

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS – EESC

LIDIA MOURA

Programas de controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): análise do efeito da temperatura ambiente sobre a eficiência do larvicida *Pyriproxyfen* em laboratório

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2019

LIDIA MOURA

Programas de controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): análise do efeito da temperatura ambiente sobre a eficiência do larvicida *Pyriproxyfen* em laboratório

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Ass. Juliano José Corbi

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M929p Moura, Lídia
 Programas de controle de *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae): análise do efeito da temperatura ambiente
sobre a eficiência do larvicida Pyriproxyfen em
laboratório / Lídia Moura; orientador Juliano José
Corbi. São Carlos, 2019.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2019.

 1. Reguladores de crescimento do inseto. 2.
Análogos do hormônio juvenil. 3. Inseticidas. 4.
Culicídeos. 5. Controle de vetores. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **LIDIA MOURA**.

Título da dissertação: "Programas de controle de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae): análise do efeito da temperatura ambiente sobre a eficiência do larvicida".

Data da defesa: 22/03/2019.

Comissão Julgadora:

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Dra. **Cristiane Matavelli**
(Bioagri Merieux The Nutriscience Company)

Dra. **Flávia Virgínio Fonseca**
(Instituto Butantan)

Resultado:

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

DEDICATÓRIA

Dedico, carinhosamente, a todos aqueles que acreditam que seja possível contribuir com a ciência brasileira como um fator de mudança social, mesmo em tempos tão sombrios como os que vivemos. Dedico, também, aos meus pais (Silvia e Valter) que, mesmo sem entenderem muito bem o campo científico, sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio para que o presente trabalho fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Uma vez, o professor Hernane Barud me disse que o momento de escrita da dissertação, sobretudo dos resultados, é o momento mais solitário de todo o processo. Pela experiência de escrever o devido trabalho devo concordar com ele, mas faço um adendo: sem o apoio, carinho e amor das pessoas que amamos, o processo todo perde o seu mais valioso sentido. Dito isso, alguns parágrafos são poucos pra expressar toda a minha gratidão àqueles que me são valiosos e é um sentimento que nem cabe no papel.

Agradeço aos meus pais, Silvia e Valter, por toda confiança, por todo amor e todo apoio, sem os quais não teria sido possível chegar neste momento. À minha avó, Marlene, pela convivência maravilhosa que sempre me deu forças pra me empenhar no meu trabalho, principalmente visando o retorno à sociedade.

Ao meu irmão, Fernando, por todo apoio, toda amizade, toda compreensão que fazem toda a diferença na minha vida e em todos os momentos dela. Uma grande inspiração pra mim.

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Juliano José Corbi, pela amizade construída, pela confiança no meu trabalho, pelas valiosas orientações e pela abertura para vida acadêmica.

Muito obrigada, Sá e Priscila, pelo acolhimento e orientação formidáveis, desde o momento de “desespero” de uma jovem ingressante ansiosa com a nova etapa na pós-graduação até a entrega da presente dissertação. Vocês são incríveis!

Agradeço muito ao professor Dr. Gustavo Enrique de Almeida Prado Alves Batista pela gentileza e pela abertura na pesquisa com *Aedes aegypti*, auxiliando diretamente na obtenção de desovas e por toda confiança e incentivo.

Agradeço aos professores Dr. Guilherme Gorni e Dra. Odete Rocha por todas as contribuições valiosas para os meus conhecimentos e, conseqüentemente, para a realização desse trabalho. São professores que me inspiram para a vida profissional, com toda a certeza.

Aos integrantes do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, por me receberem afetuosamente para conhecer e aprender sobre as ferramentas em morfometria geométrica. Muito obrigada, Karina Zanatta, Fernanda Almeida, Flávia Virgínio e Lincoln Suesdek.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos que ao longo do tempo se tornaram amigos. Obrigada pela companhia em momentos de trabalho e por todos os conselhos em momentos decisivos. A Aline, Bárbara, Carina, Mayara, Mara, Camila Geromel, Bruna, Gleyson e, especialmente ao José (que sempre foi um grande amigo e não somente um colega de laboratório) e ao Daniel (quem sempre faz muita falta), pois vocês ajudaram muito em momentos decisivos e nunca irei esquecer! Sem eles, a convivência no ambiente de trabalho não teria sido tão prazerosa como foi.

Agradeço à Kamila Jessie, a quem me refiro como um dos presentes que a pós-graduação me concebeu. Por toda a amizade, toda a confiança e incentivo que tornaram todo o processo muito

mais agradável (e por processo, quero me referir à vida também). Agradeço à Joseana Soares (MacGyver), pela amizade, pelo apoio, por toda a confiança que me acompanham desde o período da graduação e que fazem toda diferença na minha vida. Agradeço a ambas, em conjunto, pelo maravilhoso “Chá de Sexta” que trazem alento à alma.

Agradeço ao “Clube da Luluzinha” que é o apelido carinhoso para o grupo de mulheres mais incríveis que já conheci e que sempre estiveram comigo. Nessa fase não poderia ter sido diferente. Obrigada, Kátia Carnier, Ariane Silva, Rafaela “Redbass”, Karyna Neves, Isabela Pereira e Letícia Zago. Vocês fazem a vida valer a pena e me inspiram, independente da eventual distância geográfica.

Aos grandes amigos da Rep Fudida, que me acompanham desde o início da graduação e com quem sempre posso contar, não sendo diferente no período de trabalho da presente dissertação. Por todo apoio emocional e por tantas conversas produtivas, meu muito obrigada especial ao Jeremias (que dizem que se chama Ricardo), ao Iann e à Ana Carolina Rocha, que fazem toda diferença na minha vida.

Agradeço à Suzane Brochine pelo incentivo de sempre (desde o cursinho...é, estamos ficando velhas rs), pelas companhias nas corridas para acalmar a mente de tanto trabalho e por todo carinho. É um prazer imenso contar com a sua amizade!

Meu agradecimento ao grande amigo Rodrigo Elias Bianchi, que me incentivou e me lembrou que eu acreditasse em mim mesma para ingressar na carreira acadêmica. Por todo o carinho, todo o suporte e toda confiança: OBRIGADA VOCÊ!

Muito obrigada, Carol Ferreira pela amizade e toda diferença positiva que faz em minha vida mesmo em milhares de quilômetros de distância. Você é uma grande inspiração e tenho orgulho em ter sua amizade.

Obrigada, Thierry Vienna, pela amizade, pelos altos papos sobre biologia e outras ciências nas madrugadas em que estive produzindo esse trabalho. E por também me “ajudar a levantar” em momentos difíceis. Você é top.

Ao Ricardo Matta, pelo amor, incentivo e total confiança no meu ingresso na carreira acadêmica, que fizeram e ainda fazem toda a diferença.

Ao Victor, pela companhia diversas vezes ao laboratório, pelas diversas e ricas discussões sobre a ciência e por me estimular a ser uma pessoa mais forte, mesmo que da forma mais “difícil”.

Agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização desse trabalho.

“You, me, or nobody is gonna hit as hard as life. But it ain’t how hard you hit. It’s about how hard you can get hit and keep moving foward; how much you can take and keep moving foward. That’s how winning is done”

Rocky Balboa

RESUMO

MOURA, L. **Programas de controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): análise do efeito da temperatura ambiente sobre a eficiência do larvicida *Pyriproxyfen* em laboratório.** 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Programas brasileiros de controle populacional do mosquito *Aedes aegypti* são caracterizados por incluírem ações integradas entre população e poder público, compreendendo suplementarmente a aplicação de inseticidas nos potenciais criadouros do mosquito. Um dos compostos utilizados para o controle populacional de mosquitos é o *Pyriproxyfen*, um regulador de crescimento de insetos que age durante os estágios imaturos impedindo a emergência das larvas para a fase adulta. Muitas pesquisas, em condições laboratoriais controladas, encontraram resultados eficientes na aplicação desse larvicida, inferindo a confirmação de eficácia para uso nos programas de controle. Contudo, esses trabalhos disponíveis desconsideraram a interferência por fatores ambientais (e.g. temperatura, luminosidade, pH) o que, como consequência, pode apresentar diferenças nos resultados em ambiente natural. Dentre esses fatores, é importante o destaque a temperatura, que apresenta o potencial de produzir diferenças na eficiência do composto, uma vez que há evidências de interferência tanto na velocidade e no sucesso de desenvolvimento das larvas quanto da composição química do larvicida. Dessa forma, o presente trabalho avaliou o efeito da variação da temperatura na eficiência do larvicida *Pyriproxyfen* para controle populacional de larvas de *Aedes aegypti*. Para isso, foram realizados experimentos avaliando o efeito combinado de três diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C) e cinco diferentes concentrações de *Pyriproxyfen* (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg.L⁻¹), sendo as dosagens escolhidas em função da recomendação da Organização Mundial da Saúde (0,01 mg/L). Os testes foram realizados em incubadora BOD, com temperatura controlada desde a eclosão para evitar estresse térmico nas larvas. Também foi analisado o efeito sub letal do composto, nas respostas em longevidade dos mosquitos e do tamanho alar como indicador do tamanho das fêmeas provenientes dos tratamentos a 20°C e a 30°C. Quando aumentou-se a temperatura em 5°C (de 25°C para 30°C), houve redução em 30% da eficiência do larvicida na menor dosagem, redução de 10% da eficácia na concentração de 0,001 mg/L e redução em 20% na concentração de 0,01 mg/L. Para todas as concentrações testadas, os mosquitos sobreviventes tiveram sua longevidade reduzida significativamente se comparados aos mosquitos desenvolvidos em um ambiente sem o composto. Ainda, as fêmeas emergentes do ambiente a 30°C foram significativamente maiores que as fêmeas que se desenvolveram a 20°C. No que se refere ao tamanho de fêmeas, entre a mesma temperatura não houve diferença significativa com relação ao tamanho das asas. Estes resultados indicam que, apesar da alta eficiência do *Pyriproxyfen*, deve-se considerar com cautela a influência que os fatores ambientais têm sobre o efeito de compostos inseticidas no controle de vetores, uma vez que estes são capazes de interferir no cenário epidemiológico. Ademais, considerar dosagens diferentes de acordo com os fatores ambientais em campo pode trazer benefícios no uso mais racional de compostos inseticidas bem como serem mais eficientes no controle efetivo do vetor alvo.

Palavras-Chave: Reguladores de crescimento do inseto. Análogos do hormônio juvenil. Inseticidas. Culicídeos. Controle de vetores.

ABSTRACT

MOURA, L. **Surveillance programs for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control: Analysis of the temperature effect over the efficiency of Pyriproxyfen as a larvicide in laboratory conditions.** 2019. 109 p. Masters Dissertation (Master's degree in Science). São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos. 2019.

Surveillance Brazilian programs for populational control of the *Aedes aegypti* mosquito are characterized for applying integrated actions between the government and the municipalities population, comprising as a supplementary measure the application of pesticides. One of these compounds is Pyriproxyfen, an insect growth regulator that acts during the immature stages of the organism, therefore preventing its emergence to the adult stage. Many researches, at laboratory conditions, found efficient outcomes by testing this larvicide, inferring its confirmation of efficacy of application during the surveillance programs. However, these studies disconsider the possibility of interference by environmental factors, such as temperature, luminosity and pH variations. Among these factors, the environmental temperature is highlighted, considering the existing evidence of interference in the larval development and at the chemical composition of the larvicide. Thus, this study aims to assess the temperature effect over the efficiency outcomes of the Pyriproxyfen as a larvicide for *Aedes aegypti* control. Were executed experiments analyzing the combined effect of three different temperatures (20°C, 25°C, 30°C) and five concentrations of Pyriproxyfen (0,0001 mg/L, 0,001 mg/L, 0,01 mg/L, 0,1 mg/L and 1 mg/L). These tests were performed in a BOD incubator, with controlled and constant temperature, since the eclosion of the I instar larvae until the end of the test. Dead larvae were removed and registered daily. Were analyzed the sub-lethal outcomes, by the longevity of the survivors and were calculated the wing size of the females from 20°C and 30°C as an indicator of body size of these female mosquitoes. When increased 5°C in the temperature, from 25°C to 30°C, were observed a decrease in the efficiency of the larvicide by 30% at the lowest concentration, by 10% at a ten times higher concentration (0,001 mg/L) and a decrease by 20% at the concentration of 0,01 mg/L. For all concentrations assessed, the survivors lived less time than the mosquitoes which developed at a natural ambient without the Pyriproxyfen contamination. Yet, the females from the warmest environment, at 30°C, were bigger than the females that developed in a cooler environment (20°C). The results indicate that, despite of the high efficiency of this larvicide, we must consider with caution the influence by environmental factors in field conditions, since that they present the possibility of interfering directly or indirectly at the epidemiologic scenario. Furthermore, considering different dosages according to the environmental factors in the field can bring benefits in the more rational use of insecticidal compounds as well as being more efficient in the effective control of the target vector.

Keywords: Insect growth regulators. Juvenile hormone analogs. Insecticides. Culicidae. Vector control.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| 20E | 20-hidroxiectidisona |
| ACE | Agentes de combate a endemias |
| ACS | Agentes comunitários de saúde |
| DDT | Diclorodifeniltricloroetano |
| DNPCED | Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue |
| IE | Inibição de emergência |
| IE ₅₀ | Inibição de emergência para 50% da população |
| IE ₉₅ | Inibição de emergência para 95% da população |
| IGR | <i>Insect Growth Regulators</i> – Regulador de crescimento do inseto |
| JHA | <i>Juvenile Hormone Analogs</i> – Análogos do hormônio juvenil |
| LEAA | Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos |
| MoReNAa | Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>Aedes aegypti</i> à Inseticidas |
| MS | Ministério da Saúde |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PNCD | Programa Nacional de Controle da Dengue |
| TC | Tamanho do centroide |
| USP | Universidade de São Paulo |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> (Silgueiro, 2016) | 23 |
| Figura 2 - Exúvia de uma larva de <i>Aedes aegypti</i> | 25 |
| Figura 3 - Fotografia de um <i>Aedes aegypti</i> adulto (fêmea) (Gathany,2006) | 26 |
| Figura 4 - Estrutura química do hormônio juvenil III (sesquiterpenoide) encontrado em <i>Ae. aegypti</i> (Riddiford, 2012) | 38 |
| Figura 5 - Estrutura química do <i>Pyriproxyfen</i> (Riddiford, 2012)..... | 39 |
| Figura 6 - Desova de <i>Aedes aegypti</i> fixada em papel filtro..... | 42 |
| Figura 7 - Preparação da solução estoque de <i>Pyriproxyfen</i> (5mg/L). a) trituração manual do Sumilarv 0,5G®; b) agitação da solução estoque de <i>Pyriproxyfen</i> em agitador magnético.... | 44 |
| Figura 8 - Exemplo de configuração experimental do tratamento com <i>Pyriproxyfen</i> | 45 |
| Figura 9 - Desenho experimental para os testes com <i>Pyriproxyfen</i> em diferentes temperaturas..... | 46 |
| Figura 10 - Método de criação dos mosquitos adultos para análise de longevidade..... | 48 |
| Figura 11 - Localização e sequência dos marcos anatômicos utilizados para o cálculo do tamanho do centroide (Lorenz et al., 2017) | 49 |
| Figura 12 - Análise descritiva da eficiência do larvicida (% de inibição de emergência) com aplicação de 0,0001 mg/L em diferentes temperaturas..... | 53 |
| Figura 13 - Análise descritiva da eficiência do larvicida (% de inibição de emergência) com aplicação de 0,001 mg/L em diferentes temperaturas..... | 55 |
| Figura 14 - Análise descritiva da eficiência do larvicida (% de inibição de emergência) com aplicação de 0,01 mg/L em diferentes temperaturas..... | 56 |
| Figura 15 - Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambiente não contaminado pelo larvicida (experimento controle)..... | 62 |
| Figura 16 - Histograma de Kolmogorov-Smirnov para teste de normalidade dos dados referentes à longevidade dos mosquitos produzidos no experimento controle..... | 63 |
| Figura 17 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle na temperatura de 20°C..... | 64 |
| Figura 18 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle na temperatura de 25°C..... | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle na temperatura de 30°C..... | 66 |
| Figura 20 - Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambientes não contaminados (experimento controle) e de mosquitos sobreviventes a diferentes doses de Pyriproxyfen (Temperatura: 20°C)..... | 68 |
| Figura 21 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,0001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> | 69 |
| Figura 22 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> | 70 |
| Figura 23 - Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambientes não contaminados (experimento controle) e de mosquitos sobreviventes a diferentes doses de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 25°C)..... | 71 |
| Figura 24 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,0001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 25°C)..... | 71 |
| Figura 25 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 25°C)..... | 72 |
| Figura 26 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 25°C)..... | 73 |
| Figura 27 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes diferentes concentrações (mg/L) de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 25°C)..... | 73 |
| Figura 28 - Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambientes não contaminados (experimento controle) e de mosquitos sobreviventes a diferentes doses de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 30°C)..... | 74 |
| Figura 29 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes às concentrações de 0,0001 e 0,001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 30°C)..... | 75 |
| Figura 30 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> (Temperatura: 30°C)..... | 76 |
| Figura 31 - Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos sobreviventes a diferentes concentrações (mg/L) de <i>Pyriproxyfen</i> e em diferentes temperaturas (°C)..... | 77 |
| Figura 32 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,0001 | |

| | |
|--|-----|
| mg/L de Pyriproxyfen em diferentes temperaturas (°C)..... | 78 |
| Figura 33 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> em 20°C e em 25°C..... | 79 |
| Figura 34 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> em 25°C e em 30°C..... | 79 |
| Figura 35 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> em 25°C e em 30°C..... | 80 |
| Figura 36 - Ilustração dos marcos anatômicos das asas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> , escolhidos para o teste de repetibilidade..... | 83 |
| Figura 37 - Análise descritiva dos tamanhos do centroide (em milímetros) das asas de fêmeas sobreviventes aos diferentes tratamentos com <i>Pyriproxyfen</i> a 20°C..... | 84 |
| Figura 38 - Análise descritiva dos tamanhos do centroide (em milímetros) das asas de fêmeas sobreviventes aos diferentes tratamentos com <i>Pyriproxyfen</i> a 30°C..... | 85 |
| Figura 39 - Tamanho dos centroides (mm) das asas de fêmeas sobreviventes à 0,0001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> em 20°C e em 30°C..... | 85 |
| Figura 40 - Tamanho dos centroides (mm) das asas de fêmeas sobreviventes à 0,001 mg/L de <i>Pyriproxyfen</i> em 20°C e em 30°C..... | 86 |
| Figura 41 - Tamanho dos centroides (mm) das asas de fêmeas oriundas de desenvolvimento em ambiente ausente de larvicida <i>Pyriproxyfen</i> (experimento controle) em 20°C e 30°C..... | 86 |
| Figura 42 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da amostra de mortalidade das larvas (Controle – 20°C)..... | 103 |
| Figura 43 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da amostra de eficiência do larvicida (0,0001 mg/L – 20°C) | 104 |
| Figura 44 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,001 mg/L – 20°C)..... | 104 |
| Figura 45 - Histograma elaborado para o teste de normalidade de eficiência do larvicida (0,01 mg/L – 20°C)..... | 105 |
| Figura 46 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da amostra de mortalidade das larvas (Controle – 25°C)..... | 105 |
| Figura 47 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da mortalidade das larvas (0,0001 mg/L – 25°C)..... | 106 |
| Figura 48 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,001 mg/L – 25°C)..... | 106 |
| Figura 49 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,01 mg/L 25°C)..... | 107 |

| | |
|---|-----|
| Figura 50 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (Controle - 30°C)..... | 107 |
| Figura 51 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,0001 mg/L 30°C)..... | 108 |
| Figura 52 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,001 mg/L 30°C)..... | 108 |
| Figura 53 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,01 mg/L 30°C)..... | 109 |
| Figura 54 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,1 mg/L 30°C)..... | 109 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Eficiência média do larvicida <i>Pyriproxyfen</i> avaliado por meio da inibição de emergência para diferentes temperaturas. Concentrações em mg/L..... | 51 |
| Tabela 2a - Desvios padrão para os tratamentos com <i>Pyriproxyfen</i> | 52 |
| Tabela 2b - valores “p” obtidos no cálculo da estatística de Shapiro-Wilk..... | 52 |
| Tabela 3 - Valores “p” da estatística de Kruskal-Wallis para a eficiência do larvicida na concentração de 0,0001 mg/L para três temperaturas..... | 54 |
| Tabela 4 - Valores “p” da estatística de Kruskal-Wallis para a eficiência do larvicida na concentração de 0,001 mg/L para três temperaturas..... | 55 |
| Tabela 5 - Valores “p” da estatística de Kruskal-Wallis para a eficiência do larvicida na concentração de 0,01 mg/L para três temperaturas..... | 56 |
| Tabela 6 - Concentração referente à inibição de emergência para 50% e para 95% da população de <i>Ae. aegypti</i> testada para diferentes condições de temperatura..... | 57 |
| Tabela 7 - Comparativo entre os valores para IE50 encontrados por diferentes autores em relação a IE50 calculada no presente trabalho..... | 59 |
| Tabela 8 - Distribuição de quantidades de machos e fêmeas obtidos no experimento controle e suas respectivas porcentagens para cada tratamento..... | 61 |
| Tabela 9 - Número e porcentagem de indivíduos sobreviventes aos tratamentos com <i>Pyriproxyfen</i> , nas diferentes concentrações (mg/L) e temperaturas (°C)..... | 67 |
| Tabela 10 - Machos e fêmeas sobreviventes em cada concentração (mg/L) de <i>Pyriproxyfen</i> e em diferentes temperaturas (°C)..... | 67 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 22 |
| 2.1 <i>Aedes aegypti</i> | 22 |
| 2.2 <i>Aedes aegypti</i> e as arboviroses..... | 28 |
| 2.3 Programas de controle de <i>Aedes aegypti</i> | 32 |
| 2.4 Classes de inseticidas aplicados no controle de <i>Aedes aegypti</i> | 34 |
| 2.5 Reguladores de crescimento do inseto (IGRs) e o <i>Pyriproxyfen</i> | 36 |
| 2.6 Influência de fatores ambientais: temperatura ambiente..... | 39 |
| 3. HIPÓTESE E OBJETIVOS..... | 41 |
| 3.1 Hipótese..... | 41 |
| 3.2 Objetivo geral..... | 41 |
| 3.3 Objetivos específicos..... | 41 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 41 |
| 4.1 Criação de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório..... | 42 |
| 4.2 Larvicida..... | 43 |
| 4.3 Bioensaios..... | 43 |
| 4.4 Avaliação da eficiência do larvicida..... | 46 |
| 4.5 Longevidade dos indivíduos sobreviventes..... | 47 |
| 4.6 Análise de morfometria geométrica alar das fêmeas Tamanho do centroide..... | 48 |
| 4.7 Análises estatísticas..... | 49 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 51 |
| 5.1 Análise de eficiência do larvicida <i>Pyriproxyfen</i> em diferentes temperaturas e concentrações..... | 51 |
| 5.2 Análise da longevidade dos mosquitos sobreviventes ao <i>Pyriproxyfen</i> | 61 |
| 5.2.1 Perfil de longevidade dos mosquitos provenientes dos experimentos controle..... | 61 |
| 5.2.2 Perfil de longevidade dos sobreviventes a diferentes concentrações de <i>Pyriproxyfen</i> | 66 |
| 5.3 Análise da morfometria alar das fêmeas – Tamanho dos centroides..... | 83 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.3.1 | Teste de repetibilidade..... | 83 |
| 5.3.2 | Tamanhos do centroide..... | 83 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 88 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 90 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |
| 9. | APÊNDICE A - Histogramas resultantes da aplicação do teste de normalidade Shapiro-Wilk para diferentes conjuntos de amostras dos testes de eficiência do larvicida..... | 103 |

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por artrópodes são grandes preocupações para a saúde pública no Brasil e no mundo, pois podem causar uma variedade de diagnósticos clínicos, desde moderados, até quadros em que haja ameaça a vida do paciente (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). As doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), como a dengue, merecem destaque: só no continente americano, a incidência dessa enfermidade aumentou em 30 vezes nos últimos 50 anos, sendo o intervalo de 2008 a 2012 correspondentes a mais de 1,2 milhão de casos de dengue registrados a cada ano (ARAUJO et al. 2015). Segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde (2017), no Brasil, durante os últimos cinco anos houve em média, 1.164.082 incidências registradas por ano.

De acordo com Braga e Valle (2007), a dengue é endêmica na África (destacando a região setentrional), nas Américas (principalmente na região centro-sul), no Leste do Mediterrâneo, no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico. Todos os locais se encontram nas faixas de regiões tropicais e, conseqüentemente, apresentam condições propícias ao sucesso reprodutivo do mosquito *Ae. aegypti*, o qual está também altamente adaptado às condições urbanas. Dessa forma, a expansão da urbanização propiciou aumento do número de habitats disponíveis para populações de *Ae. aegypti*, bem como o aumento da frequência de migrações globais elevaram o potencial de disseminação dos vírus transmitidos pelo mosquito (MORRISON, 2008).

Na ausência de uma vacina efetiva e acessível para todas as viroses transmitidas, tampouco um tratamento específico, Lau et al (2015) relatam que abordagens integradas de controle ao vetor apresentam resultados promissores, e nestas estão inclusas ações que objetivam eliminação dos criadouros do mosquito, utilização de inseticidas, controle biológico e educação ambiental (BRAGA; VALLE, 2007). No entanto, vários estudos têm reportado o desenvolvimento de populações de mosquito resistentes aos inseticidas utilizados nestes programas de controle populacional (SILVA; COUTINHO; OLEA, 2012; MACORIS et al., 2014; DIAS, 2015; CHEDIK et al., 2016), principalmente ao “temephos”, um organofosforado que foi durante muito tempo o larvicida mais utilizado para combate ao *Ae. aegypti* (GARCIA et al., 2018).

Recentemente, os compostos sugeridos para aquisição pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) e recomendados pela seção de pesticidas da Organização Mundial da Saúde (WHOPES – *World Health Organization Pesticide Evaluation Escheme*) são: Bti

(*Bacillus thuringiensis*, espécie de bactéria que causa letalidade nas larvas por meio da liberação de endotoxinas) , *Di-flubenzuron*, *Novaluron*, *Pyriproxyfen* e *Spinosad* (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012). Como subsídio à estratégia para o manejo de resistência, é recomendada a utilização rotacionada dos larvicidas, aplicando uma única classe de larvicidas por um período máximo de quatro anos, com posterior reavaliação do nível de suscetibilidade das populações de *Ae. aegypti* (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012).

Neste contexto, o Ministério da Saúde (MS) (2014) deliberou pela substituição do larvicida outrora aplicado (*Novaluron*) pelo *Pyriproxyfen*, um composto cujo modo de ação se dá pela inibição do desenvolvimento das larvas por meio de análogos de hormônios juvenis presentes em sua composição (SCHAEFER; MULLIGAN, 1991; ISHAAYA; HOROWITZ, 1995). O MS (2014), segue as orientações disponibilizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2006), que recomenda a aplicação da concentração de 0,01 mg/L de ingrediente ativo (*Pyriproxyfen*) para controle populacional dos estágios larvas de *Aedes aegypti*.

Em condições laboratoriais, o *Pyriproxyfen* tem demonstrado alta eficiência na inibição da emergência dos indivíduos expostos (MAOZ, 2017), sendo que as respostas avaliadas pelos bioensaios, são expressas e avaliadas em termos da concentração eficiente para inibição de emergência das larvas, devido ao modo de ação do composto. No entanto, esses experimentos ao serem realizados em condições altamente controladas, tendem a desconsiderar a possibilidade de interferência nos resultados pelas variações das condições ambientais que ocorrem no ambiente natural (VAN den BRINK; KLEIN; RICO, 2017). Uma dessas condições é a temperatura do ambiente, sendo que sua variação já é conhecida por influenciar no tempo de desenvolvimento do mosquito (CHRISTOPHERS, 1960; CARRINGTON et al, 2013, GRECH et al, 2015; ZELLER; KOELLA, 2016) e na composição química do larvicida *Pyriproxyfen* (SULLIVAN; GOH, 2008).

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o efeito de diferentes temperaturas na eficiência do larvicida *Pyriproxyfen* como um agente de controle das populações de *Ae. aegypti*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aedes aegypti*

A classe Insecta é composta por, aproximadamente, 80% das espécies animais conhecidas e descritas, a qual apresenta grande diversidade adaptativa com ocorrência em praticamente todos os ambientes (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Esta classe é importante, pois está relacionada a outras espécies por meio de diversas relações ecológicas, exercendo influência no equilíbrio ecológico da biota. De acordo com Trindade et al (2004), os insetos atuam em diversos serviços ecossistêmicos como, por exemplo, na polinização, serviço essencial para a conservação da biodiversidade. No entanto, alguns insetos representam pragas tanto agrícolas quanto urbanas, tendo potencial de acarretar diversos danos à população humana (TRINDADE et al., 2004).

A ordem Diptera, que possui como representantes moscas e mosquitos, é composta por insetos cuja estrutura alar compreende um par de asas funcionais e membranosas, com asas posteriores atrofiadas. A família Culicidae, pertencente a ordem Diptera, é composta por diversos mosquitos que representam riscos à saúde pública, devido ao seu potencial de transmissão de patógenos aos seus hospedeiros vertebrados por meio do processo de hematofagia das fêmeas (i.e. que alimentam-se do sangue de outros animais) (ARIANI et al., 2015). A descoberta, no final do século XIX, que a malária e a dengue são transmitidas pela hematofagia de mosquitos, incentivou e aumentou o interesse na descrição e classificação desses insetos (HARBACH; KITCHING, 1998).

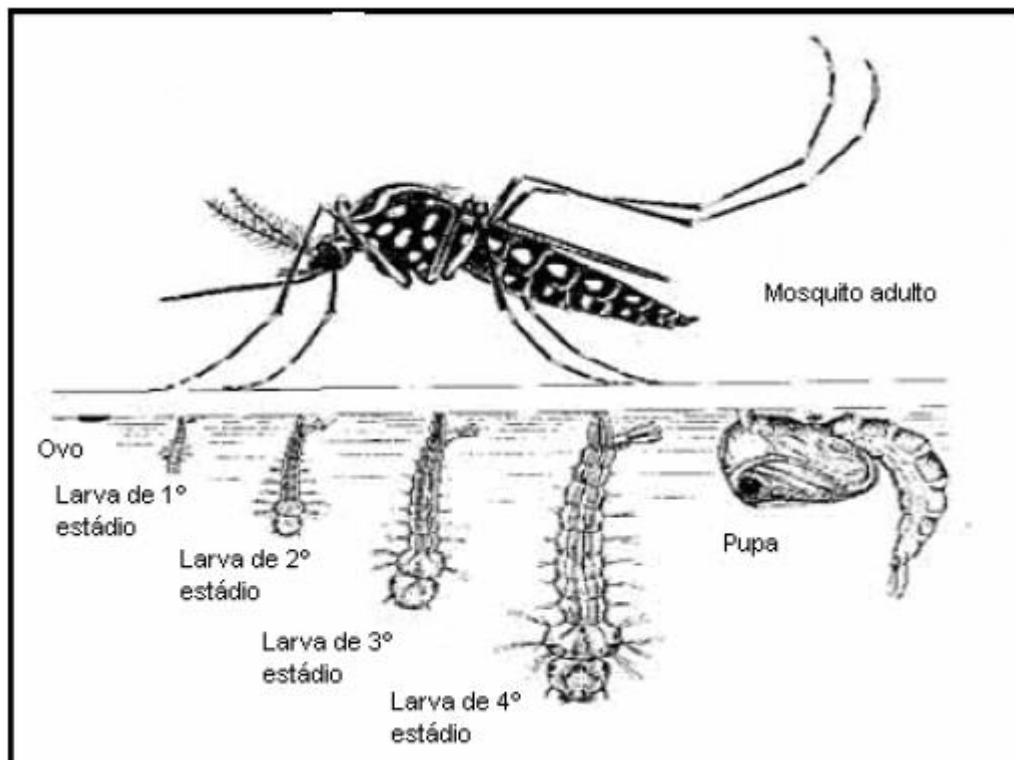
O *Ae. aegypti* é um mosquito da ordem Diptera, pertencente à família Culicidae. Este mosquito, segundo Christophers (1960), é de origem africana e possui como ancestral uma espécie selvagem do gênero *Aedes*, o qual apresentava características generalistas, com desenvolvimento larval em buracos de árvores preenchidos, temporariamente, com água proveniente das chuvas. Sua invasão e adaptação bem-sucedida nos ambientes antropizados e, posteriormente, urbanos, foi favorecida por meio da intervenção humana. O início do estabelecimento das primeiras populações de *Ae. aegypti*, no Brasil, é correlacionada às grandes navegações dos colonizadores portugueses no século XVI que, ao fazerem a rota entre o continente africano e o Brasil trazendo populações africanas escravizadas, realizavam, como consequência, o transporte dos mosquitos (CHRISTOPHERS, 1960).

Ae. aegypti é uma espécie cosmopolita com distribuição em diversos países tropicais e subtropicais, bem adaptada aos ambientes urbanos (LOUNIBOS, 2002; BROWN et al., 2014; BYTTEBIER; DE MAJO; FISCHER, 2014). Embora as mudanças na paisagem ocasionadas

pela ação humana sejam relacionadas com a consequente alteração ou destruição de habitats para várias espécies, para o *Ae. aegypti* estas mudanças atuaram na criação de novos habitats disponíveis (BROWN et al., 2014). Os locais de reprodução para o mosquito são, geralmente, recipientes de plástico, borracha ou vidro, que podem ser preenchidos com baixo volume de água (e.g. pneus, garrafas PET, vasos) e que são abundantes devido, especialmente, a intensa urbanização, característica da transição entre os séculos XIX e XX (GUBLER, 2011).

O ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti* é do tipo holometábolo (i.e. apresenta metamorfose completa), compreendendo quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os estágios larvais e de pupa são aquáticos enquanto o estágio adulto é terrestre.

Figura 1 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti*



Fonte: Ministério da Saúde.

A fase larval do mosquito apresenta, ao todo, quatro estádios. O desenvolvimento completo do período larval pode variar entre sete e 23 dias, pois o tempo e o sucesso do desenvolvimento das larvas são diretamente influenciados pela temperatura do ambiente, pela disponibilidade de alimento e pela densidade populacional (IMAM et al., 2014).

A fêmea do mosquito realiza a postura dos ovos em ambientes próximos a lâminas d'água superficiais, em recipientes sombreados com água e preferencialmente pobre em matéria orgânica (DIAS, 2015). Logo após a oviposição, a desova é permeável à água por um período

aproximado de 20 horas, e após esse período ocorre o desenvolvimento da cutícula serosa que é uma camada impermeável com função protetiva (REZENDE et al., 2008). A camada impermeável confere a característica de quiescência dos ovos, a qual é responsável pela interrupção temporária do desenvolvimento embrionário no contexto em que o ambiente não apresenta umidade suficiente para o desenvolvimento do organismo (CHAPMAN, 1969).

Durante o período de quiescência, os ovos consomem suas reservas de glicogênio e proteína em um processo dinâmico, sem refletir em mudanças significativas nos aspectos morfológicos (DA SILVA et al., 2019). Segundo Silva e Silva (1999), os ovos podem permanecer nesse estado de quiescência, sem redução significativa de sua viabilidade por 492 dias, mas apresentam taxa de eclosão ótima por um período de 121 dias.

De acordo com Da Silva et al (2019), a aptidão proporcionada pela quiescência confere uma vantagem adaptativa à espécie, pois garante maior taxa de sucesso reprodutivo e conclusão do ciclo de vida. Além disso, permite que uma desova remanescente do final de uma estação chuvosa possa eclodir na estação chuvosa seguinte, propiciando o aumento da população de mosquitos ao garantir a estabilidade populacional dos mesmos ao longo do tempo (BYTTEBIER; DE MAJO; FISCHER, 2014).

Após a eclosão, as larvas em seu primeiro estágio possuem comprimento corporal na ordem de poucos milímetros, podendo dobrar seu tamanho durante essa etapa (CHRISTOPHERS, 1960). As larvas são compostas externamente por um exoesqueleto e, por causa de sua composição, é inapta a se esticar e se acomodar ao crescimento do animal, pois uma vez secretado e endurecido, não pode ser aumentado (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). Para o crescimento, a larva passa por um processo de dissolução do exoesqueleto simultâneo a secreção e reconstituição de um novo exoesqueleto que acomode apropriadamente o crescimento dos órgãos e tecidos internos, processo denominado ecdise (SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016). De acordo com Christophers (1960), o início da ecdise é marcado pela separação das células epidérmicas da cutícula, produzindo um espaço que é preenchido pelo fluido ecdisial que, por meio de sua ação enzimática, dissolve a camada interior da cutícula que foi produzida no fim do estágio anterior, deixando espaço para o desenvolvimento da cutícula nova e maior, adequada ao comprimento da larva em seu novo ínstar (Figura 2).

Figura 2 – Exúvia de uma larva de *Aedes aegypti* (à esquerda na imagem)



Fonte: Acervo pessoal do autor (2018).

As larvas de *Ae. aegypti* são vermiformes e alongadas, com corpo dividido entre cabeça, tórax e abdômen, sendo a cabeça de formato globular e o abdômen constituído por oito segmentos (FORATTINI, 1962). O último seguimento abdominal apresenta quatro brânquias lobuladas, para regulação osmótica, e um sifão respiratório que os permite subir à superfície para respirar oxigênio atmosférico (ANJOLETTE; MACORIS, 2016; BAGLAN; LAZZARI; GUERRIERI, 2017).

A presença do sifão respiratório atribui uma vantagem adaptativa em relação às larvas de outras espécies de mosquito, uma vez que torna possível sua sobrevivência mesmo em ambientes com concentrações baixas de oxigênio dissolvido. Beserra et al (2009) relataram a capacidade das larvas de *Ae. aegypti* de se desenvolverem em ambientes com elevados graus de poluição orgânica, como em esgoto bruto (0,12 mg/L de oxigênio dissolvido) e efluente de filtro anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (0,46 mg/L de oxigênio dissolvido) sendo a mortalidade larval atribuída ao aumento da viscosidade do líquido, a qual dificulta a emersão dos indivíduos à superfície. As larvas se alimentam de partículas orgânicas presentes no meio aquático e as pupas, por sua vez, não se alimentam até completar a emergência para a fase adulta (CHRISTOPHERS, 1960).

Os adultos da espécie são facilmente identificáveis por suas características morfológicas: escamas alternadas entre brancas e escuras, desenho em forma de lira composto por escamas branco-prateadas e um escudo recoberto por escamas mais escuras (REY, 2008) (Figura 3). As fêmeas apresentam antena pilosa enquanto os machos apresentam a antena plumosa.

Figura 3 - Fotografia de um *Aedes aegypti* adulto (fêmea)



Fonte: James Gathany, Centers for Disease Control and Prevention (2006)

As asas dos adultos de *Ae. aegypti* são estruturas rígidas e planas, as quais apresentam um padrão de venação intrínseco que diferem apenas em poucos detalhes de outras espécies (SENDAYDIEGO; TORRES; DEMAYO, 2013). A variabilidade do tamanho das asas é influenciada tanto por fatores abióticos, como disponibilidade e qualidade do alimento durante o desenvolvimento larval e temperatura, quanto por fatores bióticos, como sua capacidade enquanto vetores de vírus, peso, tamanho e fecundidade potencial das fêmeas (JIRAKANJANAKIT et al., 2007; DUJARDIN, 2008; HENRY et al., 2010; SENDAYDIEGO; TORRES; DEMAYO, 2013; LORENZ et al., 2017). Desse modo, as asas são indicadores eficientes da aptidão reprodutiva dos indivíduos.

De acordo com Dias (2015), os mosquitos, de ambos os sexos, alimentam-se do néctar de fluidos açucarados proveniente principalmente de vegetais, porém a fêmea realiza também o repasto sanguíneo para maturação dos ovários, sendo escolhidas aves e mamíferos, com

preferência em humanos, para esse tipo de alimentação (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001).

A fêmea de *Ae aegypti* é habilidosa em escapar de ser morta por seu potencial hospedeiro durante o repasto sanguíneo: qualquer movimento da vítima a faz abandoná-la rapidamente e, logo após, pode atacá-la novamente ou procurar nova fonte de alimentação (PEDROSA, 2013). O comportamento da fêmea na busca de hospedeiros é também influenciado após o acasalamento com o macho, devido ao depósito de uma secreção de sua glândula acessória que auxilia na indução desse comportamento nas fêmeas grávidas (FERNANDEZ; KLOWDEN, 1995). A ingestão de sangue provê aminoácidos necessários para a síntese de proteínas no desenvolvimento do vitelo, ocasionando a cascata endócrina que resulta na maturação dos ovários (ADAMS, 1999).

No entanto, é possível que as fêmeas consigam maturar seus ovos sem a presença do sangue, característica denominada autogenia, a qual é diretamente dependente das condições ambientais e, principalmente, de fatores genéticos (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005). Altas temperaturas, nutrição larval ótima e fartas provisões açucaradas para os adultos aumentam a habilidade de autogenia das fêmeas (ARIANI et al., 2015). Segundo Adams (1999), quando há abundância de flores no ambiente, as fêmeas tendem a usar açúcar como uma fonte de energia e não o sangue, o que representa mais uma característica que demonstra a adaptabilidade do *Ae. aegypti* a diferentes condições ambientais.

Embora a autogenia seja possível, o ambiente urbano invadido pelo *Ae. aegypti* dificilmente compreende as condições ótimas para expressão dessa característica. Considerando que as fêmeas apresentam cerca de cinco a dez atividades reprodutivas ao longo de sua vida (McFIE, 1915), essa espécie de mosquito ainda representa problemas às autoridades de saúde pública pela capacidade de transmitirem vírus durante a hematofagia em hospedeiros humanos.

Diante de uma situação em que o hospedeiro a ser picado tenha um dos sorotipos de vírus com ciclo compatível ao *Ae aegypti*, a fêmea pode se tornar infectada e passar a infectar outros indivíduos em suas futuras hematofagias. Não obstante, há registros na literatura de transmissão transovariana dos sorotipos da dengue (VELANDIA-ROMERO et al, 2017), na qual a fêmea infectada transmite o vírus a sua prole, evidenciando que não necessariamente a fêmea requer se alimentar de sangue infectado para adquirir os vírus.

2.2 *Aedes aegypti* e as arboviroses

Arbovírus (*Arthropod-borne viruses*) é um termo designado aos vírus que apresentam seu ciclo de replicação nos artrópodes, sendo transmitidos por meio da hematofagia desses indivíduos em hospedeiros vertebrados, com potencial em ocasionar doenças (LOPES; LINHARES; NOZAWA, 2014; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

Segundo Morrison et al (2008), os indivíduos da espécie *Ae. aegypti* são vetores primários de três doenças provenientes de arboviroses importantes do ponto de vista de saúde pública – a dengue, a chikungunya e a febre amarela urbana – sendo capazes de se tornarem vetores de outros vírus, como já provado recentemente pela ocorrência da primeira transmissão autóctone do Zika vírus por meio do mesmo vetor, na cidade de Natal, no estado do Rio Grande do Norte, no ano de 2015 (SLAVOV et al., 2016). De acordo com Chan e Johansson (2012), os vírus levam cerca de 15 dias (entre 5 e 33 dias, à 25°C) para se multiplicar, maturar e deslocar para as glândulas salivares do mosquito.

A alta taxa de transmissão dos patógenos é atribuída principalmente à presença de uma complexa combinação de compostos na saliva da fêmea, a qual é essencial para que o indivíduo consiga se alimentar do sangue e, conseqüentemente, transmitir os vírus (COUTINHO-ABREU; GUIMARÃES-COSTA; VALENZUELA, 2016). Estes compostos, como por exemplo a proteína Aegyptina, agem na inibição da coagulação sanguínea bloqueando a agregação e adesão das plaquetas do hospedeiro durante a alimentação da fêmea (CHAGAS et al., 2014).

A manifestação da dengue ocorre como uma doença febril aguda, cujo agente etiológico é um vírus RNA do gênero *Flavivirus* composto por quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUBLER, 2011). Os flavivírus são esféricos, relativamente pequenos (40 – 50 nm) e apresentam um invólucro de lipídio (GUBLER, 1998). Os quadros clínicos apresentam um amplo espectro, podendo ser desde assintomático e benigno, até um quadro mais grave de doença hemorrágica (TAUIL, 2001). A respeito da intensidade na qual os sintomas da dengue se manifestam, Bhatt e colaboradores (2013) apontaram em seu trabalho que, em 2010, mais de 200 milhões de casos se enquadraram em ocorrências nas quais os sintomas foram brandos, não refletindo na interrupção das atividades cotidianas para uma consulta médica por parte dos infectados. No entanto, neste contexto, as pessoas contaminadas ainda configuram um reservatório do arbovírus para o mosquito, uma vez que outras fêmeas podem passar a carregar os vírus ao se alimentar destas pessoas. Além disso, o fato de casos assim não serem devidamente registrados influencia diretamente nas estatísticas de ocorrência

da doença, o que pode mascarar o real cenário de contaminação viral (GUBLER, 2011; BHATT et al., 2013). É importante ressaltar que, por se tratar de uma manifestação viral, a doença não apresenta cura, sendo possível apenas o tratamento sintomático.

No campo econômico, as ocorrências de dengue representam custos diretos e indiretos, sendo custos diretos aqueles relacionados aos gastos no tratamento e hospitalização dos pacientes, enquanto custos indiretos estão correlacionados a inatividade dos infectados durante o período de tratamento dos sintomas. Nas Américas, no período de 2000 a 2007, o custo da dengue foi estimado em US\$2,1 bilhões sendo que o Brasil representou cerca de 42% deste montante (SHEPARD et al., 2011).

O Zika vírus (ZIKV), pertencente à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, foi descoberto e isolado a partir de um macaco-rhesus em 1947, na Floresta Zika em Uganda, leste da África, com a primeira suspeita de infecção humana sendo reportada em 1954, na Nigéria (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; MACNAMARA, 1954). O diagnóstico deste paciente teve interpretação imprecisa, devido coinfeção com malária, o que levou a registrar como primeira infecção oficialmente confirmada a partir de um caso em Uganda, entre 1962 e 1963. Até o início do século XIX, este vírus não esteve relacionado com a ocorrência de nenhuma epidemia, sendo identificado apenas em transmissões esporádicas. Dados históricos sugerem que transmissões “silenciosas” entre mosquitos, humanos e outros primatas ocorreu na África e na Ásia por mais de 70 anos (BAUD et al., 2017; GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017).

A introdução do vírus às populações completamente suscetíveis às infecções, na segunda metade do século passado, facilitou a disseminação para novas áreas uma vez que se trata de um vírus que não resultou em grandes epidemias até então e, como consequência, não há conhecimento adequado sobre o arbovírus e nem medidas rígidas de prevenção contra sua arbovirose (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; CALVEZ et al., 2018). Desta forma, o vírus foi introduzido no Brasil e, embora sua origem seja desconhecida, está provavelmente ligada à intensa circulação de turistas devido ao evento esportivo da Copa do Mundo de Futebol produzida e organizada pela Federação Internacional de Futebol, em 2014, os quais podem ter trazido o vírus consigo (GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017).

De acordo com Shuaib et al (2016), a manifestação sintomática da doença causada pelo Zika vírus, apresenta semelhanças com a manifestação da dengue: febre moderada a alta, erupções cutâneas, dores moderadas nas articulações, conjuntivite, dores de cabeça, edema nas mãos e nos pés e prostração. O que difere a enfermidade causada pelo Zika vírus dos quadros clínicos provocados pela dengue é o potencial de causar complicações crônicas afetando os domínios físicos e mentais, especialmente relacionados à fetos ainda em formação, os quais

podem desenvolver problemas auditivos e visuais, além de estarem sujeitos à microcefalia (MAURICE, 2016).

Em 2016, 58 países reportaram a ameaça do Zika vírus desde 2015, dos quais 41% reportaram 2.227 potenciais associações com a ocorrência de microcefalia e/ou má formação do feto, sendo que o Brasil correspondeu a 95% destes registros (RASMUSSEN et al., 2016). A epidemia no Brasil entre 2015 e 2016, teve suas maiores taxas de incidência da doença nas regiões Centro-Oeste, com 130,2 casos por 100.000 habitantes, e na região Nordeste, com 76 casos para cada 100.000 habitantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A chikungunya (CHIKV), por sua vez, é uma arbovirose causada por um vírus da família Togaviridae, gênero *Alphavirus*, o qual foi descrito pela primeira vez durante uma epidemia na Tanzânia em 1952 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Análises genéticas das cepas do vírus indicaram três linhagens distintas: uma linhagem asiática, a linhagem ECSA (*Eastern, Central and Southern Africa*) e uma linhagem africana (WEAVER; FORRESTER, 2015).

A primeira evidência direta de manifestação da chikungunya é proveniente da Tailândia, em 1958 (HAMMON et al., 1960). No Brasil, em 2014, as primeiras transmissões autóctones ocorreram no Amapá e, ao longo desse ano, foram registrados 2772 casos da doença (HONÓRIO et al., 2015).

A chikungunya se manifesta por quadros de febre iniciados subitamente e associados com intensas e debilitantes dores articulares que deram origem ao seu nome que, no idioma Makonde, significa “tornar-se curvado” (DONALISIO; FREITAS, 2015; HONÓRIO et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A infecção pelo vírus CHIKV também pode ocasionar efeitos crônicos, sendo mais relacionados a período prolongado de indisposição e artralgia no infectado, podendo persistir tais sintomas por anos (BURT et al., 2017).

A febre amarela, cujo agente etiológico é pertencente ao gênero *Flavivirus*, é uma doença infecciosa aguda que apresenta ciclos florestais e urbanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). De acordo com Degallier et al (1992), no ciclo florestal do continente americano, a febre amarela é transmitida por mosquitos pertencentes aos gêneros *Haemagogus* (*H. janthinomys* e *H. albomaculatus*) e *Sabethes* (*S. chloropterus*), sendo os primatas não humanos os principais infectados. Conforme relatou Vasconcelos (2003), apenas no ciclo urbano há a transmissão do arbovírus pelo *Ae. aegypti*, a qual ocorre diretamente nos humanos, e sua introdução nas áreas urbanas ocorre por meio de pessoas que transitam entre áreas florestais e urbanas. Humanos são infectados esporadicamente quando picados por mosquitos selvagens que se alimentaram previamente em macacos virêmicos, transportando o

vírus para as cidades (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Uma vez que o vírus é introduzido na área urbana, as pessoas infectadas desenvolvem a viremia, podem expressar a doença e servir de fonte de infecção a novos mosquitos (VASCONCELOS, 2003).

A febre amarela foi uma das maiores pragas que assolou as Américas e o oeste da África entre os séculos XVIII e XIX, sendo que apenas em 1900 foi descoberta a relação entre os mosquitos e a transmissão desse patógeno (MONATH, 2001). Conforme descreveu Monath (2001), o período de incubação do vírus é entre três a seis dias e a doença se manifesta abruptamente, com sintomas de febre alta, calafrios, alta indisposição, mialgia generalizada, dores de cabeça e náusea. Este período de infecção tem duração em vários dias e pode ser seguido por um período de remissão no qual há desaparecimento dos sintomas, o que pode durar por 24 horas, e ser seguido por um período de intoxicação (20% dos casos), no qual a doença se manifesta em sua forma mais severa, com debilidade extrema do paciente, alta desidratação decorrente de vômitos frequentes, febre alta, insuficiência renal e diátese hemorrágica (GARDNER; RYMAN, 2010).

A medida mais eficaz para controle e prevenção da ocorrência de febre amarela é a vacinação (MONATH, 2006). A vacina para prevenção da febre amarela é altamente eficaz, com alta tolerância nos pacientes que a recebem e tem sido usada por mais de 60 anos desde a sua sintetização na década de 1930, tendo sido aplicada em mais de 400 milhões de pessoas (MONATH, 2001). De acordo com Tauil (2010), o efeito protetor da vacina tem início no décimo dia pós-vacinal e permanece ativo por, no mínimo, dez anos.

No Brasil, desde 1937, a vacina é produzida pelo Laboratório Bio-Manguinhos do Instituto Oswaldo Cruz, com a cepa 17-DD, proveniente da amostra africana Asibi, desprovida de neuro e viscerotropismo e cultivada em ovos de galinha embrionados (TAUIL, 2010). Para o estado de São Paulo, dados provenientes da Coordenadoria de Vigilância em Saúde (COVISA, 2019) indicam que a cobertura vacinal de febre amarela é de 76%. Não obstante, por ser a única doença a qual possui vacinação acessível e eficiente como medida preventiva até agora, os programas de controle com ações visando eliminação de criadouros artificiais e aplicação de inseticidas ainda se fazem importantes na prevenção e no controle de eventuais epidemias.

2.3 Programas de controle de *Aedes aegypti*

A partir do século XX, os esforços em controle das populações de *Ae. aegypti* foram intensificados no Brasil, de forma a diminuir a ocorrência de febre amarela urbana que já havia ocasionado milhares de mortes (ZARA et al., 2016). Entre as décadas de 1930 e 1940, a Fundação Rockefeller incentivou ativamente a campanha de erradicação de febre amarela, a qual incluiu ações no território brasileiro (LOWY, 1990). De acordo com Tauil (2010) em 1955 o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado do Brasil depois de 20 anos de campanha. Tal declaração de extinção do mosquito nos ambientes urbanos levou, como consequência, em aumento da complacência e apatia por parte dos órgãos de saúde pública durante as décadas seguintes, período também responsável pela crescente deterioração das infraestruturas hidráulicas e sanitárias e investimento ineficiente nestas, levando a redução da proteção às doenças infecciosas (GUBLER, 2011).

Em 1976 surgiram os primeiros registros da reinfestação de *Ae. aegypti* no Brasil, devido negligência da vigilância epidemiológica junto ao êxodo urbano acelerado e mal planejado (MACIEL; SIQUEIRA JÚNIOR; MARTELLI, 2008). No estado de São Paulo, o ressurgimento do mosquito foi detectado entre os anos de 1980 e 1981 e, mesmo com eliminação imediata dos focos identificados, em 1985 a presença desse mosquito foi detectada em 12 municípios do estado, durante um levantamento realizado em pontos estratégicos para instalação e desenvolvimento do vetor (e.g. borracharias, depósitos de pneus, ferros-velhos). Tais pontos estratégicos derivam diretamente da mudança rápida e intensa de estilo de vida das sociedades humanas, com o intenso processo de urbanização e especialmente com a expansão da indústria automobilística, gerando uma enorme quantidade de pneus de automóveis usados os quais configuram criadouros ideais para *Ae. aegypti* (GUBLER, 2011).

Conforme relataram Teixeira e Barreto (1996), a partir de 1996 o Ministério da Saúde colocou em prática o Plano de Erradicação de *Ae. aegypti* (PEAa) que tinha como objetivo a atuação multisetorial com um modelo descentralizado entre as três esferas governamentais para redução dos casos da dengue hemorrágica, especificamente. Tal plano não conseguiu atingir a atuação multisetorial, fracassando em seu propósito de erradicação das populações do mosquito no território brasileiro (BRAGA; VALLE, 2007). Conforme acrescentou Araújo (2015), outras ações que eram essenciais para o êxito do plano não foram contempladas, tais quais a cobertura adequada em saneamento básico e a disponibilização de informações acerca do problema dentro de um viés de educação ambiental da população brasileira.

A partir de 2001, a meta governamental passou a ser controlar os níveis populacionais do vetor com prioridade em cidades com maiores índices de transmissão de dengue, implantando assim o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) (ZARA et al., 2016). Já em 2002 o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) teve seu objetivo estendido em resposta a rápida disseminação do sorotipo tipo 3 da DENV e deixou de ser direcionado exclusivamente ao controle do vetor e passou a abranger adequações condizentes com as peculiaridades locais, permitindo planejamentos sub-regionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A meta de redução, estabelecida pelo PNCD, de 50% do número de casos de dengue e em 25% nos anos subsequentes não foi atingida em 143 dos 292 municípios contemplados (PESSANHA et al., 2009).

A atualização das diretrizes foi realizada em 2009, com a deliberação das Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias da Dengue (DNPCED) a qual inclui todas as esferas populacionais nos esforços em controle vetorial do *Ae. Aegypti*, incluindo a sistematização da notificação dos casos e diretrizes para períodos não epidêmicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Nas DNPCED também é definido o estadiamento clínico associado à classificação de risco, de forma a evitar ao máximo a negligência do paciente e deixar o atendimento e tratamento muito mais eficiente ao diminuir a distância entre teoria e prática médica.

Nas DNPCED, ao compreender os esforços integrados entre a esfera pública e a população, definem-se as atribuições de cada ator social no que se refere à prevenção e controle das populações do mosquito. Dessa forma, os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combate de Endemias (ACE), em parceria com a população brasileira, são responsáveis pelo combate ao mosquito por meio do controle mecânico, biológico e químico do vetor, cujas ações são direcionadas em identificar, eliminar e/ou destinar adequadamente reservatórios naturais ou artificiais de água que possam servir de criadouro para os ovos do mosquito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A abordagem atual de gestão integrada contempla diferentes medidas, sendo estas:

- O controle mecânico, que consiste na adoção de práticas que visem a eliminação de potenciais criadouros para as larvas que são realizados pela população, orientada pelos ACE ou ACS os quais podem complementar e monitorar tais ações. Contudo, em larga escala, é enfatizada a importância de que a política de resíduos sólidos seja eficiente para que o controle mecânico seja efetivo;
- O controle biológico, sendo este caracterizado pela utilização de relações ecológicas com outras espécies para eliminação dos mosquitos (e.g. introdução

de bactérias endossimbiontes do gênero *Wolbachia*, que apresentam potencial de reduzir a população de mosquitos e diminuir as transmissões dos vírus e aplicação do *Bacillus thuringiensis israelenses* que, por sua vez, tem ação larvicida por meio da liberação de endotoxinas proteicas) (MULLA, et al., 1982);

- O controle químico que é categorizado por meio da aplicação de inseticidas, os quais podem ser adulticidas ou larvicidas, sendo esta uma ação suplementar ao controle mecânico;
- As ações educativas com o intuito de alarmar e orientar a população acerca da importância no controle do mosquito e ações necessárias para o sucesso deste controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A aplicação de inseticidas (adulticidas e larvicidas) é realizada pelos ACE e tem por base as normas técnicas e operacionais estabelecidas pela OMS, a qual preconiza as doses recomendadas para cada classe de composto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Nesta abordagem do controle, a aplicação de inseticidas é realizada de forma complementar ao programa de controle, sendo recomendada para os casos nos quais o controle mecânico não é possível e nem acessível.

2.4 Classes de inseticidas aplicados no controle de *Aedes aegypti*

Os inseticidas químicos, com foco tanto no controle de mosquitos adultos (adulticidas) quanto larvas (larvicidas) podem ser classificados por sua composição ou por seu modo de ação (HODGSON; KUHR, 1990; PAIVA, 2006; DIAS, 2015). No que se refere à classificação baseado na composição, os inseticidas podem ser organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides, conforme o grupo químico ao qual pertencem (PAIVA, 2006). Em relação ao modo de ação, os inseticidas são categorizados em fases dentre as quais: a primeira geração é compreendida pelos compostos que afetam o aparelho digestivo (e.g.: arsênico), os quais geralmente são compostos inorgânicos; a segunda geração é composta por inseticidas de contato, como os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides e, por fim, a terceira geração compreende os inseticidas de ação endócrina, como os inibidores de desenvolvimento do inseto (HODGSON; KUHR, 1990).

Em 1945, com o advento da sintetização em larga escala do diclorodifeniltricloroetano (DDT), um composto da classe dos organoclorados, iniciou-se a aplicação com objetivo em erradicação do mosquito no Brasil, a princípio, com aplicação na região Nordeste (CAMARGO,

1967; D'AMATO; TORRES; MALM, 2002). Neste contexto, os mosquitos estavam completamente suscetíveis a esse novo composto, o que levou a resultados expressivos na redução populacional ocasionando na erradicação das populações no território brasileiro, relatado na seção anterior (CAMARGO, 1967). No entanto, devido a alta taxa de contaminação da biota, alta persistência no ambiente e tendência à bioacumulação ao longo da cadeia trófica levaram à sugestão de substituição desse composto seguido de proibição do mesmo (KAWADA, 2016).

Desde que o Brasil iniciou a aplicação de inseticidas organofosforados, o uso desses compostos foi praticamente exclusivo durante 20 anos, sendo o Temephos o produto mais utilizado dentro desse período (ARAUJO, 2015; GARCIA et al., 2018). Além deste, o Malathion também foi aplicado no período de 1987 a 1993, como substituto do Fenitrothion em casos de falta deste no mercado (MACORIS, 2011). Todos esses compostos são da classe dos organofosforados, a qual tem sua ação na inibição da enzima acetilcolinesterase que é essencial para a manutenção das condições ideais para os neurotransmissores no inseto. Com a inibição dessa enzima os canais de sódio ficam congestionados, produzindo sinapses aleatórias, distorção muscular e paralisia (MADDREL, 1980).

Contudo, devido uso intenso e prolongado de inseticidas com o mesmo modo de ação, populações em diversas regiões brasileiras foram identificadas com resistência ao composto organofosforado (SILVA; COUTINHO; OLEA, 2012; DIAS, 2015; CHEDIK et al., 2016). A propriedade de resistência, conforme descreve Crow (1957), é caracterizada como um marco na composição genética de uma população em resposta à pressão de seleção do ambiente, sendo possivelmente hereditária. Dessa forma, os inseticidas correspondem a uma pressão do ambiente a qual seleciona os genótipos mais resistentes, compreendendo um processo de seleção pré-adaptativo (CROW, 1957). Isto é possível, pois segundo Braga e Valle (2007), em uma população de mosquitos, existe uma proporção de indivíduos que, naturalmente, têm alelos que lhes conferem resistência a um determinado composto químico o que, por consequência, são mais prováveis de sobreviver ao ambiente contaminado e se reproduzirem, gerando descendentes viáveis, originando assim novas linhagens com alta probabilidade de possuir esses alelos. Essa característica genética, que confere a resistência, normalmente ocorre em uma frequência muito baixa nas populações naturais (MACORIS, 2011). A seleção com consequente desenvolvimento de resistência é favorecida quando os níveis de inseticidas aplicados conferem uma concentração subletal aos indivíduos.

Dessa forma, a avaliação do nível de suscetibilidade das populações aos inseticidas aplicados é ideal para monitoramento da eficiência dessa medida nos programas de controle,

sendo também uma medida indicadora da necessidade de troca do composto para o combate. Uma forma de analisar tal fator é avaliando o nível de suscetibilidade comparativa com uma população nunca exposta à pressão de seleção de um estressor químico, considerando a resposta em mortalidade para tal análise (MACORIS, 2011).

Considerando tal preocupação, a Secretaria em Vigilância de Saúde coordena uma rede de laboratórios organizados em uma rede de avaliação da resistência das populações brasileiras de *Ae. aegypti*, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* à Inseticidas (MoReNAa) (BRAGA; VALLE, 2007).

2.5 Reguladores de crescimento do inseto (IGRs) e o *Pyriproxyfen*

Diante de um contexto no qual identificam-se o surgimento de populações de mosquito resistentes aos agentes químicos empregados nos programas de controle, houve um crescente incentivo ao desenvolvimento de novos compostos que apresentassem uma ação alternativa, momento no qual se enquadra a sintetização dos reguladores de crescimento do inseto (MULLA; DARWAZEH, 1979). O regulador de crescimento do inseto (do inglês, *insect growth regulator* – daqui em diante IGR) é definido com base em seu modo de ação, o qual atua no organismo de forma a acelerar ou inibir um processo regulatório essencial ao seu desenvolvimento natural (TUNAZ; UYGUN, 2004).

Inseticidas da classe dos IGR não necessariamente implicam toxicidade aos indivíduos que são expostos a eles, mas têm seu impacto na produção de anomalias fisiológicas e/ou morfológicas, interferindo na regulação endócrina envolvida na viabilidade dos ovos, no crescimento, desenvolvimento e/ou metamorfose dos organismos alvo, induzindo-os à morte como consequência dessa intervenção (WRIGHT; MULLA, 1995; PESSOA, 2018). Por se tratar de um modo de ação com mecanismo direto na regulação endócrina de um grupo específico, há alta seletividade dos compostos dessa classe o que pode ser destacado como uma vantagem para aplicação com relação aos demais compostos. Sendo assim, os IGR conferem maior segurança ambiental por tal seletividade e reduzida taxa de efeitos negativos em organismos de outras classes, as quais não são alvo da ação destes estressores químicos (TUNAZ; UYGUN, 2004).

Diferentes compostos, pertencentes a classe dos IGR, podem apresentar distintos mecanismos de inibição ao desenvolvimento do inseto e, dessa forma, é necessária aplicação adequada do composto de acordo com o estágio do ciclo de vida do organismo alvo. Cabe aqui

indicar que existem dois grupos principais de IGR: os inibidores de síntese de quitina e os análogos de hormônios juvenis.

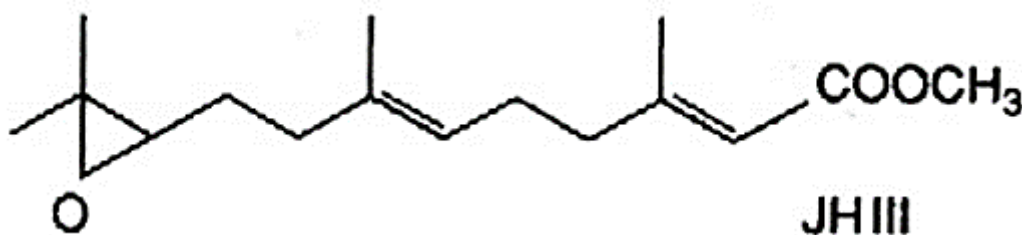
Durante a fase larval dos mosquitos, o exoesqueleto que recobre o animal é composto por uma cutícula, constituída predominantemente por quitina, que atua como uma interface entre o organismo e o ambiente, protegendo o corpo da larva contra desidratação, infecção pela microbiota e contra outros possíveis danos físicos (SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016). No decurso do período de crescimento, a cutícula precisa ser extensível entre cada um de seus segmentos, mas rígida para fornecer pontos firmes que permitam a ligação muscular ou para possibilitar a formação de estruturas como mandíbulas e garras (PESSOA, 2018). No processo de ecdise, a enzima quitinase age na dissolução da cutícula ao degradar a quitina com posterior síntese de nova quitina, de forma a compor o exoesqueleto reconstituído da larva. Os inibidores da síntese de quitina agem nesse período entre mudas de estágio, impedindo a biossíntese de quitina para a nova cutícula (MUTHUKRISHNAN et al., 2012). Cabe ressaltar que, devido ao modo de ação dos inibidores de síntese de quitina, a aplicação é recomendada para qualquer estágio larval. Como exemplo de inseticidas dessa classe, cita-se o diflubenzuron e o novaluron.

Ao longo do crescimento e desenvolvimento do inseto, dois grupos hormonais são os principais mediadores destes processos: o esteroide 20-hidroxiecdisona (20E) e os sesquiterpenoides (ou hormônio juvenil) (DUBROVSKY, 2005). O esteroide 20E é secretado como ecdisona por um par de glândulas endócrinas localizadas no prototorax (glândula prototorácica) e na parte ventroposterior da cabeça (glândulas ventrais) (SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016). O 20E tem sua função na sinalização para o início do processo de metamorfose, ligando-se ao receptor do hormônio e promovendo a alteração das expressões genéticas responsáveis pelos processos de morte das células obsoletas, proliferação celular, diferenciação dos tecidos imaginais e formação de uma nova cutícula (THUMMEL, 2002; LI; WHITE, 2003; RIDDIFORD, 2012).

O hormônio juvenil (HJ), durante a fase larval, age inibindo os genes que promovem o desenvolvimento de características adultas, de forma a permitir o acúmulo de nutrientes durante a fase larval, propiciando seu crescimento que torna possível a preparação adequada para a emergência do mosquito adulto (RIDDIFORD, 2012; SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016). Conforme relatou Dubrovsky (2005), o HJ está possivelmente relacionado à expressão genética que são ativáveis pelo 20E, exercendo uma influência direta no controle positivo ou negativo destes genes.

O HJ apresenta uma estrutura terpenoide acíclica, com um grupo epóxi em uma extremidade da molécula e um grupo metil ester na outra (ROLLER et al., 1967). A biossíntese do HJ ocorre pelas *corpora allata*, com o estímulo de um hormônio neurosecretório denominado alatotropina e ocorre antes de cada evento de metamorfose (PESSOA, 2018). A regulação da produção do HJ é mediada pela sua síntese e inibição, sendo a síntese realizada pelas alatostatinas enquanto que, na hemolinfa, o HJ é eliminado por meio da HJ esterase ao realizar a clivagem do éster metílico (PESSOA, 2018). Já foram identificadas e descritas 6 estruturas diferentes de HJ, sendo que os HJI e HJII são frequentemente encontrados em Lepidoptera enquanto que o HJIII (Figura 4) é o mais comum em espécies da ordem Diptera (SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016).

Figura 4 - Estrutura química do hormônio juvenil III (sesquiterpenoide) encontrado em *Ae. aegypti*.

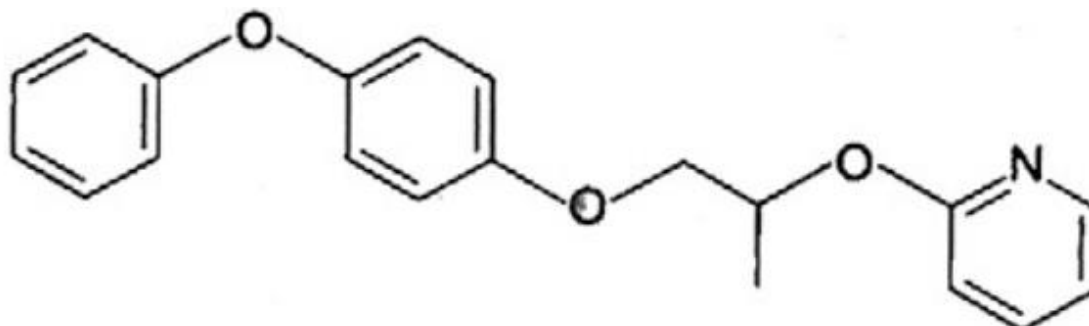


Fonte: Riddiford (2012)

Ao final do último estágio larval, as “*corpora allata*” se tornam atrofiadas e cessam a produção do hormônio juvenil (SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016). De acordo com o dogma clássico da endocrinologia de insetos, o balanço entre os títulos de 20E e HJ definem os efeitos em cada transição do estágio de desenvolvimento (DUBROVSKY, 2005).

Os inseticidas da classe dos análogos de hormônio juvenil (do inglês *juvenile hormone analogs* – daqui em diante JHA) atuam de forma a mimetizar o HJ presente nos organismos, inibindo os processos que dependem da ação do HJ (RAMASEHADRI, 2012). Pertencente a essa classe com esse modo de ação está o *Pyriproxyfen*, desenvolvido e sintetizado pela Sumitomo Chemical Corporation®.

Conforme descrevem Sullivan e Goh (2008), a molécula que compõe o *Pyriproxyfen* (Figura 5), apresenta alta estabilidade por se tratar de uma cadeia aromática, o que as tornam competidoras vantajosas em relação ao HJ natural do organismo, garantindo assim a ligação dessas moléculas aos receptores do hormônio, com alto potencial em cessar o desenvolvimento natural do organismo.

Figura 5 - Estrutura química do *Pyriproxyfen*

Fonte: Riddiford (2012).

A composição comercial desse composto pode ser encontrada em solução líquida ou em formulação granulada, sendo aplicada principalmente como larvicida no tratamento de criadouros de insetos com importância médica e sanitária, como mosquitos que apresentam sua fase larval em ambientes aquáticos, que é o caso do *Ae. aegypti*. No entanto, diferente dos compostos que inibem a síntese de quitina, a aplicação do *Pyriproxyfen* é recomendada para os últimos estádios larvais, uma vez que estes passam a exibir a redução dos títulos de HJ e o larvicida age nesse momento (TASSOU; SCHULZ, 2012). A recomendação pela OMS (2006 a,b) é de aplicação de 0,01 mg de ingrediente ativo/L, a qual é seguida pelo MS. No Brasil, a aplicação é do composto comercial Sumilarv 0,5G®, sendo este um formulado granulada em areia de origem vulcânica, produzido pela Sumitomo Chemical Brasil® (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). As orientações técnicas preconizadas pelo MS para aplicação do Sumilarv 0,5G pelos ACE em campo são determinadas com base no volume d'água a ser tratado com o produto, com correspondência de uma colher dosadora com uma extremidade com capacidade para 0,1 g. de produto e outra para 1 g. de produto.

2.6 Influência de fatores ambientais: temperatura ambiente

Para mosquitos com importância sanitária, como é o caso do *Ae. aegypti*, conhecer as interações entre as taxas de crescimento e a temperatura assim como desenvolvimento e sobrevivência nos diferentes estágios é fundamental para um planejamento adequado de controle de vetores utilizando inseticidas (GRECH et al., 2015). Como há evidências da influência de fatores ambientais no desenvolvimento dos indivíduos, é possível que as mesmas

interfiram também na eficácia dos larvicidas, uma vez em que os testes com esses compostos desconsideram a variação dos fatores ambientais em condições de campo.

No que se refere ao *Pyriproxyfen*, há evidências de que sua persistência no meio aquoso, caso haja baixo teor de matéria orgânica, diminui de acordo com o aumento da exposição à luz solar e da temperatura (SULLIVAN; GOH, 2008). Conforme descrevem Sullivan e Goh (2008), o composto está sujeito a fotólise em meio aquático produzindo subprodutos oxidados e hidroxilados, resultando em polímeros fenólicos menos tóxicos, podendo assim, estar relacionado com uma redução em sua eficácia enquanto larvicida. No entanto, até onde se sabe, não há informações disponíveis na literatura acerca de efeitos de interferência na eficácia do larvicida, após a influência do processo de fotólise.

Qualquer mudança na temperatura, a partir da temperatura padrão de laboratório ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$), tende a gerar um estresse adicional, podendo alterar assim o resultado do efeito do composto químico testado, verificado por meio de interrupções nas funções biológicas do organismo teste (TASSOU; SCHULZ, 2012). Em estudos avaliando efeitos combinados entre o estresse por *Pyriproxyfen* e variações na temperatura do ambiente em *Chironomus riparius* (Diptera: Culicidae), Tassou e Schulz (2012) encontraram uma diferença relacionada à sensibilidade do organismo dentro de um desvio de 4 graus em torno da temperatura de 20°C , sendo os organismos mais sensíveis a 24°C do que a 16°C . No entanto, não há resultados disponíveis na literatura que descrevam essa relação para as populações de *Ae. aegypti*, justificando a importância do presente trabalho uma vez que as temperaturas padronizadas em laboratório, que correspondem a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, nem sempre compreendem às temperaturas ambientais encontradas em condições de campo durante as atividades de aplicação do larvicida, considerando o fato de que essas tendem a serem mais elevadas considerando o período de maior atividade do mosquito ser durante o verão.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A variação da temperatura do ambiente exerce influência nos tratamentos com o larvicida *Pyriproxyfen*, implicando na redução de sua eficiência larvicida em temperaturas mais elevadas (30 °C).

3.2 Objetivo geral

Analisar o efeito combinado entre três diferentes temperaturas e cinco diferentes concentrações sobre a ação do larvicida Sumilarv 0,5G® (*Pyriproxyfen*) no controle das larvas de *Aedes aegypti*.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações ideais do larvicida a serem testadas, com base na concentração recomendada pela Organização Mundial da Saúde;
- Avaliar se há diferenças nas taxas de inibição de emergência das larvas em distintos tratamentos de concentração e temperatura;
- Analisar se a longevidade dos mosquitos sobreviventes a cada condição apresenta distinções significantes;
- Verificar diferenças morfológicas alares entre as fêmeas adultas provenientes de cada condição testada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O cultivo das larvas e todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), localizado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), Universidade de São Paulo, no município de São Carlos (SP).

4.2 Criação de *Aedes aegypti* em laboratório

A criação das larvas foi realizada em laboratório utilizando cartelas com desovas fixadas em papel filtro (Figura 6), fornecidas pelo laboratório ASR® localizado na cidade de Charqueada (SP), sendo uma linhagem suscetível (cepa Fiocruz) aclimatada em laboratório há 4 anos, sem mistura com populações selvagens. As desovas foram mantidas em recipientes de plástico secos e tampados, com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) umidade relativa em $70\% \pm 5\%$, ambas condições monitoradas por meio de higrômetro digital, de forma a induzir a eclosão dos ovos apenas no momento de realização dos testes.

Figura 6 - Desova de *Aedes aegypti* fixada em papel filtro



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Para sincronizar e promover a eclosão dos ovos, foi preparada a fonte de alimentação composta de ração para cachorros, triturada manualmente em cadinho, utilizando um pilão. Em um recipiente plástico com capacidade para 500 ml, foi adicionado 2,5 mg da ração triturada e com 250 ml de água deionizada, em temperatura padronizada e controlada em incubadora BOD (Incubadora BOD, com fotoperíodo, modelo SL-224, do fabricante SOLAB®), de acordo com a condição térmica de destino dos testes, para que não houvesse estresse térmico durante o desenvolvimento larval. O papel filtro, contendo os ovos, foi adicionado aos potes após 24 horas. Após cinco horas de hidratação da desova, os ovos foram desanexados do papel filtro suavemente com o auxílio de um pincel de ponta fina.

De acordo com a OMS (2005), o desenvolvimento de uma comunidade microbiana na água, devido à presença de matéria orgânica, reduz as concentrações de oxigênio dissolvido e

assim induzem a eclosão dos ovos dentro de 12 horas. Bytsebier, Majo e Fischer (2017), relataram que o sucesso das taxas de eclosão dos ovos em um ambiente composto por comunidade microbiana pode ser análogo ao ambiente natural, o qual geralmente já apresenta alguma carga de matéria orgânica nos criadouros e, com o preenchimento de água proveniente das chuvas, tende a aumentar com o tempo ao utilizar os nutrientes ali presentes.

Após a eclosão, as larvas foram alimentadas a cada dois dias. A cada três dias, a água do cultivo foi trocada parcialmente por meio do descarte de 125 ml, e preenchimento do mesmo conteúdo com água deionizada aclimatada na temperatura ambiente de destino, para prevenir o acúmulo de matéria orgânica nos potes, conforme recomendações de Silva, Silva e Lira (1998) e da OMS (2005). O ambiente de criação das larvas teve suas condições controladas em fotoperíodo de 12 horas em claro e 12 horas em escuro.

4.3 Larvicida

Para realização dos experimentos foi utilizado o produto comercializado sob a marca Sumilarv 0,5G®, sintetizado pela empresa Sumitomo Chemical (Tóquio, Japão), sendo este formulado em areia de origem vulcânica (pedra-pomes ou pumice) com um surfactante que determina a lenta diluição do produto na água, com concentração de 0,5% de ingrediente ativo (*Pyriproxyfen*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

4.4 Bioensaios

A metodologia utilizada para os bioensaios foi adaptada e padronizada conforme protocolo estabelecido pela OMS (2005, 2016). Para a manipulação das concentrações finais de teste, foi preparada uma solução estoque de *Pyriproxyfen*, com concentração conhecida de 5 mg/L. A solução estoque foi realizada pesando 0,5 g de Sumilarv 0,5G® e triturada manualmente em cadinho de porcelana utilizando pilão, para reduzir os grânulos do produto. Posteriormente, foi depositado em Erlenmeyer e dissolvido em 500 ml de água deionizada, agitando por uma hora em agitador magnético (Gehaka AA-2050®) e coberto com papel alumínio para que não houvesse evaporação do meio (Figura 7). A solução permaneceu em repouso durante 24 horas, em ambiente com temperatura controlada, de acordo com as condições de destino ao teste, protegida da luminosidade por papel alumínio, sendo agitada novamente por um período de 30 minutos antes da preparação dos experimentos, conforme recomendação de Sihuincha e colaboradores (2005) e Mbare, Lindsay e Fillingner (2013).

Figura 7 - Preparação da solução estoque de *Pyriproxyfen* (5mg/L). a) trituração manual do Sumilarv 0,5G®; b) agitação da solução estoque de *Pyriproxyfen* em agitador magnético.

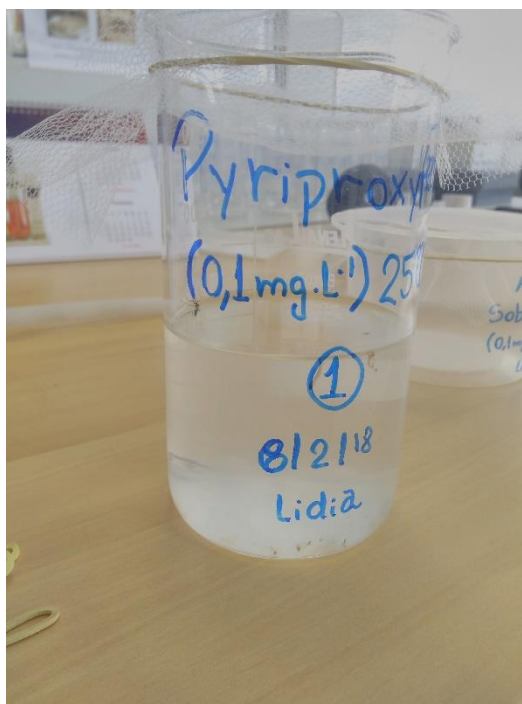


Fonte: Acervo pessoal do autor (2018).

Grupos de 20 larvas de *Ae. aegypti* entre o III e IV estágio, foram submetidos a 250 ml de solução contendo *Pyriproxyfen* em béqueres de vidro com capacidade para 500 ml, de forma a manter a altura da coluna d'água entre 5 e 10 cm. Essa configuração foi importante para que não houvesse interferência na mortalidade das larvas devido possíveis dificuldades em alcançar a superfície para respirar oxigênio atmosférico. Os béqueres foram cobertos com um pedaço de tecido tule, preso por elástico, com o intuito de permitir a entrada de ar atmosférico nos recipientes e para impedir evasão de mosquitos adultos. Nas unidades experimentais, foi registrada exteriormente a concentração e temperatura testada, a identificação numeral da réplica e a data de início do teste, como ilustra a Figura 8.

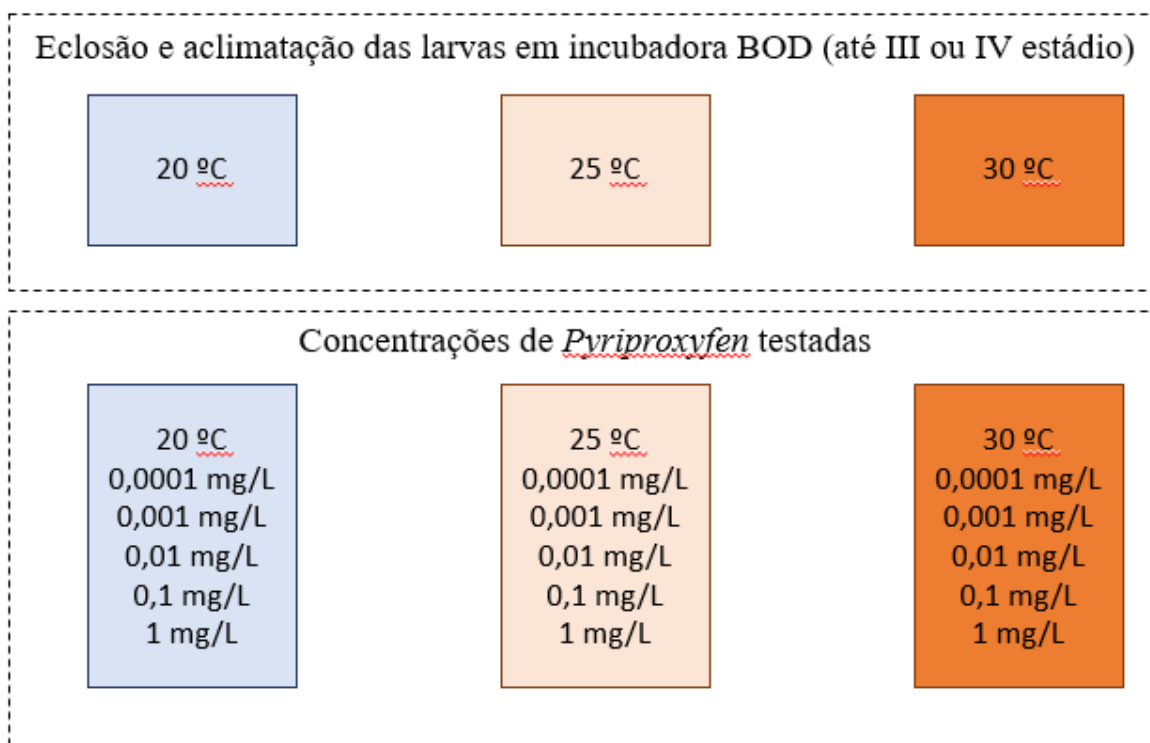
Todos os experimentos foram conduzidos para cinco concentrações que foram determinadas tendo como base a concentração de 0,01 mg de ingrediente ativo/L, que representa a dose recomendada tanto pela OMS quanto pelo MS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Sendo assim, foram testadas duas concentrações abaixo de 0,01 mg/L (0,0001 e 0,001 mg/L) e duas concentrações acima desta (0,1 e 1 mg/L)

Figura 8 - Exemplo de configuração experimental do tratamento com *Pyriproxyfen*



Fonte: Acervo pessoal do autor (2018).

Cada experimento foi submetido a três diferentes temperaturas em incubadora BOD (20, 25, 30°C). Estas temperaturas foram definidas de forma a compreender a temperatura padrão frequentemente aplicada em experimentos ecotoxicológicos em laboratório ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) e uma temperatura mais alta, frequentemente registrada nas estações primavera e verão das regiões tropicais ($30^{\circ}\text{C} \pm 2$), que corresponde aos períodos de maiores taxas de reprodução do mosquito e, como consequência, maiores ocorrências das doenças por eles vetorizadas (SIMOY; SIMOY; CANZIANI, 2015). A temperatura mais fria (20°C), por sua vez, para conhecer as respostas em um cenário próximo do inverno nos ambientes tropicais. O fotoperíodo foi mantido em 12 horas em claro, 12 horas em escuro. O desenho experimental está expresso por meio da Figura 9.

Figura 9: Desenho experimental para os testes com *Pyriproxyfen* em diferentes temperaturas

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

NOTA: Testes em quintuplicata, com 20 larvas entre III e IV estágio em cada réplica. Em cada teste, houveram cinco réplicas de experimento controle, na qual as unidades experimentais não contiveram larvicida.

Todos os testes foram realizados em quintuplicata e, paralelamente às unidades experimentais, foi realizado o experimento controle, que foi composto apenas por um grupo de 20 larvas entre o III e IV estágio larval de desenvolvimento dispostas em água deionizada e fonte de alimentação. Ao início de cada teste, foi adicionado 2,5 mg de ração para cachorros triturada para servir de fonte de alimentação, mantendo o mesmo padrão alimentar oferecido na etapa de criação das larvas. A mesma quantia de alimento foi reabastecida a cada dois dias durante os testes, para todas as unidades experimentais, com o reabastecimento interrompido quando mais de 50% dos indivíduos eram pupas ou estivessem mortos. Durante o período experimental não houve troca do meio.

4.4 Avaliação da eficiência do larvicida

As unidades experimentais foram monitoradas diariamente para a contagem e remoção de larvas e pupas mortas, para que estes indivíduos não contribuíssem com a carga de matéria orgânica no meio e potencialmente interferissem nos resultados. As larvas mortas foram retiradas cuidadosamente dos béqueres com uma pipeta Pasteur descartável. Os experimentos

foram considerados finalizados quando todas as larvas nas réplicas das unidades de controle emergiram como adultos, sendo também registrado o tempo decorrido do experimento. Ao final dos testes, foi calculado o índice de inibição de emergência para cada réplica, que expressa o número de larvas que não emergiram em adultos viáveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Nesse registro, para cada combinação entre concentração e temperatura, larvas e pupas mortas assim como mosquitos que não emergiram com sucesso das pupas, foram considerados como afetados. A mortalidade das larvas e pupas foi verificado por meio de leve estímulo com pipeta Pasteur descartável, de forma a observar a resposta do organismo. Quando sem resposta, foram considerados mortos. O cálculo para inibição de emergência é expresso pela seguinte fórmula:

$$IE(\%) = 100 - (T * 100/C)$$

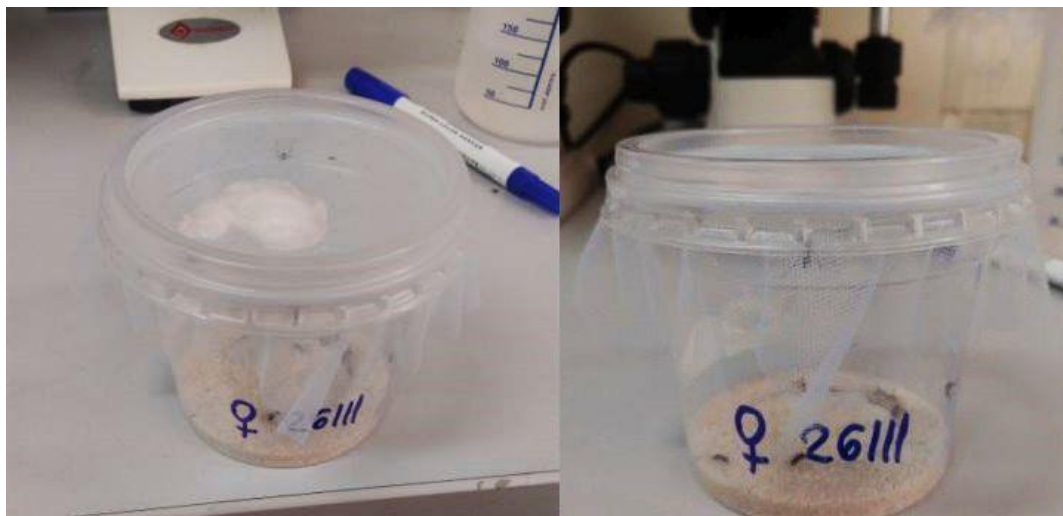
Em que T é correspondente à porcentagem de sobrevivência nos tratamentos com as doses de *Pyriproxyfen* e C é correlato à porcentagem de emergência de adultos no experimento controle.

4.5 Longevidade dos indivíduos sobreviventes

Durante a manutenção diária dos bioensaios, os indivíduos sobreviventes que emergiram para a fase adulta foram removidos dos béqueres com auxílio de um sugador. Os mosquitos foram dispostos em potes plásticos secos e tampados com tecido tule, de forma a evitar a evasão, conforme ilustra a Figura 10. Para alimentação, solução açucarada a concentração 10% (v/v) foi oferecida em pequeno chumaço de algodão sobre o tecido tule, sendo este embebido na solução diariamente para repor o conteúdo consumido ou evaporado. Em cada pote plástico foram depositados 20 gramas de areia esterilizada, para evitar que os mosquitos se prendessem aos cristais de açúcar proveniente da alimentação e conseqüentemente morressem. O algodão foi trocado a cada dois dias, de modo a impossibilitar a presença de fungos (IMAM et al., 2014).

Os recipientes com os mosquitos foram mantidos nas mesmas condições dos bioensaios de origem, para não induzir estresse térmico. Os adultos foram separados e depositados nos potes de acordo com o sexo no objetivo de impedir a cópula entre os mosquitos, pois esta tem o potencial de aumentar a longevidade das fêmeas (VILLARREAL et al., 2018).

Figura 10 - Método de criação dos mosquitos adultos para análise de longevidade.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2018).

Os potes foram preenchidos com, no máximo, cinco indivíduos para evitar a influência de competição entre os mosquitos, o que também poderia constituir fator interferente na longevidade. A morte dos mosquitos foi registrada diariamente. O mesmo método foi aplicado para os mosquitos provenientes do experimento controle.

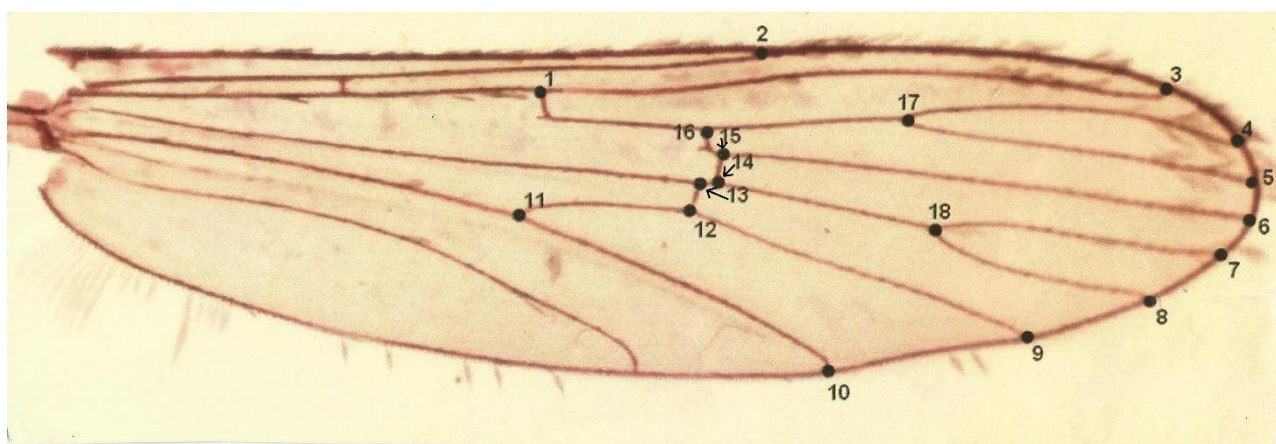
4.6 Análise de morfometria geométrica alar das fêmeas – Tamanho do centroide

Ao longo da inspeção cotidiana para reposição de alimento aos mosquitos, as fêmeas mortas foram retiradas dos potes com auxílio de uma colher de aço inoxidável e depositadas individualmente em microtubos de centrifugação (Eppendorf®) com capacidade para 2 ml, preenchido com álcool isopropílico para conservação. Os frascos foram identificados externamente, com caneta permanente, com informações sobre a longevidade do indivíduo em dias bem como a concentração de origem.

As asas direita e esquerda das fêmeas foram desanexadas cuidadosamente com auxílio de uma pinça e dispostas em uma placa de Petri, contendo álcool 70% (v/v) para reduzir as chances de danificação das asas, em ambiente seco. Com auxílio de um pincel, o excesso de escamas das asas foi removido de forma a facilitar a visualização dos marcos anatômicos alares. As asas foram montadas em lâmina com bálsamo do Canadá sintético (marca Synth®) e coberto com lamínula. Logo após a montagem das lâminas, estas foram dispostas para secagem em estufa a 55°C durante cinco dias.

As imagens dessas asas foram capturadas por meio de câmera fotográfica digital acoplada em microscópio óptico usando magnificação de 4 vezes (Nikon® modelo Eclipse E200) e digitalizadas com o *software* TS View Digital Imaging. Para cada asa fotografada, 18 marcos anatômicos (*landmarks*) foram digitalizados sobre um plano cartesiano, utilizando o *software* TpsDig 1.11.0.0 (ROHLF, 2004). Os marcos anatômicos foram escolhidos com base no conjunto de pontos utilizado por Louise, Vidal e Suesdek (2015) e Lorenz e colaboradores (2017), expostos pela Figura 11.

Figura 11: Localização e sequência dos marcos anatômicos utilizados para o cálculo do tamanho do centroide



Fonte: LORENZ, et al (2017).

Os marcos anatômicos foram utilizados para o cálculo de tamanho das asas por meio do tamanho do centroide (TC), que é determinado pela raiz quadrada da soma das distâncias quadráticas e um centro de referência (centroide), o qual é identificado pelo *software* (DUJARDIN, 2008; LORENZ, et al., 2017).

4.7 Análises estatísticas

O ensaio a 20°C foi realizado uma vez, enquanto os ensaios a 25°C e 30°C foram repetidos quatro vezes, em dias diferentes. A mortalidade para cada réplica foi registrada em planilha no *software* Microsoft Office® Excel, de acordo com o tratamento de origem (combinação entre temperatura e concentração do larvicida). As concentrações que inibiram a emergência de 50% da população (IE₅₀) e 95% da população (IE₉₅) foram calculadas para cada

temperatura utilizando o *software* R versão 3.5.1, empregando os pacotes MASS e DRC versão 3.0.1, aplicando o modelo de regressão logística para três fatores (3P).

Para cada tratamento, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk com o *software* Statistica versão 13.4.0.14 (TIBCO Software Inc, 2018) para analisar a suposição de normalidade da distribuição dos dados. Para as temperaturas de 20, 25 e 30°C, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis com intervalo de confiança de 99%. Sendo assim, a hipótese nula correspondeu a igualdade entre a eficiência dos tratamentos comparados e só foi rejeitada quando o valor p da estatística de teste apresentou valor menor que 0,01.

Para análise da longevidade dos mosquitos, o tempo de vida de cada indivíduo foi registrada em planilha do *software* Microsoft Office® Excel, discriminando cada condição de sobrevivência (temperatura e concentração). Os dados de longevidade dos mosquitos oriundos dos experimentos controle, foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, para confirmar a hipótese sobre a distribuição dos dados em uma curva normal. Este teste foi escolhido devido ao alto número de observações para esta análise (n=442 para fêmeas e n=428 para machos). A análise de longevidade foi realizada aplicando regressão de Cox (1972), utilizando o *software* SPSS® versão 25 (IBM CORP, 2017). Para avaliar se houve diferenças entre populações, entre temperaturas e entre concentrações, as longevidades foram analisadas por meio do teste qui-quadrado, com p valor 0,01.

Para os cálculos de TC, foram selecionadas, aleatoriamente, 7 asas esquerdas de diferentes fêmeas para cada concentração, provenientes dos tratamentos a 20°C e a 30°C, sendo que, apenas na maior temperatura, foi possível selecionar fêmeas sobreviventes à concentração recomendada pela OMS (0,01 mg/L). Os TC e os respectivos gráficos de caixa (box plots) foram elaborados utilizando o *software* TpsRelw (ROHLF, 2004) e com o Clic package (DUJARDIN, <http://xyom-clic.eu/the-clic-package/>). Com o *software* GraphPad InStat versão 3 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com, 2018), foram realizadas as análises de variância (ANOVA) e teste T bicaudal, com correção de Welch, ao nível de rejeição 0,01 para comparação dos TC calculados para as duas condições térmicas 20°C e 30°C de forma a ser possível avaliar possíveis efeitos na maior amplitude térmica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de eficiência do larvicida *Pyriproxyfen* em diferentes temperaturas e concentrações

A medida de porcentagem em inibição de emergência (IE%) é interpretada como eficiência do larvicida, uma vez que o composto não produz toxicidade direta aos indivíduos, mas atua como barreira à emergência de mosquitos adultos. Assim, a porcentagem de larvas que não se tornaram mosquitos adultos viáveis é considerada como sucesso da ação do larvicida.

Os experimentos aplicando diferentes concentrações de *Pyriproxyfen* em torno da concentração recomendada pela OMS (0,01 mg/L) (2006 a,b), apresentaram melhores taxas em eficiência junto ao aumento de cada concentração, o que era um resultado esperado para todas as temperaturas avaliadas. No entanto, cabe ressaltar que as concentrações de 0,1 mg/L e 1 mg/L apresentaram alta eficiência, com baixa variação em torno de 100%, independente da temperatura testada. A Tabela 1, apresenta os valores de eficiência média para cada tratamento considerando, para este cálculo, todas as repetições dos testes.

Tabela 1 - Eficiência média do larvicida *Pyriproxyfen* avaliado por meio da porcentagem em inibição de emergência para diferentes temperaturas. Concentrações em mg/L.

| Temperatura(°C) | Concentrações (mg/L) | | | | | |
|-----------------|----------------------|--------|-------|------|------|------|
| | 0 (Controle) | 0,0001 | 0,001 | 0,01 | 0,1 | 1 |
| 20 | 15% | 68% | 79% | 98% | 100% | 100% |
| 25 | 2% | 34% | 79% | 96% | 100% | 100% |
| 30 | 1% | 35% | 69% | 80% | 99% | 100% |

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

NOTA: O teste em 20°C durou 22 dias. O teste em 25°C durou, em média, 15 dias. O teste em 30°C durou, em média, 10 dias.

A distribuição das respostas registradas apresentou baixa variabilidade expressa pelo desvio padrão, considerando todas as repetições dos testes (20°C com n= 5; 25°C e 30°C com n= 20). O experimento controle apresentou a menor variabilidade em comparação aos

tratamentos, o que era um resultado esperado devido à baixa mortalidade das larvas que confirma a validade dos testes (Tabela 2a).

Os testes de normalidade Shapiro-Wilk apresentaram diferentes resultados, expostos na Tabela 2.b, apontando que não houve unanimidade na confirmação da hipótese de normalidade das distribuições amostrais. Dessa forma, para fins de comparação das médias entre os diferentes tratamentos, optou-se por aplicar uma estatística não-paramétrica com o modelo de Kruskal-Wallis, devido a necessidade de contrastar três grupos com variáveis independentes (20°C, 25°C e 30°C). Os gráficos resultantes de cada teste de normalidade Shapiro-Wilk demonstrando a distribuição dos dados de cada concentração em histograma em função do esperado para uma distribuição normal estão dispostos no Apêndice A.

Tabela 2a - Desvios padrão para os tratamentos com *Pyriproxyfen*

| | Desvio padrão | | | | | |
|------------------|---------------------|--------|-------|------|------|------|
| | Concentração (mg/L) | | | | | |
| Temperatura (°C) | 0 (Controle) | 0,0001 | 0,001 | 0,01 | 0,1 | 1 |
| 20 | 0,04 | 0,19 | 0,16 | 0,03 | 0,00 | 0,00 |
| 25 | 0,03 | 0,19 | 0,14 | 0,08 | 0,00 | 0,00 |
| 30 | 0,03 | 0,18 | 0,16 | 0,12 | 0,01 | 0,00 |

Tabela 2b – valores “p” obtidos no cálculo da estatística de Shapiro-Wilk

| | Significância de Shapiro-Wilk | | | | | |
|------------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---|
| | Concentração (mg/L) | | | | | |
| Temperatura (°C) | 0 (Controle) | 0,0001 | 0,001 | 0,01 | 0,1 | 1 |
| 20 | 0,314 | 0,429 | 0,544 | 0,006 | - | - |
| 25 | 0,000 | 0,001 | 0,002 | 0,000 | - | - |
| 30 | 0,000 | 0,962 | 0,455 | 0,093 | 0,433 | - |

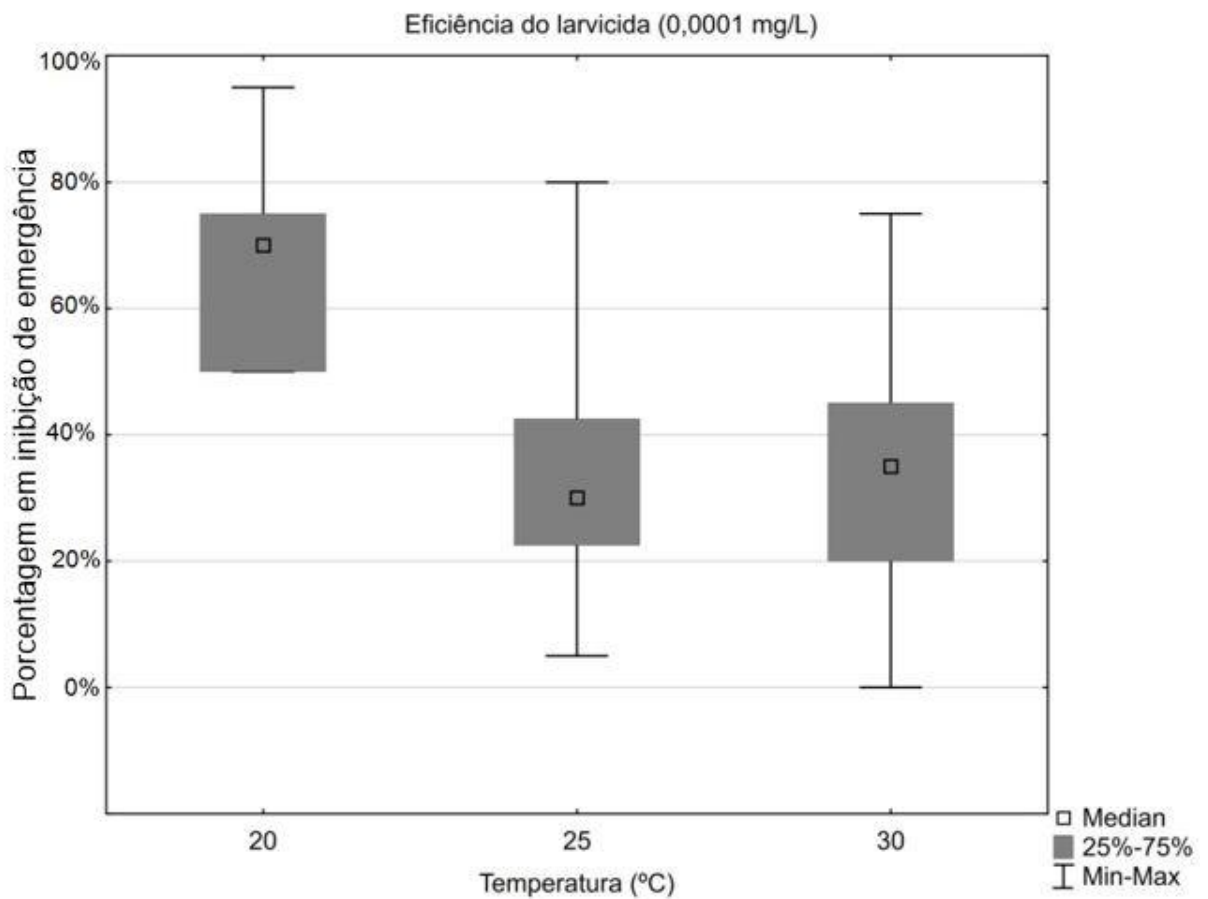
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Nota: os valores destacados em negrito de significância de Shapiro-Wilk são relacionados às amostras que se enquadraram em uma distribuição normal. Não há valores calculados em 0,1 (20°C e 25°C) e nem para todos os tratamentos correspondentes a 1 mg/L devido o desvio padrão nulo.

Cada tratamento entre concentração e temperatura foi avaliado separadamente para explorar seus efeitos de forma mais detalhada para, enfim, conceber as possíveis diferenças nas variações das doses aplicadas em temperaturas ambientais diferentes para o controle das larvas de *Ae. aegypti*.

Para a concentração de 0,0001 mg/L, os resultados provenientes da temperatura constante em 20°C apresentaram taxas de eficiência do larvicida mais uniformes em torno de uma média (68%), se comparados aos efeitos observados para as demais temperaturas (Figura 12). Embora esta observação se confirme pela distribuição apresentada em boxplot, não há evidências de diferença significativa da eficiência do larvicida nas três temperaturas avaliadas para a concentração 0,0001 mg/L. Os valores “p” da estatística do teste de Kruskal-Wallis estão dispostas na Tabela 3.

Figura 12 – Análise descritiva da eficiência do larvicida (% de inibição de emergência) com aplicação de 0,0001 mg/L em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Tabela 3 - Valores “p” da estatística de Kruskal-Wallis para a eficiência do larvicida na concentração de 0,0001 mg/L para três temperaturas

| Variável dependente: Eficiência do larvicida | 20°C | 25°C | 30°C |
|---|----------|----------|----------|
| 20°C | | 2,900884 | 2,718152 |
| 25°C | 2,900884 | | 0,288926 |
| 30°C | 2,718152 | 0,288926 | |

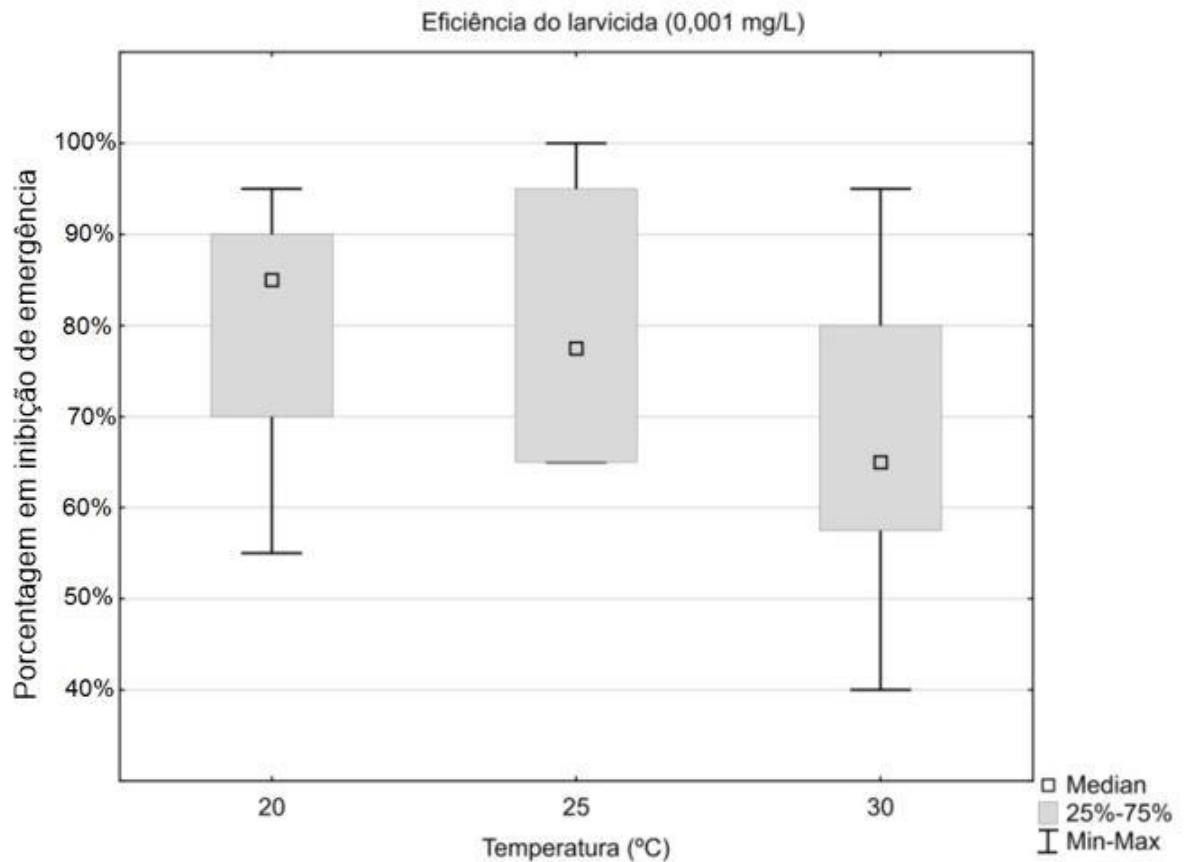
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

NOTA: Valores para comparações múltiplas (valores “p”); Variável independente para agrupamento: Temperatura (°C); teste de Kruskal-Wallis: $H(2, N=45) = 8,926833$ $p = 0,0215$. Nível de significância: 0,01

Ao analisar a concentração 10 vezes maior (0,001 mg/L), nota-se que a distribuição em inibição de emergência dos adultos para os tratamentos a 25°C, foi mais homogênea e apresentou média igual a observada para 20°C, embora para esta última tenha sido observada maior variabilidade (Figura 13). Para 30°C, o larvicida apresentou maior variação na resposta em inibição de emergência dos adultos, porém com redução em apenas 10% na média em eficiência.

Semelhante ao observado para 0,0001 mg/L, para uma concentração dez vezes maior (0,001 mg/L) não foi observada diferença estatisticamente significativa para nenhuma das temperaturas testadas, com valores “p” da estatística de Kruskal-Wallis resumidas na Tabela 4.

Figura 13 - Análise descritiva da eficiência do larvicida (% de inibição de emergência) com aplicação de 0,001 mg/L em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Tabela 4 - Valores “p” da estatística de Kruskal-Wallis para a eficiência do larvicida na concentração de 0,001 mg/L para três temperaturas.

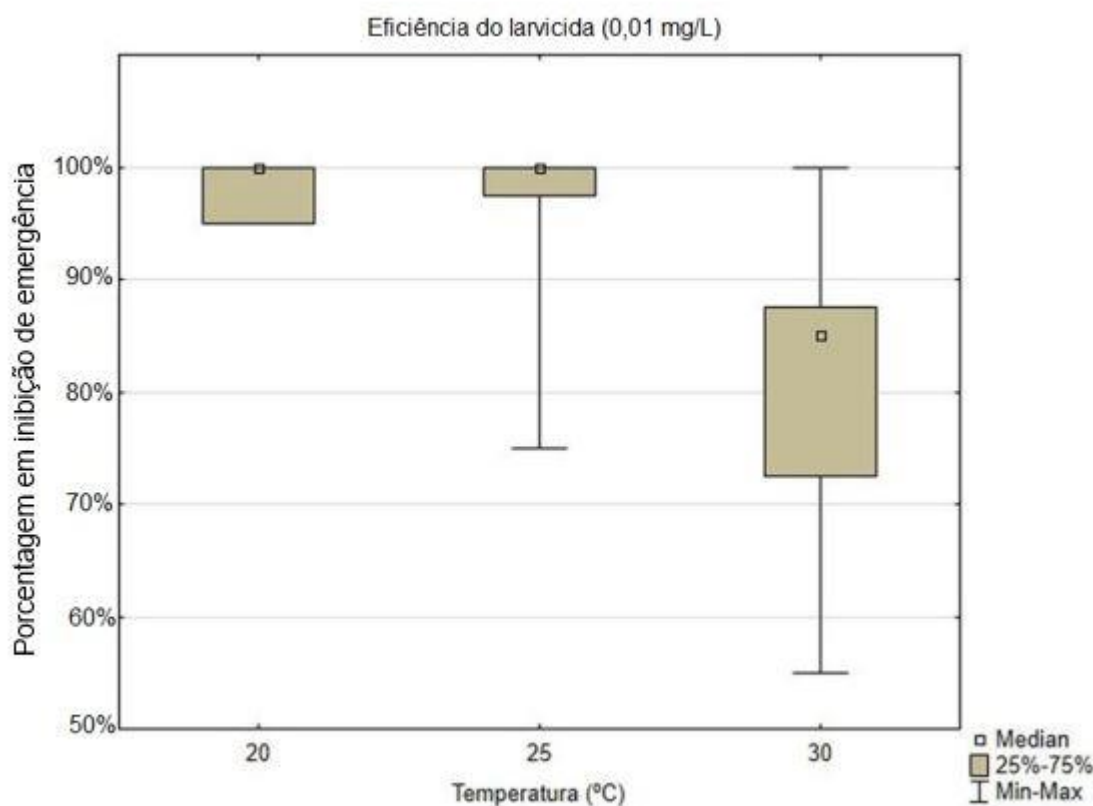
| Variável dependente: Eficiência do larvicida | 20°C | 25°C | 30°C |
|---|----------|----------|----------|
| 20°C | | 1,000000 | 0,529643 |
| 25°C | 1,000000 | | 0,080260 |
| 30°C | 0,529643 | 0,080260 | |

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Nota: Valores para comparações múltiplas (p valores); Variável independente para agrupamento: Temperatura (°C); Teste de Kruskal-Wallis: $H(2, N=45) = 5,476753$; $p = 0,0647$

Para a concentração recomendada pela OMS (2006), isto é, de 0,01 mg/L, todas as temperaturas testadas refletiram eficiência muito superior a 50%. As temperaturas menores (20°C e 25°C), por sua vez, corresponderam às maiores e mais homogêneas taxas de eficiência se comparadas as respostas provenientes da temperatura em 30°C, o que pode ser visualizado na Figura 14.

Figura 14 - Análise descritiva da eficiência do larvicida (% de inibição de emergência) com aplicação de 0,01 mg/L em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Para esta concentração (0,01 mg/L), há evidências de redução da eficiência do larvicida quando aplicados a temperatura constante em 30°C, se comparados com a eficiência obtida para 20°C e 25°C nesta mesma dose. Entre as temperaturas 20°C e 25°C, não houve diferenças significativas sobre a eficiência alcançada. Os valores da estatística de Kruskal-Wallis estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores “p” da estatística de Kruskal-Wallis para a eficiência do larvicida na concentração de 0,01 mg/L para três temperaturas.

| Variável dependente: Eficiência do larvicida | 20°C | 25°C | 30°C |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| 20°C | | 1,000000 | <u>0,016164</u> |
| 25°C | 1,000000 | | <u>0,000024</u> |
| 30°C | <u>0,016164</u> | <u>0,000024</u> | |

Fonte: Elaborado pelo autor (2018)

NOTA: Valores para comparações múltiplas (p valores); Variável independente para agrupamento: Temperatura (°C); Teste de Kruskal-Wallis: $H(2, N=45) = 24,00705$; $p < 0,01$

Para as concentrações 0,1 mg/L e 1 mg/L, não foi possível analisar a eficiência, por meio de um modelo estatístico, em todas as temperaturas testadas. Apenas a concentração de 0,1 mg/L na temperatura de 30°C acarretou em eficiência média (porcentagem de mortalidade) de 99% e com baixa variabilidade (desvio padrão = 0,01).

De forma geral, houve evidências de que, apenas para a concentração de 0,01 mg/L, o aumento na temperatura do ambiente implicou redução significativa da ação do *Pyriproxyfen* enquanto larvicida, quando comparados a intervalos de temperatura maiores (entre 25°C e 30°C) uma vez que o aumento na temperatura do ambiente em torno de uma média menor (entre 20°C e 25°C) não indicou redução da eficiência do composto.

Quando calculados os valores referentes à concentração do composto que inibe a emergência de 50% da população (IE₅₀) e de 95% da população (IE₉₅), notou-se que a taxa de erro resultante para cada temperatura é pequena, o que valida os resultados encontrados (Tabela 6).

Para 20°C, a IE₅₀ coincide com a menor concentração testada e é semelhante à IE₉₅ para esta mesma temperatura, deixando evidente a alta sensibilidade das larvas nesta condição térmica. Além disso, entre os intervalos de 20°C e 25°C, houve uma diferença em apenas quatro vezes na concentração para IE₅₀ enquanto que, para o intervalo térmico entre 20 e 30°C, essa concentração para o mesmo efeito é maior em dez vezes.

Tabela 6 - Concentração referente à inibição de emergência para 50% e para 95% da população de *Ae. aegypti* testada para diferentes condições de temperatura.

| Temperatura (°C) | IE ₅₀ (mg/L) | IE ₉₅ (mg/L) |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| 20 | 0,0001 | 0,0002 |
| 25 | 0,0004 | 0,002 |
| 30 | 0,001 | 0,06 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

De acordo com os resultados obtidos a 25°C, observa-se que, para o aumento da eficiência média do larvicida, de 50% para 95%, a concentração deve ser cinco vezes maior. Para 30°C, a IE₅₀ corresponde a concentração dez vezes maior que a encontrada para IE₅₀ a 20°C. A IE₉₅ encontrada para a temperatura de 30°C foi também maior que a concentração recomendada pela OMS (2006 a,b), além de ter sido 60 vezes maior que a IE₅₀ para a mesma temperatura testada.

O *Pyriproxyfen* é um composto altamente eficiente enquanto larvicida para controle populacional de *Ae. aegypti*, sem necessidade de aplicação de dosagens altas para atingir seu

efeito desejado, se comparados com outras classes de larvicidas (SECCACINI et al., 2008). Esta afirmação é corroborada pelos resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que a concentração calculada para inibição média de 95% dos mosquitos foi menor que a dose recomendada pela OMS, com exceção do tratamento em 30°C, que exibiu um aumento em 6 vezes nesta concentração indicada ao controle do vetor.

Para cepas suscetíveis (cepa *Rockefeller* da Venezuela), foi encontrada a concentração de 0,0000074 mg/L para IE₅₀ e 0,000067 mg/L para IE₉₅ em testes realizados a temperatura controlada em 25°C (GÓMEZ et al., 2011). Marcombe e colaboradores (2018), avaliando os efeitos do larvicida em duas populações de *Ae. aegypti* suscetíveis e criadas em laboratório, encontraram a concentração de IE₅₀ em 0,000086 mg/L atestando a alta eficiência do composto em concentrações baixas, a 27°C.

Vythilingam e colaboradores (2005) obtiveram o resultado em 100% de inibição de emergência de adultos com a aplicação da concentração recomendada pela OMS (2006 a,b) em condições laboratoriais a 25°C, semelhante à eficiência encontrada para a mesma concentração pelo presente estudo na mesma temperatura, sendo menor apenas a condição de temperatura de 30°C. No entanto, para esta última pesquisa citada, não foi apontada a origem das cepas utilizadas para os testes. Esta informação é importante pois, além dos fatores ambientais, parâmetros das populações testadas referentes ao grau de suscetibilidade dos indivíduos influenciam diretamente nos resultados possíveis.

Darriet e Corbel (2006), testando o efeito do *Pyriproxyfen* em cepas suscetíveis de referência e em condições de temperatura padronizada a 27°C, encontraram IE₅₀ equivalente à concentração de 0,0001 mg/L, sendo esta vulnerabilidade semelhante à encontrada no presente estudo para a temperatura ambiental de 20°C. Lau et al (2015), testando o grau de suscetibilidade ao *Pyriproxyfen* de diferentes populações de *Ae aegypti* coletados em campo na Malásia encontraram IE₅₀ média de 0,02 mg/L, testando os efeitos a temperatura padronizada em 25°C. Entre estes dois estudos, a diferença da origem das populações testadas evidenciou a influência deste parâmetro sobre os resultados encontrados em eficiência de um mesmo composto, sem grandes variações na temperatura do ambiente. Sihuincha et al (2005), ao testarem o *Pyriproxyfen* em uma população selvagem da região de Iquitos (Peru), a 25°C, encontraram a IE₅₀ e IE₉₅ nas concentrações de 0,000012 mg/L e 0,00061 mg/L, respectivamente, a qual indica a alta sensibilidade destas populações ao *Pyriproxyfen*, diferente dos resultados reportados por Lau et al (2015).

Uma pesquisa realizada por Andrighetti e colaboradores (2008) aplicando oito diferentes dosagens de *Pyriproxyfen* em populações brasileiras de *Ae. aegypti* com diferentes

taxas de resistência ao inseticida organofosforado Temefós encontrou diferentes valores efetivos para IE_{50} , sendo que para a população correspondente a maior resistência apresentou também maior resistência à aplicação do *Pyriproxyfen*, com IE_{50} equivalente a 0,00337 mg/L. Esta IE_{50} , referente à população mais resistente ao Temefós, é ainda maior que a encontrada pela situação de menor suscetibilidade do presente estudo, proveniente dos testes realizados em temperatura a 30°C ($IE_{50} = 0,01$ mg/L).

A comparação dos diversos experimentos disponíveis na literatura é apresentada resumidamente na tabela 7, indicando como as concentrações para IE_{50} destes estudos são maiores ou menores com relação aos valores encontrados pelos cálculos com os resultados do presente estudo.

De forma geral, cabe observar que os estudos que testaram em cepas suscetíveis apresentam valores para IE_{50} menores que as encontradas pelo presente trabalho, porém tal diferença é menor quando comparada à IE_{50} para tratamentos a 30°C. Tal sensibilidade maior em menor temperatura corrobora a hipótese inicial do presente trabalho, a qual atesta que a temperatura exerce influência nos resultados encontrados.

Tabela 7 - Comparativo entre os valores para IE_{50} encontrados por diferentes autores em relação a IE_{50} calculada no presente trabalho.

| Autor | Comparação (IE_{50} - 25°C) | Comparação (IE_{50} - 30°C) | Condição térmica de teste | Origem da cepa testada |
|-------------------------|---|---|--|--|
| Estrada e Mulla (1986) | 4 vezes menor | 10 vezes menor | 26°C | Cepas suscetíveis criadas em laboratório* |
| Darriet e Corbel (2006) | 4 vezes menor | 10 vezes menor | 27°C | Cepas suscetíveis de referência* |
| Sihuincha et al (2005) | 8,5 vezes menor | 100 vezes menor | 25°C | Populações selvagens coletadas em Iquitos (Peru) |
| Seccacini et al (2008) | 8,5 vezes menor | 25 vezes menor | 26°C | Cepa <i>Rockfeller</i> Venezuelana |

| | | | | |
|--------------------------|---|--|---------------|--|
| Andrighetti et al (2008) | 0,8 vez maior (Rockfeller) 8,2 vezes maior (População altamente resistente) 1,8 vez maior (População com resistência moderada) 4,5 vezes maior (população com baixa resistência) | 2,2 vezes maior (Rockefeller) 3 vezes maior (População altamente resistente) 1,5 vez menor (População com resistência moderada) Não foi observada diferença (população com baixa resistência) | Não informado | Populações selvagens brasileiras com diferentes taxas de resistência ao Temefós comparadas com a cepa Rockfeller de referência, altamente suscetível |
| Lau et al (2015) | 50 vezes maior | 20 vezes maior | 25°C | Populações selvagens coletadas na Malásia |
| Marcombe et al (2018) | 4,7 vezes menor | 12 vezes menor | 27°C | Duas populações suscetíveis criadas em laboratório* |
| Marina et al (2018) | 50 vezes maior | 20 vezes maior | 25°C | Populações coletadas em Chiapas (México) e aclimatadas em laboratório por seis meses |

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

NOTA: A dimensão se refere ao encontrado pelos autores em comparação ao valor encontrado pelo presente trabalho, nas condições 25°C e 30°C. *não foram descritas, nos artigos originais, as origens das cepas de referência.

A estabilidade do *Pyriproxyfen* quando adicionado em meio aquoso é relativamente alta, conferindo também alta persistência neste ambiente, a qual é característica da lenta diluição do composto (RITCHIE et al., 2013; MIAN; DHILLON; DODSON, 2017). Este atributo é vantajoso pois há maior potencial das partículas do composto serem ingeridas pelas larvas.

No entanto, a exposição a luz solar e o aumento da temperatura têm o potencial de reduzir a estabilidade deste composto. Schaeffer e colaboradores (1988) encontraram que, em um intervalo de 9 dias, o *Pyriproxyfen* teve sua concentração reduzida em 30% da concentração inicial a 24°C e em 35% a 38°C enquanto que, sob exposição solar, tal redução corresponde a 53% e a 68%, respectivamente. Esta evidência corrobora com os resultados do presente trabalho, visto que a degradação do *Pyriproxyfen* devido a temperatura mais alta pode ser correlacionada com a redução observada de eficiência em inibição de emergência dos indivíduos.

Os processos fisiológicos dos organismos ectotérmicos são diretamente influenciados pelas condições térmicas do ambiente, interferindo no sucesso e no tempo de desenvolvimento e longevidade dos indivíduos (COURET; DOTSON; BENEDICT, 2014). Grech e colaboradores (2015) observaram que, para *Ae aegypti*, o tempo de desenvolvimento larval a 15,2°C teve 17,4 dias de duração até a emergência, ao passo que a 22°C esse tempo diminuiu para 7 dias de duração. Cabe ressaltar que estes resultados são pouco realistas em comparação ao que ocorre no ambiente, visto que o *Ae aegypti* ocorre predominantemente em ambiente tropical os quais apresentam médias de temperatura ambiente superiores nos períodos mais quentes, para os quais as populações têm suas maiores taxas reprodutivas.

Sendo assim, tanto a degradação do composto, quanto o desenvolvimento mais rápido das larvas em maior temperatura (30°C), possivelmente influenciaram no resultado com redução da eficiência do larvicida na concentração de 0,01 mg/L.

5.2 Análise da longevidade dos mosquitos sobreviventes ao *Pyriproxyfen*

5.2.1 Perfil de longevidade dos mosquitos provenientes dos experimentos controle

Ao todo, foram obtidos 1708 mosquitos, sendo 841 destes, correspondentes a mosquitos sobreviventes aos tratamentos com *Pyriproxyfen*. Em condições do experimento controle (sem a presença do larvicida) foram obtidos 427 machos e 440 fêmeas, com os números absolutos e suas respectivas porcentagens por sexo, em cada condição de temperatura, sintetizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição de quantidades de machos e fêmeas obtidos no experimento controle e suas respectivas porcentagens para cada tratamento

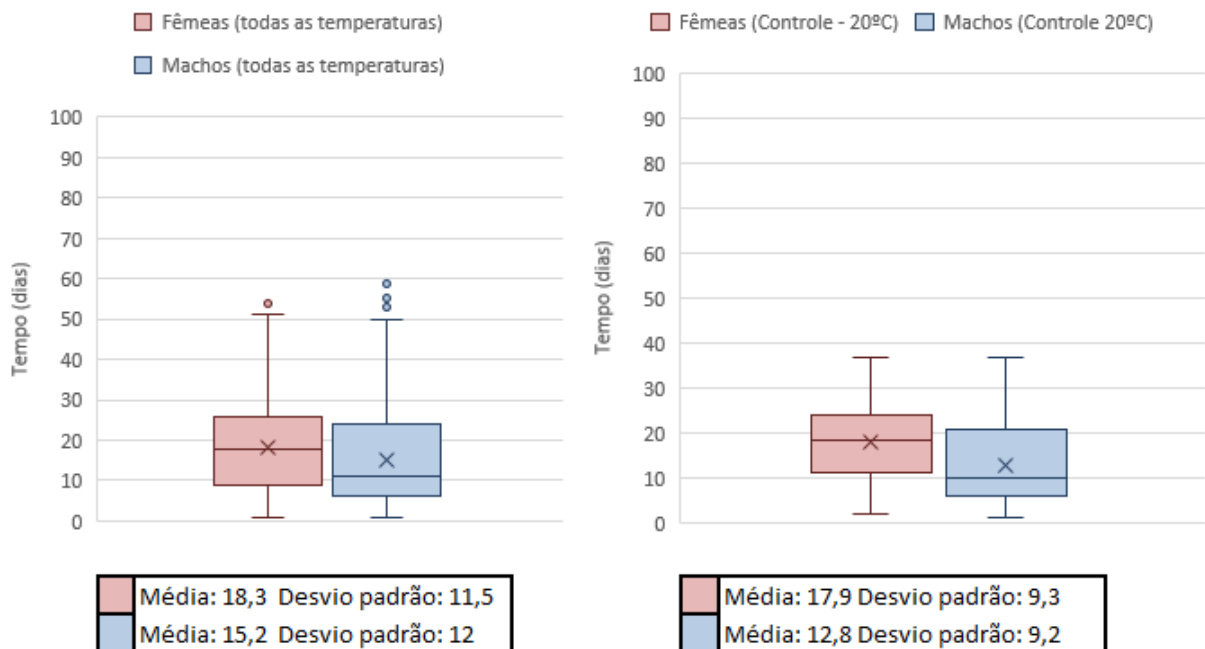
| Temperatura (°C) | Machos | Fêmeas |
|------------------|-------------|------------|
| 20 | 50 (50%) | 35 (35%) |
| 25 | 195 (49,7%) | 197(50,2%) |
| 30 | 176 (44%) | 224 (56%) |

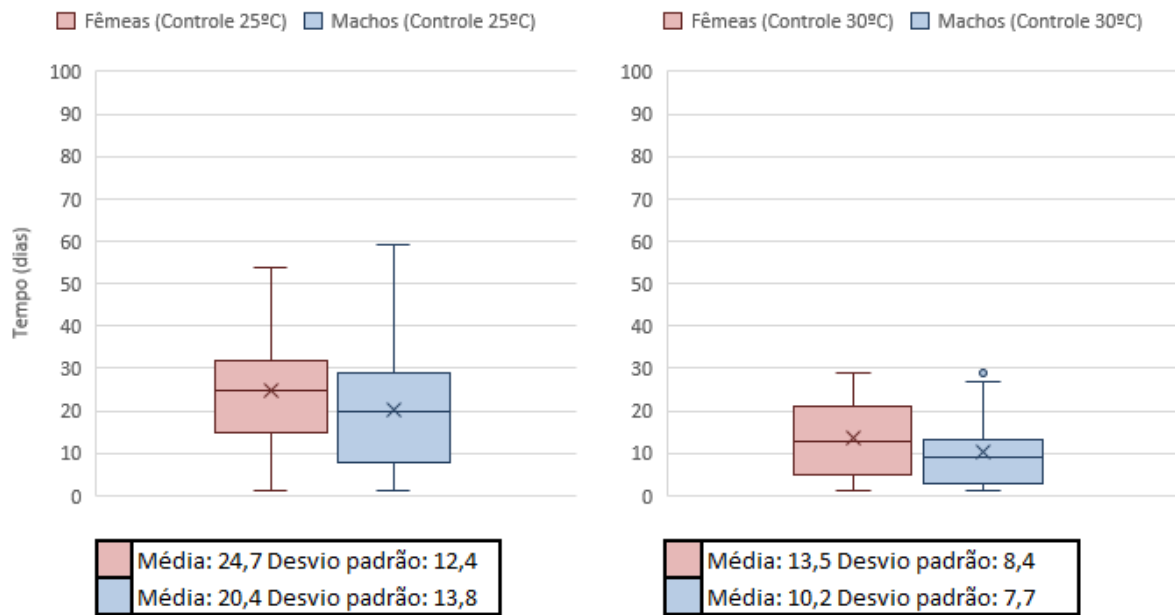
Fonte: Elaborado e organizado pelo autor (2018).

Observou-se que a longevidade de ambos, machos e fêmeas, apresentaram respostas distintas em diferentes temperaturas ($p < 0,01$), resultado que condiz com o esperado, uma vez

que organismos ectotérmicos têm seu metabolismo dependente da condição térmica do ambiente. Quando a temperatura foi desconsiderada, as respostas a respeito da longevidade dos indivíduos estiveram mais próximas das longevidades provenientes do experimento em 20°C, mesmo que este tenha apresentado menor número de observações (n=100). A análise descritiva da longevidade dos mosquitos do experimento controle, estão ilustradas pelos boxplots que são apresentados na Figura 15. Para todas as temperaturas, as fêmeas vivem alguns poucos dias a mais que os machos.

Figura 15 – Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambiente não contaminado pelo larvicida (experimento controle).



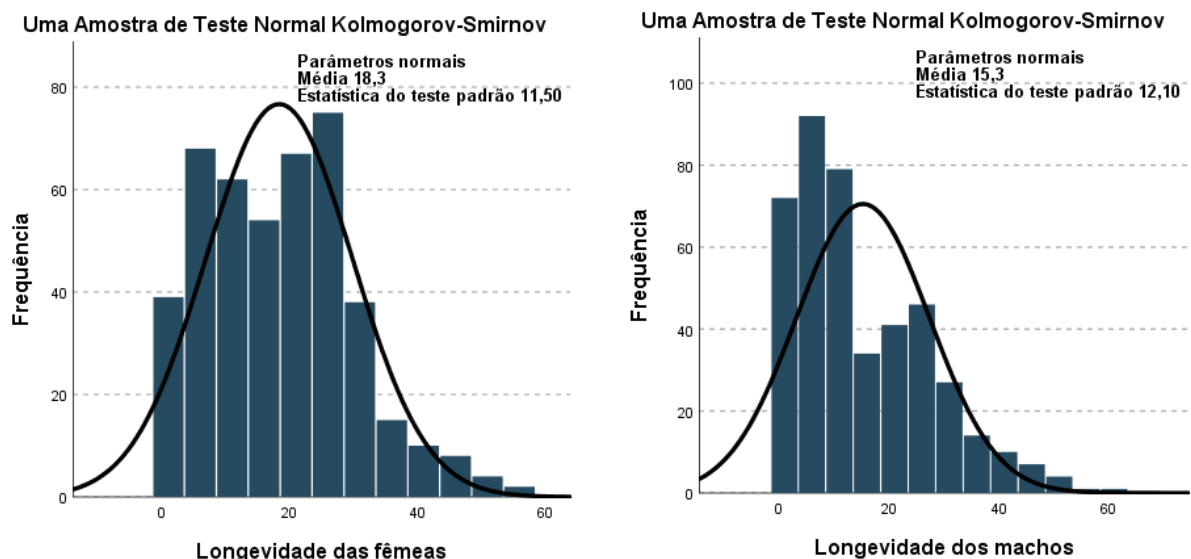


Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

NOTA: Não houve diferença significativa entre a longevidade de machos e fêmeas, exceto na temperatura de 30°C para a qual as fêmeas viveram mais que machos ($p < 0,01$)

A distribuição de longevidade para machos e fêmeas, produzidos no experimento controle, não se ajustou em uma distribuição normal, o que foi confirmado por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, aplicado para um valor “p” = 0,01 indicando que os dados não são paramétricos, atendendo à premissa da aplicação do modelo da Regressão de Cox conforme ilustrado pela Figura 16.

Figura 16 - Histograma de Kolmogorov-Smirnov para teste de normalidade dos dados referentes à longevidade dos mosquitos produzidos no experimento controle.

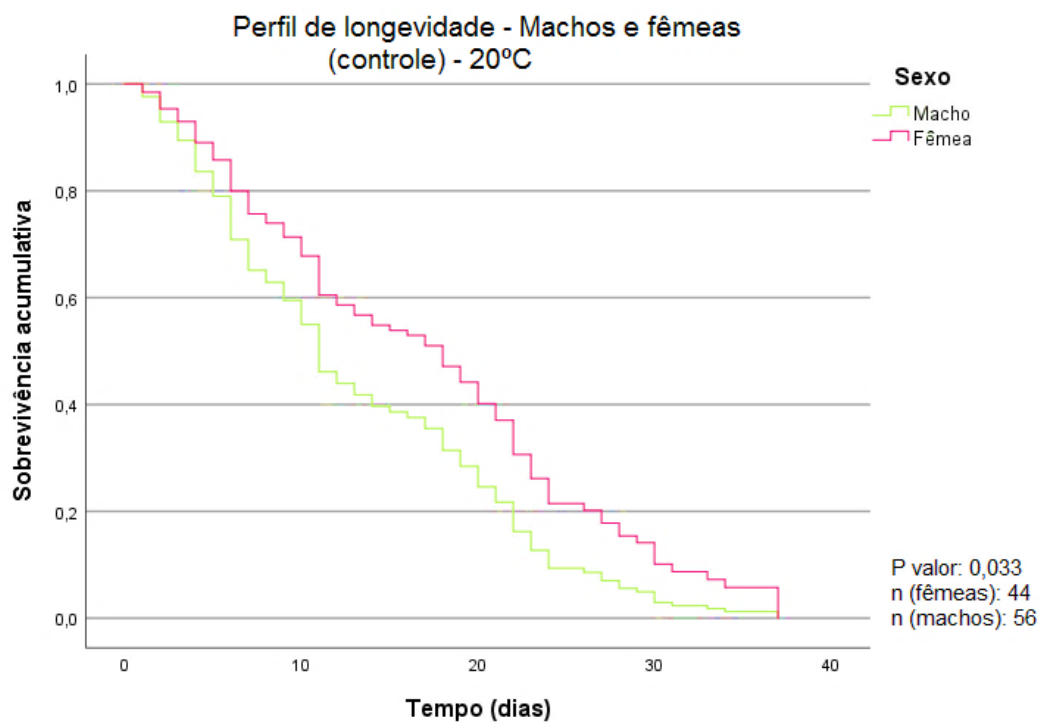


Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

NOTA: valor “p” < 0,01 para machos e para fêmeas.

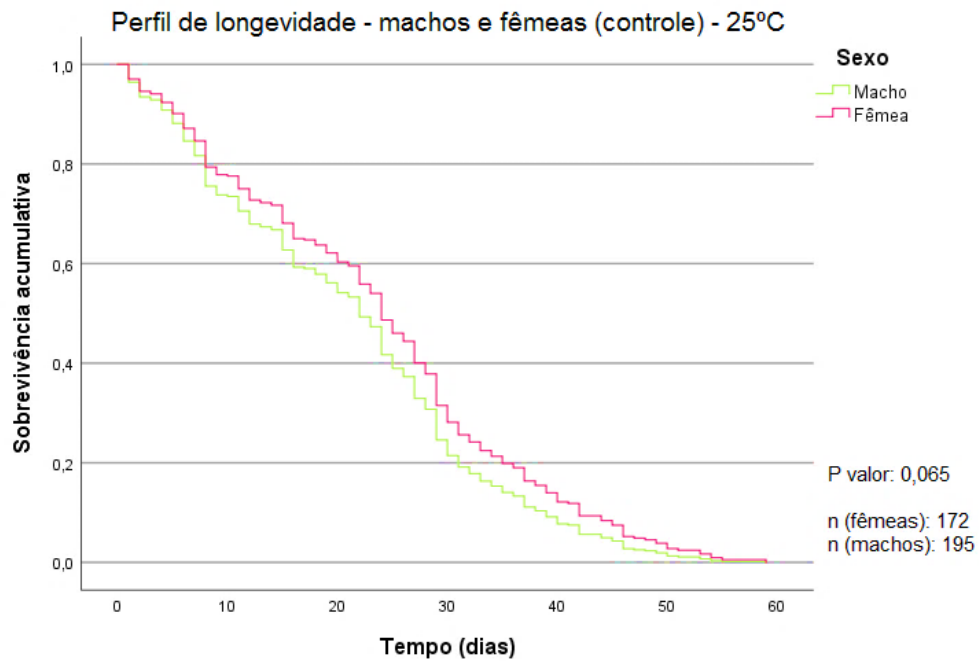
O perfil de longevidade obtido por meio do modelo de regressão de Cox para machos e fêmeas na condição de temperatura constante a 20°C não apresentou diferença significativa (valor “p” > 0,01) (Figura 17). Resultado similar foi verificado na análise da diferença de longevidade entre machos e fêmeas produzidos na temperatura de 25°. No entanto, embora o comportamento tenha sido similar, na temperatura de 25°C foi observada uma tendência aos mosquitos em viverem por períodos mais longos, o que é evidente pela Figura 18.

Figura 17 – Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle na temperatura de 20°C



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

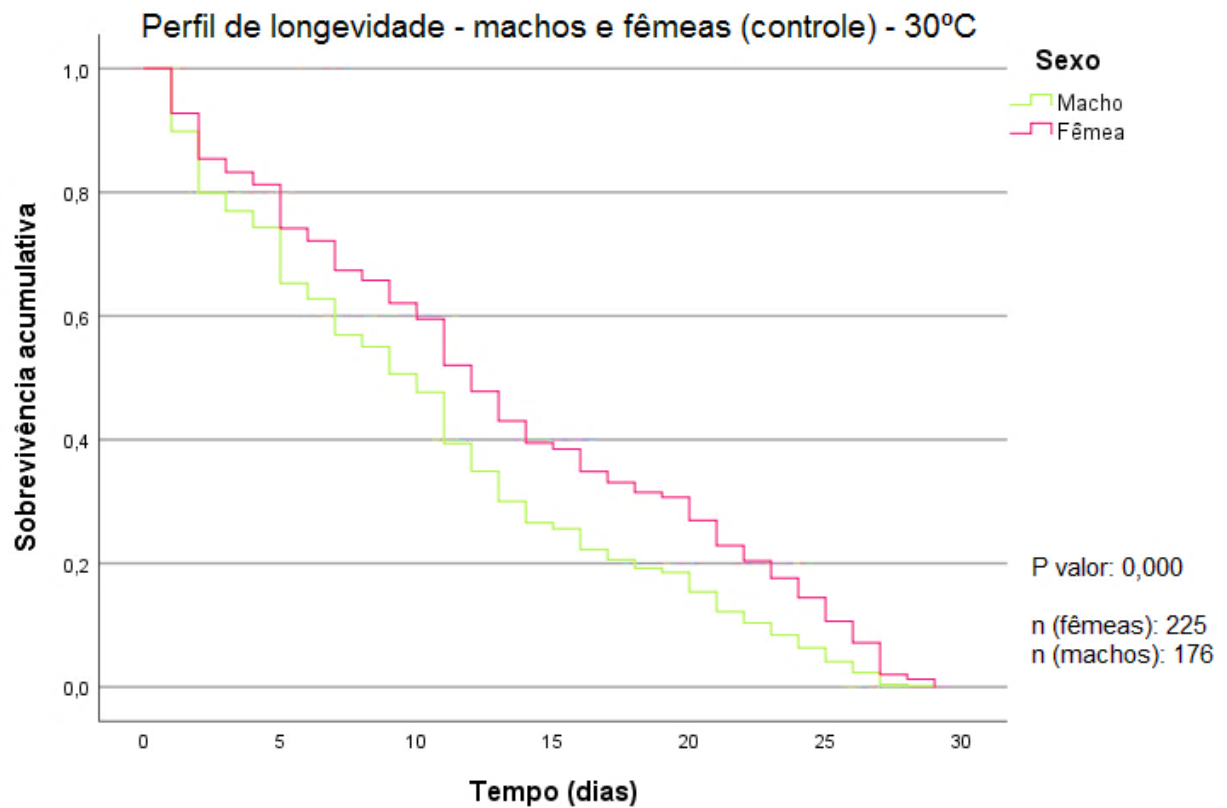
Figura 18 – Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle na temperatura de 25°C.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

No que tange à longevidade de machos e fêmeas, na condição térmica em 30°C, foi observado que machos viveram menos que as fêmeas ($p < 0,01$), sendo essa observação ilustrada pela Figura 19, porém ambos viveram menos, se comparados aos registros de longevidade na temperatura de 25°C.

Figura 19 – Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle na temperatura de 30°C



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

5.2.2 Perfil de longevidade dos sobreviventes a diferentes concentrações de *Pyriproxyfen*

O perfil de sobrevivência e emergência de adultos aos tratamentos com *Pyriproxyfen* demonstrou um aumento em menores concentrações, que pode ser visualizado na Tabela 9. Com relação ao aumento da temperatura, a sobrevivência também foi maior para todas as concentrações testadas.

Tabela 9 - Número e porcentagem de indivíduos sobreviventes aos tratamentos com *Pyriproxyfen*, nas diferentes concentrações (mg/L) e temperaturas (°C).

| Temperatura (°C) | Concentração (mg/L) | | |
|------------------|---------------------|-------------|-----------|
| | 0,0001 | 0,001 | 0,01 |
| 20 | 32 (32%) | 21 (21%) | 2 (2%) |
| 25 | 240 (60%) | 78 (19,5%) | 13 (3,2%) |
| 30 | 261 (65,2%) | 114 (28,5%) | 80 (20%) |

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Na proporção entre machos e fêmeas sobreviventes a cada concentração, exposta na Tabela 10, há destaque para a concentração de 0,001 mg/L a 20°C a qual exibiu um valor aproximado de 62% de machos sendo que, para as temperaturas maiores, a maior proporção foi de ocorrência de fêmeas.

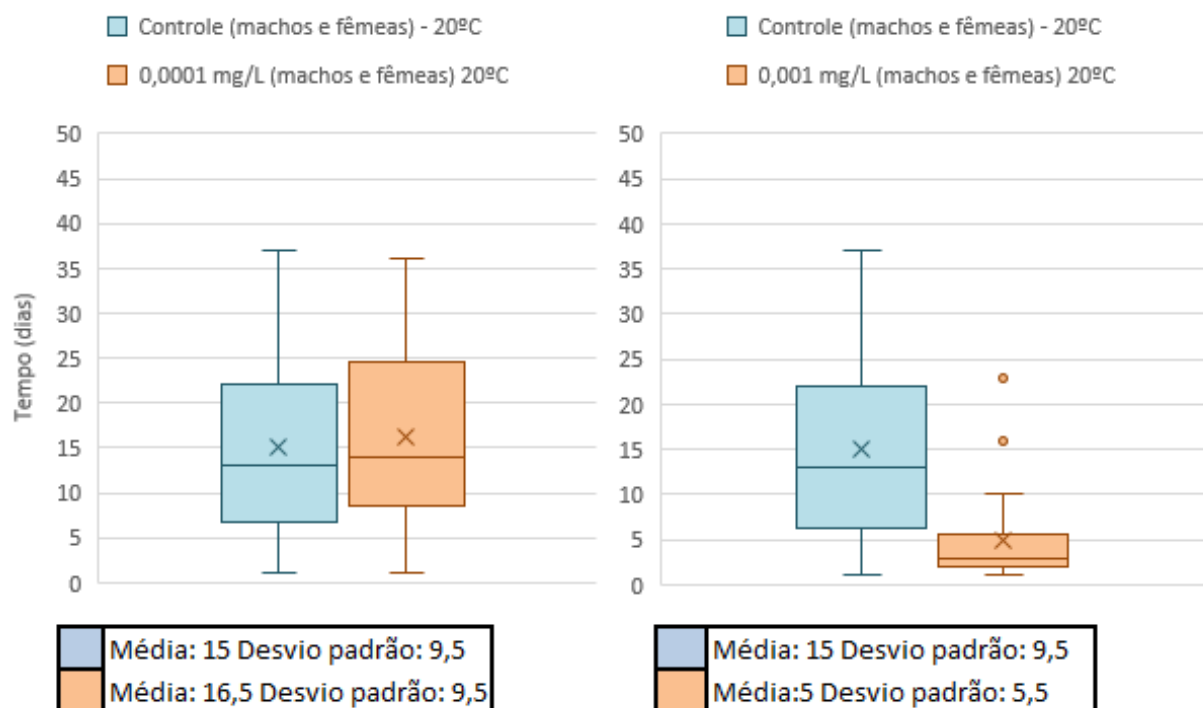
Tabela 10 - Machos e fêmeas sobreviventes em cada concentração (mg/L) de *Pyriproxyfen* e em diferentes temperaturas (°C).

| 0,0001 mg/L (<i>Pyriproxyfen</i>) | | |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| Temperatura (°C) | Machos | Fêmeas |
| 20 | 13 (40,6%) | 19 (59,3%) |
| 25 | 119 (49,5%) | 121 (50,4%) |
| 30 | 146 (55,9%) | 115 (44%) |
| 0,001 mg/L (<i>Pyriproxyfen</i>) | | |
| Temperatura (°C) | Machos | Fêmeas |
| 20 | 13 (61,9%) | 8 (38,1%) |
| 25 | 34 (43,5%) | 44 (56,4%) |
| 30 | 50 (45,7%) | 64 (56,1%) |
| 0,01 mg/L (<i>Pyriproxyfen</i>) | | |
| Temperatura (°C) | Machos | Fêmeas |
| 20 | 2 (100%) | 0 |
| 25 | 6 (46,1%) | 7 (53,8%) |
| 30 | 42 (52,5%) | 38 (47,5%) |

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Para a temperatura de 20°C, observou-se uma redução de 11,5 dias entre as médias de sobrevivência dos indivíduos em resposta ao aumento em 10 vezes da concentração de ingrediente ativo (de 0,0001 mg/L para 0,001 mg/L), conforme observado na Figura 20. Para concentrações 10 vezes maiores, correspondendo ao recomendado pela OMS, não foram produzidos mosquitos suficientes para tal análise (n=2 com longevidade de 2 dias).

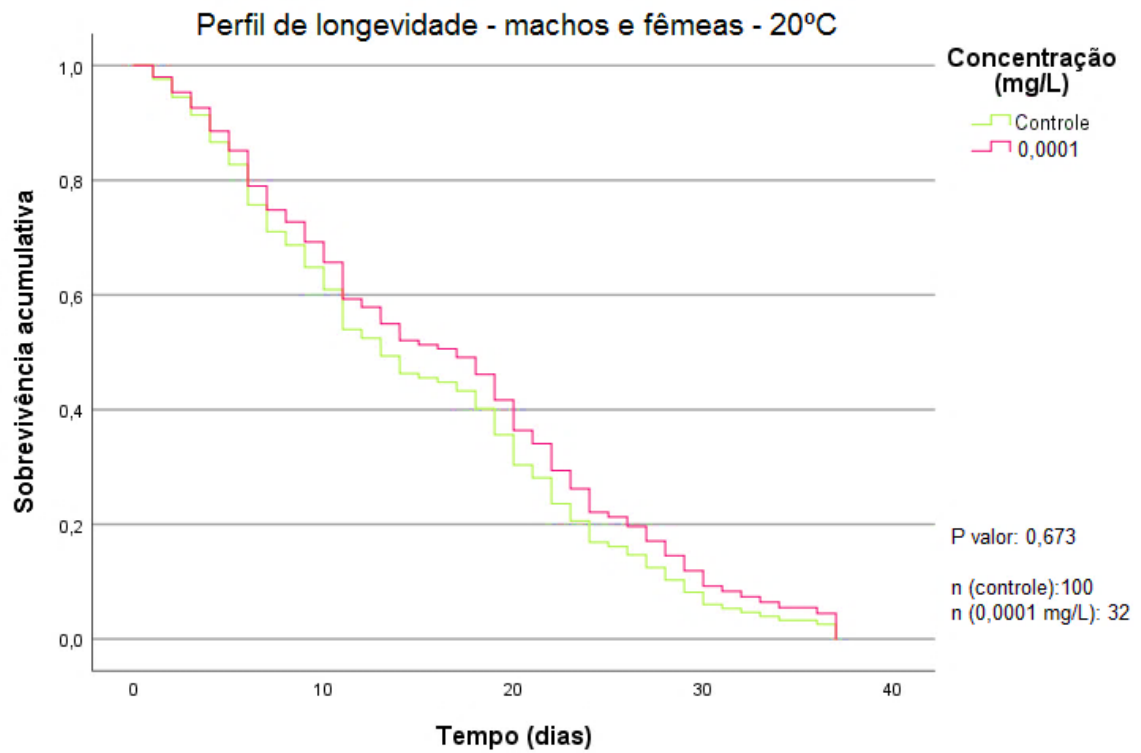
Figura 20 – Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambientes não contaminados (experimento controle) e de mosquitos sobreviventes a diferentes doses de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 20°C).



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

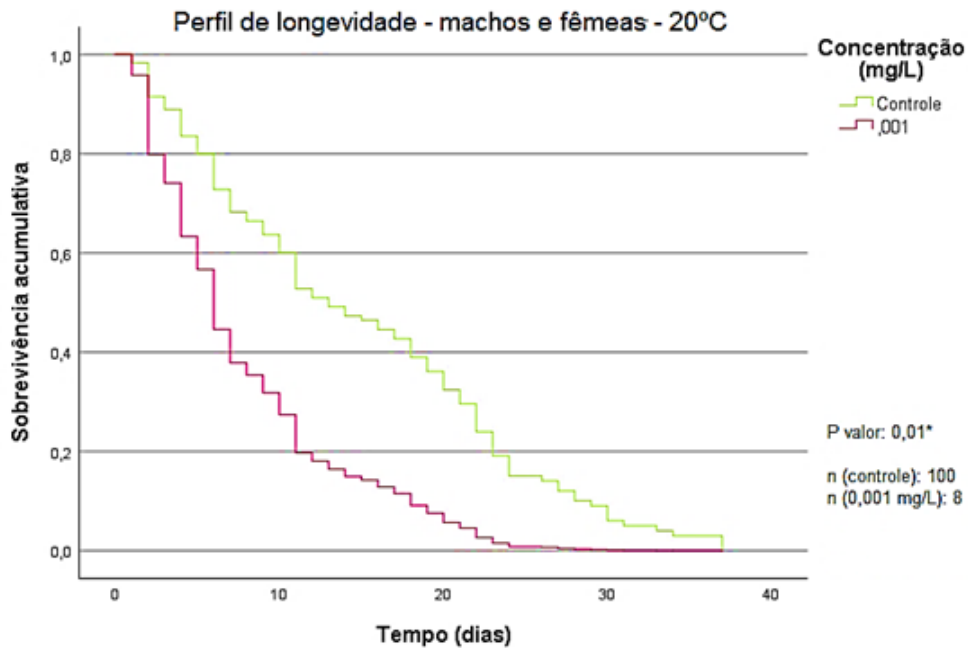
Ao analisar a longevidade por meio da regressão de Cox, não houve evidências de diferenças significativas entre a longevidade dos mosquitos provenientes de ambiente não contaminado (experimento controle) e dos indivíduos sobreviventes ao tratamento com *Pyriproxyfen*, na concentração de 0,0001 mg/L (Figura 21). Essa relação é diferente quando são comparados o perfil de longevidade do experimento controle, com a concentração dez vezes maior, correspondente a 0,001 mg/L, demonstrado na Figura 22. O baixo número de observações, devido à baixa sobrevivência nessa concentração, junto à presença de dois *outliers* possivelmente influenciaram nas análises.

Figura 21 – Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,0001 mg/L de *Pyriproxyfen*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 22 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen*.

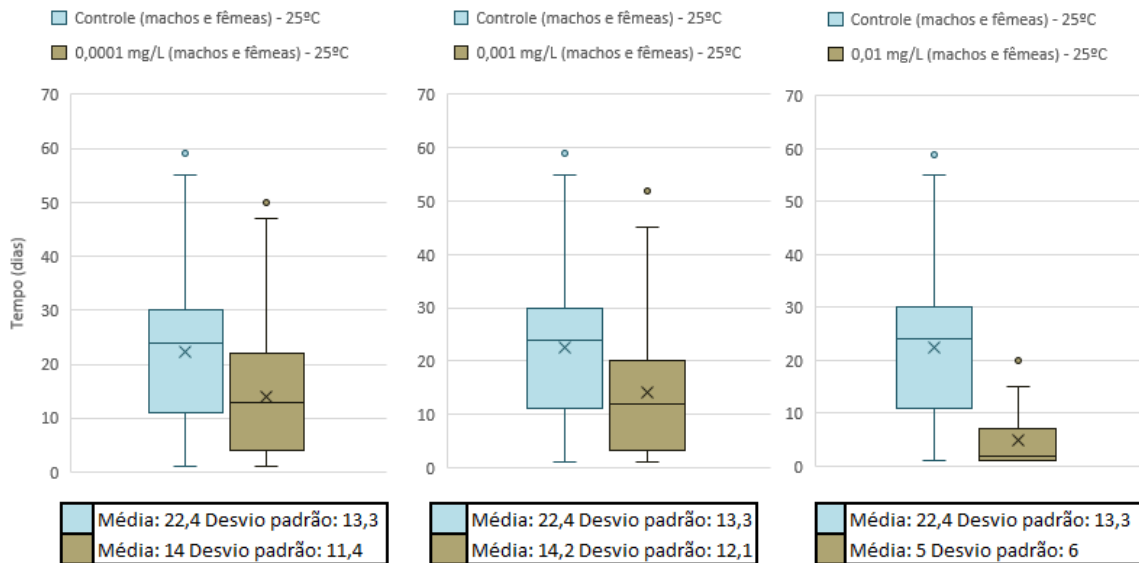


Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Na temperatura em 25°C, constatou-se maior diferença entre as longevidades médias observadas quando comparados os indivíduos do controle e os indivíduos sobreviventes ao tratamento com *Pyriproxyfen*, em todas as concentrações (Figura 23). Além disso, o tempo médio de longevidade foi maior para todas as condições.

Entretanto, o aumento em dez vezes na menor concentração (de 0,0001 mg/L para 0,001 mg/L) não produziu aumento na longevidade média dos mosquitos, sendo observada diminuição na longevidade média apenas na concentração de 0,01 mg/L, assim como também houve menor número de observações para esta última concentração, o que é consequência da redução na taxa de sobrevivência.

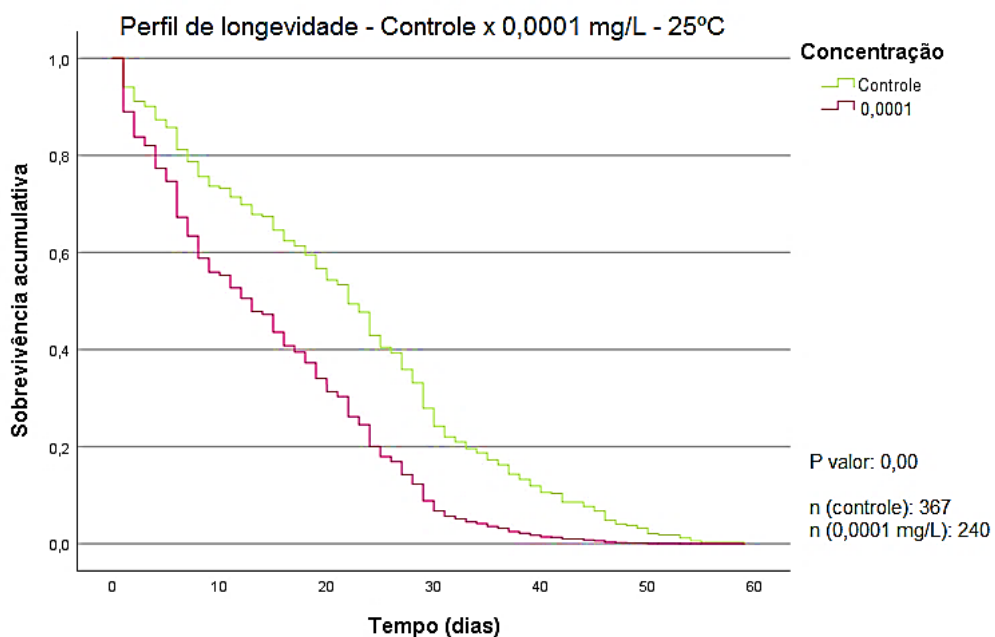
Figura 23 – Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambientes não contaminados (experimento controle) e de mosquitos sobreviventes a diferentes doses de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 25°C).



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Houve evidência de diferença significativa entre a longevidade dos indivíduos no controle e na concentração de 0,0001 mg/L, demonstrando que os mosquitos sobreviventes dessa concentração vivem menos que os indivíduos do controle (Figura 24).

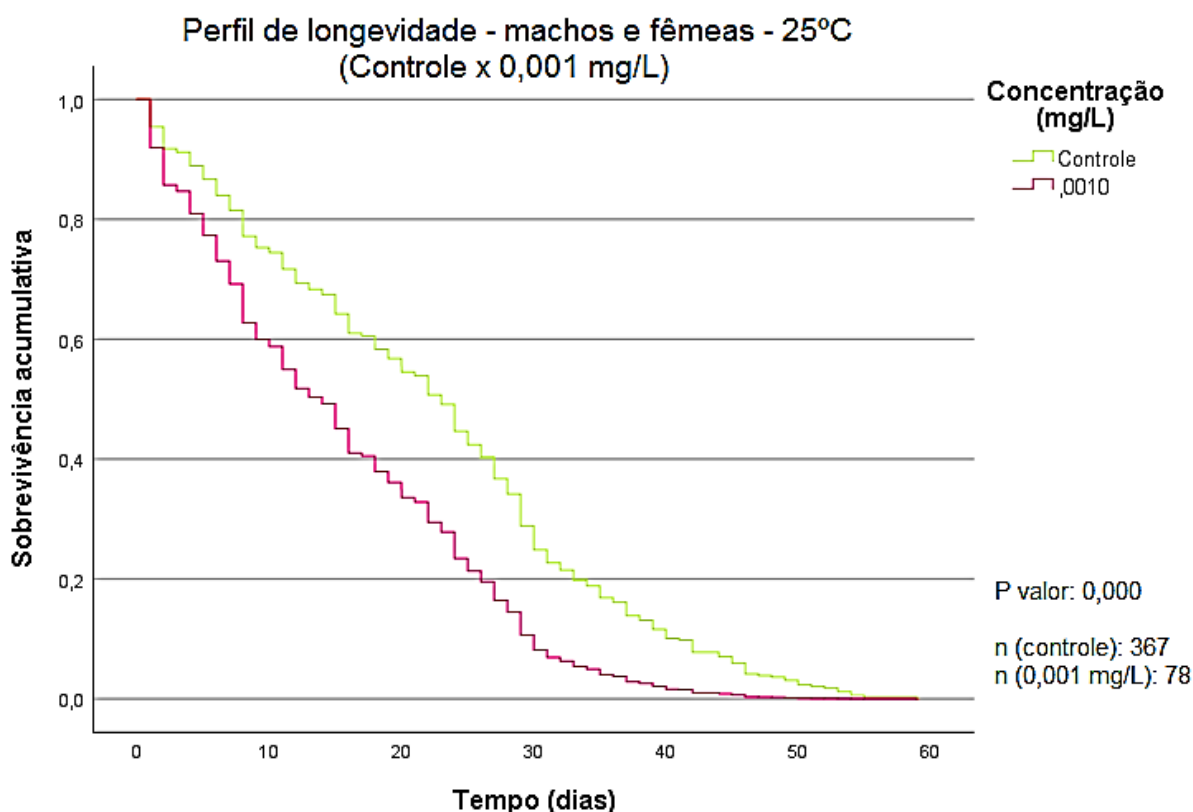
Figura 164 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,0001 mg/L de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 25°C)



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Resultado semelhante foi observado na avaliação entre a longevidade dos mosquitos do experimento controle e a concentração de 0,001 mg/L (Figura 25), o que era esperado, uma vez que a longevidade média observada para essa concentração foi muito similar a encontrada para a concentração de 0,0001 mg/L (variação de 0,2 dias na média observada).

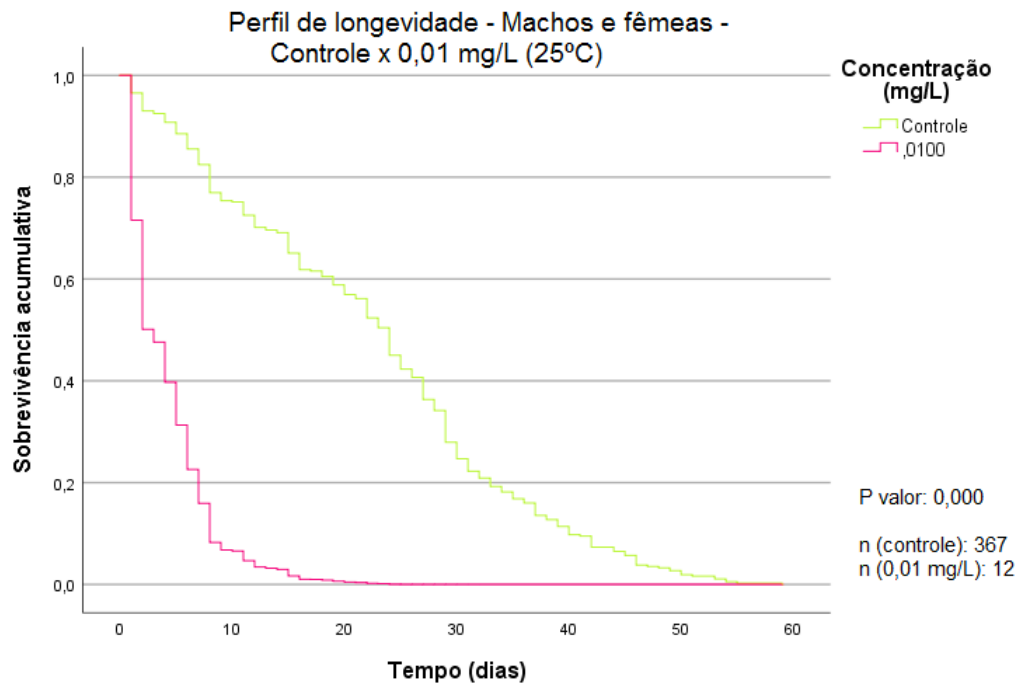
Figura 25 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 25°C)



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

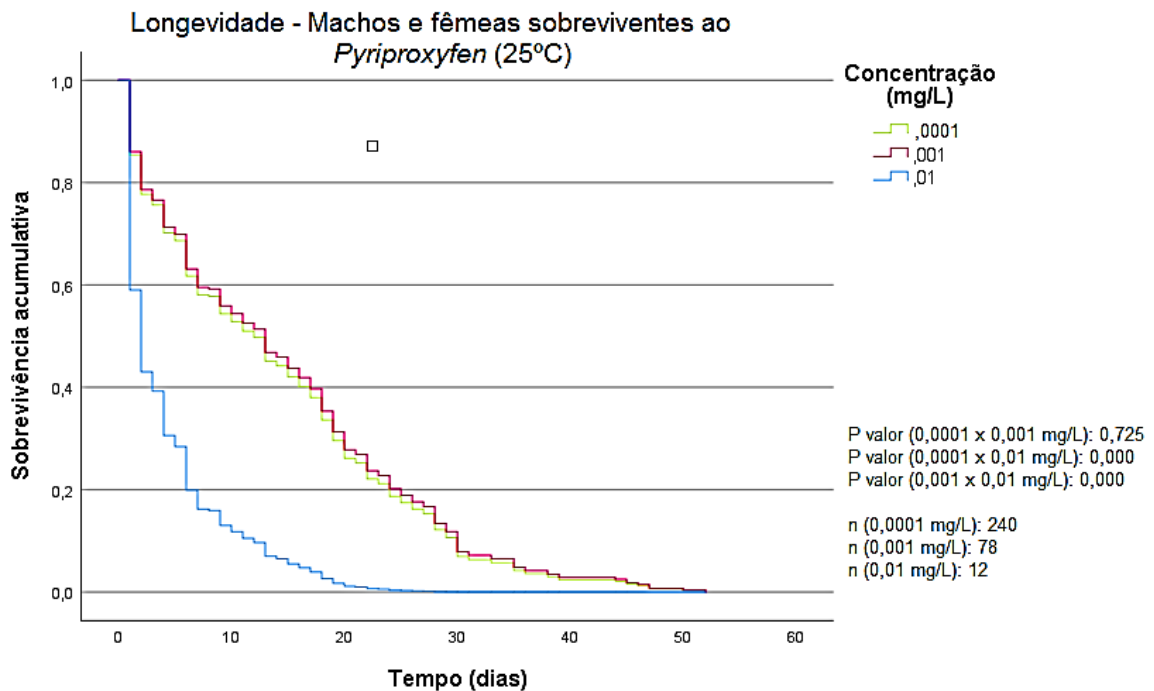
Ao analisar os registros sobre a longevidade dos mosquitos sobreviventes ao tratamento com 0,01 mg/L, houve indício de que estes também vivem menos que os mosquitos provenientes de um desenvolvimento em ambiente ausente do larvicida (Figura 26) e também vivem menos que os sobreviventes às concentrações menores (0,0001 mg/L e 0,001 mg/L) (Figura 27).

Figura 176 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 25°C)



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

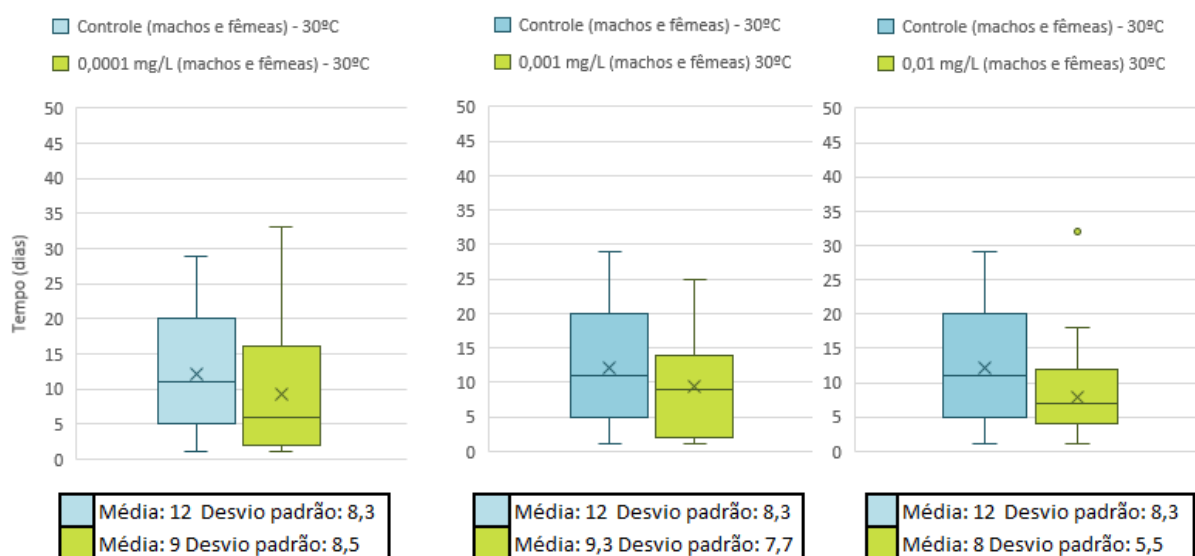
Figura 27 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes diferentes concentrações (mg/L) de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 25°C)



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Assim como o observado para temperatura de 25°C, em 30°C não houve diferença entre a longevidade média dos mosquitos sobreviventes a 0,0001 mg/L e 0,001 mg/L. Em geral, para essa temperatura, os mosquitos viveram menos se comparados aos mosquitos provenientes da temperatura de 25°C e viveram mais em relação aos indivíduos de 20°C, ilustrado descritivamente por meio dos boxplots expressos na Figura 28.

Figura 28 - Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos provenientes de ambientes não contaminados (experimento controle) e de mosquitos sobreviventes a diferentes doses de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 30°C).

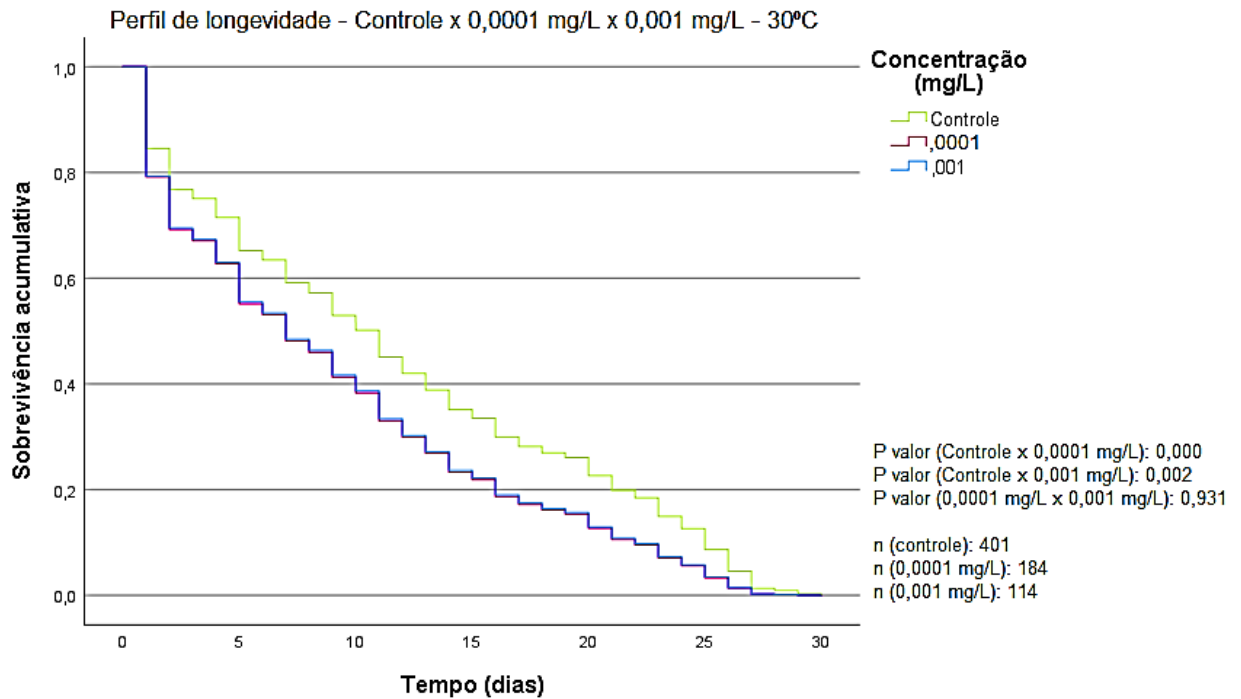


Fonte: Elaborado pelo autor (2018)

No entanto, houve aumento de três dias na longevidade média dos mosquitos na concentração de 0,01 mg/L, se comparados com os registros de longevidade obtidos para esta mesma dose, porém na condição térmica de 25°C, assim como também houve aumento do número de observações ($n = 80$).

A diferença do perfil de longevidade entre o controle e a menor concentração foi estatisticamente significativa, sendo evidente que, mesmo com a baixa concentração do ingrediente ativo, os mosquitos de ambos os sexos viveram menos (Figura 29). O mesmo resultado foi encontrado quando a concentração foi aumentada em dez vezes (0,001 mg/L).

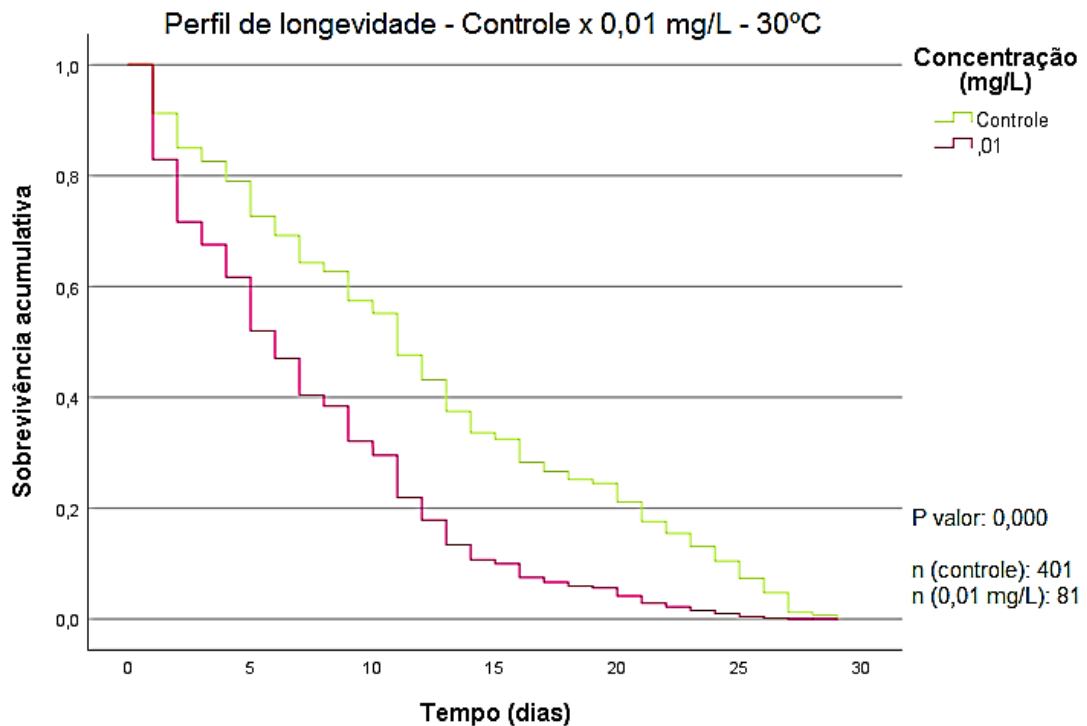
Figura 29 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes às concentrações de 0,0001 e 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 30°C).



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Foi observado aumento na longevidade média dos mosquitos sobreviventes ao tratamento com a concentração de 0,01 mg/L junto com o aumento da temperatura do ambiente para 30°C. A condição de maior temperatura ainda apresentou diferença significativa da longevidade exibida pelo controle, permitindo então inferir que os mosquitos sobreviventes dessa condição (0,01 mg/L) vivem menos que os mosquitos do experimento controle (Figura 30).

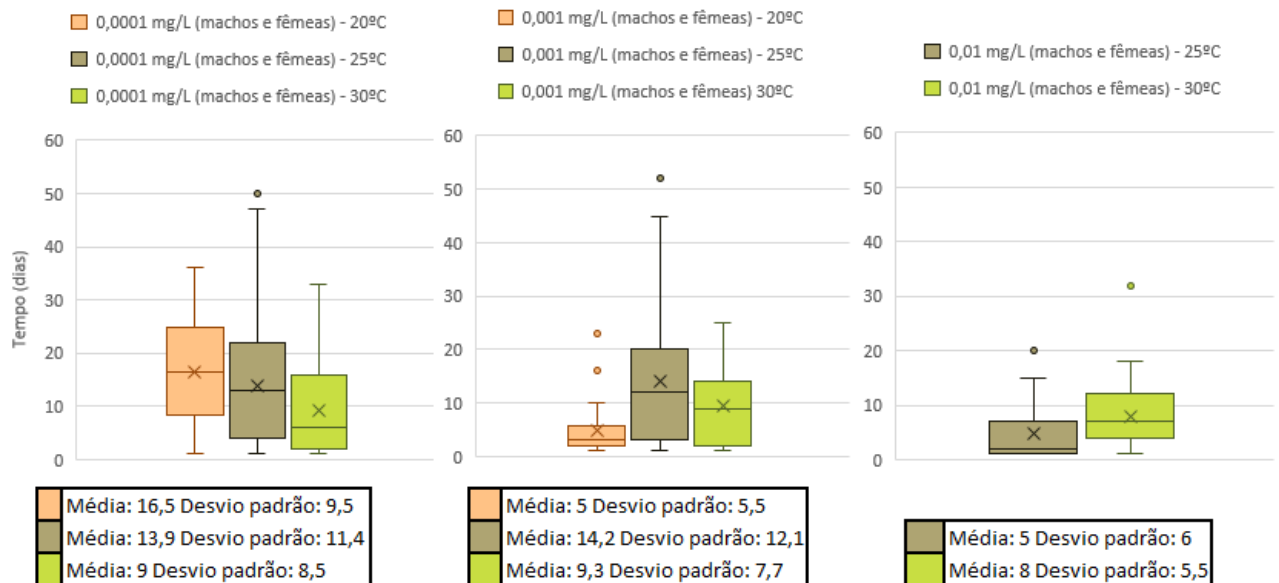
Figura 30 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas provenientes do experimento controle em comparação aos sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L de *Pyriproxyfen* (Temperatura: 30°C)



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Ao avaliar os registros em longevidade dos indivíduos sobreviventes às aplicações do *Pyriproxyfen*, verificou-se que o aumento da concentração de 0,0001 mg/L para 0,001 mg/L, no teste realizado em temperatura ambiente de 20°C, resultou em redução significativa da longevidade dos mosquitos (p valor = 0,000), apresentando redução em 11,5 dias no tempo de vida, o que indica a sensibilidade dos mosquitos ao estresse térmico e ao larvicida. Quando comparado o mesmo intervalo de concentrações, porém à temperatura de 25°, não houve diferença significativa entre as longevidades dos mosquitos sobreviventes, sendo esta afirmação também perceptível por meio dos dados descritivos expostos nos boxplots que compõem a Figura 31.

Figura 31 - Análise descritiva da longevidade (dias) dos mosquitos sobreviventes a diferentes concentrações (mg/L) de *Pyriproxyfen* e em diferentes temperaturas (°C).

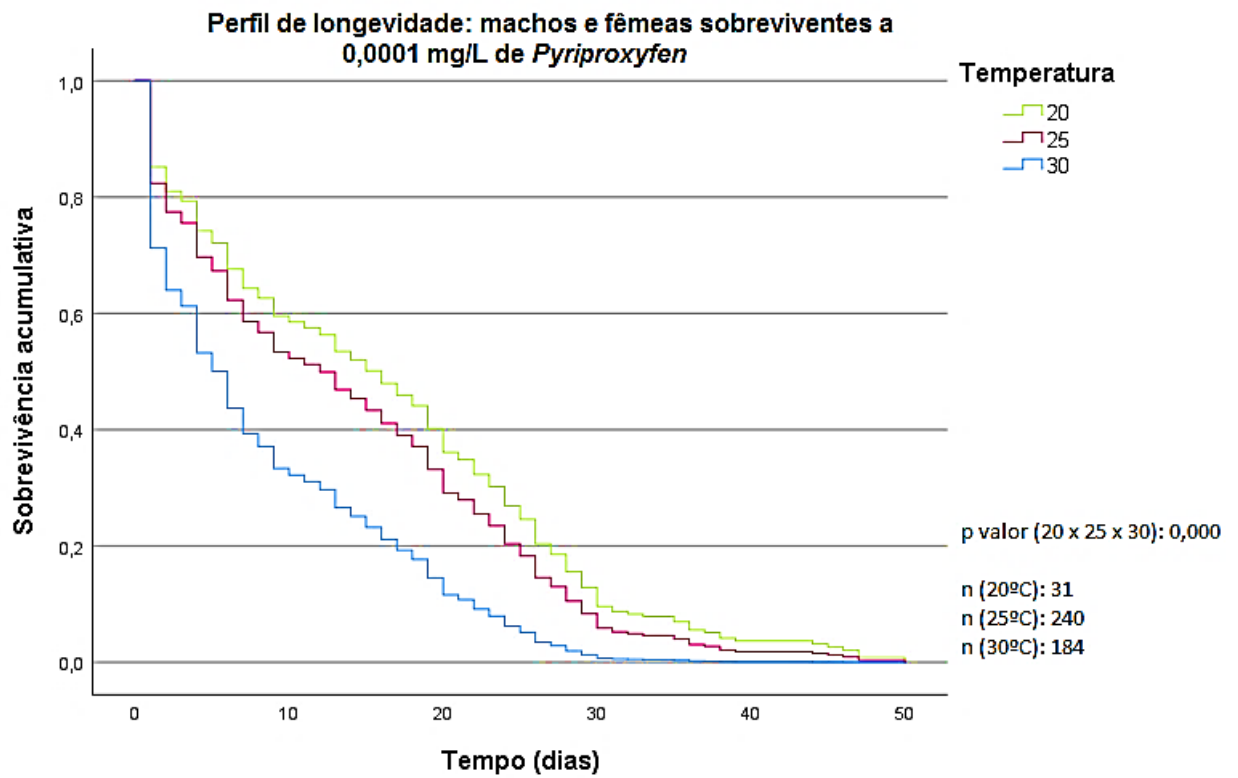


Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Comparando as longevidades dos mosquitos sobreviventes à menor concentração aplicada nas três diferentes condições de temperatura, houve evidências de que os mosquitos vivem menos em temperaturas menores da mesma forma como foi verificado nos indivíduos que se desenvolveram em um ambiente ausente do tratamento com *Pyriproxyfen* (Figura 32). Com relação aos sobreviventes a 0,001 mg/L, não houve evidências de que os indivíduos apresentem diferenças na longevidade entre as temperaturas 20°C e 25°C (valor “p” > 0,01).

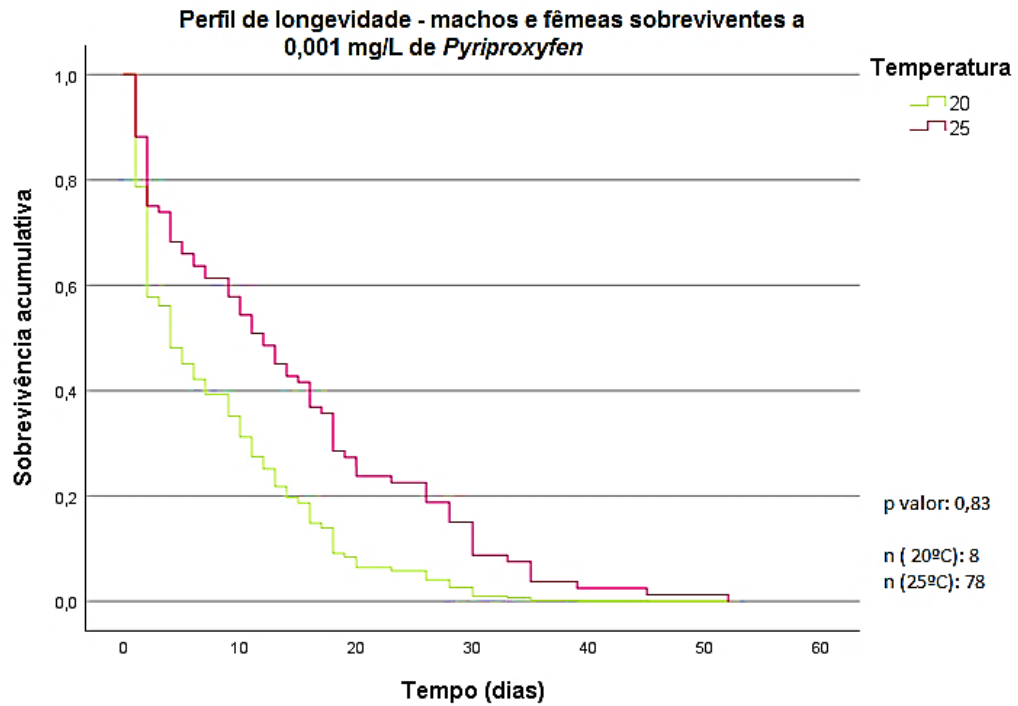
Em contrapartida, houve subsídio estatístico para inferir que, com um aumento de 25°C para 30°C, os mosquitos vivem menos quando sobreviventes ao desenvolvimento larval em um ambiente com 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen* (valor “p” < 0,01). O perfil de longevidade comparando as temperaturas 20°C e 25°C está exposto pela Figura 33 enquanto a resultante da regressão de Cox evidenciando as diferenças encontradas entre 25°C e 30°C estão evidentes pela Figura 34.

Figura 32 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,0001 mg/L de *Pyriproxyfen* em diferentes temperaturas (°C)



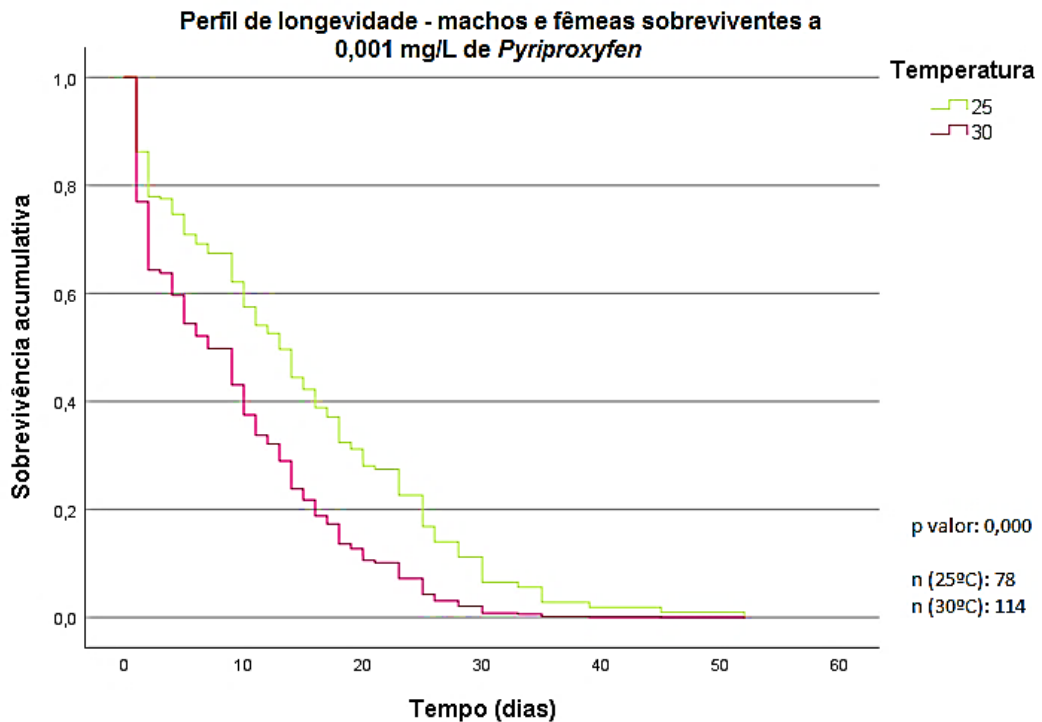
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 33 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen* em 20°C e em 25°C.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 184 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen* em 25°C e em 30°C.

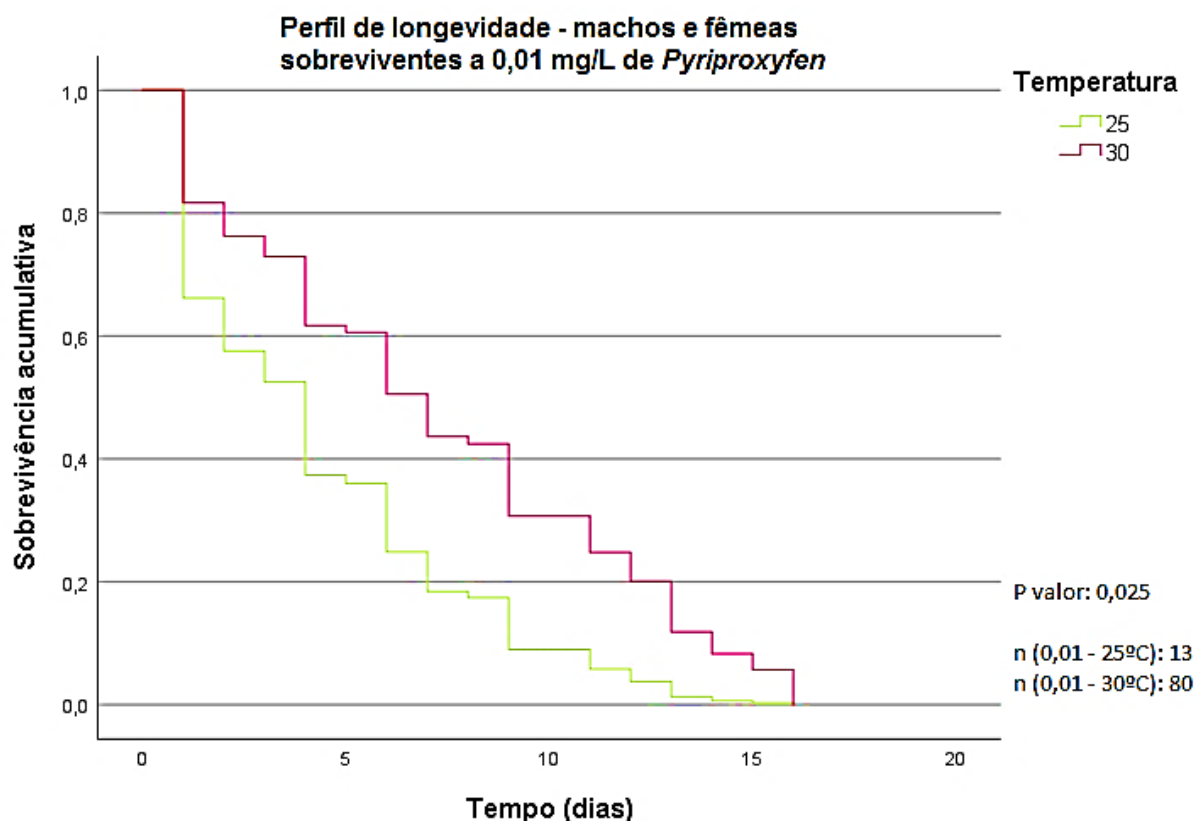


Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Entre as temperaturas de 25°C e 30°C, não houve indícios de diferenças nas longevidades dos mosquitos oriundos de desenvolvimento larval em um ambiente contaminado com 0,01 mg/L de *Pyriproxyfen* (valor “p” > 0,01). Conforme ilustrado pela Figura 35, em ambos os tratamentos em diferentes temperaturas houve um padrão de longevidade similar, não ultrapassando um máximo de 15 dias de vida entre ambas as condições.

Os mosquitos provenientes da temperatura de 30°C apresentaram 3 dias a mais em média que os mosquitos sobreviventes em 25°C, o que representa um resultado diferente do observado como padrão para 25°C, sendo a temperatura em que apresentou as maiores longevidades tanto para os tratamentos com o larvicida quanto para os mosquitos provenientes do experimento controle. Essa breve divergência produziu a diferença observada no padrão de longevidade ilustrado pelo gráfico, gerado pela regressão de Cox.

Figura 35 - Longevidade (dias) de machos e fêmeas sobreviventes à concentração de 0,01 mg/L de *Pyriproxyfen* em 25°C e em 30°C.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Por meio dos dados apresentados, cabe reafirmar a alta eficiência do *Pyriproxyfen* em todas as três condições térmicas padronizadas e testadas no controle populacional de *Ae. aegypti*. O ingrediente ativo, além de apresentar alta eficiência na inibição de emergência das

larvas, também exerceu efeito potencial sobre a aptidão reprodutiva das populações utilizadas para o teste, com a observação da redução na longevidade média de ambos machos e fêmeas sobreviventes a todas as concentrações aplicadas. Os resultados obtidos no presente trabalho são corroborados pelos resultados encontrados por Pessoa (2018), que avaliando o efeito do *Pyriproxyfen* sobre diversos aspectos de vida de machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, também encontrou efeito na redução da longevidade dos indivíduos submetidos ao composto.

No entanto, conforme alertaram Antonio et al. (2009), em situações nas quais a concentração letal não é atingida, tais como em contextos em que o composto sofre degradação com o tempo ou ainda em ambientes que estão sujeitos a serem perturbados pela água das chuvas, um certo número de larvas pode estar apto a se desenvolver. Desta forma, a dose de 0,01 mg/L que é recomendada para aplicação em campo pela OMS correspondeu a uma dose sub letal para 20% dos organismos testados, quando aplicada em temperatura ambiente de 30°C. Este resultado pode não apresentar relevância estatística mas implica relevância biológica, uma vez que houve aumento em 5,4 vezes no número de fêmeas sobreviventes a 30°C (n = 38), temperatura frequentemente registrada nos períodos de verão em que as taxas reprodutivas da espécie são maiores, se comparado ao resultado para 25°C na mesma concentração (n = 7).

Para estes indivíduos sobreviventes às doses testadas, cabe aqui ressaltar que a presença do *Pyriproxyfen* no ambiente pode ter agido, como consequência, na intensificação dos efeitos de competição intraespecífica durante a fase larval, uma interação biológica que apresenta potencial de interferir em diversas características dos organismos por influenciar na demanda energética do organismo para obtenção de recursos e na alocação de energia para diversas funções fisiológicas (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007). Partículas orgânicas como fonte de alimento geralmente são abundantes e com alta qualidade para os dois primeiros estágios larvais, mas tornam-se menos abundantes e com qualidade reduzida para os terceiro e quarto estágios larvais, momento em que a competição por alimento tende a ser mais intensa e momento no qual o larvicida exerce efeito (STEINWASCHER, 2018).

Reiskind e Lounibos (2009), avaliando em laboratório os efeitos da competição intraespecífica durante o desenvolvimento larval para *Ae. aegypti*, identificaram fêmeas menores e menos longevas quando provenientes do crescimento em ambiente com maior densidade de imaturos. Esta relação foi observada também por Steinwascher (2018), como consequência da menor disponibilidade de alimento nos criadouros devido a densidade de larvas que reflete na maior demanda em nutrição. A densidade populacional, durante a fase imatura, também tem o potencial de influenciar na capacidade vetorial das fêmeas resultantes, isto é, a suscetibilidade das fêmeas em se tornarem infectadas por algum vírus compatível ao

seu ciclo de vida (MUTURI et al., 2011). Esses resultados corroboram com o efeito observado no presente trabalho, em que a longevidade foi menor em todos os mosquitos sobreviventes aos tratamentos com *Pyriproxyfen* no estágio larval quando comparada com a longevidade dos mosquitos do experimento controle sem contaminação do composto. Essa observação indica a possibilidade de que a competição intraespecífica tenha sido intensificada em resposta à permanência forçada na fase imatura, conferida pelo análogo de hormônio juvenil testado.

Fatores bióticos e abióticos, durante a fase adulta, também têm potencial em interferir na longevidade dos mosquitos, especialmente das fêmeas. Villareal et al (2018) comprovaram que as proteínas seminais secretadas pelas glândulas acessórias dos machos transferidas para a fêmea durante a cópula estão relacionadas ao aumento significativo da longevidade das fêmeas. Tal efeito não foi passível de ser verificado pelo presente trabalho, pois os machos e fêmeas foram isolados durante o experimento de análise da longevidade. Em contrapartida, Sylvestre, Gandini e Maciel-de-Freitas (2013) demonstraram que fêmeas infectadas com sorotipos de DENV têm sua longevidade reduzida, assim como também diminuem seu sucesso reprodutivo e fecundidade.

Tais efeitos configuram fatores de grande interesse considerando as respostas em longevidade como um dos efeitos às concentrações sub letais, uma vez que estes podem refletir no cenário epidemiológico. Para insetos que representam importância médica e sanitária, conhecer seus aspectos de história de vida e os fatores que os afetam é fundamental para que os programas de controle sejam eficientes.

Com a sobrevivência a concentrações sub letais do larvicida, há possibilidade de desenvolvimento de resistência para populações de gerações subsequentes. Conforme Christophers (1960) descreveu, os mosquitos estão aptos a copularem logo após a emergência e caso apresentem alelos que confirmam alguma característica de resistência podem transmitir tal característica à prole.

Para o Diflubenzuron, um larvicida da classe de IGR que age inibindo a síntese de quitina, Belinato e Valle (2015) verificaram o desenvolvimento de resistência ao composto após seis gerações, a qual também esteve associada a redução na longevidade como custo a tal desenvolvimento de resistência. Conforme afirmaram Louise, Vidal e Suesdek (2015), ao analisarem a variabilidade genética de uma população de *Ae. aegypti* durante 20 gerações, verificaram alto polimorfismo e foi detectada mudanças nos padrões dos marcadores genéticos dentro do período do estudo, 14 meses. Essa alta plasticidade pode refletir um patrimônio genético rico e, como consequência, implicar fácil adaptação dessa espécie a novos ambientes,

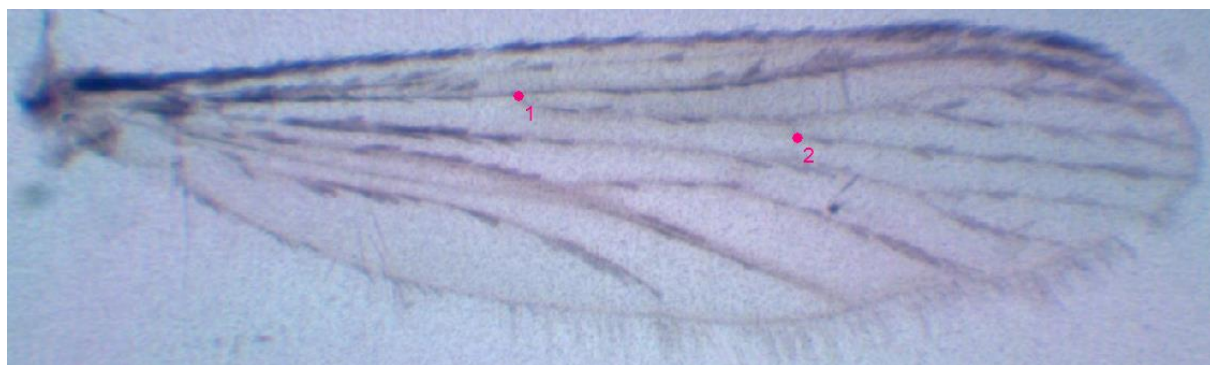
o que configura uma limitação aos esforços de controle desse vetor (LOUISE; VIDAL; SUESDEK, 2015).

5.3 Análise da morfometria alar das fêmeas – Tamanho dos centroides

5.3.1 Teste de repetibilidade

Foi executado teste de repetibilidade no *software* Statistica versão 13.4.0.14 (TIBCO Software Inc, 2018), recomendado por Vidal (2010), de forma a medir a confiabilidade do sistema de medidas aplicado para o cálculo do TC. Em uma mesma asa, escolhida aleatoriamente, foram realizadas seis repetições de marcação de dois marcos anatômicos, sendo que o segundo marco representa um ponto de maior dificuldade de determinação (Figura 36).

Figura 36 - Ilustração dos marcos anatômicos das asas do mosquito *Aedes aegypti*, escolhidos para o teste de repetibilidade



Fonte: Acervo pessoal do autor (2018).

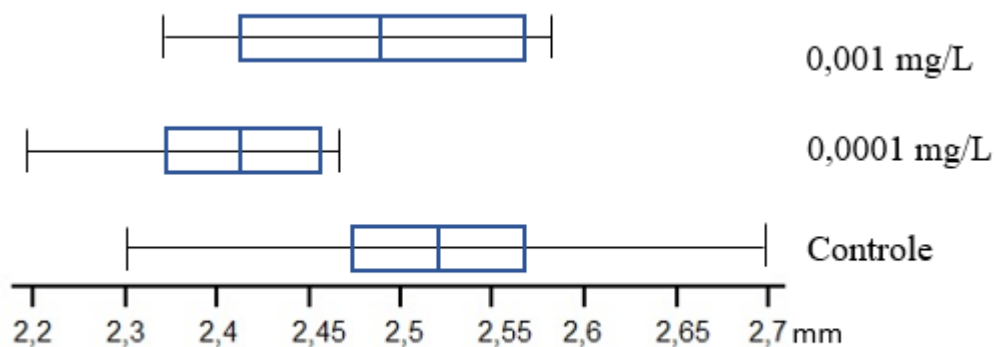
A verificação da repetibilidade produziu mais de 90% de confiança nas medições examinadas, o que indica que o sistema de medidas do operador está no intervalo aceitável (ASQC/AIAG, 1991).

5.3.2 Tamanhos do centroide

Para as asas analisadas da temperatura em 20°C, os TC calculados variaram entre 2,2 mm. e 2,7 mm entre todas as asas utilizadas na avaliação (n = 21). Asas provenientes de fêmeas sobreviventes à dose em 0,0001 mg/L apresentaram variação de apenas 0,27 mm entre a maior e a menor asa. Para as sobreviventes a 0,001 mg/L, baixa variação também foi observada, sendo esta apenas 0,23 mm menor entre os valores máximos e mínimos. Para as asas examinadas oriundas do experimento controle, a variação foi de 0,4 mm. As distribuições dos tamanhos do centroide (para 20°C) representadas em boxplot estão ilustradas pela Figura 37. No entanto, não

há evidência de que o tamanho das asas seja diferente entre as sobreviventes das duas concentrações avaliadas e o controle a 20°C (valor “p” = 0,1469).

Figura 37 – Análise descritiva dos tamanhos do centroide (em milímetros) das asas de fêmeas sobreviventes aos diferentes tratamentos com *Pyriproxyfen* a 20°C

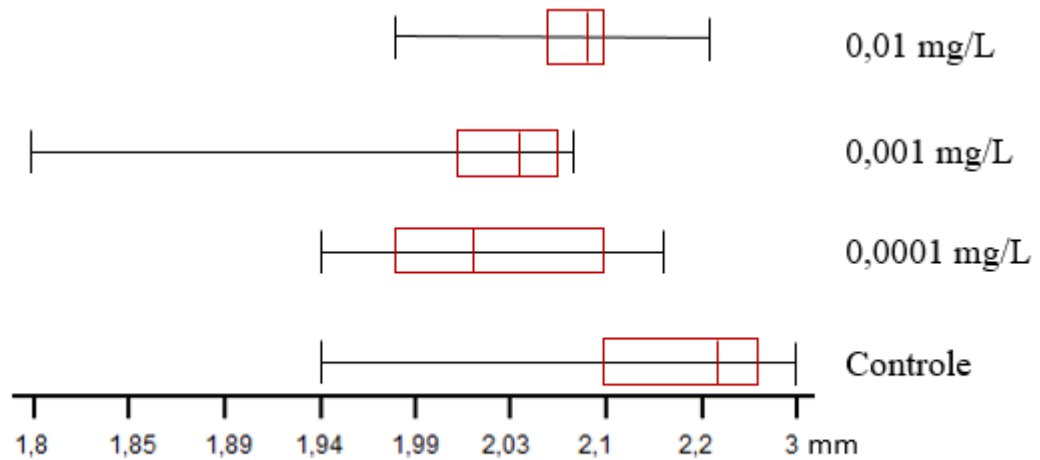


Valor “p” > 0,01

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Na condição térmica de 30°C, a variação do tamanho das asas avaliadas por meio do cálculo do TC apresentou tamanho mínimo em 1,8 mm (nas condições de sobrevivência a 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen*) e tamanho máximo em 3 mm (fêmea proveniente do ambiente sem contaminação pelo larvicida) (Figura 38). Não houve diferença significativa entre as diferentes condições analisadas, com evidência de que não há variação expressiva no tamanho das asas (p valor = 0,088).

Figura 198 - Análise descritiva dos tamanhos do centroide (em milímetros) das asas de fêmeas sobreviventes aos diferentes tratamentos com *Pyriproxyfen* a 30°C

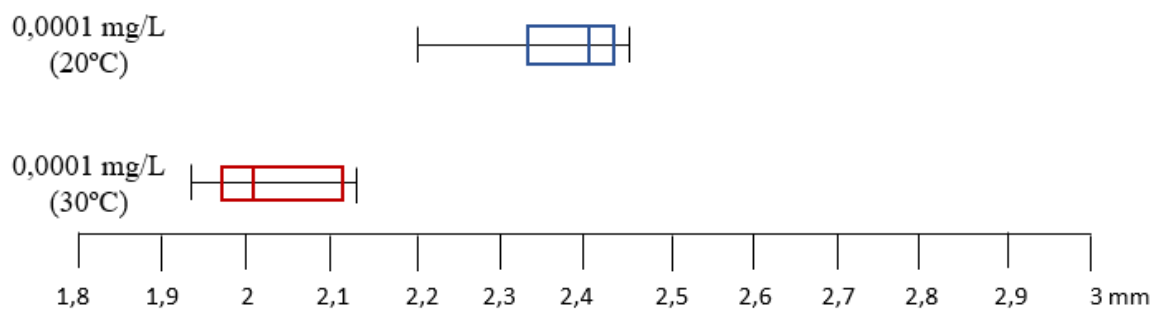


Valor "p" > 0,01

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

No entanto ao comparar o tamanho do centroide alar provenientes de indivíduos desenvolvidos em condição térmica de 20°C e de 30°C, houve evidência de que as fêmeas, quando sobreviventes a um ambiente contaminado com *Pyriproxyfen*, são maiores a 20°C do que a 30°C (Figura 39 e Figura 40). Essa afirmação é excetuada para os casos nos quais as fêmeas são oriundas de desenvolvimento larval ausente de *Pyriproxyfen* (experimento controle), o que se confirma por meio da Figura 41.

Figura 39 - Tamanho dos centroides (mm) das asas de fêmeas sobreviventes à 0,0001 mg/L de *Pyriproxyfen* em 20°C e em 30°C



Valor "p" < 0,01

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 40 - Tamanho dos centroides (mm) das asas de fêmeas sobreviventes à 0,001 mg/L de *Pyriproxyfen* em 20°C e em 30°C

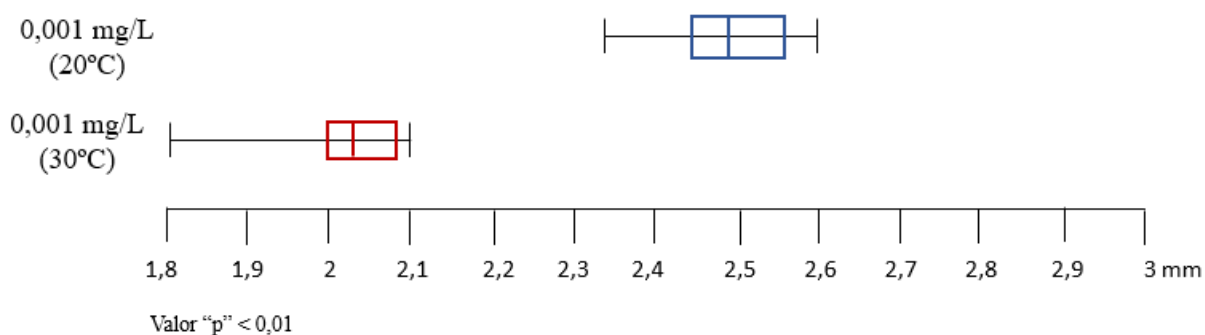
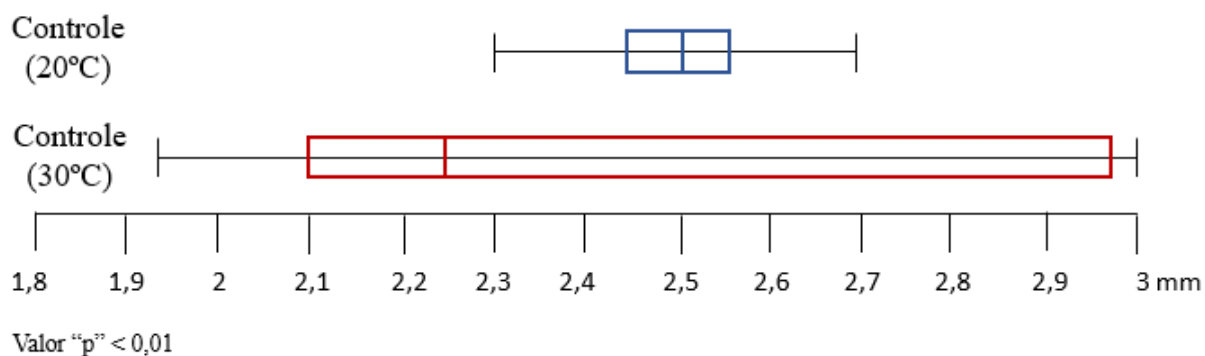


Figura 41 - Tamanho dos centroides (mm) das asas de fêmeas oriundas de desenvolvimento em ambiente ausente de larvicida *Pyriproxyfen* (experimento controle) em 20°C e 30°C



Efeitos indiretos de interações bióticas e abióticas, durante o desenvolvimento dos estágios imaturos, impactam diretamente características da história de vida dos organismos quando adultos principalmente para espécies com ciclos de vida complexos, os quais apresentam estágios aquáticos e terrestres, como é o caso do *Ae. aegypti* (PECHENIK, 2006). Para *Ae. aegypti*, os efeitos indiretos refletem na eficiência em transmissão dos vírus pois tais condições vivenciadas pelas larvas ocasionam em heterogeneidade de forma individual entre os mosquitos, ajudando a determinar quais indivíduos têm maior potencial em transmissão dos patógenos e quais características são essas (JULIANO et al., 2014).

O tamanho do mosquito adulto é interpretado como uma manifestação física da qualidade do habitat larval e reflete diretamente no comprimento da asa, sendo este um indicador viável desse parâmetro (NASCI, 1986; NASCI; MITCHELL, 1994;

STEINWASCHER, 2018). O porte do mosquito, de ambos os sexos, apresenta correlação linear com as reservas totais de carboidratos e proteínas acumuladas durante a fase larval e, para as fêmeas, reflete diretamente na habilidade em usar tais reservas para reprodução (BRIEGEL, 1989).

De acordo com um experimento realizado por Briegel (1989), fêmeas maiores ingeriram volumes de sangue duas vezes maiores que fêmeas menores. De forma diferente a outros mosquitos hematófagos, Scott e colaboradores (1993) identificaram que a fêmea de *Ae. aegypti* pode se alimentar de sangue mais de uma vez dentro de um mesmo ciclo gonotrófico, característica denominada discordância gonotrófica. A frequência de alimentação, no entanto, é positivamente correlacionada com a condição térmica do ambiente, com as fêmeas se alimentando mais frequentemente em ambientes mais quentes se comparados com a frequência notada para ambientes mais frios (SCOTT et al., 2000). Esta resposta observada acerca da relação entre temperatura e atividade hematófaga, entretanto, é confirmada como um dos efeitos indiretos exercidos pela temperatura do ambiente no desenvolvimento dos indivíduos e nas reservas energéticas (YASUNO; TONN, 1970). Essa relação tem impactos diretos na epidemiologia uma vez que também está relacionado com a suscetibilidade das fêmeas em serem infectadas pelos vírus.

Em condições laboratoriais, houve evidência de que fêmeas maiores são menos vulneráveis a se tornarem infectadas por algum sorotipo da dengue (ALTO; REISKIND; LOUNIBOS, 2008). Uma pesquisa realizada por Juliano e colaboradores (2014), avaliando a frequência de infecção por DENV e tamanho de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas no Rio de Janeiro, corroboraram tal afirmação na relação entre fêmeas menores e maior potencial de infecção por dengue. Não obstante, fêmeas menores que são oriundas de ambientes com intensa competição larval, vivem menos e conseqüentemente apresentam menor probabilidade de viverem o suficiente para se tornarem infectadas e transmitirem os patógenos aos vertebrados, levando como consequência à preocupação às fêmeas maiores que, mesmo que não tenham o mesmo alto potencial em adquirirem os vírus, vivem mais e suficiente para transmitirem tais patógenos além de consumirem maior volume de sangue (BRIEGEL, 1989; JULIANO et al., 2014).

Considerando os resultados encontrados no presente trabalho, as fêmeas sobreviventes aos tratamentos a 30°C foram significativamente menores e viveram menos que as provenientes do ambiente a 20°C além de serem mais representativas do que tende a acontecer em condições naturais. O intervalo de tamanho alar encontrado para as fêmeas na condição térmica em 30°C foi similar ao encontrado por Vidal (2010), para fêmeas coletadas em campo na região

metropolitana de São Paulo (entre 2,1 e 2,9 mm). No entanto, não houve diferenças significativas entre o tamanho alar das fêmeas afetadas pelo *Pyriproxyfen* quando larvas das fêmeas provenientes do experimento controle a 30°C. Este resultado indica que o larvicida junto com a temperatura têm influência sobre o tamanho das fêmeas, o que pode ser diferente caso a densidade larval difira da testada no presente trabalho.

Muito embora os resultados encontrados pelo presente trabalho induzam a inferir que as fêmeas sobreviventes aos tratamentos a 30°C são vetores mais eficientes, tal afirmação não pode ser feita sem a realização de testes de suscetibilidade aos vírus.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos experimentos realizados com o IGR *Pyriproxyfen* demonstram que, apesar da variação da temperatura, há efeito sobre o controle populacional de larvas de *Ae. aegypti*. No entanto, em temperaturas ambientais mais altas tais como a testada pelo presente trabalho, em 30°C, há uma tendência em redução significativa da eficiência se comparado com o resultado obtido para temperaturas mais baixas. Esse efeito merece destaque pois, uma vez que as maiores taxas reprodutivas da espécie são em períodos chuvosos e mais quentes, há possibilidade de impacto no cenário epidemiológico refletindo indiretamente no sucesso dos programas de controle. Ainda com relação à temperatura, cabe ressaltar que os ensaios desenvolvidos para a presente dissertação ainda não são ambientalmente representativos, pois no ambiente a temperatura está sujeita a flutuações as quais também têm o potencial de apresentar diferentes resultados. Cabe apontar que, durante o desenvolvimento dos experimentos, a maior temperatura aplicada foi em 35°C, mas que, devido a alta mortalidade dos indivíduos no grupo controle, os resultados foram excluídos. Supõe-se que tal mortalidade a qual inviabilizou a utilização dos resultados tenha sido em razão da alta temperatura, mantida de modo constante, sendo também um possível estressor para organismos ectotérmicos. No ambiente, é possível encontrar períodos com temperatura ambiente a 35°C, especialmente no verão e principalmente em regiões tropicais geograficamente próximas à linha do Equador. No entanto, tais temperaturas não são constantes conforme a padronização dos experimentos aqui delineados. Alguns autores relatam a influência de diferentes amplitudes térmicas na dinâmica de epidemias tal como também na interferência no tempo de desenvolvimento do vetor (CARRINGTON et al., 2013; ALTO et al., 2017; HUBER et al., 2018) e, sendo assim, a amplitude térmica tem potencial de interferir na eficiência do composto de forma diferente a

observada e relatada na presente dissertação, principalmente por este se tratar de um disruptor endócrino.

No que se refere ao cenário epidemiológico referente às arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* os potenciais efeitos sub letais causados pela aplicação do *Pyriproxyfen* também devem ser considerados, pois estes estão diretamente ligados à competência das fêmeas como vetores dos vírus. Sendo assim, recomenda-se a avaliação da possível influência das concentrações sub letais desse composto na suscetibilidade das fêmeas em se tornarem infectadas por algum dos sorotipos dos vírus, visto que tais resultados podem igualmente contribuir com ajustes necessários para manutenção de uso do composto visando manter e otimizar seu uso no propósito de controle populacional.

É importante ressaltar que embora não haja identificação de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao *Pyriproxyfen*, há essa possibilidade, mesmo com a aplicação rotacionada de larvicidas e adulticidas, devido ao alto polimorfismo dessa espécie e capacidade de adaptação relativamente rápida. Em conjunto, a aplicação racional de compostos no controle do vetor implica economia de recursos financeiros aos órgãos públicos e, indiretamente, implica economia em outros setores considerando a prevenção das doenças ocasionadas pelo mosquito. Não obstante, vale lembrar que a transmissão de doenças veiculadas pelo *Ae. aegypti* ocorre por meio de um processo dinâmico e espaço-temporal, o qual é afetado por múltiplos fatores envolvendo vetores, patógenos e humanos (ZHU et al., 2018). Sendo assim, mesmo com a aplicação bem-sucedida e padronizada conforme todos os fatores ambientais, a integração de diversas formas de controle deve ser enfatizada como parte do processo para o sucesso efetivo na prevenção e controle de epidemias.

O *Ae. aegypti* é uma espécie exótica e invasora, em associação próxima aos ambientes urbanos, a qual dificilmente se encontra sob pressão de competição interespecífica ou predação por habitarem, na fase larval, criadouros artificiais provenientes da ação humana. Sendo assim, dificilmente o *Pyriproxyfen* atinge organismos não alvo, como larvas de outros macroinvertebrados (e.g.: Odonata, Ephemeroptera, Plecoptera). No entanto, os criadouros contendo *Pyriproxyfen* podem estar sujeitos a serem carregados para rios e riachos (e.g. sob influência de chuvas) e potencialmente afetarem a fauna. Embora o larvicida seja classificado com uma alta seletividade implicando baixa toxicidade à organismos de outros táxons, o efeito em outros macroinvertebrados não é conhecido e este pode refletir em impactos na comunidade como um todo, se considerando os potenciais efeitos nas cadeias tróficas.

7 CONCLUSÕES

- a) O aumento da temperatura em 5°C, de 25°C para 30°C, resultou em redução significativa da eficiência do *Pyriproxyfen* como larvicida no controle de *Aedes aegypti* na concentração recomendada pela OMS (0,01 mg/L);
- b) Os mosquitos sobreviventes às concentrações do larvicida para todas as condições térmicas testadas têm longevidade reduzida se comparados aos mosquitos que provém de desenvolvimento larval em ambiente não contaminado pelo *Pyriproxyfen*;
- c) O *Pyriproxyfen*, em concentrações sub letais, produz diferenças no tamanho das fêmeas;
- d) Fêmeas que se sobreviveram a exposição ao *Pyriproxyfen*, durante os estágios imaturos, em ambientes mais quentes (30°C) são menores que fêmeas provindas de ambientes mais frios (20°C).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T. S. Hematophagy and hormone release. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 92, n. 1, p. 1–13, 1999.
- ALTO, B. W.; REISKIND, M. H.; LOUNIBOS, L. P. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 688–695, 2008.
- ANDRIGHETTI, M. T. M.; CERONE, F.; RIGUETI, M.; GALVANI, K. C.; MACORIS, M. L. G. Effect of Pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. **Dengue Bulletin**, v. 32, 2008.
- ANJOLLETE, A. F. F.; MARCORIS, M. de L. da G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 13, n. 156, p. 19–29, 2016.
- ANTONIO, G. E.; SÁNCHEZ, D.; WILLIAMS, T.; MARINA, C. F. Paradoxical effects of sublethal exposure to the naturally derived insecticide spinosad in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 65, n. 3, p. 323–326, 2009.
- ARAÚJO, H. R. C.; CARVALHO, D. O.; IOSHINO, R. S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, v. 6, p. 576 – 594, 2015.
- ARIANI, C. V.; SMITH, S. L.; OSEI-POKU, J.; SHORT, K.; JUNEJA, P.; JIGGINS, F. M. Environmental and genetic factors determine whether the mosquito *Aedes aegypti* lays eggs without a blood meal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 4, p. 715 – 721, 2015.
- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, v. 35, p. 661–675, 2005.
- BAGLAN, H.; LAZZARI, C.; GUERRIERI, F. Learning in mosquito larvae (*Aedes aegypti*): Habituation to a visual danger signal. **Journal of Insect Physiology**, v. 98, n. 1, p. 160–166, 2017.
- BAUD, D.; GUBLER, D. J.; SCHAUB, B.; LANTERI, M. C.; MUSSO, D. An update on Zika vírus infection. **The Lancet**, v. 390, p. 2099 – 2109, 2017.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. Ecology: From individuals to ecosystems. São Paulo: ARTMED, 4. ed. 2007. 740 p.
- BELINATO, T. A.; VALLE, D. The impact of selection with Diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1 – 19, 2015.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 295–302, 2007.

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 3, p. 165 – 172, 1990.

BROWN, J. E.; EVANS, B. R.; ZHENG, W.; OBAS, V.; BERRERA-MARTINEZ, L.; EGIZI, A.; ZHAO, H.; CACCONE, A.; POWELL, J. R. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514 – 525, 2014.

BURT, F. J.; MINER, J. J.; LENSCHOW, D. J.; MERITS, A.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A.; RUDD, P. A.; TAYLOR, A.; HERRERO, L. J.; ZAID, A.; NG, L. F. P.; MAHALIGAM, S. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. e107 – e117, 2017.

BYTTEBIER, B.; DE MAJO, M. S.; FISCHER, S. Hatching response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs at low temperatures: effects of hatching media and storage conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 97–103, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/ME13066>>.

CALVEZ, E.; MOUSSON, L.; VAZEILLE, M.; O'CONNOR, O.; CAO-LORMEAU, V. M.; MATHIEU-DAUDÉ, F.; POCQUET, N.; FAILLOUX, A. B.; DUPONT-ROUZEYROL, M. Zika virus outbreak in the Pacific: Vector competence of regional vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. 1 – 12, 2018.

CAMARGO, S. History of *Aedes aegypti* eradication in the Americas. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 36, p. 602-603, 1967.

CARRINGTON, L. B.; SEIFERT, S. N.; WILLITS, N. H.; LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W. Large diurnal temperature fluctuations negatively influence *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) life-history traits. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 43 – 51, 2013.

CHAGAS, A. C.; RAMIREZ, J. L.; JASINSKIENNE, N.; JAMES, A. A.; RIBEIRO, J. M. C.; MARINOTTI, O.; CALVO, E. Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and bloodfeeding success in dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, v. 111, n. 19, p. 1 – 6, 2014.

CHAN, M.; JOHANSSON, M. A. The incubation periods of dengue viruses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

CHAPMAN, R.F. Diapause. In: **The insects. Structure and function**. The English Universities Press Ltd, p.717-731, 1969.

CHEDIAK, M.; PIMENTA JR, F. G.; COELHO, G. E.; BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; CAVALCANTE, K. R. L. J.; SOUSA, L. C.; MELO-SANTOS, M. A. V.; MACORIS, M. L. G.; ARAÚJO, A. P.; AYRES, C. F. J.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; GOMES, R. G.; CAMPOS, K. B.; GUEDES, R. N. C. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 311- 321, 2016.

CHRISTOPHERS, S. R. **The Yellow Fever Mosquito: Its life history, bionomics and Structure**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1960.

COURET, J.; DOTSON, E.; BENEDICT, M. Q. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

COUTINHO-ABREU, I. V.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; VALENZUELA, J. G. Impact of insect

salivary proteins in blood feeding, host immunity, disease, and in the development of biomarkers for vector exposure. **Current Opinion in Insect Science**, v. 1, n. 10, p. 98–103, 2016.

CROW, J. F. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, v. 2, p. 227–246, 1957.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difetil Cloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6, 2002.

DARRIET, F.; CORBEL, V. Laboratory evaluation of Pyriproxyfen and Spinosad, alone and in combination, against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 6, p. 1190 – 1194, 2006.

DA SILVA, R. M.; VITAL, W. O.; FONSECA, R. N.; MARTINS, Y. P. M.; LEMOS, F. J. A.; VAZ JR, I. S.; LOGULLO, C. Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 227, p. 56 – 63, 2019.

DE OLIVEIRA, W. K.; FRANÇA, G. V. A.; CARMO, E. H.; DUNCAN, B. B.; KUCHENBECKER, R. S.; SCHMIDT, M. I. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **The Lancet**, v. 390, p. 861 – 870, 2017.

DEGALLIER N.; ROSA, A. P. A. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, E. S. T.; RODRIGUES, S. G.; FILHO, G. C. S.; ROSA, J. F. S T. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 2/3, p. 136 – 142, 1992.

DIAS, L. dos S. **Avaliação da persistência e efeito do Spinosad no desenvolvimento e reprodução e populações brasileiras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) resistentes aos inseticidas temephos e deltametrina**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p.283 – 285, 2015.

DUBROVSKY, E. B. Hormonal cross talk in insect development. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 6–11, 2005.

DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875–890, 2008.

ESTRADA, J. G.; MULLA, M. S. Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. **Journal of the American Control Association**, v. 2, n. 1, 1986.

FERNANDEZ, M.; KLOWDEN, M. J. Male accessory gland substances modify the host-seeking behavior of gravid *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 11, p. 965–970, 1995.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica: parte geral, Diptera, Anophelini**. 1. ed. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia, 1962.

GARCIA, G. A.; DAVID, M. R.; MARTINS, A. J.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; LINSS, J. G. B.; ARAÚJO, S. C.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D. 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**, n.12, v. 2, p. 1 – 20, 2018.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: a reemerging threat. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 237 – 260, 2010.

GÓMEZ, A.; SECACCINI, E.; ZERBA, E.; LICASTRO, S. Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 993 – 996, 2011.

GRECH, M. G.; SARTOR, P. D.; ALMIRÓN, W. R.; LUDUEÑA-ALMEIDA, F. Effect of temperature on life history traits during immature development of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Córdoba city, Argentina. **Acta Tropica**, v. 146, p. 1 – 6, 2015.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.

GUBLER, D. J. Dengue , urbanization and globalization : The unholy trinity of the 21 st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3–11, 2011.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. History and emergence of Zika Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 10, p. S860–S867, 2017.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 9pp. 2001. Disponível em <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>.

HAMMON, W.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E.; Viruses associated with epidemic hemorrhage fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, v. 131, n. 3407, p. 1102 – 1103, 1960.

HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology**, v. 23, n. 4, p. 327–370, 1998.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 411–422, 2001.

HENRY, A.; THONGSRIPONG, P.; FONSECA-GONZALES, I.; JARAMILLO-OCAMPO, N.; DUJARDIN, J. P. Wing shape of dengue vectors from around the world. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 207 – 214, 2010.

HODGSON, E.; KUHR, R. J. **Safer Insecticide: development and use**. Marcel Dekker INC: New York. 1990

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906 – 908, 2015.

IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.

IMAM, H.; ZARNIGAR, H.; SOFI, G.; AZIZ, S. The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 53 – 55, 2014.

ISHAAYAT, I.; HOROWITZ, A. R. Pyriproxyfen, a novel insect growth regulator for controlling whiteflies: mechanisms and resistance management. **Pesticide Science**, v. 43, p. 227–232, 1995

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGKIAT, S.; APIWATHNASORN, C.; SINGHANIYOM, S.; BELLEC, C.; DUJARDIN, J. P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354 – 1360, 2007.

KAWADA, H. DDT and pyrethroid resistance in *Aedes Aegypti* (L .) and *Aedes Albopictus* (Skuse): Past, present, and... In: SANDERS, K. **DDT Properties, uses and toxicity**. 1. ed. New York: Nova Science Publishers INC, 2016. p. 33 – 83.

JULIANO, S. A.; RIBEIRO, G. S.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; CASTRO, M. G.; CODEÇO, C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; LOUNIBOS, L. P. She's a femme fatale: Low-density larval development produces good disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1070 – 1077, 2014.

LAU, K. W.; CHEN, C. D.; LEE, H. L.; NORMA-RASHID, Y.; SOFIAN-AZIRUN M. Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, p. 199 – 206, 2015.

LI, T. R.; WHITE, K. P. Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 5, n. 1, p. 59 – 72, 2003.

LOPES, N.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55 – 64, 2014. Disponível em < <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v5n3/v5n3a07.pdf>>. Acesso em 12 de outubro de 2017.

LORENZ, C.; ALMEIDA, F.; ALMEIDA-LOPES, F.; LOUISE, C.; PEREIRA, S. N.; PETERSEN, V.; VIDAL, P. O.; VIRGINIO, F.; SUESDEK, L. Geometric morphometrics: What has been measured? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 205 – 215, 2017.

LOUISE, C.; VIDAL, P. O.; SUESDEK, L. Microevolution of *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

LOUNIBOS, L. P. Invasion by insect vectors of human disease. **Annual Reviews of Entomology**, v. 47, p. 233–266, 2002.

LÖWY, I. Yellow fever in Rio de Janeiro and the Pasteur Institute Mission (1901-1905): the transfer of science to the periphery. **Medical History**, v. 34, n. 2, p. 144-163, 1990.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111-130, 2008.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MACORIS, M. L.G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBOLETO, V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteração da resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 5, p. 521–522, 1999.

MACORIS, M. L. G. **Mecanismos de resistência de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) a inseticidas**. 2011. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2011.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; WANDERLEY, D. M. V.; RIBOLLA, P. E. M. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 573 – 578, 2014.

MADDRELL, S. H. P. The insect neuroendocrine system as a target for insecticides, In: **Insect neurobiology and pesticide action**. Society of Chemical Industry, London, p. 329-334, 1980.

MARCOMBE, S.; CHONEPHETSARATH, S.; THAMMAVONG, P.; BREY, P. T. Alternative insecticides for larval control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Lao PDR: insecticide resistance and semi-field trial study. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

MARINA, C. F.; BOND, G.; MUÑOZ, J.; VALLE, J.; QUIROZ-MARTINEZ, H.; TORRES-MONZÓN, J. A.; WILLIAMS, T. Efficacy of larvicides for the control of dengue, Zika, and chikungunya vectors in an urban cemetery in southern Mexico. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1941 – 1952, 2018.

MAOZ, D.; WARD, T.; SAMUEL, M.; MÜLLER, P.; RUNGE-RANZINGER, S.; TOLEDO, J.; BOYCE, R.; VELAYUDHAM, R.; HORSTICK, O. Community effectiveness of Pyriproxyfen as a dengue vector control method : A systematic review. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.

MAURICE, J. The Zika virus public health emergency: 6 months on. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 449–450, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31207-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31207-7)>.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155–163, 2017.

MBARE, O.; LINDSAY, S. W.; FILLINGER, U. Dose–response tests and semi-field evaluation of pyriproxyfen granules (Sumilarv® 0.5G) for the lethal and sub-lethal effects of slow release control of the malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu lato. **Malaria Journal**, v. 12, p. 1 – 12, 2013.

McFIE, J. W. S. Observations on the bionomics of *Stegomyia fasciata*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 6, n. 3, p. 205-29, 1915.

MIAN, L. S.; DHILLON, M. S.; DODSON, L. Field evaluation of Pyriproxyfen against mosquitoes in catch basins in Southern California. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 2, p. 145–147, 2017. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.2987/17-6649.1>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano Nacional de Controle da Dengue. 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle das Epidemias de Dengue. 2009. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Orientações técnica para utilização do larvicida *Pyriproxyfen* (Sumilarv® 0,5G) no controle de *Aedes aegypti*. 2014. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/632-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/13059-orientacoes-tecnica-para-utilizacao-do-larvicida-pyriproxyfen-0-5-g-no-controle-de-aedes-aegypti>. Acesso em 20 de agosto de 2017

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos de dengue. Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 1990 – 2016. 2017. Disponível em <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf>. Acesso em 07 de novembro de 2017.

MIAN, L. S.; DHILLON, M. S.; DODSON, L. Field evaluation of Pyriproxyfen against mosquitoes in catch basins in Southern California. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 2, p. 145–147, 2017. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.2987/17-6649.1>>.

MIYAMOTO, J.; HIRANO, M.; TAKIMOTO, Y.; HATAKOSHI, M. Insect Growth Regulators for Pest Control, with Emphasis on Juvenile Hormone Analogs. **Pest Control with Enhanced Environmental Safety**, p. 144–168, 1993.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 11 – 20, 2001.

MONATH, T. P. Yellow fever as an endemic/epidemic disease and priorities for vaccination. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 99, n. 5, p. 341 – 347, 2006.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, n. 160, p. 160 – 173, 2015

MORRISON, A. C. et al. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. 362–366, 2008.

MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A. New insect growth regulators against flood and stagnant water mosquito and effects on non-target organisms. **Mosquito News**, v. 39, p. 746-755, 1979.

MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A.; DARWAZEH, H. A. Larvicidal Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 Against Stagnant-Water Mosquitoes and Its Effects on Nontarget Organisms. **Environmental Entomology**, v. 11, n. 4, p. 788 – 795, 1982.

MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, n. 2, p. 269 – 273, 1995.

MUTHUKRISHNAN, S.; MEZENDORFER, H.; ARAKANE, Y.; KRAMER, K. J. Chitin metabolismo in insects. In: GILBERT, L. I. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. London: Academic. 1. ed, p. 193 – 235. 2012.

MUTURI, E. J.; ALTO, B. W. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1157–1163, 2011. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2010.0209>>.

MUTURI, E. J.; CONSTANZO, K.; KESAVARAJU, B.; ALTO, B. W. Can pesticides and larval competition alter susceptibility of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) to arbovirus infection? **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, 429 – 436, 2011.

NASCI, R. S. Relationship of wing length to adult dry weight in several mosquito species (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 4, p. 716–719, 1990.

NASCI, R. S.; MITCHELL, C. J. Larval diet, adult size, and susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with Ross River virus. **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 123 – 126, 1994.

PAIVA, M. H. S. **Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil.** 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Instituto Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

PECHENIK, J. A. Larval experience and latent effects - Metamorphosis is not a new beginning. **Integrative and Comparative Biology**, v. 46, n. 3, p. 323–333, 2006.

PEDROSA, M. C. **Aspectos ecológicos da ocorrência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1984) (Diptera: Culicidae) em áreas verdes urbanas e residenciais.** 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) - Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

PESSANHA, J. E. M.; CAIAFFA, W. T.; CÉSAR, C. C.; PROIETTI, F. A. Avaliação do Plano Nacional de Controle da Dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 7, p. 1637 – 1641, 2009.

PESSOA, L. F. F. **Uso do Pyriproxyfen em novas abordagens para controle de formas jovens e adultas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde). Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RAMASEHADRI, P.; FARKAS, R.; PALLI, S. Recent progress in juvenile hormone analogs (JHA) research. In: DHADIALLA, T. **Advances in Insect Physiology**, Academic Press, 2012. ISBN: 9780123915009

RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A.; PETERSEN, L. R. Zika virus and birth defects - Reviewing the evidence for causality. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 1981 – 1987, 2016.

REISKIND, M. H.; LOUNIBOS, L. P. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, n. 1, p. 62 – 68, 2009.

REZENDE, G. L.; MARTINS, A. J.; GENTILE, C.; FARNESI, L. C.; PELAJO-MACHADO, M.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: Presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Developmental Biology**, v. 8., n. 182, p. 1 – 14, 2008.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

REY, D.; DAVID, J.; MEYRAN, J. Factors influencing the toxicity of xenobiotics against larval mosquitoes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, p. 317–327, 2003.

RIDDIFORD, L. M. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, n. 3, p. 477–484, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.06.001>>.

RITCHIE, S. A.; PATON, C.; BUHAGIAR, T.; WEBB, G. A.; JOVIC, V. Residual treatment of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in containers using Pyriproxyfen slow-release granules (Sumilarv® 0.5G). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1169 – 1172, 2013.

ROHLF, F. J. TpsDig. 1.4 ed: Ecology & Evolution, Stony Brook University, New York; 2004.

ROLLER, H.; DAHM, K. H.; SWEELY, C. C.; TROST, B. M. The structure of the juvenile hormone. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 6, n. 2, p. 179 – 180, 1967.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados.** 7ª ed. Editora Roca, São Paulo. 1145 p. 2005.

SCOTT, T.W.; CLARK, G.G.; AMERASINGHE, P.H.; LORENZ, L.H.; REITER, P.; EDMAN, J.D. Detection of multiple blood feeding patterns in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histological technique. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, p. 94–99, 1993.

SCOTT, T. W.; AMERASINGHE, P. H.; MORRISON, A. C.; LORENZ, L. H.; CLARK, G. G.; STRICKMAN, D.; KITTAYAPONG, P.; EDMAN, J. D. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood feeding frequency. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 89 – 101, 2000.

SCHAEFER, C. H.; MIURA, T.; DUPRAS JR, E. F.; MULLIGAN, F. S.; WILDER, W. H. Efficacy, nontarget effects, and chemical persistence of S-31183, a promising mosquito (Diptera: Culicidae) control agent. **Journal of Economic Entomology**, 81, n. 6, p. 1648 – 1655, 1988.

SCHAEFER, C. H.; MULLIGAN, F. S. Potential for resistance to Pyriproxyfen: a promising new mosquito larvicide. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 3, p. 409 – 411, 1991.

SECACCINI, E.; LUCIA, A.; HARBURGER, L.; ZERBA, E.; LICASTRO S.; MASUH, H. Effectiveness of Pyriproxyfen and Diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 3, p. 398 – 403, 2008.

SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAUDE. **Resumo executivo do II Seminário Internacional para Avaliação de Ações de Controle Químico de *Aedes aegypti* no Brasil, 2012**. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/16/Resumo-Executivo-II-Seminario-Aedes-aegypti-final.pdf>.

SENDAYDIEGO, J. P.; TORRES, M. A. J.; DEMAYO, C. G. Describing wing geometry of *Aedes aegypti* using Landmark-based geometric morphometric. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 379–383, 2013.

SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. Economic impact of dengue illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.

SHUAIB, W.; STANAZI, H.; ABAZID, A. G.; MATTAR, A. A. Re-Emergence of Zika Virus: A review on pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention. **American Journal of Medicine**, v. 129, n. 8, 2016.

SIDALL, J. B. Insect growth regulators and insect control: a critical appraisal. **Environmental Health Perspective**, v. 14, p. 119 – 126, 1976.

SIHUINCHA, M., E.; ZAMORA-PEREA, W.; ORELLANA-RIOS, J. D.; STANCIL, V.; LOPEZ-SIFUENTES, C.; VIDAL-ORE, G.; DEVINE, J. Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**. 42: 620–630, 2005.

SILVA, C. M.; COUTINHO, G. S. L.; OLEA, R. S. G. A luta humana contra o *Aedes aegypti*. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 19, n. 3, p. 105–113, 2012.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; LIRA, K. S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 53 – 63, 1998.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. 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**, v. 32, n. 4, p. 349–355, 1999.

SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, p. 100–110, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.07.007>>.

SLAVOV, S. N.; OTAGUIRI, K. K.; KASHIMA, S.; COVAS, D. T. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1 – 11, 2016.

STEINWASCHER, K. Competition among *Aedes aegypti* larvae. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–41, 2018.

SUBRAMANIAN, S.; SHANKARGANESH, K. Insect hormones (as pesticides). In: OMKAR. **Ecofriendly pest management for food security**, Lucknow: Academic Press, 2016. p. 613 – 650.

SULLIVAN, J. J. S.; GOH, K. S. G. Environmental fate and properties of Pyriproxyfen. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, n. 4, p. 339–350, 2008.

SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behaviour, survival, oviposition success and fecundity. **PLoS One Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, 2013.

TASSOU, K. T. .; SCHULZ, R. Combined effects of temperature and pyriproxyfen stress in a full life-cycle test with *Chironomus riparius* (Insecta). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 2384–2390, 2012.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 99–102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 555 – 558, 2010.

TIBCO Software Inc. (2018). Statistica (data analysis software system), version 13. <http://tibco.com>.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.1, n.1, p.122-35, 1996.

THUMMEL, C. S. Ecdysone-regulated puff genes 2000. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 113 – 120, 2002.

TRINDADE, T. S. A.; SOUSA, A. H.; VASCONCELOS, W. E.; FREITAS, R. S.; SILVA, A. M. A.; PEREIRA, D. S.; MARACAJÁ, P. B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró , RN. **Revista de Biologia e Ciências Naturais**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2004.

TUNAZ, H.; UYGUN, N. Insect growth regulators for insect. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 28, n. 6, p. 377 – 387, 2004.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pesticides and their application for the control of vectors

and pests of public health importance, 6th ed. Geneva, World Health Organization, Department of Control of Neglected Tropical Diseases, Pesticide Evaluation Scheme (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1; Disponível em http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHOPES_GCDPP_2006.1_eng.pdf). 2006 a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pyriproxyfen. 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy)propyl ether. Geneva, World Health Organization (WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides; Disponível em http://www.who.int/whopes/quality/en/pyriproxyfen_eval_specs_WHO_jul2006.pdf). 2006 b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Disponível em http://www.who.int/whopes/resources/who_cds_whopes_gcdpp_2005.13/en/ Acesso em 14 de outubro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204588/WHO_ZIKV_VC_16.1_eng.pdf;jsessionid=0D9DAA15731BDA2F27605E76B59DB00E?sequence=2>. Acesso em 10 de novembro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chikungunya. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>. Acesso em 14 de outubro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International travel and health: Yellow Fever. Disponível em <http://www.who.int/ith/diseases/yf/en/>>. Acesso em 10 de novembro de 2017.

WRIGHT, J. E. Environmental and toxicological aspects of insect growth regulators. **Environmental Health Perspective**, v. 14, p. 127 – 132, 1976.

YASUNO, M.; TONN, R. J. A study of biting habits of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 43, n. 2, p. 319–325, 1970.

VAN den BRINK, P. J.; KLEIN, S. L.; RICO, A. Interaction between stress induced by competition, predation and an insecticide on the response of aquatic invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 9, p. 2485–2492, 2017.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275 – 293, 2003.

VELANDIA-ROMERO, M. L.; OLANO, V. A.; CORONEL-RUIZ, C.; CABEZAS, L.; CALDERÓN-PELÁEZ, M. A.; CASTELLANOS, J. E.; MATIZ, M. I. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia. **Biomedica**, v. 37, p. 1 – 24, 2017.

VIDAL, P. O. **Estudo genético e morfológico de populações de *Aedes aegypti* (Culicidae) na área metropolitana de São Paulo (SP)**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

VILLARREAL, S. M.; PITCHER, S.; HELINSKI, M. E. H.; JOHNSON, L.; WOLFNER, M. F.; HARRINGTON, L. C. Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 108, p. 1 – 9, 2018

VYTHILINGAM, I.; LUZ, B. M.; HANNI, R.; BENG, T. S.; HUAT, T. C. Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxyfen (Sumilarv® 0.5 G) against dengue vectors. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 3, p. 296 – 300, 2005.

ZARA, A. L. A.; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1 – 2, 2016.

ZELLER, M.; KOELLA, J. C. Effects of food variability on growth and reproduction of *Aedes aegypti*. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 552 – 559, 2016.

APÊNDICE A – Histogramas resultantes da aplicação do teste de normalidade Shapiro-Wilk para diferentes conjuntos de amostras dos testes de eficiência do larvicida.

Figura 42 – Histograma elaborado para o teste de normalidade da amostra de mortalidade das larvas (Controle – 20°C)

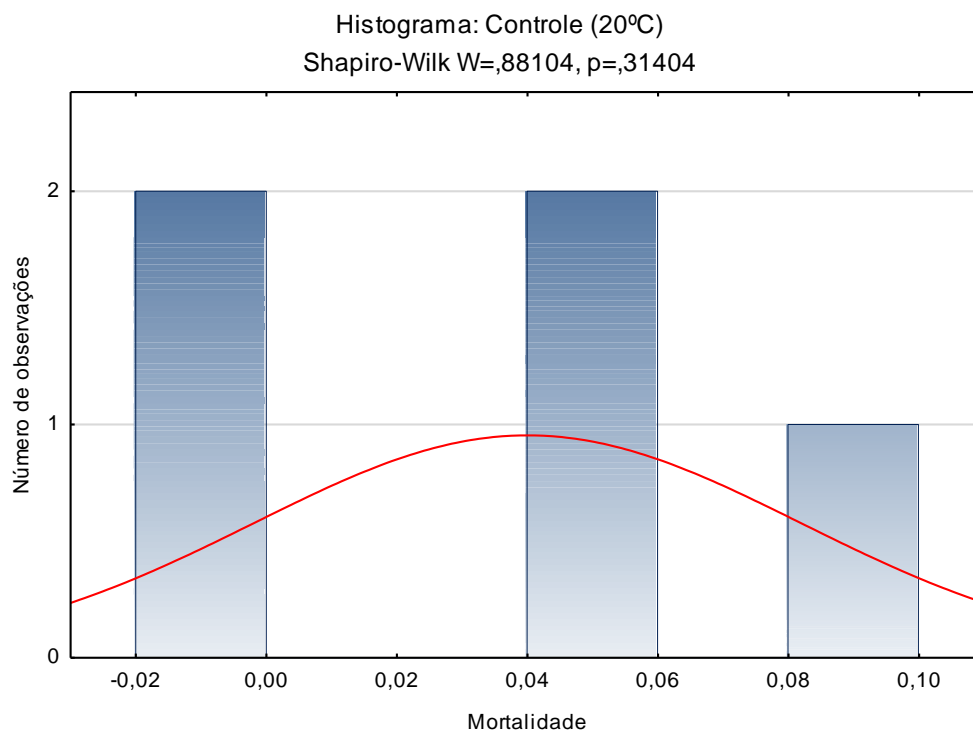


Figura 43 – Histograma elaborado para o teste de normalidade da amostra de eficiência do larvicida (0,0001 mg/L – 20°C)

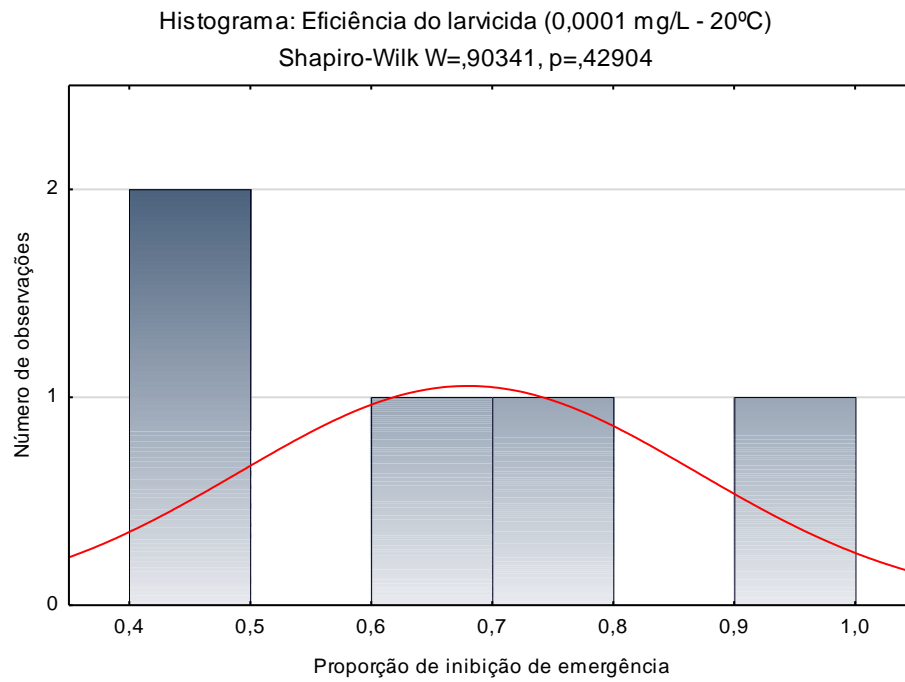


Figura 44: Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,001 mg/L – 20°C)

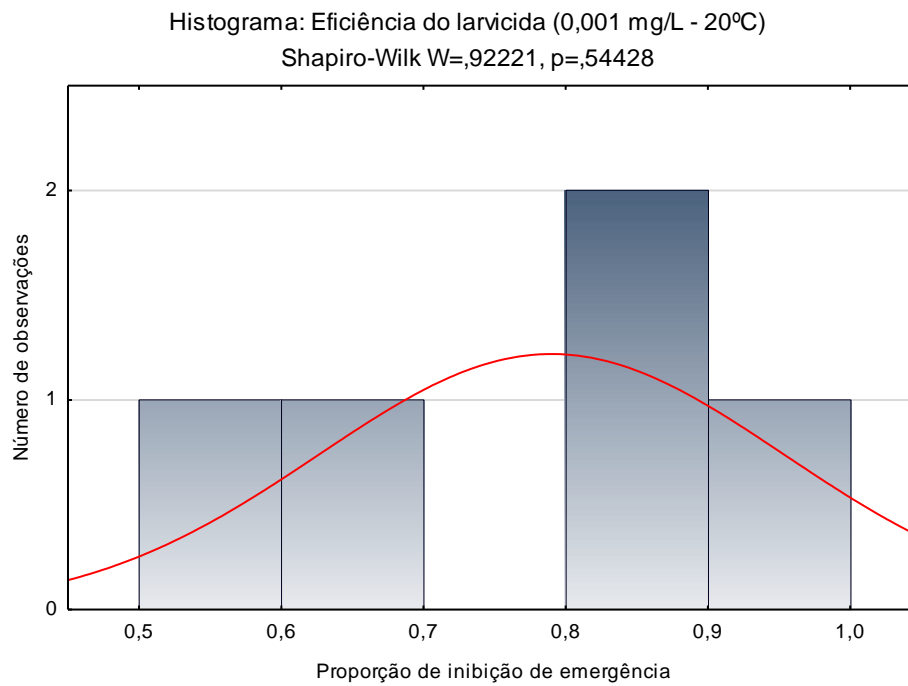


Figura 45: Histograma elaborado para o teste de normalidade de eficiência do larvicida
(0,01 mg/L – 20°C)

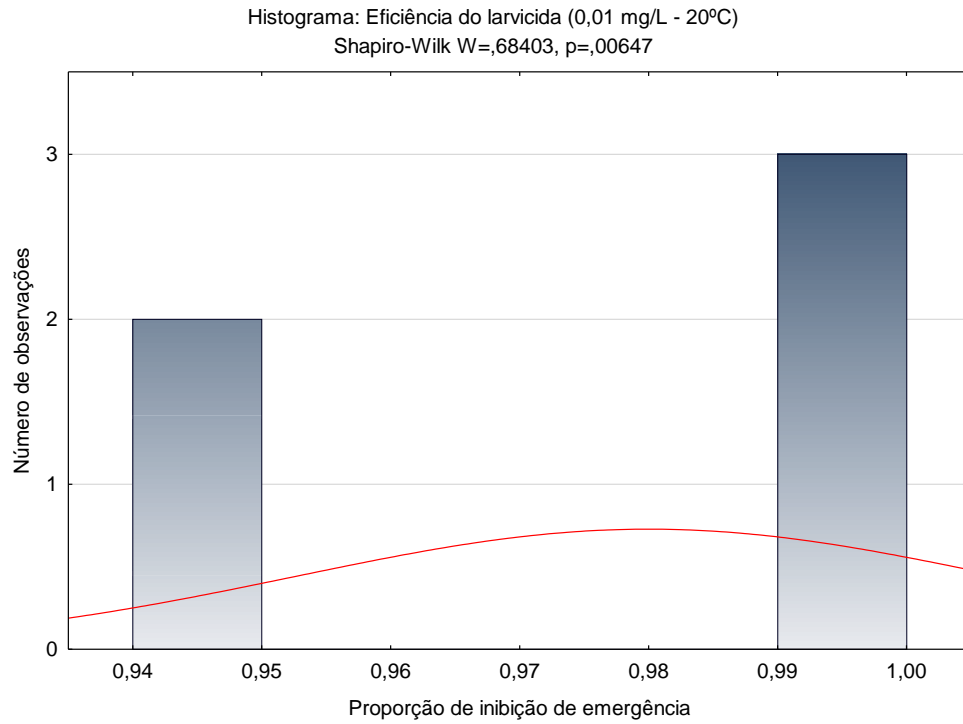


Figura 46 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da amostra de mortalidade das larvas
(Controle – 25°C)

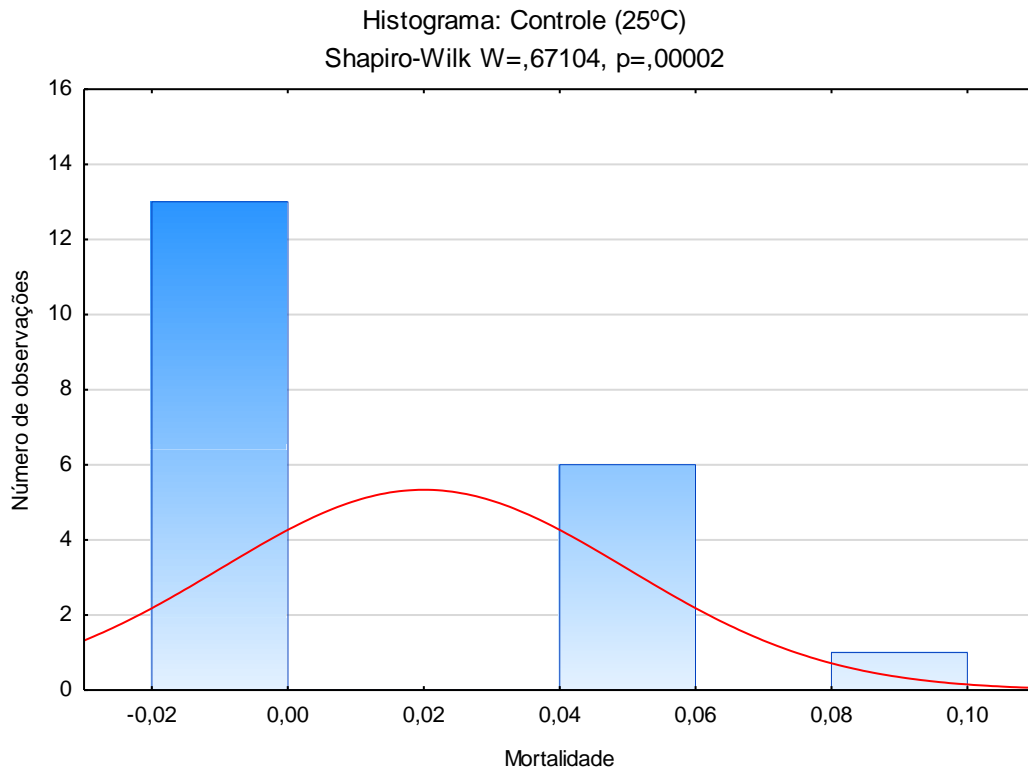


Figura 47 – Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,0001 mg/L 25 °C)

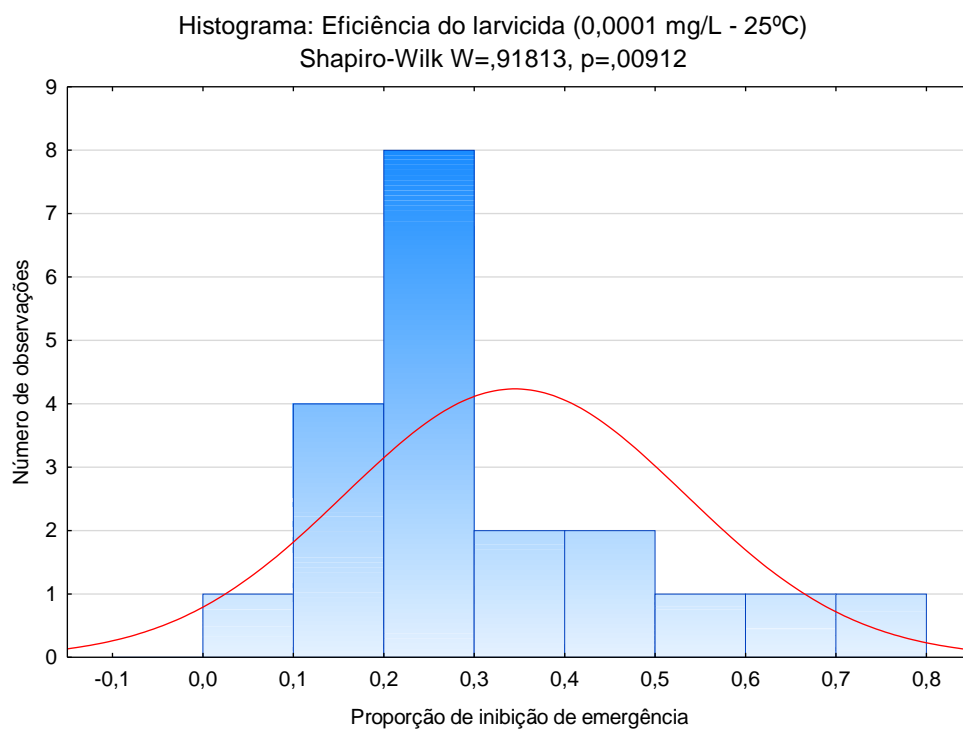


Figura 48 – Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,001 mg/L 25°C)

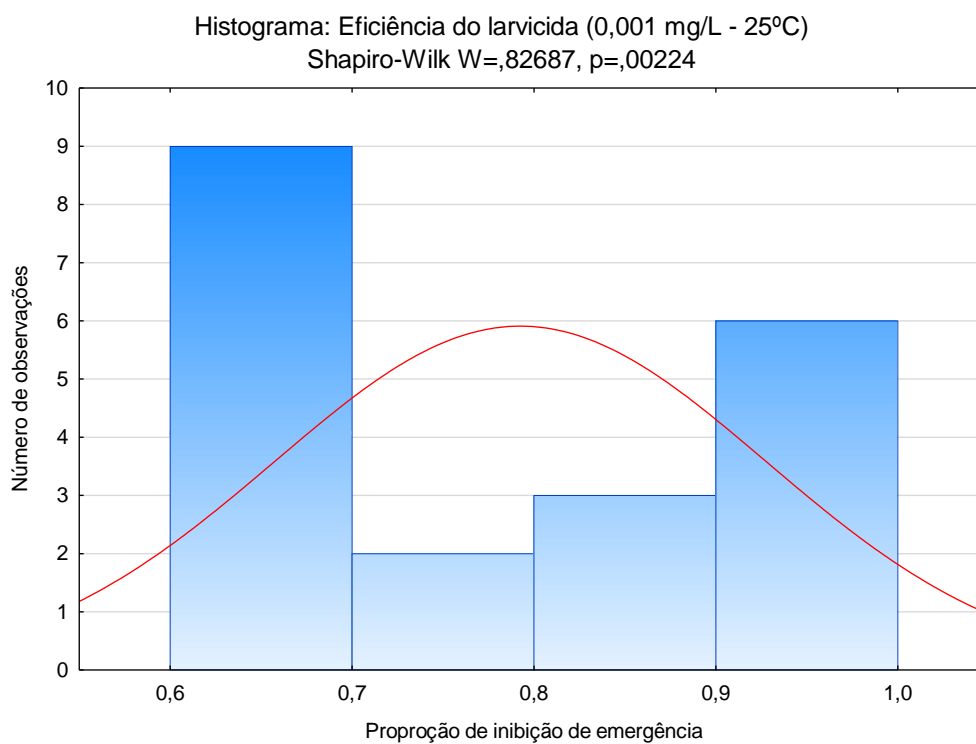


Figura 49 – Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,01 mg/L 25°C)

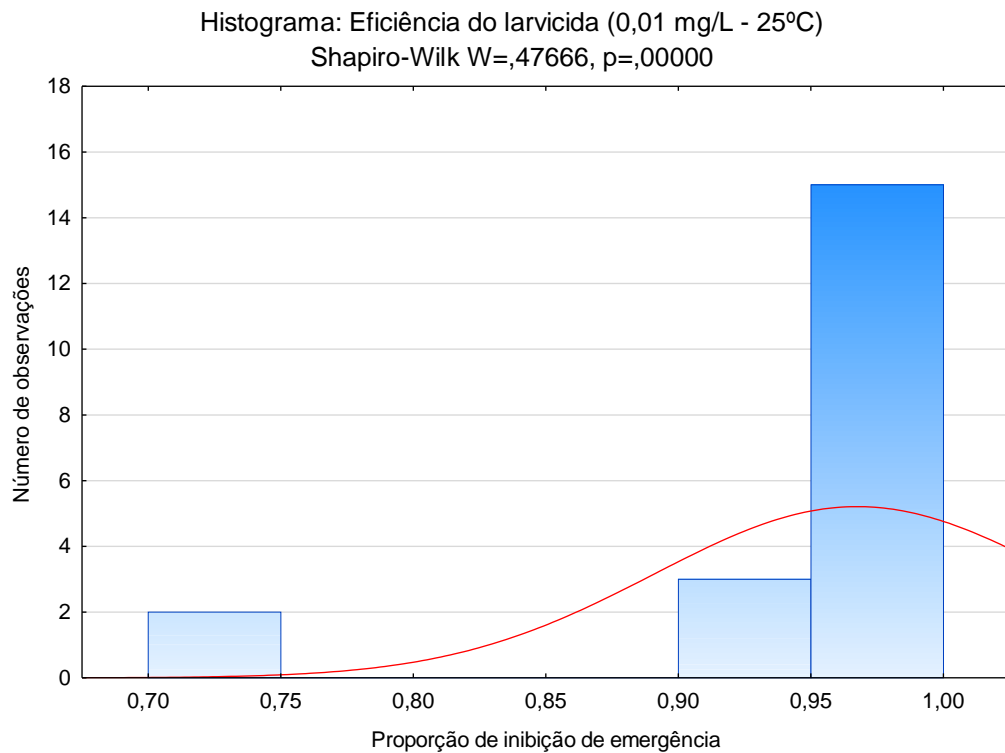


Figura 50 – Histograma elaborado para o teste de normalidade da mortalidade das larvas (Controle – 30°C)

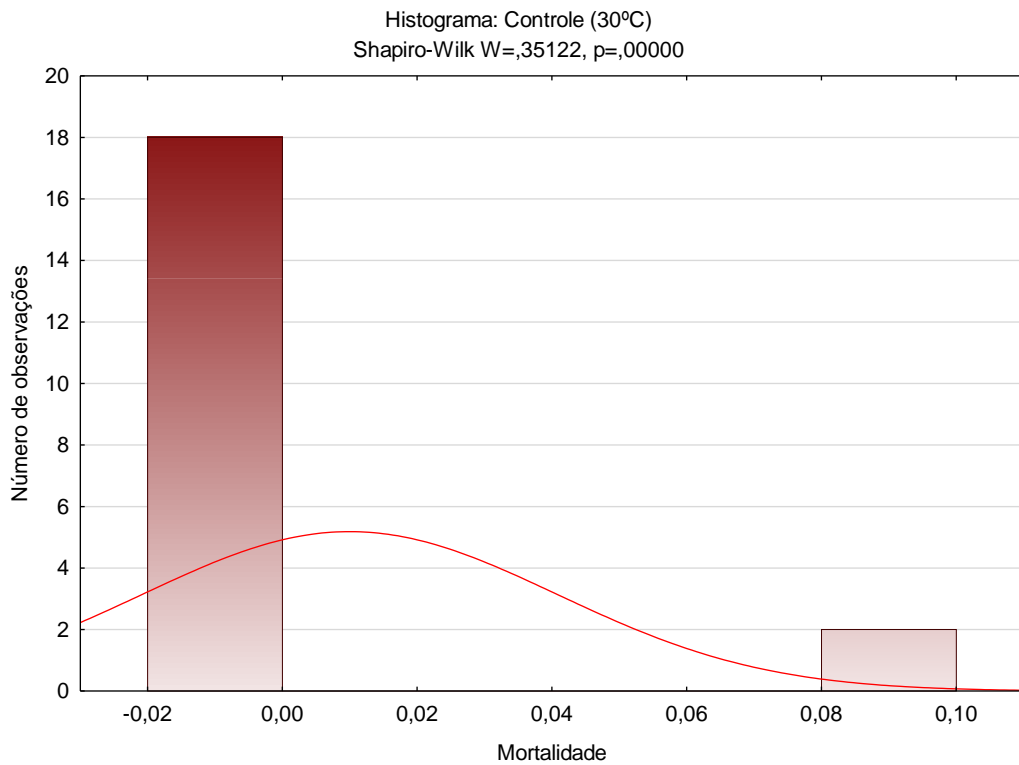


Figura 51 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,0001 mg/L 30°C)

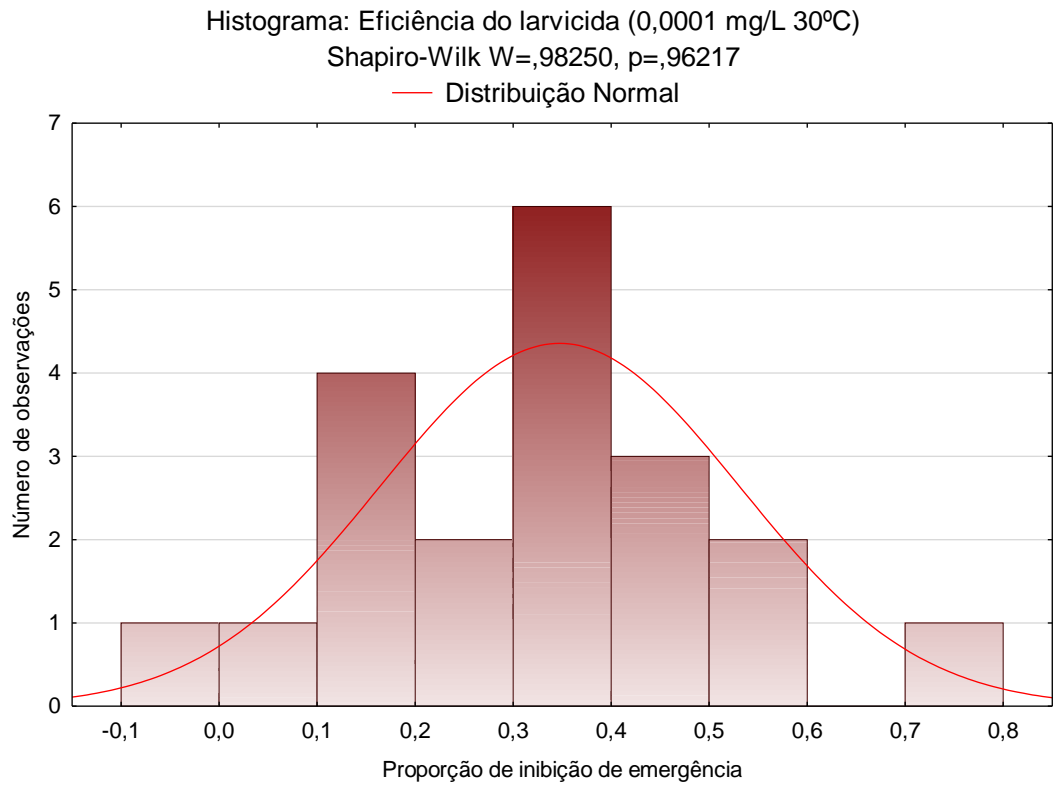


Figura 52 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida (0,001 mg/L 30°C)

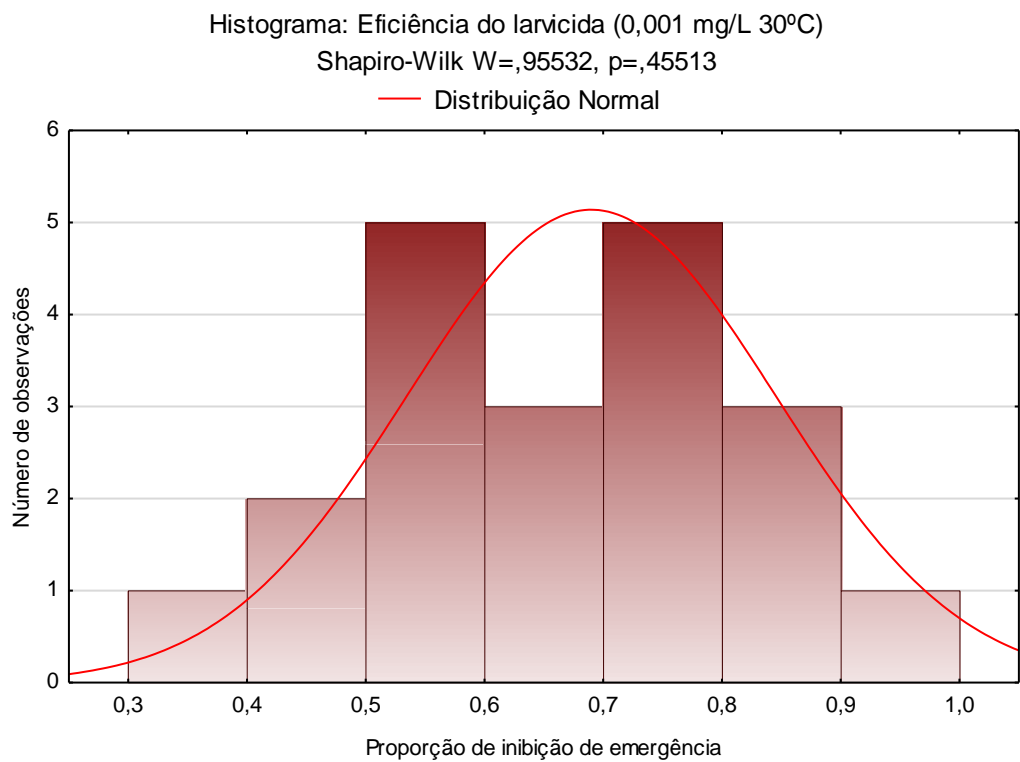


Figura 53 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida
(0,01 mg/L 30°C)

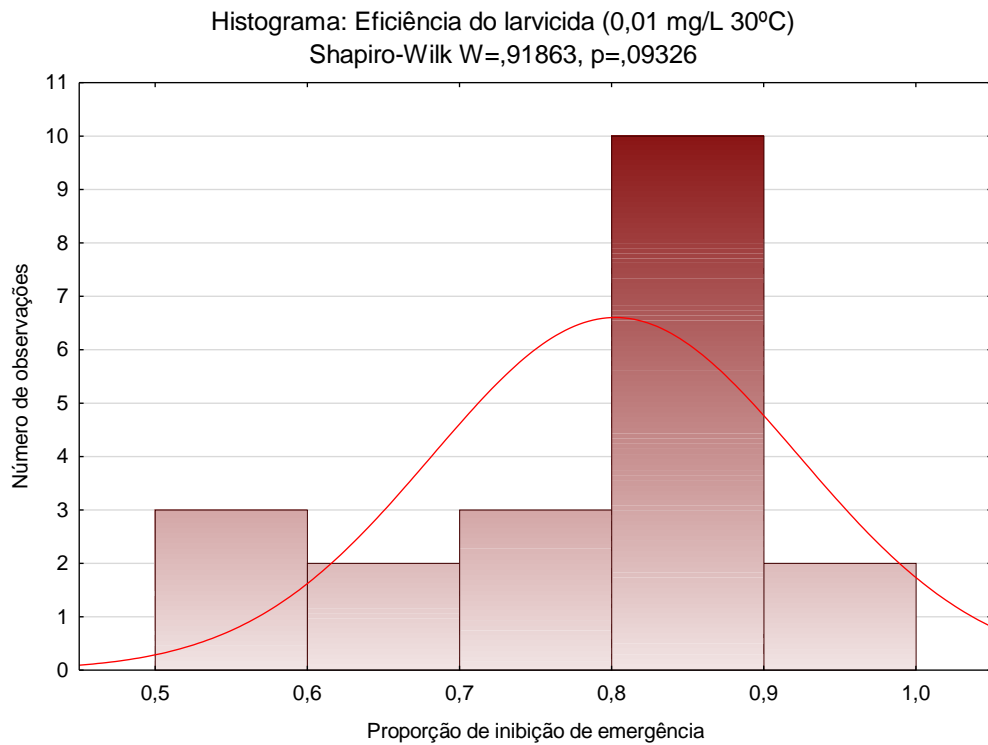


Figura 54 - Histograma elaborado para o teste de normalidade da eficiência do larvicida
(0,1 mg/L 30°C)

