso, A. R., Palacios, R., Thomé, B., Mondini, G., Braga, P., & Kalil, J. (2015). Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*, *33*(50), 7121–7125. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.105>
- Ranson, H., N’Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., & Corbel, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, *27*(2), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004>
- Reddy, B. N., Rao, B. P., Prasad, G., & Raghavendra, K. (2012). Identification and classification of detoxification enzymes from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Bioinformation*, *8*(9), 430–436. <https://doi.org/10.6026/97320630008430>
- Reisinger, E. C., Tschismarov, R., Beubler, E., Wiedermann, U., Firbas, C., Loebermann, M., ... Ramsauer, K. (2018). Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. *The Lancet*, *392*(10165), 2718–2727. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32488-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32488-7)
- Resende, M. C. de, & Gama, R. A. (2006). Persistence and efficacy of growth regulator pyriproxyfen in laboratory conditions for *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *39*(1), 72–75. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000100014>
- Robertson, J., Russell, R., Preisler, H., & Savin, N. (2007). *Bioassays with Arthropods*.
- Rocha, H., Paiva, M., Araújo, A. P. de, Camacho, D., Moura, A., Gomes, L., ... Santos, M. (2015). Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. *Acta Tropica*, *152*, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.013>
- Rocha, T., & Betoni, S. (2014). A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica, *Revista Uningá Review*, *20*, 7.
- Rodríguez, M. M., Bisset, J., Ruiz, M., & Soca, A. (2002). Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of medical entomology*, *39*(6), 882–888.
- Schaffner, F., & Mathis, A. (2014). Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *The Lancet Infectious Diseases*, *14*(12), 1271–1280. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70834-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70834-5)
- Scott, T. W., Amerasinghe, P. H., Morrison, A. C., Lorenz, L. H., Clark, G. G., Strickman, D., ... Edman, J. D. (2000). Longitudinal Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood Feeding Frequency. *Journal of Medical Entomology*, *37*(1), 89–101. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.1.89>
- Seixas, G., Grigoraki, L., Weetman, D., Vicente, J. L., Silva, A. C., Pinto, J., ... Sousa, C. A. (2017). Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005799. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005799>
- Shepard, D. S., Halasa, Y. A., Zambrano, B., Dayan, G. H., & Coudeville, L. (2011). Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(2), 200–207. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503>
- Silva, A. G. da, Cunha, I. C. L., Santos, W. S., Luz, S. L. B., Ribolla, P. E. M., & Abad-Franch, F. (2012). Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations.

- Evolutionary Applications*, 5(7), 664–676. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00244.x>
- Silva, H. H. G. da, & Silva, I. G. da. (1999). Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(4), 349–355. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821999000400003>
- Silva, J. J. da, & Mendes, J. (2007). Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(6), 612–616. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000600002>
- Slama, K. (2013). *Insect hormones and bioanalogues*. Place of publication not identified: Springer.
- Smith, L., Kasai, S., & Scott, J. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.005>
- Soper, F. L. (1965). Rehabilitation of the eradication concept in prevention of communicable diseases. *Public Health Reports*, 80(10), 855–869.
- Stanaway, J. D., Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., Coffeng, L. E., Brady, O. J., ... Murray, C. J. L. (2016). The Global Burden of Dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(6), 712–723. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00026-8)
- Stone, C., Chitnis, N., & Gross, K. (2016). Environmental influences on mosquito foraging and integrated vector management can delay the evolution of behavioral resistance. *Evolutionary Applications*, 9(3), 502–517. <https://doi.org/10.1111/eva.12354>
- Tauil, P. L. (2001). Urbanização e ecologia do dengue. *Cadernos de Saúde Pública*, 17, S99–S102. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700018>
- Tauil, P. L. (2002). Critical aspects of dengue control in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(3), 867–871. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000300030>
- Tavares, L. A., & Ferreira, A. G. (2006). Análises quali-e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. *Química Nova*, 29(5), 911.
- Teich, V., Arinelli, R., & Fahham, L. (2017). *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. *Jornal Brasileiro de Economia da Saúde*, 9, 267–276. <https://doi.org/10.21115/JBES.v9.n3.p267-76>
- Teixeira, M. da G., & Barreto, M. L. (1996). Porque Devemos, de Novo, Erradicar o *Aedes Aegypti*. *Ciência & Saúde Coletiva*, 1(1), 122–136. <https://doi.org/10.1590/1413-812319961101582014>
- Teixeira, M. da G., Barreto, M. L., & Guerra, Z. (1999). Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico do Sus*, 8(4), 5–33. <https://doi.org/10.5123/S0104-16731999000400002>
- Teixeira, M. G., Andrade, A. M. S., Costa, M. da C. N., Castro, J. S. M., Oliveira, F. L. S., Goes, C. S. B., ... Vasconcelos, P. F. C. (2015). East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(5), 906–907. <https://doi.org/10.3201/eid2105.141727>

- Terzian, A. C. B., Zini, N., Sacchetto, L., Rocha, R. F., Parra, M. C. P., Del Sarto, J. L., ... Nogueira, M. L. (2018). Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34423-6>
- Thiberville, S.-D., Moyen, N., Dupuis-Maguiraga, L., Nougairede, A., Gould, E. A., Roques, P., & de Lamballerie, X. (2013). Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, 99(3), 345–370. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>
- Tunaz, H., & Uygun, N. (2004). Insect Growth Regulators for Insect Pest Control*. *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY*, 28(6), 377–387.
- Urdaneta-Marquez, L., & Failloux, A.-B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.020>
- Valle, D, Pimenta, D., & Cunha, R. (2015). *Dengue: teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- Valle, Denise, Pimenta, D. N., & Aguiar, R. (2016). Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 419–422. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742016000200020>
- Vasconcelos, P. F. da C. (2015). Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 6(2), 9–10. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232015000200001>
- Vasconcelos, P. F., Rosa, A. P., Pinheiro, F. P., Rodrigues, S. G., Rosa, E. S., Cruze, A. C., & Rosa, J. F. (1999). *Aedes aegypti*, Dengue and Re-urbanization of Yellow Fever in Brazil and other South American Countries-Past and Present Situation and Future Presentative.
- Vontas, J., David, J.-P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G. K., Louis, C., & Ranson, H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology*, 16(3), 315–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00728.x>
- Wahid, B., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2017). Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases*, 58, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006>
- Weaver, S. C. (2013). Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in Microbiology*, 21(8), 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., ... Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*, 130, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral research*, 85(2), 328. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Wells, T. N. C., Huijsduijnen, R. H. van, & Voorhis, W. C. V. (2015). Malaria medicines: a glass half full? *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(6), 424. <https://doi.org/10.1038/nrd4573>

- Whalon, M. E., Mota-Sanchez, D., & Hollingworth, R. M. (Orgs.). (2008). *Global pesticide resistance in arthropods*. Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABI.
- WHO. World Health Organization (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Recuperado de <http://www.who.int/iris/handle/10665/69101>
- WHO. World Health Organization (2012). WHO | Global Strategy for dengue prevention and control, 2012–2020. Recuperado de <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>
- WHO. World Health Organization (2018a). Dengue and severe dengue. Recuperado 21 de agosto de 2018, de <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- WHO. World Health Organization (2018b, fevereiro 16). Microcephaly. Recuperado 4 de dezembro de 2018, de <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/microcephaly>
- WHO. World Health Organization (2018c, julho 20). Zika virus. Recuperado 12 de outubro de 2018, de <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- WHO, World Health Organization. (2016). Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations: interim guidance for entomologists. Recuperado de <http://www.who.int/iris/handle/10665/204588>
- WHO, World Health Organization. (2017a). WHO | Global vector control response 2017–2030. Recuperado de <http://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/en/>
- WHO, World Health Organization. (2017b, outubro 31). Fact sheet: Vector-borne diseases. Recuperado 26 de julho de 2018, de <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- WHO, World Health Organization. (1957). Expert Committee on Malaria, Seventh Report. WHO Technical Report Series No. 125WHP.
- Yactayo, S., Staples, J. E., Millot, V., Cibrelus, L., & Ramon-Pardo, P. (2016). Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(suppl_5), S441–S445. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw390>
- Zara, A. L. de S. A., Santos, S. M. dos, Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25(2), 391–404. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742016000200017>

URGENTE



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS
COORDENAÇÃO-GERAL DOS PROGRAMAS NACIONAIS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DA MALÁRIA E
DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO Aedes
Setor Comercial Sul, Quadra 4, Bloco A, Edifício Principal, 1º andar.
70304-000 - Brasília-DF
Tel. (61) 3213-8004

NOTA INFORMATIVA Nº 103, DE 2017/CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS

Informa nova proposta para as atividades de monitoramento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados pelo PNCD

I – BREVE HISTÓRICO DO MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA

Desde 1999 o Ministério da Saúde vem monitorando a susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* a inseticidas utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), e recomendando estratégias de manejo quando necessário.

A partir dos anos 1990, a incidência de dengue aumentou consideravelmente no Brasil, como consequência da dispersão do *Ae. aegypti* no território nacional. Com os primeiros relatos de resistência do vetor aos inseticidas seguido de confirmações laboratoriais, em 1999 um grupo de técnicos do PNCD e especialistas recomendou a implantação de um processo de monitoramento da resistência do *Ae. aegypti* a inseticidas no país. Os resultados serviram como subsídio às decisões do PNCD para o manejo de inseticidas. Até o ano de 2010 os dados apresentados por meio do monitoramento demonstraram a expansão territorial e a necessidade de substituir os princípios ativos que compõem a deltametrina e temephós, inseticidas utilizados.

A presente Nota Informativa trata sobre a proposta de reestruturação das atividades do monitoramento de resistência em 145 municípios selecionados no país, prontos para serem realizados nos anos de 2017 e 2018.

II – NOVA PROPOSTA PARA AS ATIVIDADES DE MONITORAMENTO

O grande desafio para o monitoramento da resistência das populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas reside na logística, principalmente no processo de coleta e posterior processamento das amostras. Nesse sentido, foi firmado um convênio entre o Ministério da Saúde e o Laboratório de Fisiologia e Controle de Vetores e Artrópodes – LAFICAVE/FIOCRUZ com os seguintes objetivos:

- Produção de vídeo e cartilha instrucionais sobre a coleta, armazenamento e envio de ovos ao laboratório;
- Fornecimento de ovitampas e palhetas para coleta de amostras aos municípios participantes;
- Realização dos ensaios de suscetibilidade das populações coletadas em campo em 145 municípios brasileiros ao pyriproxyfen, malathion, e genotipagem das mutações *kdr* V1016I e F1534C nestas populações.

O conhecimento do estado atual das populações de *Aedes aegypti* do país em relação à resistência, é fundamental e estratégico, o LAFICAVE foi escolhido para coordenar este processo de monitoramento, por ter experiência pregressa na coordenação da rede de monitoramento, além de ser vinculado à FIOCRUZ, o que facilita os procedimentos administrativos para viabilizar a proposta.

Em razão do volume de trabalho, o laboratório LAFICAVE estabeleceu parceria com o Laboratório da Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN em Marília, SP, que fará parte do sistema (acho que essa frase é desnecessária para ir como informação ao município) A Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública - CGLAB coordenará e orientará os laboratórios estaduais no envio das amostras coletadas em campo, auxiliando a CGPNCMD nas atividades de monitoramento da resistência. O laboratório estadual deverá sempre comunicar a CGLAB o envio das amostras ao LAFICAVE e, caso o laboratório não tenha como viabilizar o transporte, entrar em contato com a CGLAB para indicar alternativas de envio.

O monitoramento da resistência das populações de *Ae. aegypti* a inseticidas com quantidade maior de municípios e melhor distribuição espacial, pode contribuir para o manejo adequado das alternativas com base em conhecimento sobre o perfil e dos mecanismos de resistência

envolvidos. Os municípios indicados para o monitoramento em 2017/2018 foram definidos, junto às Secretarias Estaduais de Saúde, considerando-se os seguintes aspectos:

- a) Distribuição espacial abrangendo todo o território brasileiro;
- b) Índices de infestação pelo vetor suficientes para realização da coleta de ovos;
- c) Histórico de transmissão de dengue importante;
- d) Regiões em fronteira com outros países;
- e) Capacidade operacional do Programa Municipal de Controle da Dengue para realizar as coletas.

A lista dos municípios selecionados para o monitoramento da resistência segue no Anexo I.

Para realização dos testes, os municípios deverão instalar ovitrampas (armadilhas de oviposição do *Aedes aegypti*) em residências selecionadas por amostragem, coletar os ovos e enviar o material ao laboratório estadual de entomologia. As armadilhas, palhetas, vídeo e cartilhas com instruções necessárias para a coleta e envio de amostras serão fornecidos pela FIOCRUZ e Ministério da Saúde. Para maior qualidade e confiabilidade dos resultados, a coleta e envio devem seguir as orientações estabelecidas.

Ressaltamos que o preenchimento das informações solicitadas na ficha que acompanha as amostras como data e local de coleta deve ser cuidadosamente observado pelos Agentes de Controle de Endemias.

As coletas de ovos foram antecipadamente programadas, junto às Secretarias Estaduais de Saúde, considerando-se o período chuvoso e a distribuição de envio de amostras no segundo semestre de 2017 e primeiro semestre de 2018. Esta programação visa não sobrecarregar o laboratório. Segue no Anexo II o calendário previsto para coletas de ovos.

O envio do material biológico ao laboratório deve ocorrer imediatamente após o término das coletas, visando evitar perda de material uma vez que após trinta dias, o índice de eclosão pode ser prejudicado. O laboratório estadual receberá essas amostras e, por sua vez, encaminhará ao LAFICAVE/FIOCRUZ.

Os resultados dos testes realizados serão enviados à CGPNCMD/MS e CGLAB/MS para análise subsidiando a tomada de decisões quanto ao manejo de inseticidas utilizados e discussão junto ao Comitê Técnico Assessor sobre as decisões a serem tomadas.

III- DA SOLICITAÇÃO

Para prosseguimento às ações planejadas para o monitoramento da resistência, solicitamos que as Secretarias de Saúde dos municípios selecionados manifestem oficialmente sua intenção de participação, encaminhando Ofícios às Coordenações Estadual e Nacional do Programa de Controle da Dengue na Secretaria Estadual de Saúde e no Ministério da Saúde (CGPNCMD).

Brasília, 31 de maio de 2017.



Evino Valero Martins
Coordenador Geral da CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS

De acordo

Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

Anexo I - Municípios selecionados para monitoramento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas

UF	MUNICÍPIO
AC	Brasiléia
	Cruzeiro do Sul
	Assis Brasil
	Rio Branco
	Sena Madureira
AM	Tabatinga
	Coari
	Humaitá
	Manaus
	São Gabriel da Cachoeira
AP	Calçoene
	Macapá
	Oiapoque
	Pedra Branca do Amapari
PA	Laranjal do Jari
	Altamira
	Belém
	Itaituba
	Tucuruí
	Redenção
	Breves
	Santarém
Xinguara	
RO	Marabá
	Cacoal
	Guajará-Mirim
RR	Ariquemes
	Porto Velho
	Vilhena
RR	Boa Vista
	Rorainópolis
TO	Araguaína
	Gurupi
	Palmas
	Dianópolis

UF	MUNICÍPIO
AL	Arapiraca
	Delmiro Gouveia
	Maceió
	Santana do Ipanema
BA	Barreiras
	Teixeira de Freitas
	Brumado
	Irecê
	Itabuna
CE	Salvador
	Serrinha
	Aracati
	Crateús
	Fortaleza
	Icó
MA	Juazeiro do Norte
	Quixadá
	Sobral
	Bacabal
	Balsas
PB	Barra do Corda
	Imperatriz
	São Luís
PB	Alagoa Grande
	João Pessoa
PE	Campina Grande
	Souza
	Araripina
	Garanhuns
	Palmares
	Petrolina
	Recife
Salgueiro	
Santa Cruz do Capibaribe	

UF	MUNICÍPIO
PI	Floriano
	Parnaíba
	Picos
	São Raimundo Nonato
RN	Teresina
	Mossoró
	Jardim do Seridó
	Natal
	Pau dos Ferros

UF	MUNICÍPIO
DF	Brasília
GO	Cristalina
	Goânia
	Iporá
	Jataí
	Minaçu
	Morrinhos
	Posse
	Três Lagoas
MS	Campo Grande
	Corumbá
	Coxim
	Dourados
	Ponta Porã
	Três Lagoas
MT	Alta Floresta
	Barra do Garças
	Água Boa
	Confresa
	Cuiabá
	Juína
	Pontes e Lacerda
	Rondonópolis
Sinop	
PR	Londrina
	Francisco Beltrão
	Paranavaí
	Maringá
	Foz do Iguaçu
RS	Quaraí
	Passo Fundo
	Santa Rosa
	Gravataí
	Santa Maria

UF	MUNICÍPIO
SC	Itajaí
	Chapecó
	São Miguel do Oeste
	Florianópolis
	Xanxerê
ES	Cachoeiro do Itapemirim
	Nova Venécia
	Aracruz
MG	Vitória
	Belo Horizonte
	Bom Despacho
	Governador Valadares
	Montes Claros
	Unai
	Patos de Minas
	Teófilo Otoni
	Uberaba
	Varginha
	Juiz de Fora
RJ	Angra dos reis
	Campos dos Goytacazes
	Nova Friburgo
	Rio de Janeiro
SE	Volta Redonda
	Aracaju
	Itabaiana
	Nossa Senhora da Glória
SP	Lagarto
	São Sebastião
	Presidente Prudente
	Ribeirão Preto
	Sorocaba
	São José do Rio Preto
São Paulo	

Anexo II - Cronograma proposto para coleta de ovos de *Aedes aegypti*

REGIÃO	UF	MUNICÍPIOS	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR
N	AC	5					X					
	AM	5					X					
	AP	5			X	X	X					
	PA	9	X	X	X	X	X					
	RO	5	X	X	X	X	X					
	RR	2			X	X						
	TO	4				X	X					
NE	AL	4				X	X					
	BA	7			X	X	X					
	CE	7	X	X								
	PB	4			X	X						
	PE	7			X	X	X					
	PI	5		X								
	RN	4	X	X								
	MA	5		X	X							
CO	SE	4				X	X					
	DF	2					X					
	GO	7			X	X	X					
	MS	6				X	X					
SE	MT	9				X	X	X				
	ES	4					X	X				
	RJ	5			X	X	X					
	MG	10								X	X	X
SUL	SP	6					X	X				
	PR	5				X	X					
	RS	5								X	X	
	SC	5							X	X		

Anexo II – Linha do tempo – emprego de inseticidas no PNCD – Parte da apresentação proferida pelo Ministério da Saúde na reunião sobre “Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* aos Inseticidas Utilizados pelo PNCD”.

Linha do tempo – emprego de inseticidas no PNCD

