Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Investigação do comportamento de tolerância ao n,
n- dietilmetilbenzamida (DEET) em populações de
Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)

Pollyana Conceição Romão Maia

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientação: Profa. Dra. Tamara Nunes
de Lima Camara

Co-orientação: Profa. Dra. Roseli La Corte
dos Santos.

São Paulo
2020

Investigação do comportamento de tolerância ao N, N-dietilmetilbenzamida(DEET) em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Pollyana Conceição Romão Maia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientação: Profa. Dra. Tamara Nunes Lima-Camara

Co-orientação: Profa. Dra. Roseli La Corte dos Santos.

Submetido aos comitês de ética em pesquisa com seres humanos (CEP), Comitê de Ética em Pesquisa com animais (CEPA) e Comitê de Biossegurança

VERSÃO REVISADA

SÃO PAULO

2020

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Profa. Dra. Tamara Lima Camara e Profa. Dra. Roseli La Corte, pela confiança, paciência, atenção e otimismo em todas as orientações durante o mestrado.

A todos os professores do Programa de Saúde Pública, pelos dois anos enriquecedores do mestrado.

À Universidade Federal de Sergipe, pelo espaço fornecido para a realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante os dois anos do mestrado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da UFS por todo o espaço e suporte disponibilizado, em especial a Myrela, Anuska e a Profa. Luciane Storti.

Ao Luís, por sua bondade, finais de semana, feriados, férias e carnavais para participar de todos os experimentos (não sei o que teria sido de mim sem você)

À Antoniele, por seu tempo para participar dos experimentos, quando esse tempo era quase impossível.

Alexandra, por todas as caronas para o campo e por transforma-los em passeios divertidos.

A todos os voluntários que foram ao campo comigo, não teria sido fácil sem vocês e a Fernando, por sua criatividade na modificação da gaiola dos experimentos.

Aos agentes de Saúde do município de Laranjeiras, por nos acompanhar em todas as coletas e aos moradores e por abrirem as suas casas para as instalações das armadilhas.

Aos professores do LEPaT, Silvio Dolabella, Luciene Barbosa e Wagner Arrais, pela paciência e colaboração.

À minha inseparável técnica Elisangela, por todas as tardes e noites por toda a ajuda.

Aos meus colegas de insetário Ester, Lázaro, Liandra e Jamile, por dividirem o espaço com todas as minhas gaiolas e por serem meus “voluntários” em todos os momentos.

Aos meus colegas do LEPaT, Yvana, Carol, Anne, Luciana, Monique, Alex, Franci, e Luciana Oliva por todas as conversas.

Aos meus colegas da USP por me acolherem, em especial, Pamela, Victor, Bruno, Ronan.

À Noemi e Denise, por me darem um lar e uma palavra amiga quando tudo era novo e difícil.

À Rose, por todas as conversas e carinho durante todo esse período; Rafael, por todas as conversas aleatórias e sorvetes; Jânio, por toda a ajuda e amizade.

Às minhas amigas, Hellida e Sebastiana, por todo apoio e por acreditarem em mim.

As(os) Benjagirls (Juci, Letícia, Lynna, Mércia, Mari, Tirzah, Túlio e Yrna) por participarem direta ou indiretamente no meu trabalho.

À minha mãe, por todo amor e dedicação para tornar os meus sonhos possíveis e minha jornada mais fácil.

Às minhas irmãs e sobrinho, por todo o carinho.

A Deus, por permitir que tantas pessoas boas passassem por meu caminho, compartilhado momentos bons e ruins tornando esses anos únicos em minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

MAIA, P. C. R. **Investigação do comportamento de tolerância ao N, N-dietilmetilbenzamida (DEET) em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** 2020. Dissertação - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2020.

Aedes aegypti é um mosquito de grande interesse para saúde pública, pois é o vetor de arbovírus, como dengue, chikungunya e Zika. Para o controle desse vetor, são utilizados o controle biológico, mecânico e o controle químico, com utilização de inseticidas e repelentes. Os repelentes são considerados uma das melhores formas de se evitar as picadas das fêmeas, sendo os mais comercializados aqueles que possuem N,N-dietilmetilbenzamida (DEET) na fórmula, além de serem um dos mais estudados atualmente. Entretanto a resistência a alguns inseticidas como o piretroide, pode levar à alteração na atividade locomotora dos mosquitos. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar aspectos relacionados à tolerância ao DEET e à resistência a xenobióticos em cepas *Ae. aegypti* de campo (Laranjeiras) e de laboratório (Rockefeller). Foram realizados testes de repelência com *Ae. aegypti* para a resposta ao odor humano. Em cada teste, foram utilizadas 50 fêmeas, totalizando 700 fêmeas da população Laranjeiras e 1500 fêmeas para a população Rockefeller. As fêmeas foram colocadas em gaiolas de teste por cerca de duas horas, a fim de se adaptarem ao ambiente. Posteriormente, foi realizado o teste de repelência, que consistiu na exposição do mosquito a 0,5 mL de DEET (10% em etanol), este foi aplicado uniformemente pelo antebraço humano. Para diagnosticar a presença da mutação kdr na população de Laranjeiras foram analisadas 32 fêmeas dessa população. Para avaliar a atividade locomotora das fêmeas de *Ae. aegypti* Rockefeller e de Laranjeiras, foi utilizado o Drosophila Activity Monitor - Trikinetics. No período de setembro a novembro de 2019, foram instaladas 290 ovitrampas no município de Laranjeiras – SE, tendo sido verificado um total de 80,3% de palhetas com presença de ovos de *Aedes*, contabilizando 15.940 ovos. Após a realização dos bioensaios, foi possível observar maior sensibilidade ao DEET nas fêmeas provenientes do campo. Além disso, também foi possível observar a presença da mutação kdr e uma maior atividade locomotora nessa população. Dessa forma, nossos resultados sugerem que mosquitos resistentes podem ser mais susceptíveis ao DEET.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Repelentes, Resistência, Mutações, Gerações

ABSTRACT

MAIA, P. C. R. **Investigation of tolerance behavior to N, N-diethylmethylbenzamide (DEET) in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** 2020. Dissertação - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2020.

Aedes aegypti is a mosquito of great interest for public health, as it is the vector of arboviruses, such as dengue, chikungunya and Zika. Biological, mechanical and chemical control, with the use of insecticides and repellents, are used against this vector. Repellents are considered one of the best ways to avoid female bites, being those that have N, N-diethylmethylbenzamide (DEET) in the formula the most commercialized, as well as the most studied today. However, resistance to some insecticides such as pyrethroid, can lead to changes in the locomotor activity of mosquitoes. Thus, this study aims to evaluate aspects related to DEET tolerance and resistance to xenobiotics in field *Ae. aegypti* (Laranjeiras) and laboratory (Rockefeller) strains. Repellency tests were performed with *Ae. aegypti* for the response to human odor. In each test, 50 females were used, totaling 700 females from the Laranjeiras population and 1500 females from the Rockefeller population. The females were placed in test cages for about two hours in order to adapt to the environment. Subsequently, the repellency test was performed, which consisted of exposing the mosquito to 0.5 mL of DEET (10% in ethanol), which was applied evenly to the human forearm. To diagnose the presence of the *kdr* mutation in the population of Laranjeiras, 32 females from that population were analyzed. To evaluate the locomotor activity of *Ae. aegypti* Rockefeller and Laranjeiras females, the Drosophila Activity Monitor - Trikinetics was used. In the period from September to November 2019, 290 ovitraps were installed in the municipality of Laranjeiras - SE, with a total of 80.3% of reeds with the presence of *Aedes* eggs, accounting for 15,940 eggs. After conducting the bioassays, it was possible to observe greater sensitivity to DEET in females from the field. In addition, it was also possible to observe the presence of the *kdr* mutation and greater locomotor activity in this population. Thus, our results suggest that resistant mosquitoes may be more susceptible to DEET.

Keywords: *Aedes aegypti*, Repellents, Resistance, Mutations, Generations

Sumário

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	9
1.2	Importância na saúde pública.....	9
1.2.2	Controle mecânico	13
1.2.3	Controle biológico	14
1.2.4.1	Organoclorados	15
1.2.4.2	Organofosforados.....	15
1.2.4.3	Carbamatos	16
1.2.4.4	Piretroides.....	17
1.2.4.5	Reguladores de crescimento (IGR)	17
1.3	Resistência a inseticidas químicos.....	18
1.3.1	Alteração do sítio-alvo	19
1.4	Métodos individuais de proteção: Os repelentes	21
2	HIPÓTESES	25
3	OBJETIVOS.....	26
	Objetivos específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Área de estudo	27
4.2	Coletas em campo.....	28
4.2.1	Instalação das Ovitampas.....	28
4.2.2	Criação e manutenção das colônias de campo e Rockefeller	29
4.2.3.	Preparação dos mosquitos para os bioensaios	30
4.2. 4.	Testes de repelência.....	31
4.2.5.	Bioensaios de sensibilidade ao DEET.....	32

4.2.6. Seleção da sensibilidade ao DEET na população Rockefeller	33
4.2.7. Voluntários	35
4.4. Atividade Locomotora.....	36
4.5. Análises estatísticas	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Estabelecimento das colônias para os bioensaios	39
5.2 Bioensaios de sensibilidade ao DEET	39
5.3 Frequência de mutações no canal de cálcio do tipo <i>Kdr</i>	41
5.5 Seleção da sensibilidade ao DEET na população Rockefeller.....	43
5.6 Seleção da sensibilidade ao DEET na população Rockefeller.....	44
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO	51
8 LIMITAÇÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO.....	72
Anexo I – Certificado do Comitê de ética em pesquisa com animais (CEPA)	72
Anexo III- Parecer com substanciado do CEP da Universidade Federal de Sergipe	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti*

Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) é uma espécie de mosquito considerada cosmopolita, sendo encontrada em áreas tropicais e subtropicais do mundo (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Esse mosquito apresenta hábitos antropofílicos e endofílicos e, por isso, é altamente frequente em áreas domiciliares e peridomiciliares de ambientes urbanos e suburbanos (FORATTINI., 2004; LIMA-CAMARA et al., 2006). Os criadouros de *Ae. aegypti* são representados, principalmente, por recipientes artificiais, como tanques, pneus, vasos de planta, latas, garrafas, entre outros (SILVA et al ., 2006; BRAGA e VALLE, 2007; MARTINS et al., 2010; MARTEIS et al., 2013; BERMUDI et al., 2017). Entretanto, formas imaturas dessa espécie já foram encontradas em criadouros naturais, como as bromélias, axilas de folhas e bambus cortados (VAREJÃO et al., 2005; BRAGA e VALLE, 2007; CERETTI- JUNIOR et al., 2015; LIMA-CAMARA et al.,2016).

Estudos realizados em campo apontam que *Ae.aegypti* apresenta, em geral, padrão diurno e bimodal de atividade, com os principais picos ocorrendo nos crepúsculos matutino e vespertino (ATMOSOEDJONO et al. 1972, CHADEE e MARTINEZ, 2000; LIMA-CAMARA et al., 2010). Entretanto, variações fisiológicas podem afetar a atividade dessa espécie, como inseminação, alimentação sanguínea (LIMA-CAMARA et al., 2014) e infecção por vírus dengue (LIMA-CAMARA et al. 2011) e por Zika (PADILHA et al., 2018). Desta forma, as fêmeas de *Ae. aegypti* com essas características apresentam uma diminuição da atividade locomotora nas médias diurnas (com luzes apagadas e acesas) em comparação às fêmeas que são virgens e não alimentadas. Além disso, já foi demonstrado que fêmeas de *Ae.aegypti* com perfil de resistência a piretroides possuem maior atividade diurna em relação às não resistentes (BRITO et al.,2013)

1.2 Importância na saúde pública

Desde o início do século XX, *Ae. aegypti* possui grande importância para a saúde pública no Brasil, pois é considerado o principal transmissor de agentes etiológicos que afetam diretamente o homem, como os vírus da febre amarela (YFV), dengue, chikungunya e Zika. No caso dos vírus dengue, Zika e chikungunya, diversos casos humanos são reportados anualmente no Brasil.

As epidemias de dengue no Brasil ocorrem todos os anos, sendo a primeira em 1980 em Boa Vista- RR, causadas pelo sorotipo DENV 1 e DENV 4. Logo após, em 1986, ocorreu a epidemia no estado do Rio de Janeiro e em algumas regiões do nordeste, desde então a dengue é caracterizada pela transmissão endêmica e epidêmica no país. Nos locais endêmicos essa arbovirose possui um impacto econômico e social, afetando todos os níveis sociais, principalmente, as populações mais pobres que vivem em situações de riscos (NOGUEIRA et al., 2001; CÂMARA et al, 2007; BRASIL, 2019a). No período de 2003 a maio de 2019 foram reportados 11.137.664 de casos prováveis dessa arbovirose no Brasil, sendo que é possível destacar cinco anos de epidemias, como o ano de 2008, 2010, 2013, 2015, 2016 que foram marcados pela reintrodução de novos sorotipos e a introdução de novos vírus. A média do coeficiente de mortalidade no Brasil de 2003 a 2019 foi de 3,05/100 mil habitantes, sendo que os estados de Goiás, Mato Grosso, Ceará, Mato Grosso do Sul e Espírito Santo, apresentaram uma média até três vezes maior que o nacional.

A chikungunya foi introduzida no Brasil em 2014, no ano seguinte foi confirmada a autoctonia em 35 países, incluído no Brasil, nos estados da Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, sendo que no final de 2016, foram confirmados em todos os estados. Entre o ano de 2014 a 2019, foram registrados 589.076 casos prováveis e 495 óbitos confirmados por laboratório, sendo os anos de 2016 e 2017 com maior incidência de casos. As maiores concentrações de mortes por chikungunya é na região Nordeste, sendo que, no ano de 2017, o estado do Ceará registrou 80% dos óbitos do país (BRASIL, 2019a). Em estudos realizados através de informações dos registros Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e de Formulários da VDENA no Rio de Janeiro, no período de 2015-2016, foi possível observar que dos 112 casos relacionados a chikungunya e a Zika desse período, apresentaram manifestações como a síndrome de Guillain-Barré, (64,3%) e meningoencefalite (24,1%); seguida de encefalomielite desmielinizante aguda (8%), mielite transversa (2,7%) e neurite óptica (0,9%), exames laboratoriais confirmaram 43,7% dos casos, destes, 57,1% foram positivos para chikungunya (AZEVEDO et al., 2018).

Outra consequência causada por uma arbovirose é a síndrome congênita do vírus Zika (SCZ), causada pelo vírus Zika que foi registrado pela primeira vez no Brasil em 2015, sendo que, no ano seguinte, foi possível observar que todos os estados notificaram casos autóctones. Nesse mesmo ano, foi observado um aumento no número de casos de microcefalia em recém nascidos no estado de Pernambuco, sendo confirmada a relação do

vírus Zika posteriormente. Do ano de 2015 a 2019, foram notificados 17.642 de casos prováveis da SCZ, destes 19,3% confirmados e 3,9% denominados prováveis para a relação com a infecção durante a gestação. Em relação ao número de casos dessa arboviroses em todos os estados do Brasil, entre os anos de 2016 a 2019, já foram notificados cerca de 239.634 casos prováveis da doença, sendo que houve uma diminuição do número de casos no ano de 2017 e 2018 em relação ao ano de 2016. Apesar dessa diminuição no ano de 2019, foi possível observar que 24,8% de casos de Zika foram registrados em mulheres grávidas (BRASIL, 2019a). A erradicação dessas arboviroses é um problema para a Saúde Pública, como é possível observar nos novos casos de febre amarela no Brasil.

No Brasil, o vírus da febre amarela pode ocorrer em dois ciclos distintos: o silvestre e o urbano. O ciclo urbano ocorre em grandes centros, em áreas antropizadas, tendo o homem como o principal hospedeiro e o mosquito *Ae. aegypti* como principal vetor (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; NORONHA; CAMACHO, 2017; CAVALCANTE; TAUIL, 2017). Já o ciclo silvestre da febre amarela possui como hospedeiro amplificador os primatas não humanos, sendo que o homem pode participar do ciclo como um hospedeiro acidental. Os principais vetores são algumas espécies de mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, que possuem os hábitos estritamente silvestres (HEVÉR et al., 1986; BRASIL, 2018b).

O ciclo urbano da febre amarela não ocorre no Brasil desde 1942, quando foi registrado pela última vez no município de Sena Madureira, no estado do Acre (LIMA, 1985; VASCONCELOS, 2002; VASCONCELOS, 2003). Em contrapartida, o Brasil vem registrando vários casos humanos de febre amarela silvestre nos últimos anos: de julho de 2017 a abril de 2018, por exemplo, foram confirmados 1.127 casos de febre amarela silvestre no país, sendo que 328 vieram a óbito (BRASIL, 2018c). As pessoas infectados por esse vírus, são aquelas que tiveram uma passagem por área silvestre ou em regiões de mata consideradas de riscos, sem a devida vacinação (BRASIL, 2018c). Outro fator a ser considerado é o aumento das áreas de risco para a infecção pelo vírus da febre amarela, no início do ano de 2017, 88 municípios brasileiros foram incluídos como área de recomendação para a vacinação pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (CAVALCANTE; TAUIL, 2017). Devido à relevância do vetor na transmissão desses arbovirus para a saúde pública, inúmeras campanhas já foram desenvolvidas para a erradicação ou controle de *Ae.aegypti* no Brasil ao longo dos anos.

1.2.1 Controle de *Ae. aegypti* no Brasil

A primeira campanha que eliminou parcialmente o *Ae. aegypti* ocorreu, indiretamente, em 1690, porém, diferentemente das que ocorreram posteriormente, esta foi direcionada, principalmente, para a erradicação da febre amarela que, na época, pensava-se ser transmitida pelo ar. Desta forma, essa campanha tinha como objetivo a purificação do ar, através da queima de ervas aromáticas, de tiros de artilharia e da limpeza das ruas. Mesmo sem o conhecimento epidemiológico da doença, essas recomendações afetavam diretamente o desenvolvimento do mosquito, mas não o suficiente para reduzir a epidemia, que ainda perdurou por 10 anos (FRANCO., 1969; TEXEIRA e BARRETO., 1996).

Somente em 1881, *Ae. aegypti* foi identificado como o vetor do vírus da febre amarela (EXPOSITO, 1971) e, em 1906, esse mesmo mosquito foi associado ao ciclo da dengue, tendo essa relação confirmada em 1908 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1979). Essas informações forneceram um embasamento técnico-científico adequado para iniciar a primeira campanha voltada diretamente para a eliminação do *Ae. aegypti*, liderada pelo pesquisador Emílio Ribas, nas cidades de Sorocaba, em 1901, São Simão, 1902 e Ribeirão Preto, 1903, focando, principalmente, na eliminação dos criadouros desse mosquito (FRANCO, 1969). Já no Rio de Janeiro, em 1903, Oswaldo Cruz iniciou sua campanha de eliminação da febre amarela, que tinha como principais objetivos evitar que os mosquitos picassem os doentes e impedir a proliferação do *Ae. aegypti*, por meio da eliminação dos criadouros (FRANCO, 1969).

Apesar dessa campanha não ter conseguido erradicar o *Ae. aegypti*, ela conseguiu debelar os casos de febre amarela urbana no Rio de Janeiro em 1904, sendo considerada eliminada da cidade em 1907 (TEXEIRA e BARRETO., 1996). Em 1955, o Brasil participou de uma campanha de erradicação do *Ae. aegypti* nas Américas, conseguindo eliminar o último foco dessa espécie no dia 2 de abril do mesmo ano (TEXEIRA e BARRETO, 1996). Entretanto, entre 1963 e 1969, foi verificada a reintrodução dessa espécie no estado do Pará e depois no Maranhão. Tais focos foram rapidamente controlados, mas, em 1976, devido à falta de uma vigilância continuada e ao crescimento exacerbado da população, houve a reinfestação do *Ae. aegypti*, dessa vez com rápida expansão pelo país (AMARAL e TAUIL, 1983; TEXEIRA e BARRETO, 1996; BRAGA e VALLE, 2007; ZARA, et al 2016). Atualmente, essa espécie é encontrada em todos os estados brasileiros (BRAGA e VALLE, 2007; ZARA, et al 2016).

Entre todas as arboviroses cujos agentes etiológicos são transmitidos pelo *Ae. aegypti*, somente a febre amarela e a dengue possuem vacinas como profilaxia. A vacina da febre amarela, 17D, é considerada uma das mais seguras e eficazes feita por vírus vivos atenuados (VASCONCELOS, 2003; BRASIL, 2018d), enquanto a vacina registrada para a dengue é considerada apenas 60% eficaz, recomendada somente para pessoas que nunca tiveram contato com os quatro sorotipos do dengue (BRASIL., 2020e). Até o momento, não há vacina disponível para Zika e chikungunya. Dessa forma, a melhor maneira de reduzir a morbidade e a mortalidade causadas por essas doenças é controlando o mosquito vetor desses arbovírus (BRASIL., 2017f).

O controle de *Ae. aegypti* é um grande desafio para a saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, pois a falta de infraestrutura das cidades, relacionada, por exemplo, à coleta de lixo e ao abastecimento de água irregulares, não colaboram para o êxito dos métodos aplicados (HALSTEAD, 1988; COELHO, 2008; ZARA et al., 2016). Neste caso, é necessária uma análise para melhor compreensão da população local desse mosquito, incluindo sua diversidade genética e sua distribuição espaço-temporal, além de um estudo aprofundado a respeito das cidades (ENDERSBY et al., 2011; CAMPOS et al., 2012; RASˆIC´ et al., 2014; RASˆIC´ et al., 2015). Para o controle do *Ae. aegypti*, com consequente diminuição dos casos humanos das doenças relacionadas a este vetor, utiliza-se, normalmente, alguns métodos, como o controle mecânico, biológico e químico (BRASIL, 2001f).

1.2.2 Controle mecânico

O controle mecânico de vetores no Brasil tem sido desenvolvido por agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combate a Endemias (ACE), com auxílio da população (BRASIL., 2006g; ZARA et al., 2016). Esse método tem como objetivo a detecção, eliminação e drenagem de reservatórios naturais e artificiais que possam abrigar ovos de *Ae. aegypti*, reduzindo, assim, a população desse mosquito. Além disso, esse método também busca instalar telas em portas e janelas, consequentemente diminuindo o contato homem-vetor (BRAGA e VALLE, 2007; BRASIL., 2009h). Controle mecânico também é realizado por fábricas e importadoras pneumáticas, que têm como apoio legal a Resolução Conama nº 258, cujo objetivo é a coleta e descarte adequado de pneus inservíveis nas cidades, assim gerando uma diminuição desse tipo de criadouro (BRASIL, 1999i; BRASIL, 2009h).

1.2.3 Controle biológico

O controle biológico é realizado a partir da utilização de seres vivos que atuem como inimigos naturais do vetor, seja durante a fase imatura ou adulta. Mosquitos do gênero *Toxorhynchites*, copépodos e peixes da espécie *Gambusia affinis* alimentam-se de larvas e pupas de *Ae. aegypti* e são exemplos de controle biológico para essa espécie de mosquito (ROSE, 2001; BRAGA e VALLE, 2007; ZARA, 2016). Outro método é a utilização do bacilo da espécie *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), que pode proporcionar um controle a curto prazo de algumas espécies de *Aedes* (LACEY, 2007; BRAGA e VALLE, 2007; BOYCE et al., 2013), devido à sua capacidade de liberar endotoxinas protéicas, que irão agir no intestino das larvas, causando o rompimento da membrana e, conseqüentemente, a morte do inseto (BOYCE et al., 2013), entretanto não há evidências que esse método isolado possua impacto a longo prazo na redução do vetor (ZARA, 2016).

Entre diversas outras espécies de peixes larvófagas, os machos da espécie *Betta splendens* se destacam, pois são capazes de consumir cerca de 400 larvas de *Ae. aegypti* por dia (CAVALCANTI et al., 2007). No ano de 2000, em 10 municípios do estado do Ceará, houve uma grande campanha na implementação de peixes predadores em reservatórios de água dentro dos domicílios, sendo que, na capital Fortaleza, em 2007, existiam, aproximadamente, 419.000 residências com peixes em seus reservatórios (CAVALCANTI et al., 2007). Outro exemplo de utilização de controle biológico é apresentado por Toohey et al. (1985) que, em 1985, liberaram 2.000 fêmeas da espécie *Toxorhynchites amboinensis* em duas áreas distintas de Fiji. Em 10 meses, essa espécie conseguiu se estabelecer em uma das regiões e controlou cerca de 80% da população de *Ae. aegypti* em latas e pneus (TOOHEY et al., 1985).

1.2.4 Controle Químico

O controle químico é efetuado através do uso de substâncias químicas para o controle dos vetores nas suas fases larvais e adulta, sendo esse método um dos últimos a serem utilizados na saúde pública (BRASIL, 2001f). Os inseticidas foram estudados e aperfeiçoados durante a Segunda Guerra Mundial, com o objetivo de controlar a malária, piolhos e outras pragas. Um dos primeiros inseticidas com alta duração a ser criado foi o organoclorado DDT (diclorodifeniltricloroetano) (D'AMATO et al., 2002;

FLORES et al.,2004).

A utilização dos inseticidas químicos ou orgânicos possui normas técnicas para uso, redigidas por grupos técnicos da Organização Mundial da Saúde (OMS), que orientam quais produtos, dosagens e métodos devem ser utilizados. Tais inseticidas devem ser utilizados de forma consciente, pois o uso indiscriminado pode gerar desequilíbrio ambiental (BRAGA e VALLE, 2007; BRASIL, 2009c; ZARA, 2016). Diversos inseticidas já foram utilizados em grande escala: inicialmente, os organoclorados, seguidos por organofosforados, carbamatos, piretroides, e toda uma série de derivados de triazinas (LARA e BATISTA,1992).

1.2.4.1 Organoclorados

Os organoclorados são inseticidas que possuem carbono, hidrogênio e cloro na sua composição. São classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos; hexaclorociclohexanos; ciclodienos; e policloroterpenos (WARE e WHITACRE, 2004; BRAGA e VALLE, 2007). Apesar dos diversos estudos realizados, não se sabe ao certo qual é o mecanismo de ação do DDT. É de conhecimento que seu efeito atinge os canais de sódio e potássio, desequilibrando a distribuição destes no corpo dos insetos e, conseqüentemente, danificando os impulsos nervosos, provocando, assim, paralisia seguida de morte, gerando o efeito “knockdown” (D’AMATO et al., 2002; WARE e WHITACRE, 2004; BRAGA e VALLE, 2007).

O DDT foi utilizado em larga escala por programas de erradicação da malária durante um grande período (1946-1970), porém seu uso foi proibido em diversos países. Em janeiro de 1970, a Suécia foi o primeiro país a banir a utilização do DDT, enquanto somente em 1971, o Brasil começou a restringir a utilização desse produto em seu território. Essas medidas foram tomadas devido à permanência do DDT no ambiente e por ficar acumulado no organismo e tecidos de humanos e de outros animais (D’AMATO et al., 2002; CHEN e ROGAN, 2003; FLORES et al., 2004; DAGLIOGLU et al.,2010).

1.2.4.2 Organofosforados

Os organofosforados são todos os inseticidas que possuem fósforo na sua composição, sendo divididos em três subgrupos: os alifáticos (malation, vapon, vidrin,

entre outros); os derivados de fenil (etil e metil paration, fenitrothion, entre outros); e os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil, entre outros). Os organofosforados foram descobertos depois dos organoclorados e possuem diversas vantagens em relação a estes, sendo, assim, bastante utilizados na saúde pública (OLIVEIRA et al., 2017). Entretanto, esse grupo de inseticidas apresenta uma grande toxicidade para os vertebrados em relação aos organoclorados, mesmo quando estão em baixas concentrações, além de apresentar uma maior instabilidade química, necessitando, obrigatoriamente, de renovações periódicas (WARE e WHITACRE, 2004).

Um dos organofosforados que foi bastante utilizado no controle de larvas de mosquitos, inclusive de *Ae. aegypti*, é o Temephos. Este larvicida começou a ser aplicado no Brasil em 1967. A OMS indica a utilização desse larvicida em água potável, pois apresenta uma baixa toxicidade em mamíferos e baixa fixação no meio ambiente (BRASIL, 2011j). Porém, sua utilização precisa ser limitada, por sua moderada e alta toxicidade a pássaros e organismos marinhos, respectivamente (CAMARGO et al., 1998; LIMA et al 2006; CRIVELANTI et al, 2010).

O temephos inibe irreversivelmente a acetilcolinesterase, enzima responsável por catalisar a hidrólise da acetilcolina em ácido acético e colina, interrompendo a transmissão dos impulsos nervosos nos insetos. Entretanto, quando expostos ao larvicida, há um acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas, acarretando uma hiperatividade nervosa, sinapses aleatórias, distorção muscular, colapso nervoso, paralisia e morte do inseto (IBRAHIM et al., 1998). Em diversos estados do Brasil como São Paulo (MARCORIS et al., 1999), Distrito Federal (CARVALHO et al., 2004) Campo Grande (CAMPOS et al., 2003), Minas Gerais (HORTA et al., 2011), Rio de Janeiro, Sergipe, Alagoas (BRAGA et al., 2004; LA CORTE et al., 2016) e Ceará (LIMA et al., 2006) já foram constatados a resistência dos mosquitos ao Temephos.

1.2.4.3 Carbamatos

Os carbamatos são substâncias derivadas do ácido carbâmico. Esse grupo de inseticida começou a ser utilizado em 1951, entretanto, somente em 1956, o primeiro ácido foi extraído, sendo o carbaril o mais comercializado (WARE e WHITACRE, 2004; HEMINGWAY e RANSON, 2005). Esse inseticida foi um grande sucesso por sua baixa toxicidade em mamíferos e à sua alta capacidade no controle dos insetos (WARE e WHITACRE, 2004). Os carbamatos geram a carbamilação, que é a inibição da ação da

AChE, acumulando a acetilcolina nas terminações nervosas, porém essa inibição é reversível, tornando a ação similar aos organofosforados (WARE e WHITACRE, 2004; HEMINGWAY e RANSON, 2005). Apesar de funcionarem de formas similares nos sistemas biológicos, é possível notar duas diferenças marcantes entre esses inseticidas: (1) os carbamatos são fortes inibidores da acetilcolinesterase e apresentam seletividade pronunciada com a AChE de algumas espécies; e (2) a inibição da AChE pelos carbamatos é reversível, ao contrário dos organofosforados (WARE e WHITACRE, 2004; BRAGA e VALLE, 2007).

1.2.4.4 Piretroides

Os piretroides são derivados de uma substância natural, o piretro, extraída de plantas pertencentes à família *Compositae*, espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium*, podendo ser considerados um dos inseticidas mais antigos, pois há relatos de seu uso na Mesopotâmia (ROMAN e OLIVEIRA, 1983; PAIVA e MENEZES, 2003; BRAGA e VALLE, 2007). Os piretróides podem ser definidos quimicamente como ésteres compostos por um radical ácido e um radical álcool, ambos com carbonos assimétricos (ROMAN e OLIVEIRA., 1983). São substâncias não cumulativas, ativas em pequenas e grandes doses, biodegradáveis, e raramente causam algum tipo de toxicidade em pássaros e em mamíferos, apesar de causarem irritações na mucosa destes. Em contrapartida, esse produto é altamente tóxico para os animais marinhos (BRAGA e VALLE.,2007).

A primeira síntese do composto natural piretro deu origem ao ácido crisantêmico e às ciclopentalonas, sendo estes os pontos principais para o desenvolvimento dos piretróides sintéticos. Em 1949, o primeiro composto sintetizado foi a Alestrina, que se tornou um dos compostos sintetizados mais utilizados no mercado (WARE e WHITACRE, 2004). Esse composto possui um bom desempenho em realizar o efeito *knockdown* nos insetos, porém eles conseguem realizar a desintoxicação desse produto. Além disso, a Alestrina não é considerada fotoestável, sendo utilizada somente como inseticida doméstico (ROMAN e OLIVEIRA, 1983). Em 1967, a Resmetrina foi sintetizada na Inglaterra, tendo demonstrado um melhor efeito letal nos insetos, mas compartilhando com a Alestrina a característica de não ser fotoestável. Somente em 1973, foram sintetizados os primeiros piretroides sintéticos fotoestáveis (ROMAN e OLIVEIRA, 1983; PAIVA e MENEZES, 2003; BRAGA e VALLE., 2007).

1.2.4.5 Reguladores de crescimento (IGR)

Os reguladores de crescimento funcionam como inseticidas fisiológicos, sendo biodegradáveis e não acumulativos no ambiente. Os IGRs atuam no mecanismo de desenvolvimento, metamorfose e reprodução dos insetos, interferindo em seu desenvolvimento endócrino (FOURNET et al., 1993; PERRY et al., 1998; BATRA et al., 2005), que altera a produção de quitina nos insetos. Além disso, pode causar diversas alterações no inseto adulto, causado por doses subletais, diminuindo as chances de vida desse inseto (VASUKI, 1992; MARTINS et al., 2008; BELINATO et al., 2009).

Dessa forma, possuem uma atividade eficaz no controle de mosquitos, podendo ser considerado uma nova geração de inseticidas com uma perspectiva favorável no controle de insetos (MULLA et al., 1989; FOURNET et al., 1993). Como é possível observar nos compostos derivados do benzoil-fenil-uréias, que tem ganhado atenção no controle de insetos, este por sua vez teve sua função descoberta em 1970, derivando assim o desenvolvimento do diflubenzuron o primeiro BPU utilizado no controle de insetos, além do triflumuron, indicados pela OMS como larvicidas eficientes (GRAF, 1993 CHAVASSE e YAP., 1997; MERZENDORFER; ZIMONCH, 2003; CHEN et al., 2005). Podem ser utilizados em locais onde há uma resistência aos temefos, entretanto, não é recomendável a utilização desse produto em água potável, dificultando, assim, a utilização desses produtos em recipientes destinados ao armazenamento de água para o consumo humano (MARTINS e SILVA., 2004).

1.3 Resistência a inseticidas químicos

O uso indiscriminado de diferentes produtos químicos para o controle ou erradicação de mosquitos, inclusive *Ae. aegypti*, nos últimos anos fez com que eles ficassem constantemente expostos, levando, conseqüentemente, a uma resistência em algumas populações desses vetores. A resistência a inseticidas, de fato, representa um prejuízo para uma das formas de controle vetorial na sociedade. A OMS define uma população resistente a inseticidas quando os insetos são expostos a uma alta dose de inseticida que, em condições normais, seriam letais para uma população susceptível a inseticidas (ARAGÃO, 1971; SUBRAMANYAM e HAGSTRUM, 1996; BRAGA e VALLE., 2007). A resistência é um evento conhecido, aproximadamente, desde 1908, quando a espécie *Aspidio tussperniciosus* (Diaspidídeo) demonstrou resistência a aplicações de calda sulfocálcica, utilizada em diversos momentos no combate aos insetos sugadores (ARAGÃO, 1971).

A resistência de algumas populações de vetores a determinados produtos químicos pode ocorrer como resposta a fatores genéticos e operacionais que podem ser caracterizados pela pressão seletiva ou por imperícia dos métodos de controle (BRASIL, 1976i; CARVALHO et al., 2004). A resistência pode ter uma base bioquímica, quando está é associada ao local-alvo da interação com o inseticida, fazendo com que este não se ligue ao seu sítio específico (BRAGA e VALLE., 2007). Outra forma é através das enzimas de desintoxicação (resistência metabólica), quando os níveis aumentados ou atividades modificadas de esterases, oxidases ou glutatona S-transferases (GST) impedem que o inseticida alcance seu local de ação (BROGDON e MCALLISTER.,1998).

1.3.1 Alteração do sítio-alvo

Os mosquitos expostos aos inseticidas neurotransmissores organoclorados, organofosforados, carbamatos e os piretroides sofrem alterações nos seus sítios alvos, com isso, há uma dificuldade na interação do inseticida com o sistema nervoso do inseto, resultando em uma resistência a esses produtos (HEMINGWAY e RANSON., 2000; BRAGA e VALLE.,2007). Um exemplo da alteração do sítio-alvo é a resistência causada pela pouca afinidade com a acetilcolinesterase (AChE), que é o resultado da ação direta dos organofosforados e carbamatos que geram um desequilíbrio da ação AChE na acetilcolina presente na fenda sináptica, desta forma os impulsos nervosos não cessam e os canais de sódio na célula pós-sináptica permanecem abertos, gerando a morte do inseto (HEMINGWAY e RANSON, 2000; BRAGA e VALLE, 2007). O receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA) é responsável por impedir a entrada de íons de cloro no meio intracelular é alterado com a utilização dos organoclorados. Essa alteração é acarretada pela mutação de um par de base receptor, causando a substituição de um aminoácido (alanina por serina), sendo essa mutação presente na espécie *Ae. aegypti* (THOMPSON et al .,1993; HEMINGWAY e RANSON,2000).

Os principais sítios alvos dos organoclorados e dos piretroides são os canais de sódio que sofrem alteração quando expostos a estes inseticidas químicos. Quando há a interação com os inseticidas, o canal de sódio permanece aberto, com isso os impulsos nervosos não cessam, levando o inseto à morte (BRAGA e VALLE, 2007). A resistência ocorre quando há sensibilidade do canal de sódio a essas substâncias (HEMINGWAY e RANSON, 2000; WARE e WHITACRE, 2004). Diversas mutações pontuais estão sendo descritas por concidir com o fenótipo knockdown (Kdr), essas

estão presentes entre os segmentos IIS6 e IIS6 no NaV. Em *Ae. aegypti*, são relatadas 12 mutações não- sinônimas em nove codons diferentes, sendo essas Gly923Val, Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Val1016Ile e Val1016Gly (BRENGUES et al. 2003; SAAVEDRA- RODRIGUEZ et al. 2007; CHANG et al. 2009; HARRIS et al. 2010; KUSHWAH et al. 2015). A resistência ao Kdr já foi registrada em algumas regiões do Brasil (MARTINSet al., 2009), sendo a região nordeste uma delas (LIMA et al., 2011). Populações de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* no estado de Sergipe já apresentaram heterozigotos resistentes em todos os municípios estudados (DOLABELLA et al., 2016).

1.3.2 Resistência Metabólica

Normalmente, o processo de desintoxicação dos xenobióticos, que são substâncias que difere do sistema biológico do ser vivo (GONÇALVES et al, 2014), ocorre em duas fases, conhecidas como Fases I e II. Na Fase I, ocorrem as reações de oxidação, redução e hidrólise, enquanto na Fase II, ocorrem as reações sintéticas ou de conjugação (LANDIS e MING HO, 1995; BRAGA e VALLE, 2007). A resistência a compostos químicos associada a enzimas ocorre tanto na Fase I, com as monooxigenases e esterases, quanto na Fase II, com a glutathione S-transferases (BRAGA e VALLE, 2007).

As monooxigenases dependentes do citocromo P450 (CYP450-monooxigenases) são onipresentes e encontradas em diversos seres vivos, fazendo parte do catabolismo e do anabolismo de xenobióticos em insetos. Desta forma, é uma via comum na resistência de mosquitos a inseticidas (KARUNARATNE e HEMINGWAY, 2001; HEMINGWAY et al., 2004; WILLIAMS et al., 2019). As monooxigenases estão presentes, principalmente, no corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi dos insetos (BERGE et al., 1998; KOMAGATA et al., 2010). As enzimas do CYP450 podem ser consideradas uma das principais superfamílias de enzimas, pois possuem um grande número de formas, tendo sido, por isso, criada uma nomenclatura baseada nas suas homologias de sequências (NELSON et al. 1996). Essa nomenclatura é mundialmente aceita, referindo-se à superfamília P450 como CYP, seguida por um número referente à família, uma letra para a subfamília e um número para espécie (NELSON et al. 1996; BERGE et al., 1998).

A enzima P450 já foi relacionada a diversos relatos de resistência a xenobióticos em insetos, como, por exemplo em larvas de *Ae. aegypti* coletadas em Singapura. Tais

larvas demonstraram uma resistência de 1650 vezes à permetrina na sua décima geração que, por sua vez, é um dos inseticidas piretroides mais utilizado no controle de mosquitos (KASAI et al., 2014). Alguns genes dessa cepa resistente mostraram-se super expressos nos estágios larval e adulto, após a realização da PCR quantitativa em tempo real. Foi possível observar que as isoformas CYP9M6 e CYP6BB2, possivelmente, foram capazes de desintoxicar a permetrina para a 4'-HO-permetrina (KASAI et al., 2014). As enzimas P450 estão relacionadas com efeito sinérgico com o DEET e inseticidas (BONNET et al., 2009). Ramirez et al (2012) realizaram estudos pilotos para observar a ação inibitória de repelentes conhecidos na P450. Para isso, foram incubadas doses únicas desses repelentes com enzimas P450 de fígados de coelhos por dez minutos. Esses experimentos mostraram que o DEET inibe 60% dessas enzimas, esses estudos se mostraram significativos, levando à realização de outros testes com óleos essenciais (RAMIREZ et al., 2012).

As esterases são enzimas que influenciam diretamente na resistência dos mosquitos a inseticidas, atuando no sistema nervoso central, na proteólise e no metabolismo hormonal desses insetos (ALDRIDGE, 1953). As classes de esterases que colaboram para essa resistência são carboxilesterases e as colinesterases.

As carboxilesterases estão presentes na desintoxicação dos inseticidas, sendo a resistência oferecida por elas através da amplificação do número de genes ou através do aumento da atividade de ação de mecanismo (ANTHONY et al., 1995). No processo da colinesterase, a resistência ocorre devido à mutação gênica, sendo esta a responsável pela resistência à AchE. Com isso, é gerada a resistência aos inseticidas, principalmente aos organofosforados e carbamatos, que têm como alvo principal a AchE (FIELD et al., 1988; OAKESHOTT et al., 1993; HEMINGWAY e KARUNARATNE, 1998).

Já as GST são enzimas multifuncionais que estão presentes em diversas funções. Nos insetos, essas enzimas participam da desintoxicação dos xenobióticos, catalisando o ataque nucleofílico da glutatona reduzida (GSH) nos centros eletrofílicos dos compostos lipofílicos (HEMINGWAY e RANSON, 2000; BRAGA e VALLE, 2007). Essas enzimas participam da resistência dos insetos a produtos químicos (RANSON e HEMINGWAY, 2005). É possível verificar a presença dessas enzimas em duas espécies de mosquitos: *Anopheles gambiae*, que apresenta diversas GST elevadas em populações resistentes ao DDT; e *Ae. aegypti*, que possui duas GST elevadas, sendo super expressas em todos os tecidos, exceto nos ovários das fêmeas (PRAPANTHADARA et al., 1995).

1.4 Métodos individuais de proteção: Os repelentes

Diversos mecanismos de proteção individual podem ser adotados pelo homem para evitar a picada das fêmeas de *Ae. aegypti*, como o uso de calças e blusas de mangas longas e a aplicação de repelentes (STEFANI et al., 2009). No caso do vírus Zika especificamente, que pode causar anomalias graves em recém-nascidos quando as gestantes são infectadas, o governo brasileiro incentivou o uso de repelente por mulheres grávidas, promovendo a distribuição do produto às beneficiadas pelo programa bolsa família, a fim de que as chances de sequelas consequentes da infecção descaíssem (BRASIL, 2017s; MELO et al., 2019).

Os repelentes são substâncias que podem ser sintéticas ou naturais. Sua função principal é produzir uma camada de vapor com um odor forte, quando aplicados sobre a pele e roupas, para desmotivar os mosquitos a picarem o homem (PAULA et al., 2004; STEFANI et al., 2009; RIBAS e CARREÑO, 2010). A utilização de repelentes teve seus primeiros relatos na sociedade Greco-Romana, considerados uma das melhores formas de se evitar a picada, doenças e reações imunoalérgicas causadas por mosquitos. Entretanto, alguns fatores relacionados ao homem e ao ambiente podem interferir na eficácia do repelente, como o ácidolático, o suor, gás carbônico, ingestão de álcool, idade, odor e locais mais quentes e úmidos (GUPTA e RUTLEDGE., 1989; STEFANI et al., 2009).

Os repelentes naturais derivados de plantas são utilizados em diversas comunidades do mundo (BUENO e ANDRADE, 2010). São várias as famílias de plantas que possuem características para repelir os insetos, como *Myrtaceae*, *Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Meliaceae*, *Caesalpiniaceae*, *Fabaceae*, *Rutaceae*, *Zingiberaceae* (MACIEL et al., 2010; BUENO e ANDRADE, 2010; MAIA e MOORE, 2011). No Brasil, o consumo de repelentes naturais tem aumentado consideravelmente e isso pode estar relacionado com a diversidade e riqueza de flora que o país apresenta. Outros países também vêm utilizando produtos com componentes derivados de vegetais, como óleos e extratos essenciais, pois têm a vantagem de apresentarem compostos não tóxicos e biodegradáveis na formulação (KRINSKI et al., 2014). Entretanto, os repelentes que possuem componentes sintéticos são os mais utilizados, podendo ser espaciais (adorantes) ou de contato (saborizantes), tendo o modo de ação “cheirar e evitar” e “saborear e ir embora”, respectivamente (LEAL et al., 2017). Dentre os repelentes sintéticos, o N,N- dietilmetilbenzamida (DEET) é bastante comercializado, além de ser um dos mais estudados atualmente (PAULA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2017).

Muitos autores sugerem que o DEET atinge diretamente os neurônios receptores olfativos dos mosquitos, dificultando a localização dos seres humanos (DITZEN et al., 2008; SYED e LEAL, 2008; MAIA e MOORE, 2011).

O DEET foi desenvolvido e patenteado pelos Estados Unidos em 1946, para ser utilizado pelo exército em áreas infestadas com insetos (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1980; SELIM et al., 1995). Atualmente, é considerado o “padrão ouro” dos repelentes, mesmo sendo comercializado há mais de 64 anos (FRADIN, 1998; DOGAN et al., 1999; DEGENNARO, 2015). Comparando com diversos produtos botânicos e óleos essenciais, o DEET é considerado superior em relação ao tempo de duração (FRADIN e DAY, 2002; MIOT et al., 2004; PAGE et al., 2009). Em relação a outros repelentes sintéticos, o DEET é considerado igualmente superior, como foi observado por Leal et al. (2017), que reportaram que o DEET obteve um resultado de proteção na primeira picada significativamente superior à picaridina, quando testados a 1%. No estudo realizado por Qualls et al. (2012), o DEET também se mostrou superior na duração de proteção contra a primeira picada de mosquitos positivos para Sindbisvirus (SINV), seguido pela picaridina, 2-U e óleo de eucalipto-limão.

Entretanto, experimentos pioneiros realizados com *Ae. aegypti* demonstraram que o DEET pode não inibir completamente a ação, reduzindo somente a intensidade da abordagem do mosquito. Além disso, alguns mosquitos dessa espécie mostraram-se insensíveis quando expostos ao DEET (STANCZYK et al., 2010), sendo que alguns desses indivíduos transmitiram essa característica para a prole (RUTLEDGE et al., 1994; BOECKH et al., 1996; STANCZYK et al., 2010). A resistência de algumas populações de vetores por determinados produtos químicos pode ocorrer como resposta a fatores genéticos e operacionais. Sendo assim, a resistência é uma característica genética de cada população, pois são levados em consideração os produtos aos quais esses insetos foram expostos. Além disso, a sensibilidade do DEET pode variar dentro da própria espécie, dependendo do local de origem de cada cepa (RUTLEDGE et al., 1978; MACIEL et al., 2010).

Nos últimos anos, os mosquitos vêm sendo constantemente expostos aos repelentes, podendo levar, conseqüentemente, à uma seleção para insensibilidade nas populações desses vetores. Dessa forma, haveria um prejuízo para uma das formas mais eficazes de proteção pessoal contra arboviroses na sociedade. Apesar da grande relevância dessa descoberta, pouco se sabe sobre a insensibilidade do *Ae. aegypti* e até

mesmo de outras espécies em outras partes do mundo ao DEET. Devido à grande importância do *Ae. aegypti* para a saúde pública no Brasil, faz-se necessário o preenchimento dessa lacuna no conhecimento acerca da tolerância das populações desse mosquito vetor ao DEET, bem como da manutenção desse comportamento em gerações posteriores dessa espécie.

2 HIPÓTESES

Para este estudo, foram consideradas as seguintes hipóteses:

- 1- As cepas de *Ae. aegypti* de laboratório (Rockefeller) e de campo não possuem o mesmo nível de sensibilidade ao DEET.

Havendo diferença na sensibilidade, foram exploradas outras diferenças entre as populações que possam estar associadas à sensibilidade ao DEET, como a resistência a inseticidas e atividade locomotora:

- 2- As cepas de *Ae. aegypti* de laboratório (Rockefeller) e de campo diferem quanto à atividade locomotora.
- 3- Há um aumento no número de fêmeas insensíveis ao longo das gerações nas linhagens Sensível e Insensível da população Rockefeller.

3 OBJETIVOS

Avaliar aspectos relacionados à tolerância ao DEET e à resistência a xenobióticos em cepas *Ae. aegypti* de campo e de laboratório.

Objetivos específicos

- Verificar a insensibilidade das cepas de *Ae. aegypti* de laboratório (Rockefeller) e de campo (Laranjeiras) ao DEET em condições de laboratório;
- Investigar se a insensibilidade ao DEET é transmitida para as próximas gerações do mosquito;
- Caracterizar o perfil de resistência KDR das cepas de *Ae. aegypti* da população de Laranjeiras;
- Verificar o padrão de atividade locomotora das cepas de *Ae. aegypti* Rockefeller e Laranjeiras em condições de laboratório.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no estado de Sergipe, no município de Laranjeiras (Latitude: -10.8032, Longitude: -37.1696; 10°48'12" Sul, 37°10'11" Oeste), localizado a 4 km da capital Aracaju (Figura 1). O município possui área de 162,3 km² e tem população estimada de 26.903 habitantes (BRASIL, 2019). Esse município foi escolhido para este estudo por possuir vários casos de arboviroses, além de apresentar diversos focos de proliferação de *Ae. aegypti*. Além disso, essa área contém informações prévias acerca da resistência de *Ae. aegypti* a xenobióticos (DOLABELLA et al., 2016; LA CORTE et al., 2018; PIMENTEL et al., 2019/ dados não publicados). Além disso, os serviços dos agentes de endemias do município foram disponibilizados, desta forma facilitando a instalação das armadilhas nas residências.

Figura 1- Mapa do Brasil, com destaque em cinza para o estado de Sergipe. Em vermelho, área do município de Laranjeiras, onde ocorreu a instalação das armadilhas para a coleta dos ovos de *Aedes aegypti* em setembro e novembro de 2019.

Fonte: IBGE, 2010, sistema de referência de coordenadas: SAD69/UTM Zone 24s.
Elaboradora: Athawana Andrade Silva, abril, 2020, São Cristóvão.

4.2 Coletas em campo

4.2.1 Instalação das Ovitampas

Os ovos de *Ae. aegypti* foram coletados em campo através de armadilhas de oviposição (ovitampas). As ovitampas consistem em recipientes plásticos escuros, com capacidade de, aproximadamente, 500 ml (Figura 2). Dentro de cada ovitampa, foi fixada, com um clip, uma palheta de Eucatex com, aproximadamente, 17 cm x 3 cm, e com um lado áspero adequado para a postura dos ovos de *Ae. aegypti*. Em cada palheta foi colocado um número de identificação. Não foi utilizada a solução de feno devido ao seu forte odor, o que aumentaria o índice de rejeição por parte dos moradores. Dessa forma, foram utilizados apenas 300 ml de água em cada ovitampa.

Figura 2- Armadilha (Ovitampa) instalada para a coleta de ovos da espécie *Aedes aegypti* na área peridomiciliar do município de Laranjeiras no período de setembro e novembro de 2019.

A instalação das ovitampas foi realizada em locais selecionados com base nas áreas que possuíam maiores índices de infestações de *Ae. aegypti*, de acordo com informações disponibilizadas pela Secretária de Saúde do Município, de forma a aumentar a probabilidade de coleta de ovos. Foram instaladas 290 armadilhas, uma por residência, em locais sombreados e protegidos da chuva, onde havia pouca circulação de pessoas e animais.

A retirada das armadilhas foi realizada cinco dias após a instalação, para evitar que se tornassem criadouros para mosquitos. As palhetas foram individualmente colocadas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Entomologia e

Parasitologia Tropical (LEPaT), na Universidade Federal de Sergipe, para verificação de positividade (presença de ovos), contagem e eclosão das larvas. Todas as palhetas positivas, isto é, com presença de ovos, foram mantidas em salas climatizadas, com temperatura de 26°C+/-1°C, umidade relativa do ar de 60-80%, e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD12:12).

Os ovos da população Rockefeller, utilizada para comparação, foram cedidos pelo Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEPaT), da Universidade Federal de Sergipe (UFS), a partir de colônia mantida desde 2015 no insetário. As fêmeas geradas desses ovos foram utilizadas nos bioensaios de sensibilidade ao repelente DEET.

4.2.2 Criação e manutenção das colônias de campo e Rockefeller

Todas as palhetas/cartelas contendo ovos das cepas de Laranjeiras e Rockefeller, respectivamente, foram colocadas em bandejas de polietileno (35 x 20 x 6 cm), devidamente identificadas, contendo 1,5 L de água filtrada e 0,5 g de ração de peixe (Marine Granules Tetra). Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com ração de peixe. As pupas formadas foram transferidas para copos de plásticos descartáveis (50ml), em quantidade de, aproximadamente, 50 pupas em cada recipiente. Os copos com as pupas foram colocados em gaiolas do tipo Bugdorm (30 × 30 × 30 cm), onde também havia um algodão embebido em solução açucarada (10%), que serviu de alimento para os adultos após a emergência.

Em cada dia, a gaiola com os adultos que emergiram era datada e as pupas restantes transferidas para outra gaiola com as pupas do dia, dessa forma era possível determinar a idade das fêmeas. Os machos e fêmeas eram mantidos na mesma gaiola para que houvesse a cópula entre eles, sendo essa livre até a separação que antecedia os experimentos. A identificação das espécies foi realizada no momento da separação das fêmeas. Foi utilizado o capturador de Castro para a identificação, feita pela observação dos caracteres do tórax do mosquito.

O respasto sanguíneo das fêmeas foi realizado por meio de Glytube, seguindo protocolo proposto por Silva et al. (2013), com algumas alterações. Basicamente, eram utilizados tubos tipo Falcon (50ml), contendo 35 ml de glicerina, aquecidos a 60°C. Posteriormente os tubos Falcon eram colocados em pequenos sacos e amarrados com elásticos, enquanto as tampas, forradas com Parafilm®, continham 1,5ml de sangue. Em

seguida, os tubos prontos eram colocados na parte superior das gaiolas para alimentação das fêmeas (Figura 3).

O sangue de carneiro utilizado foi obtido no Biotério da Universidade Federal de Sergipe (UFS), seguindo todos os regulamentos do comitê de ética em pesquisa com animal (CEPA) da UFS (Nº 57/2018; ANEXO I). Após a alimentação sanguínea, um ovipositor, ou seja, um recipiente de plástico de cor escura e papel filtro, foi deixado, em cada gaiola, para a postura dos ovos, sendo que todos os ovos foram posteriormente contabilizados.

Figura 3- Alimentação das fêmeas de *Ae. aegypti* em laboratório (A) Tubos Falcon contendo 35 ml de glicerina; (B) Tampas do tubo Falcon perfuradas na parte superior e revestidas com Parafilm®; (C) Tampas do tubo Falcon com 1,5ml de sangue de carneiro; (D) Alimentação das fêmeas de *Ae. aegypti* nas gaiolas.

4.2.3. Preparação dos mosquitos para os bioensaios

Para cada gaiola teste foram selecionadas 50 fêmeas de *Ae. aegypti* com 5 a 12 dias de emergência, as quais eram mantidas em jejum por 12h antes do teste ocorrer. As gaiolas de teste foram modificadas, possuindo um dos seus lados de vidro, para melhor visualização dos mosquitos e um suporte de 1,5 cm na sua parte superior (Figura 4), para que o antebraço do voluntário não entrasse em contato com os mosquitos. As fêmeas

eram separadas 2 horas antes do bioensaio e colocadas em gaiolas menores e mantidas no laboratório para aclimatização.

O experimento de sensibilidade foi realizado com fêmeas obtidas a partir dos ovos coletados em campo e os de laboratório, enquanto os experimentos de hereditariedade da resposta ao DEET pela população de Rockefeller foram realizados com as fêmeas proveniente dos cruzamentos do primeiro experimento.

Figura 4-Gaiola adaptada para os experimentos de repelência. A seta amarela mostra a lateral da gaiola, composta por uma placa de vidro, enquanto a seta vermelha indica o suporte construído para apoio do braço do voluntário, São Cristóvão, SE, 2020.

4.2.4. Testes de repelência

O teste de repelência foi realizado de acordo com o protocolo proposto por Stanczyk et al., (2010), com algumas alterações. O experimento consistiu na exposição de fêmeas de *Ae. aegypti* ao DEET. Foi utilizado o antebraço do voluntário nele, foi aplicado, uniformemente, 0,5 mL de solução de N,N-Dietil-m- toluamida (DEET) a 10% em etanol absoluto (Figura 5), sendo esta a concentração que mais se aproxima da comercializada no país.

Figura 5. Braço do voluntário no suporte (setas vermelhas) a 1,5 cm da gaiola contendo fêmeas de *Ae. aegypti*.

O antebraço do voluntário foi exposto no suporte por dois minutos, para que a atividade dos mosquitos pudesse ser observada. Quando expostas ao DEET, as fêmeas que pousavam no suporte ou sondavam o braço eram consideradas insensíveis a esse repelente e eram removidas com um capturador de Castro, e colocadas em uma gaiola separada e identificada como insensíveis ao DEET. As que não fizeram nenhuma tentativa foram consideradas sensíveis ao repelente e colocadas em outra gaiola também identificada.

Após a classificação das colônias em linhagens sensíveis (LS) e insensíveis (LI) ao DEET, as fêmeas foram colocadas para a reprodução, estabelecendo, assim, a próxima geração de fêmeas que foram testadas (Figura 6). Os procedimentos de experimentação e de separação para o posterior cruzamento das gerações seguintes foram realizados somente na população de Rockefeller, enquanto que as cepas coletadas em campo só foram utilizadas no primeiro experimento, devido ao baixo número de ovos disponível para a manutenção da próxima geração.

4.2.5. Bioensaios de sensibilidade ao DEET

Para os bioensaios de sensibilidade ao DEET foram utilizadas duas cepas de *Ae. aegypti*, sendo uma de campo e a outra de laboratório. Normalmente, eram realizados

quatro experimentos por voluntário, dois de cada cepa, dependendo da disponibilidade de fêmeas no dia do bioensaio.

4.2.6. Seleção da sensibilidade ao DEET na população Rockefeller

Os bioensaios para a seleção da sensibilidade foram realizados até a terceira geração na população Rockefeller. Após cada bioensaio, as fêmeas eram separadas em gaiolas de acordo com a sua resposta (sensibilidade ou insensibilidade) ao DEET e, em cada geração, as fêmeas sensíveis da linhagem Insensível e as fêmeas insensíveis da linhagem Sensível eram descartadas. As fêmeas de cada linhagem eram alimentadas para produção de ovos, os quais a seu tempo, eram colocados para a eclosão para a continuação dos bioensaios das gerações posteriores (Figura 6).

Figura 6- Esquema de seleção das linhagem Sensível e Insensível da população Rockefeller após a realização dos experimentos de repelência ao DEET. São Cristovão, 2020.

4.2.7. Voluntários

Todos os voluntários eram saudáveis, tinham entre 18 e 50 anos, não possuíam alergia a repelentes e não estavam gestantes. Os voluntários eram orientados a não fazer uso de nenhum produto de fragrância, como cremes, perfumes, repelentes ou fumar no dia teste. Todos os voluntários receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com todas as informações necessárias, seguindo recomendações dos Comitês de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP (Nº 2.728.268; Anexo II e colocar no Anexo) e da Universidade Federal de Sergipe (Nº 3.303.611; Anexo III).

Todos os voluntários foram expostos a fêmeas de *Ae. aegypti*, para verificar a atratividade para os mosquitos, com isso foi selecionado um de quatro voluntários. Sendo que na primeira etapa todos foram utilizados, na mesma frequência nas duas populações. Para a segunda etapa dos experimentos, foi utilizado somente um voluntário, devido a questões logísticas.

4.3. Avaliação da frequência da mutação KDR em *Ae. aegypti*

Foram analisadas 32 fêmeas da espécie *Ae. aegypti* população de laranjeiras, para diagnosticar a presença da mutação kdr. Os DNAs genômicos foram extraídos utilizando a técnica proposta por Ayres et al. (2002) com algumas modificações.

Os mosquitos foram macerados individualmente em microtubos de 1,5 ml juntamente com 180 µl de Digestion Buffer e 20 µl de proteinase K e a mistura colocada no vórtex rápido. A amostra foi colocada em banho-maria à 55°C por 30 minutos. Após isso, centrifugou-se a solução a 15.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo e adicionado 20 µl de RNase A, vortexando brevemente e incubando à temperatura ambiente por 2 minutos. Foram adicionados 200 µl de Genomic Lysis e vortexando para obter uma solução homogênea. O DNA foi precipitado pela adição de 200 µl de Etanol 96-100% ao lisado. Em seguida, foi realizada a transferência do conteúdo do tubo para a coluna de extração acoplada a um tubo coletor e centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e lavado com 500 µl de Wash Buffer 1 e centrifugado mais uma vez a 10.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µl de Wash Buffer 2 e centrifugou-se em velocidade máxima por 3 minutos. Por fim, colocou-se a coluna de

extração em um novo tubo coletor, o DNA foi ressuspensionado em 100 µl de Elution Buffer (TRIS-EDTA, 10:1 mM) e centrifugou-se a velocidade máxima por 1 minuto. Após a extração de DNA, as amostras foram armazenadas até sua utilização nas reações de PCR.

Para detectar a mutação Val1016Ile, a reação de PCR foi realizada utilizando os seguintes primers alelo-específicos desenvolvidos por Saavedra-Rodriguez et al.: um específico para o alelo mutante (5'-GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A-3'), um específico para o alelo selvagem (5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG-3'). Em microtubos de 0,5 ml colocouse 12,5 µl de Master Mix® (Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂, Tampão), adicionouse 8,5 µl de água Mili-q® autoclavada e 1 µl de cada primer. Depois de homogenizar, transferiu-se 23 µl dessa solução para cada microtubo e adicionou-se 2 µl de DNA extraído. Para observar se houve contaminação da amostra, foi utilizado um controle negativo contendo 23 µl da solução e 2 µl de água Mili-q® autoclavada. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: por 5 minutos a 95°C para a desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento, 1 minuto a 72°C para extensão. Uma temperatura final de extensão de 72°C a 5 minutos e a reação finalizada a 4°C a 59:59 minutos. A separação dos produtos da reação da PCR será realizada por eletroforese em gel de agarose a 4%. A presença de banda única de 98pb indica indivíduo homozigoto dominante-susceptível, a presença de duas bandas de 98 e 78pb representa indivíduo heterozigoto-susceptível, enquanto a presença de banda única de 78pb indica indivíduo homozigoto recessivo-resistente.

4.4. Atividade Locomotora

O sistema de análise de atividade (Drosophila Activity Monitor - Trikinetics) foi utilizado para a análise da atividade locomotora das fêmeas de *Ae. aegypti* Rockefeller e de Laranjeiras. As fêmeas foram colocadas individualmente em tubos de vidro, abertos em ambas as extremidades, com 10 mm de diâmetro e 8 cm de comprimento. Na preparação do tubo para atividade locomotora, um pequeno chumaço algodão embebido com solução açucarada 15% foi colocado em uma das extremidades. Após colocação do mosquito, ambas as extremidades do tubo foram vedadas com "parafilme". Esses tubos ficaram organizados em monitores contendo 32 canais cada.

Cada tubo contendo um mosquito fica localizado em um canal (unidade de monitoramento individual) e sua movimentação pode ser detectada e registrada cada vez que o indivíduo atravessava o feixe de luz infravermelho, localizado no meio do tubo. Os monitores contendo 32 tubos cada foram colocados dentro de uma incubadora, com temperatura e fotoperíodo controlados, e conectados a um computador por cabos. Para quantificação da atividade, foi utilizado o programa “DAMSystem data collection”, que registrou, em intervalos de 30 minutos, o número de vezes que cada mosquito interrompeu o feixe de luz infravermelho (Figura 7).

Para a análise da atividade locomotora, é excluído o primeiro dia de experimento, pois esse dia é destinado a preparação das fêmeas nos tubos de atividade locomotora, sendo assim o primeiro dia apresentado no gráfico corresponde ao segundo dia de experimento, para que não haja interferência de movimentação derivada do estresse da manipulação dos espécimes. Fêmeas que ficaram vivas até o quarto dia de experimento foram consideradas para as análises.

Figura 7. Placa de Monitoramento de Atividade com 32 tubos contendo uma fêmea de *Ae. aegypti* em cada. Foto Pancetti, FGM (2016).

4.5. Análises estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas e apresentados em tabelas e gráficos produzidos no pacote office Excel. Para a comparação da insensibilidade/sensibilidade das duas populações e ao decorrer das gerações foram utilizados os testes estatísticos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, respectivamente. Quando o teste de Kruskal-Wallis indicou a rejeição da hipótese nula, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar a diferença estatística entre as gerações. Os Softwares utilizados para a elaboração dos testes foram o SPSS e o Bioestat. Para a atividade locomotora, foi utilizado o teste t, para comparação das médias de atividade total e diurna entre as populações Rockefeller e Laranjeiras. Para manter um equilíbrio entre as populações Rockeffeler e Laranjeiras, quando comparadas na primeira etapa dos experimentos, foram escolhidas 14 amostras aleatoriamente.

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento das colônias para os bioensaios

No período de setembro a novembro de 2019, foram instaladas 290 ovitrampas no município de Laranjeiras – SE, para realização dos bioensaios com mosquitos de campo. Na análise das palhetas para positividade de ovos, foi verificado um total de 80,3% de palhetas com presença de ovos de *Aedes*, contabilizando 15.940 ovos. Para a eclosão das larvas, os ovos foram colocados, gradualmente, para eclosão. Das larvas que eclodiram, 60,3% chegaram à fase de pupa. Após a triagem, três mosquitos foram identificados como *Ae. albopictus* e excluídos, sendo todos os demais *Ae. aegypti*. Nenhuma outra espécie foi identificada.

5.2 Bioensaios de sensibilidade ao DEET

No período de agosto a outubro de 2019, foram realizados os bioensaios com a população Rockefeller e, de outubro de 2019 a janeiro de 2020, com a população Laranjeiras. Foram realizados 14 bioensaios com a população de campo, totalizando 700 fêmeas, e 30 bioensaios com a população de laboratório, totalizando 1500 fêmeas. Com a finalidade de manter o equilíbrio no tamanho das amostras, foram sorteados 14 bioensaios dentre os 30 realizados com a população Rockefeller, para compor a sub-amostra dessa primeira etapa do trabalho. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a proporção de mosquitos insensíveis na amostra total (13,2% insensíveis (IC95%: 8,3-18,6) e a sub-amostra (12,9% insensíveis (IC95%: 6,0-19,7) da população Rockefeller ($U = 205,5$; $Z(U) = 0,1$; $p = 0,9$).

A sensibilidade ao DEET variou intra e interpopulações. Metade da amostra da população de Laranjeiras (7 gaiolas) apresentou fêmeas completamente sensíveis ao DEET. Nas demais gaiolas, o número de fêmeas insensíveis, ou seja, que tentavam aproximar-se do braço tratado, variou de uma a, no máximo, quatro. No total, 2,7% (IC95%: 1,0-4,4) das fêmeas foram insensíveis e 97,3% (IC95%: 95,6-99,0) sensíveis ao DEET. Na população Rockefeller todas as gaiolas apresentaram pelo menos uma fêmea insensível. No total, 12,9% (IC95%: 6,0-19,7) das fêmeas foram insensíveis e 87,1% (IC95%: 80,3-94,0) foram sensíveis (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição do número de fêmeas de *Aedes aegypti* das populações de Laranjeiras e Rockefeller, de acordo com a sensibilidade ao DEET em bioensaios de repelência, São Cristóvão, SE, março de 2020.

Experimentos	Populações			
	Laranjeiras		Rockefeller	
	Sensível	Insensível	Sensível	Insensível
1°	50	0	47	3
2°	50	0	49	1
3°	48	2	45	5
4°	50	0	47	3
5°	50	0	46	4
6°	46	4	48	2
7°	48	2	31	19
8°	50	0	47	3
9°	47	3	48	2
10°	46	4	41	9
11°	49	1	43	7
12°	50	0	27	23
13°	50	0	45	5
14°	47	3	46	4
Total	681	19	610	90
Total geral (%)	97,3	2,7	87,1	12,9
Intervalo de confiança	[95,6 ; 99,0]	[1,0 ; 4,4]	[80,3 ; 94,0]	[6,0 ; 19,7]

Quando comparadas, as duas populações testadas mostraram diferença estatisticamente significativa ($U = 27,5$; $Z(U) = 3,2$; $p = 0,001$) quanto à resposta ao repelente. Além disso, as medianas das fêmeas insensíveis foram diferentes, sendo maior na população Rockefeller ($M_R = 4$) do que na Laranjeiras ($M_R = 0,5$) (Figura 8). Desta forma, foi possível manter a hipótese nula, ou seja, há diferença entre as populações com relação à sensibilidade ao DEET.

Figura 8. Frequência de fêmeas de *Aedes aegypti* das populações de Laranjeiras e Rockefeller insensíveis ao DEET em experimentos de repelência, São Cristóvão, SE, março de 2020.

5.3 Frequência de mutações no canal de cálcio do tipo *Kdr*

Foi extraído o DNA de 32 fêmeas de *Ae. aegypti* da população Laranjeiras. Após esse procedimento, foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) a fim de verificar a presença da mutação *Kdr* (Val1016Ile) nessas fêmeas.

Das fêmeas testadas da população de Laranjeiras, 21,9 % apresentaram genótipo de resistência, ou seja, apresentaram o gene mutante Val1016Ile na forma homozigota. Paralelamente, 21,9% das fêmeas foram heterozigotas e 56,2% foram homozigotas (sem o gene de resistência), sendo ambas susceptíveis a piretroides.

5.4 Atividade locomotora das fêmeas de *Ae.aegypti*

A atividade locomotora de 160 fêmeas de *Ae. aegypti* foram avaliadas, sendo 83 fêmeas da população de Laranjeiras e 77 fêmeas da população Rockefeller. Na Figura 9, podemos observar que tanto as fêmeas da população de Laranjeiras quanto as Rockefeller apresentaram padrão diurno e bimodal de atividade, com um pico menor no acender das luzes e um maior no apagar das luzes. O aumento da atividade locomotora a partir da metade da fase clara pode ser observado nas duas populações, nos quatro dias testados (Figura 9). Nos quatro dias testados, a atividade locomotora das fêmeas de *Ae. aegypti* da população de Laranjeiras foi maior do que a de Rockefeller, bem como o pico do apagar das luzes (Figura 9).

As fêmeas de *Ae. aegypti* da população de Laranjeiras apresentaram a média de atividade total e a média de atividade diurna significativamente maior do que as fêmeas de Rockefeller (testet; $t=-3,082$, $p=0,002$ e $t= -3,657$, $p< 0,001$, respectivamente). Mesmo quando o pico do acender das luzes é retirado da média diurna, a atividade na fase clara ainda é significativamente maior na população de Laranjeiras do que Rockefeller ($t= -3,825$, $p< 0,001$). Apesar do pico do apagar das luzes ter sido maior na população de Laranjeiras, essa diferença não foi significativa ($t= -1,389$, $p= 0,167$). Também não foram observadas diferenças significativas entre as médias noturnas e do pico do acender das luzes entre as duas populações ($t= -1,085$, $p= 0,279$ e $t= 0,360$, $p= 0,719$, respectivamente).

Figura 9—Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* da população de Laranjeiras (Linha vermelha, n=83), coletadas no período de setembro a novembro de 2019 e da população Rockefeller (Linha azul, n=77). Experimento realizado sob regime de 12 horas de claro (colunas brancas) e 12 horas de escuro (colunas cinza) (LD 12:12), a 25°C. Fevereiro de 2020, São Paulo, SP.

5.5 Seleção da sensibilidade ao DEET na população Rockefeller

No período de agosto de 2019 a março de 2020, foram realizados bioensaios de seleção da sensibilidade para a população Rockefeller. O experimento iniciou com 30 bioensaios (1.500 fêmeas), os quais foram reduzindo a depender do número de ovos obtidos em cada geração, das taxas de eclosão e mortalidade e questões logísticas. Na população Rockefeller insensível, foram realizados 29 bioensaios (1.450 fêmeas) na geração F1, 13 (650 fêmeas) na F2 e 6 (282) na F3. Na população Rockefeller sensível, foram realizados 12 bioensaios (600 fêmeas) na geração F1, 14 (700 fêmeas) na F2 e 15 (750 fêmeas) na F3 (Figura 10).

No bioensaio inicial, 202 fêmeas (13,5%) foram insensíveis ao DEET e, após o repasto sanguíneo, colocaram o total de 9.036 ovos, dando origem à linhagem Insensível. Na geração F1, 178 fêmeas (12,3%) foram insensíveis ao DEET e colocaram o total de 17.558 ovos; enquanto que na F2 35 fêmeas (5,4%) foram insensíveis ao DEET e colocaram 3.428 ovos e na F3, 11 fêmeas (3,9%) foram insensíveis ao DEET e colocaram 1.523 ovos (Figura 10).

5.6 Seleção da sensibilidade ao DEET na população Rockefeller

No período de agosto de 2019 a março de 2020, foram realizados bioensaios de seleção da sensibilidade para a população Rockefeller. O experimento iniciou com 30 bioensaios (1.500 fêmeas), os quais foram reduzindo a depender do número de ovos obtidos em cada geração, das taxas de eclosão e mortalidade e questões logísticas. Na população Rockefeller insensível, foram realizados 29 bioensaios (1.450 fêmeas) na geração F1, 13 (650 fêmeas) na F2 e 6 (282) na F3. Na população Rockefeller sensível, foram realizados 12 bioensaios (600 fêmeas) na geração F1, 14 (700 fêmeas) na F2 e 15 (750 fêmeas) na F3 (Figura 10).

No bioensaio inicial, 202 fêmeas (13,5%) foram insensíveis ao DEET e, após o repasto sanguíneo, colocaram o total de 9.036 ovos, dando origem à linhagem Insensível. Na geração F1, 178 fêmeas (12,3%) foram insensíveis ao DEET e colocaram o total de 17.558 ovos; enquanto que na F2 35 fêmeas (5,4%) foram insensíveis ao DEET e colocaram 3.428 ovos e na F3, 11 fêmeas (3,9%) foram insensíveis ao DEET e colocaram 1.523 ovos (Figura 10).

A linhagem Sensível foi iniciada com 1.298 fêmeas (86,5%) do bioensaio inicial, as quais, após o repasto sanguíneo, colocaram 30.542 ovos. Na F1, 571 fêmeas (95,2%) foram sensíveis ao DEET e colocaram 13.994 ovos; enquanto que na F2, 631 fêmeas (90,1%) foram sensíveis ao DEET e colocaram 23.891 ovos e na F3, 724 fêmeas (96,5%) sensíveis ao DEET e colocaram 2.965 ovos (Figura 10).

Figura 11. Desenvolvimento das gerações de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas ao DEET através de experimentos realizados com voluntários. São Cristóvão, 2020.

O número de fêmeas insensíveis na linhagem Insensível variou durante os bioensaios e entre as gerações, sendo que a amplitude e a mediana na geração parental ($M_d=4$; $AT= 31$) foram superiores às das gerações F1 ($M_d=2$; $AT= 29$), F2 ($M_d=0$; $AT= 11$) e F3 ($M_d= 1,5$; $AT= 4$) (Figura 12). É possível observar que o número de fêmeas insensíveis e a amplitude da variação diminuíram ao longo das gerações. Foi observada diferença estatística significativa entre as gerações testadas ($H = 8,3$; $p = 0,0389$), todavia com a aplicação do teste de Dunn não foi possível verificar diferenças par a par, sendo todas as combinações não significativas.

Figura 11–Número de fêmeas de *Aedes aegypti* insensíveis ao DEET da população Rockefeller, linhagem Insensível em experimentos de repelência, março de 2020, São Cristóvão, SE.

Na linhagem Sensível, a mediana entre as gerações não apresentou grande variação, diferente da amplitude total, que variou de forma significativa entre elas. A geração parental foi a que obteve os índices absolutos mais altos ($M_d = 46$; $AT= 31$), quando comparada com as gerações F1 ($M_d= 47,5$; $AT= 5$), F2 ($M_d= 46,5$; $AT= 16$) e F3 ($M_d=49$; $AT= 9$), sendo que a geração F1 obteve a menor amplitude e a F3 a maior mediana (Figura 13). Houve variação significativa das fêmeas sensíveis entre as gerações testadas ($H= 16,5$; $p= 0,0009$) da linhagem Sensível, rejeitando-se a hipótese nula. Através da análise par-a-par entre as gerações, foi possível identificar que essa diferença ocorreu entre a geração parental e a geração F3 ($H= 16,5$; $p <0,05$).

Figura 13. Número de fêmeas de *Aedes aegypti* sensíveis ao DEET da população Rockeffeler, linhagem Sensível em experimentos de repelência, março de 2020, São Cristóvão, SE.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizada a coleta de ovos de *Ae. aegypti* utilizando ovitrampas, que possuem maior sensibilidade para a detecção dessa espécie, podendo ser utilizadas também no monitoramento desse vetor nas estações de transmissão do dengue e em área de baixa infestação (BRASIL, 2014m; CODEÇO et al., 2015; BARRETO et al., 2020). As coletas realizadas com ovitrampas no município de Laranjeiras- SE apresentaram 83,3% de positividade para ovos *Ae. aegypti*, demonstrando alta infestação nessa região. Resultado similar foi encontrado por La Corte et al. (2018), que estudaram sete outros município do estado de Sergipe durante os anos de 2010 e 2011, e observaram que os municípios mais próximos da capital, Aracaju, apresentaram também alto índice de positividade para ovos (70%).

A alta incidência de *Ae. aegypti* é a realidade de vários municípios brasileiros, e esse fato pode estar ligado à ocupação desordenada da população em grandes centros

urbanos (MAIA et al., 2019). A desigualdade socioeconômica é outro fator que influencia diretamente a alta densidade dessa espécie, principalmente quando a região possui recolhimento de resíduos sólidos insatisfatório e a má distribuição de água, assim aumentando o número de criadouros artificiais para o mosquito (TAUIL, 2001; OLIVEIRA e VALLA, 2001; LINHARES e CELESTINO, 2006; MARTEIS et al., 2013; MERÊNCIO et al., 2018).

O município de Laranjeiras está na 24^o posição do ranking fornecido pelo IBGE (2008) sobre o abastecimento de água no estado de Sergipe. Especificamente na área urbana, onde foram instaladas as armadilhas, 95% da distribuição é realizada pela rede geral de abastecimento de água, 4% por outra forma de abastecimento e 1% advém de poços ou nascentes na propriedade (BRASIL, 2010n). Entretanto, a falta de água era constante na maioria das casas da área de estudo desse trabalho, possuindo muitos moradores com reservatórios armazenando água em casa, o que servia de criadouro para as formas imaturas de *Ae. aegypti*. Marteis et al. (2013) observaram que 70,5% dos recipientes positivos para a forma imatura de *Ae. aegypti* em um bairro localizado na capital do estado de Sergipe durante os anos de 2007 e 2008 eram para armazenamento de água.

Os altos índices de positividade de *Ae. aegypti* podem acarretar o aumento dos casos de arboviroses associadas a essa espécie. Os primeiros resultados publicados pelo Ministério da Saúde em 2020 mostraram que, até a 7^o semana epidemiológica (SE), os números de casos prováveis do Brasil foram superiores em relação aos anos de 2015 e 2019 (BRASIL, 2020 r). Desta forma, é necessária a utilização de técnicas de proteção individual para evitar o contato com o vetor, como o uso de repelentes. Com base nos resultados do nosso trabalho, é possível afirmar que a utilização do DEET para a espécie *Ae. aegypti* pode ser positiva para se evitar o contato homem-vetor na área estudada.

Em nossos experimentos, encontramos uma grande proporção de fêmeas sensíveis ao DEET em ambas as populações. O resultado encontrado indica funcionalidade positiva para o repelente testado, principalmente considerando que não foi avaliada a atividade de pouso efetivo no braço, mas de aproximação. É possível que os resultados apresentassem ainda maior sensibilidade caso os experimentos fossem realizados como braço dentro da gaiola, o que, todavia, não seria possível executar com população de mosquitos de campo em área endêmica como o Estado de Sergipe. Frequentemente, a proteção individual da população contra picadas de mosquitos é realizada através do uso de repelentes naturais ou sintéticos. Dentre os sintéticos, o mais

utilizado é o DEET (PAULA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2017). No presente trabalho, contrariamente ao que seria esperado, foi observado que a população de campo obteve menor número de fêmeas insensíveis quando expostas ao DEET em comparação com a população Rockefeller. Resultados semelhantes foram encontrados por Deletre et al.(2019), que verificaram que a população de *Anopheles gambiae* de laboratório, susceptível a inseticidas, não mostrou repelência espacial ao DEET, enquanto que populações de campo dessa espécie, resistentes a inseticidas, apresentaram resultados de repelência. Esses resultados sugerem que fatores endógenos ligados à resistência a inseticidas estão também envolvidos na resposta dos mosquitos a repelentes, sendo um deles o DEET (DELETRE et al., 2019).

As mutações no local alvo podem modificar o comportamento das populações resistentes em comparação com as susceptíveis (DELETRE et al., 2019), modificando, desta forma, a relação entre o número de mosquitos resistentes a repelentes e inseticidas. Além disso, populações resistentes a piretroídeos, organofosforados e carbamatos podem ter a atividade e número de enzimas desintoxicantes do complexo P450 modificadas devido à superexpressão dos genes metabolizadores desses inseticidas (DJOUAKA et al., 2008; BONNET et al., 2009; LIU, 2015.). Embora o processo ainda não esteja elucidado, essas enzimas mostraram-se relacionadas à atividade do DEET (JAMIREZ et al. 2012).

Em estudos realizados na população de *Ae aegypti* de Laranjeiras pelo grupo LEPaT (UFS), foi possível observar que essa população resistente a inseticidas possui enzimas desintoxicante do complexo P450 em quantidade muito superior nas cabeças das fêmeas em relação à população susceptível a inseticidas. Isto pode resultar em uma maior sensibilidade ao DEET (PIMENTEL et al., 2019/ dados não publicados), caso estas enzimas façam parte da percepção do repelente pelas fêmeas. Este fator poderia explicar os resultados dos experimentos de repelência realizados neste estudo, com a população de campo mostrando maior sensibilidade em relação à população susceptível e também o aumento da sensibilidade na população Rockefeller, selecionado em laboratório, sendo observado. Todavia, a quantificação da P450 na linhagem selecionada não foi realizada.

Além disso, a maior sensibilidade da população de campo pode estar relacionada também com a presença do gene mutante Val1016Ile, sendo que a cepa estudada possui homozigose (21,9%) para esse gene. Assim como os resultados encontrados por Deletre et al.(2019), que apontam a espécie *An. gambiae* com essa mutação, apresentaram

resposta de repelência ao DEET em altas doses (0,1 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), corroborando com o presente trabalho, onde a população com essa característica apresentou uma maior sensibilidade, diferentemente da população de referência que não foi repelida.

As variações entre as populações resistentes e susceptíveis também são refletidas no aumento da atividade locomotora desses mosquitos, como foi possível observar nos resultados do presente estudo, nos quais os mosquitos de campo mostraram mais atividade durante a fase clara em relação aos mosquitos susceptíveis. Já foi demonstrado, em condições de laboratório, que fêmeas de *Ae. aegypti* com perfis de resistência apresentam mais atividade locomotora em relação ao controle não resistente (BRITO et al 2013; NAKAZATO et al. dados não publicados). Assim, esse aumento de atividade também poderia promover a evitação de superfícies e amplificar a resposta ao DEET.

Nos experimentos realizados ao longo das gerações na população Rockefeller, foi possível identificar diminuição da insensibilidade ao DEET nos dois ramos da seleção. Na linhagem Sensível, foi observada redução gradual das fêmeas insensíveis, apresentando diferença estatisticamente significativa em F3, quando 96,5% das fêmeas eram sensíveis ao DEET, em contraposição com os 86,5% na geração parental. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez as fêmeas sensíveis estavam sendo selecionadas. Por outro lado, ao contrário do que era esperado, a sensibilidade ao DEET também aumentou no ramo das insensíveis. Na geração parental, 13,5% das fêmeas era insensível ao DEET, mas em F3 essa proporção foi de 3,9%. RUTLEDGE et al (1994) obtiveram resultado semelhante em experimentos com *Ae. aegypti* onde foi possível observar diminuição na insensibilidade entre a geração parental e a sua prole, indicando que a variação na resposta ao repelente é multifatorial. Além disso, observaram reações diferentes entre as cepas e os repelentes utilizados. Assim, a reação de sensibilidade dos mosquitos a repelentes irá variar, como é possível observar quando comparamos os resultados encontrados por Stanczyk et al (2010) que observou aumento de 53-54% de fêmeas insensíveis ao DEET entre as gerações F0 – F2 e apontaram a insensibilidade ao DEET como herança dominante. No presente trabalho mostrou diminuição no número de fêmeas insensíveis nas gerações de ambas as linhagens em mosquitos suscetíveis a inseticidas, desta forma indicando diferença entre as duas cepas. Porém é necessário a realização de novos experimentos para melhor avaliar a insensibilidade ao logo das gerações dessa espécie.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, verificou-se que a população de campo resistente a inseticidas possui a maior sensibilidade ao DEET, sendo esse fato atrelado às diversas formas de ação do repelente no sistema nervoso dos mosquitos. Nossos resultados sugerem também uma associação entre a resistência a xenobióticos com a eficácia desse repelente na população estudada, entretanto são necessários mais estudos a respeito dessa temática. Além disso, foi possível observar que as fêmeas de campo possuem uma maior atividade locomotora, podendo interferir na insensibilidade dessas fêmeas ao repelente DEET. Foi possível observar que a insensibilidade da população Rockefeller ao DEET diminui ao longo das gerações. Assim, possivelmente há uma proteção positiva até a terceira geração, mas outros experimentos devem ser realizados para afirmar essa proteção nas demais gerações.

8 LIMITAÇÕES

Devido às restrições estabelecidas perante a epidemia de COVID-19, desde março de 2020, não foi possível a realização dos testes de biologia molecular (Kdr) com a cepa Rockefeller, os bioensaios de atividade locomotora com as linhagens selecionadas e nem a continuação das linhagens para a realização dos testes de repelência dos mosquitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIDGE, W. N. The inhibition of erythrocyte cholinesterase by tri-esters of phosphoric acid. III. The nature of the inhibitory process. **Rev. Biochem J.** V. 54(3), p. 442–448, 1953.
- AMARAL, R.; TAUIL, L.P. Duas ameaças e um mosquito: febre amarela e dengue. **Rev. A saúde no Brasil.** V. 1(4), 1983.
- ANTHONY, N.; ROCHELEAU, T.; MOCELIN, G.; LEE, H. J.; FFRENCH-CONSTANT, R. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Rev. FEBS Lett.** V. 368(3), p. 461-465, 1995 .
- ARAGÃO, M. B. A.. Resistência aos inseticidas e sua medida em mosquitos. **Rev.Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.6, n. 2, 1972.
- ATMOSOEDJONO, S.; VAN PEENEN, P.F.D.; SEE, R.; SAROSO, J.S. Man-biting activity of *Aedes aegypti* in Djakarta, Indonesia. **Rev. Mosquito News.** V. 32, p. 467-469, 1972.
- AYRES, C. F.; MELO-SANTOS, M. A. V.; SOLE-CAVA, A. M.; FURTADO, A.F. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology. Rev. Honolulu.** V. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.
- BARRETO, E.; RESENDE, M. C.; EIRAS, A. E.; DEMARCO, J. P. C.. Avaliação da armadilha ovitrampa iscada com atraente natural para o monitoramento de *Aedes* spp. em Dili, capital do Timor-Leste. **Rev. Ciênc. saúde coletiva.** V. 25 (2), p. 665- 672, Fev. , 2020.
- BATRA, C.P.; MITTAL, P.K.; ADAK , T. ; ANSARI, M.A. Efficacy of IGR compound Starycide 480 SC (Triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. **J Vect Borne Dis.** V. 42, p. 109–116, Sept., 2005.

BELLINATO, D. F.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; ARAÚJO, S. C. ; MARTINS, A. J.; LIMA, J. B. P. ; VALLE, D. . Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *Rev. BioMed Research International*, V. 2016, p. 1-12, 2016.

BERGE, J.B; FEYEREISEN, B; AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil.Trans. Rev. Soc. Lond.B.* V. 353, p. 1701-1705, 1998.

BERMUDI, P. M. M.; KOWALSKI, F.; MENZATO, M. M.; FERREIRA, M. C.; PASSOS, W. B. S.; OKU, V. J. A.; KUMOW, A.; LUCIO, T. V. F. M.; LIMA-CAMARA, T. N.; URBINATTI, P. R.; CHIARAVALLOTI, N. F. Criadouro de *Aedes aegypti* em reservatório subterrâneo de água da chuva: um alerta. *Rev. Saúde Pública*. São Paulo, v. 51, p. 122, 2017.

BOECKH, J.; BREER, H.; GEIER, M.; HOEVER, P.; KRUGER, W. Acylated 1,3 aminopropanols as repellents against bloodsucking arthropods. *Rev. Pesticide Science*. V. 48, p. 359–373, 1996.

BONNET, J.; PENNETIER, C.; DUCHON, S.; LAPIED, B.; CORBEL, V. Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitos. *Rev. Parasit Vectors*. V. 2 (17), 2009.

BOYCE, R.; LENHART, A.; KROEGER, A.; VELAYUDHAN, R.; ROBERTS, B.;HORSTICK, O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Rev. Tropical Medicine and International Health*. V. 18, nº 5, p. 564–577. Maio, 2013.

BRAGA, I. A. & VALLE, D.. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Rev. Epidemiol. Serv. Saúde [online]*. V.16, n.2, p.113-118, 2007.

BRAGA, I. A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S; VALLE, D.; *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2004.

BRASIL (A) Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019. Boletim Epidemiológico **Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde**, 2019.

BRASIL (F). Regulamenta os §§ 4º e 5º do art. 198 da Constituição, dispõe sobre o aproveitamento de pessoal amparado pelo parágrafo único do art. 2º da Emenda Constitucional nº 51, de 14 de fevereiro de 2006, e dá outras providências.

BRASIL (G). Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. **Ministério da saúde**, 2009.

BRASIL (G). Regulamenta os §§ 4º e 5º do art. 198 da Constituição, dispõe sobre o aproveitamento de pessoal amparado pelo parágrafo único do art. 2º da Emenda Constitucional nº 51, de 14 de fevereiro de 2006, e dá outras providências.

BRASIL (H). Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. **Ministério da saúde**, 2009.

BRASIL (I). RESOLUÇÃO CONAMA nº 258, de 26 de agosto de 1999. Publicada no DOU no 230, de 2 de dezembro de 1999, Seção 1, página 39.

BRASIL (N). Fonte: Biomas – MMA/Informações sobre Saneamento – SNIS/Ministério das Cidades <<https://infosanbas.org.br/municipio/laranjeiras-se/>> Acessado em 14 de julho de 2020 as 21:13.

BRASIL (S), 2017. Grávidas do Bolsa Família começam a receber repelentes em março<<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/02/gravidas-do-bolsafamiliacomecam-receber-repelentes-em-marco>> acessado em 01 de outubro de 17 as 13:34.

BRASIL (M). Avaliação de armadilhas
<https://www.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=13131&catid=434&Itemid=250> Acessado em 14 de julho de 2020 as 21:13.

BRASIL(B). Vacinação Febre Amarela <<https://www.saude.gov.br/hospitais->

federais/920-saude-de-a-a-z/febre-amarela/10771-vacinacao-febre-amarela> acessado as 22:20 no dia 30 de maio de 2020.

BRASIL(C). Folha informativa – Dengue e dengue grave. OPAS, 2019. <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5963:folha_informativa-dengue-e-dengue-grave&Itemid=812> acessado as 22:20 no dia 30 de maio de 2020.

BRASIL(D). Vacinação Febre Amarela <<https://www.saude.gov.br/hospitais-federais/920-saude-de-a-a-z/febre-amarela/10771-vacinacao-febre-amarela>> acessado as 22:20 no dia 30 de maio de 2020.

BRASIL(E). Vacina da dengue: qual é a recomendação?. <http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacinadadenguequalaerecomendacao/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR> acessado as 22:20 no dia 30 de maio de 2020.

BRASIL(F). Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor- Manual de Normas Técnicas. **FUNASA**, 2001.

BRASIL(I). Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. Informe del Comité de Expertos de La OMS en Insecticidas. Ginebra (OMS-Serie de Informes Tecnicos, 585). **OMS-organizacion mundial de la salud**, 1976.

BRASIL(J). Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. Informe del Comité de Expertos de La OMS en Insecticidas. Ginebra (OMS-Serie de Informes Tecnicos, 585). **OMS-organizacion mundial de la salud**, 1976.

BRASIL., 2019 (L) <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/se/laranjeiras.html>> Acessado em 14 de julho de 2020 as 21:13.

BRENGUES, C; HAWKES, N.J.; CHANDRE, F.; MCCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.; MANGUIN, S.; MORGAN, J.C.; HEMINGWAY, J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated

sodium channel gene. **Rev. Med Vet Entomol.** V. 17, p. 87-94,2003.

BRITO, L.P.; LINSS, J.G.; LIMA-CAMARA, T.N.; BELINATO, T.A.; PEIXOTO, A.A.; LIMA, J. B.; VALLE, D.; MARTINS, A. J. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. **Rev. PLoS One.** V. 8;8(4) 2013.

BROGDON, W.G. & MCALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Rev. Emerg. infect. dis.** V. 4, n. 4, p. 605-613, 1998.

BUENO, V. S.; ANDRADE, C.F.S. Avaliação Preliminar de Óleos Essenciais de Plantas como Repelentes para *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae). **Rev. Bras. Pl. Med.** V. 12(2): 215–219, 2010.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C.. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V. 40(2), p. 192-196, 2007.

CAMARGO, M.F.; SANTOS, A.H.; OLIVEIRA, A.W.S.; ABRÃO, N.; ALVES, R. B. N.; ISAC, E. Avaliação de ação residual do larvicida temephos sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Rev. Patologia Tropical** . V. 27, p. 65– 70, 1998.

CAMPOS, J; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Rev. de Saúde Pública.** V. 37, p. 523-527, 2003.

CAMPOS, M.; SPENASSATTO, C.; MACORIS, L.G. M.; PADUAN, K. D. O. S. S.; PINTOJ,; RIBOLLA,P.E. Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in São Paulo, Brazil. **Rev. Ecol Evol.** V. 2(11), p. 2794-2802, 2012.

CARVALHO, M.S.L.; CALDAS, E.D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOSA P.T.R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal.

Revista de Saúde Pública. V. 38, p. 623-629, 2004.

CAVALCANTI, P.L.G.; LIMA, J. W. O.; CUNHA, J. C. L.; SANTANA, E. W. P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de cimento do município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Bettas splendens* como alternativa de controle biológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, V. 37, p. 400-404, 2004.
CDCs (Centers for Disease Control). Control of Dengue. **Rev. Vector Topics.** vol. 2, p. 1-39, 1979.

CERETTI JUNIOR, W.; OLIVEIRA C. R.; RIZZO, M.; STROBEL, R.C.; JUNIOR, M. O. M.; MELLO, M. H. S. H.; FERNANDES, A.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CARVALHO, G. C.; MARRELLI, M. T. Species Composition and Ecological Aspects of Immature Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Bromeliads in Urban Parks in the City of São Paulo, Brazil. **Journal of Arthropod-Borne Disease.** V. 10, p. 102-112, 2015.

CHADEE, D. D.; MARTINEZ, R. Landing periodicity of *Aedes aegypti* with implications for dengue transmission in Trinidad, West Indies. **Journal of Vector ecology.** V. 25, p. 158-163, 2000.

CHANG, C.; SHEN, W.K.; WANG, T.T.; LIN, Y.H.; HSU, E.L.; DAI, S.M. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. **Rev. Insect Biochem. Mol. Biol.** V. 39, p. 272-278, 2009.

CHAVASSE, D. C.; YAP, H. H. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: OMS, 1997.

CHEN, A.; ROGAN, W.J..Nonmalarial Infant Deaths and DDT Use for Malaria Control. **Rev. Emerging Infectious Diseases** . V. 9, No. 8, August, 2003.

CODEÇO, C.T.; LIMA, A. W. S.; ARAÚJO, S. C.; LIMA, J. B. P.; MACIEL DE FREITAS, R., HONÓRIO, N. A.; GALARDO, A. K. R.; BRAGA, I. A.; COELHO, E.; VALLE, D.. Surveillance of *Aedes aegypti*: Comparison of House IndexwithFour Alternative Traps. **Rev.PLoS Negl Trop Dis.** 2015. COELHO, G.E.. Dengue: desafios

atuais. **Epidemiol Serv Saude**. V. 17, p. 231– 3, 2008.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, **Fundação Instituto Oswaldo Cruz**, 1994.

COSTA-DA-SILVA, A.L.; NAVARRETE, F.R.; SALVADOR, F.S.; COSTA, K. M.; IOSHINO, R.S.; AZEVEDO. D, S. Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**. V. 8(1), 2013.

CRIVELENTI, L. Z.; GUILHERME, L. C.; MORELLI, S.; BORIN, S. Toxicidade do inseticida Organofosforado Abate® em alevinos de *Poecilia reticulata*. **Rev. J. Braz. Soc. Ecotoxicol**. V. 5, n. 2-3, 2010.

DAGLIOGLU, N.; GULMEN, M.K; AKCAN, R.; EFEOGLU, P.; YENER, F.; UNAL, I.. Determination of organochlorine pesticides residues in human adipose tissue, data from Cukurova, Turkey. **Rev. Bull Environ Contam Toxicol**. V. 85, p. 97-102, 2010.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental uma revisão. **Rev. Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6a, p. 995-1002, Nov, 2002 .

DEGENNARO M. The mysterious multi-modal repellency of DEET. **Fly**. 2015.

DELETRE E, MARTIN T, DUMÉNIL C, CHANDRE F. Insecticide resistance modifies mosquito response to DEET and natural repellents. **Parasit Vectors**. V. 12, p. 89, 2019.

DITZEN, M., PELLEGRINO, M., VOSSHALL, L. B. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. **Rev. Science**. V. 319, nº.5871, p. 1838-1842, 2008.

DJOUAKA, R.F.; BAKARE, A.A.; COULIBALY, O.N.; AKOGBETO, M.C.;RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; STRODE, C. R. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3

and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. **BMC Genomics**. V. 9, p. 538, 2008.

DOGAN, E.B.; AYRES, J.W.; ROSSIGNOL, P. A. Behavioural mode of action of DEET: inhibition of lactic acid attraction. **Rev. Med Vet Entomol**, 1999.

DOLABELLA, S. S.; SANTOS, R. L.; SILVA, M. C.; STEFFLER, L. M.; RIBOLLA, P.E.; CAVALVANTI, S. C.; JAIN, S.; MARTINS, A. J. Detection and Distribution of V1016Ikdr Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations. **J Med Entomol**. V. 53, p. 967-971, 2016.

ENDERSBY, N.M.; HOFFMANN, A.A.; WHITE, V. L.; RITCHIE, S.A.; JOHNSON, P.H.; WEEKS, A.R. Changes in the genetic structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in Queensland, Australia, across two seasons: implications for potential mosquito releases. **J Med Entomol**. V. 48, p. 999-1007, 2011.

EXPOSITO, R. C.; FINLAY, C. J.. Obras Completas. Academia de Ciencias de Cuba, Habana. 1971.

FIELD, L. M.. Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). **Biochem J**. V. 349, p. 863–868, 2000.

FIELD, L.M.; DEVONSHIRE, A.L.; FORDE, B.G. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. **Biochem J**. V. 251, p. 309-312, 1988.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L.R.. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambient. soc.**, Campinas, v. 7, n. 2, p.111-124, Dez. 2004.

FORATTINI, O.P. Ecologia epidemiologia e sociedade. 2ª ed. São Paulo: **Artes Médicas**; 2004.

FORATTINI, O.P.. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia. São Paulo, **EDUSP**, vol. 2, 2002.

FOURNET, F.; SANNIER, C.; MONTENY, N. Effect of their sex and growth regulators OMS 2017 and Diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. V. 9, p. 426-430, 1993.

FRADIN, M. S.; DAY, J.F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **Rev. N Engl J Med** .. V. 347, p. 13–18, 2002.

FRANCO, O. História da Febre Amarela no Brasil. **Ministério da Saúde, DNERU**. Rio de Janeiro, 1969.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Rev. Parasitol today*, V. 9, p. 471-474, 1993.

GUPTA, R. K.; RUTLEDGE, L. C. Laboratory evaluation of controlled-release repellent formulations on human volunteers under three climatic regimens. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 1989.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Rev. Science**. V. 239, p. 476-481, 1988.

HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, V. 83, n. 2, p. 277-284, 2010.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, V. 34, n°. 7, p. 653-665, 2004.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H.. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Rev. Medical and Veterinary Entomology**. V. 12, p. 1-12, 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H.. Chemical Control of Vectors and Mechanisms of Resistance. In: MARQUARDT, W. C. et al (Ed.). **Biology of Disease Vectors**. Fort Collins: Elsevier, 2005.

HEMINGWAY. J.; RANSON. H.. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology**. V. 45, p. 371-391, 2000.

HORTA, M. A. P.; CASTRO, F. I. C.; ROSA, C. S.; DANIEL, M. C.; MELO, A. L. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos in Brazil: a revision and new data for Minas Gerais state. **Rev. BioAssay**. V. 6, p. 1-6, 2011.

IBRAHIM, H.; KHEIR, R.; HELMI, S.; LEWIS, J.; CRANE, M. Effects o organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorine pesticides, and a heavy metal on survival and cholinesterase activity of *Chironomus riparius* Meigen. **Rev. Bull Environ Contam Toxicol**. Vol. 60(3):448-455, 1998.

KARUNARATNE, S.H.; HEMINGWAY, J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. **Bull World Health Organ**, 2001.

KASAI, S.; KOMAGATA, O.; ITOKAWA, K.; SHONO, T.; KOBAYASHIM, N. G. L. C. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. **PLoS Negl Trop Dis**. V. 8(6), 2014.

KOMAGATA, O.; KASAI, S.; TOMITA, T. Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. **Rev. Insect Biochem Mol Biol**.. V. 40(2), p. 146-152, 2010.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Insecticidal potential of the *Annonaceae* family plants. **Rev. Bras Frutic**, 2014.

KUSHWAH, R. B. S.; DYKES, C. L.; KAPOOR, N.; ADAK, T.; SINGH, O. P.

Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (*kdr*) mutations, F1534 Candanovel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015.

LA CORTE, R.; MELO, V. A.D.; DOLABELLA, S.S.; MARTEIS, L, S. Variation in temephos resistance in field populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the State of Sergipe, Northeast Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V. 51 (3), p. 284-290, May-June, 2018.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *bacillus sphaericus* for mosquito control. **Source: Journal of the American Mosquito Control Association..** V. 23(sp2), p. 133-163, 2007.

LANDIS, W. G.; MING-HO Y. Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems. 2nd ed. **Boca Raton (Fla.): Lewis**, 1995.

LARA, W.H.; BATISTA, G.C. Pesticidas. **Química Nova**. V.15, p.161-166, 1992.

LEAL, W. ; BARBOSA, R. ; ZENG, F. ; FIERESTEIN, G. ; TAN, K. ; PAIVA, M. S.; GUEDES, D. R. D.; CRESPO, M.; AYRES, C. F. J. Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents?. **Rev. Scientific Reports**. V. 7, p. 1-9, 2017.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA, F. A. M. ; LIMA J. W. O.; RAMOS J. A. N.; CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S.. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V. 39, n. 3, p. 259- 263, Junho, 2006 .

LIMA-CAMARA, T. N.; HONORIO, N. A.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Cad. Saúde Pública [online]**, 2006.

LIMA-CAMARA, T. N.; BRUNO, R. V. ; LUZ, P. M. ; CASTRO, M. G. ; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. ; SORGINE, M. H. ; PEIXOTO, A. A. Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. **Plos One**, V. 6, 2011.

LIMA-CAMARA, T. N.; LIMA, J. B. P ; BRUNO, R. V. ; PEIXOTO, A.A . Study on the

effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 304-311, 2014.

LIMA-CAMARA, T.N. Activity patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (diptera: culicidae). **Rev. Oecologia Brasiliensis (Impresso)**. V. 14, p. 737-744, 2010.

LIMA-CAMARA, T.N.; URBINATTI, P.R.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Encontro de *Aedes aegypti* em criadouro natural de área urbana, São Paulo, SP, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 2016.

LINHARES, E. K.; CELESTINO, A. A. Considerações sobre casos registrados de dengue entre 2000 e 2005 e alguns fatores socioambientais na Zona Oeste do Rio de Janeiro. **In: Encontro nacional de estudos populacionais**, 15., 2006, Caxambu. *Anais*. Caxambu: ABEP, 2006.

LIU, N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. **Annu. Rev. Entomol.** Vol. 60, p. 537–59, 2015.

LUZ, P. M ; LIMA-CAMARA, T.N ; BRUNO, R.V ; CASTRO, M.G ; SORGINE, M.H; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. ; PEIXOTO, A. A . "Potential impact of a presumed increase in the biting activity of dengue-virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females on virus transmission dynamics". **Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Impresso)**, V. 106, p. 755-758, 2011.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C.M.L.; AMÓRA, S. S. A. Plant extracts used in the control of diptera in vector of zoonosis. **Rev. Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2010.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; FLASSER, C.; GARBELOTO, V. C.; CIRINO, C. B. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. de Saúde Pública**. V. 33, p. 521-522, 1999.

MAIA, C. V. DE A.; DE LIMA, G. S.; ROCHA, A. D. S.; DE OLIVEIRA, E. L.; DA SILVA, M. C. F.; DA SILVA, H. H.; BARROS, G. D. S. Distribuição espacial de criadouros de *Aedes aegypti* em Jaguaruana – CE – Brasil e suas correlações com indicadores sociodemográficos. **Hygeia – Rev. Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, V. 15, n. 31, p. 71 - 81, Jul. 2019.

MAIA, M. F.; MOORE, S. J.. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**, 2011.

MARTEIS, L. S.; STEFFLER, L. M.; ARAUJO, K. C. G. M. SANTOS, R. L.C. Identificação e distribuição espacial de imóveis-chave de *Aedes aegypti* no bairro Porto Dantas, Aracaju, Sergipe, Brasil entre 2007 e 2008. **Cad. Saúde Pública**, Vol. 29, n. 2, p. 368-378, Rio de Janeiro, Feb. 2013.

MARTINS, A. J.; BELINATO, T. A.; LIMA, J. B. P. E VALLE, D. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Rev. Pest Manag Sci*, V. 68:1547, 2008.

MARTINS, V. E. P.; ALENCAR, C. H. M.; FACÓ, P. E. G.; DUTRA, R. F.; ALVES, C. ROBERTO.; PONTES, R. J. S.; GUEDES, M. I. F. Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. V. 43, n. 1, 2010.

MELO, V. A.D.; SILVA, J.R.S.; LA CORTE, R. Medidas de proteção individual de gestantes contra a infecção pelo zika vírus. **Rev. de Saúde Pública**. V. 53:72, 2019.

MERÊNCIOA, I.; TASCAB, F.; VIEIRA, C. A. O.. Indicadores socioambientais de focos do *Aedes aegypti* no extremo sul de Santa Catarina. **Rev. Acta Brasiliensis**. V. 2(2), p. 53-57, 2018.

MIOT, H. A.; BATISTELLA, R. F.; BATISTA, K. A.; VOLPATO, D. E. C.; AUGUSTO, L. S. T.; MADEIRA, N. G.; HADDAD, V. J.; MIOT, L. D. B. Comparative study of the topical effectiveness of the Andiroba Oil (*Carapa guianensis*) and deet 50% as repellent for *Aedes* sp. **Rev. Inst Med Trop**, 2004.

MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A.; DARWAZEH, H. A.; EDE, L. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against floodwater mosquitoes. **Rev. Applied Environmental Microbiology**. V. 43(6), p. 1288-1293, 1982.

NAKAZATO. B. M. Atividade locomotora de fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com diferentes perfis de resistência a inseticidas, em diferentes áreas do Estado de São Paulo. 2018. **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Faculdade de Saúde Pública da USP**.

NASCIMENTO, A. M. D.; MAIA T. D. S.; SOARES, T. E. S.; MENEZES, L.R.A.; SCHER, R.; COSTA, E.V.; CAVALCANTI, S. C.H.; LA CORTE, R. Repellency and Larvicidal Activity of Essential oils from *Xylopia laevigata*, *Xylopia frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and Their Individual Compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. **Rev. Neotrop Entomol**, 2017.

NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEY- EREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C.; NEBERT, D. W.. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Rev. Pharmacogenetics**. V. 6, p. 142, 1996.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S.; SCHATZMAYR, H. G.. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, V. 96(7), p. 925-926, 2001.

OAKESHOTT, J. G.; VAN PAPENRECHT, E.A.; BOYCE, T.M. ; HEALY M.J.; RUSSELL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases *Genetica*. **Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands**. V. 90, p. 239-268, 1993.

OLIVEIRA, R. M.; VALLA.V. V.. As condições e as experiências de vida de grupos populares no Rio de Janeiro: repensando a mobilização popular no controle do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**. V. 17, (supl.), p. 77-88, Rio de Janeiro, 2001.

OLIVEIRA, S. R.; CALEFFE, R.R.T.; HELIO CONTE, H.. Chemical control of *Aedes aegypti*: a review on effects on the environment and human health. **Rev. do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria**. V. 21, n. 3, p. 240- 247, 2017.

PADILHA, K. P; RESCK, M. E. B.; CUNHA, O.A.T.; TELES-DE-FREITAS, R.; CAMPOS, S. S.; SORGINE, M.H.F.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FARNESI, L.C.; BRUNO, R.V.. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**. V.113, n.10, 2018.

PAGE, P.C.; LABUSCHAGNE, K.; NURTON, J.P.; VENTER G.J.; GUTHRIE, A. J.. Duration of repellency of N, N- diethyl-3-methylbenzamide, citronella oil and cypermethrin against Culicoides species when applied to polyester mesh. **Rev. Veterinary Parasitology**, 2009.

PAIVA, K. B. S.; MENEZES, M. L.. Avaliação do emprego dos adsorventes: carvão ativo, chromosorb w e membrana c18 na preparação de amostras de ar para a determinação de d-aletrina em ambientes fechados. **Rev. Ecl. Quím.** Vol. 28(1), p. 97-103, 2003.

PAULA, J. P.; FARAGO, P.V.; CHECCHIA, L. E. M; HIROSE, K. M.; RIBAS, J.L.C.. Atividade Repelente do Óleo Essencial de *Ocimum selloi* Benth. (Variedade eugenol) contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. **Rev. Acta Farm. Bonaerense**, 2004.

PERRY, A.; YAMAMOTO, I; ISHAAYA, I; PERRY, R.. Insect Growth Regulators (IGRs), 1998.

PIMENTEL, A. S. Avaliação da resposta de monooxigenases à exposição ao repelente deet em população de *Aedes aegypti* resistentes a inseticidas. 2019. **Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitaria) - Programa de pós graduação de Biologia Parasitaria da Universidade Federal de Sergipe**.

PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J ; KETTERMAN, A. J..DDT- resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT- dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferases. **Rev. Bulletin of**

Entomological Research.V.85, p. 267-274, 1995.

QUALLS, W. A.; DAY, J. F.; XUE, R.; BOWERS, D. F. Altered behavioral responses of *Sindbis* virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to DEET and non-DEET based insect repellents. **Rev. Acta Trop.**, 2012.

RAMIREZ, A. G. I.; LOGAN, J.G.; LOZA-REYES, E.; STASHENKO, E.; MOORES, G. D. Repellents inhibit P450 enzymes in *Stegomyia (Aedes) aegypti*. **PloS one**. 2012.

RAŠIĆ G, SCHAMA R, POWELL R.; SCHAMA, R.; FREITAS, R. M .; ENDERSBY-HARSHMAN, N. M.; FILIPOVIĆ, I.; SYLVESTRE, G.; MÁSPERO, R.C.;HOFFMANN, A. A. Contrasting genetic structure between mitochondrial and nuclear markers in the dengue fever mosquito from Rio de Janeiro: implications for vector control. **Rev. Evol Appl.** V. 8(9), p. 901-915, 2015.

RAŠIĆ, G.; ENDERSBY N. M.; WILLIAMS, C.; HOFFMANN, A. A. Using Wolbachia-based release for suppression of *Aedes* mosquitoes: insights from genetic data and population simulations. **Rev. Ecological Applications.**V.24, p.1226–1234, 2014.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; COLON, N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Rev. J. Am. Mosquito Control Association**, 1991.

RIBAS, J.; CARREÑO, A. M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. **Rev. An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, 2010.

ROMAN, E. S.; OLIVEIRA, M.A.S. Inseticidas piretróides no controle de pragas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Porto Velho, Porto Velho- RO**. 111. Título. IV. Série. ISSN0101-8957. Março, 1983.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Rev. Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.7, n.1, p.17-23, 2001.

RUTLEDGE, L. C., MOUSSA, M. A., LOWE, C. A.; SOFIELD, R. K. Comparative sensitivity of mosquito species and strains to the repellent diethyl toluamide. **Journal of Medical Entomology**, 1978.

RUTLEDGE, L.C.; GUPTA, R. K.; PIPER, G.N.; LOWE, C. A. Studies on the inheritance of repellent tolerances in *Aedes aegypti*. **J Am Mosquito Contr**, 1994.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; FLORES, A. E.; STROND, C.; SALLAS, F. I.. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. **Rev. Genetics**, V.180, p.1137–1152, 2008.

SELIM, S.; HARTNAGEL, R.E. J.; OSIMITZ, T.G.; GABRIEL, K.L.; SCHOENIG, G.P. Absorption, metabolism, and excretion of N,N-diethyl-m- toluamide following dermal application to human volunteers. **Fundam Appl Toxicol**. V. 25(1), p. 95-100, 1995.

SILVA, V. C.; SCHERER, P. O.; FALCÃO, S. S.; ALENCAR, J.; CUNHA, S. P.; RODRIGUES, I.M.; PINHEIRO, N.L.. Diversidade de criadouros e tipos de imóveis frequentados por *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**. V. 40, n. 6, p. 1106-1111, São Paulo, Dec. 2006.

STANCZYK, N.M.; BROOKFIELD, J.F.; IGNELL, R.; LOGAN, J.G.; FIELD, L. M.. Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. **Rev. Proc. Natl. Acad. Sci, U S A**, 2010.

STEFANI, G. P.; PASTORINO, A. C.; CASTRO, A. P. B. M.; JACOB, C. M. A.; FOMIN, A. B. F.. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. **Rev. Paulista de Pediatria (Impresso)**, 2009.

SUBRAMANYAM, B.H.; HAGSTRUM, D.W.. Sampling. In Bh. Subramanyam and D.W. Hagstrum (eds) Integrated Management of Insects in Stored Products. **New York: Marcel Dekker, Inc**, 1995.

SYED, Z.; LEAL, W. S.. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. **REV.**

Proc. Natl. Acad. Sci, U S A, 2008.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M. L.. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Rev. Ciência & Saúde Coletiva**. V. 1, p. 122-135, 1996.

THOMPSON, M.; SHOTKOSKI, F.; FFRENCH-CONSTANT, R.. Cloning andsequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Rev. Elsevier Science Publishers**.V. 325, p.3. 187-190, 1993.

TOOHEY, M.K.; M.S. GOETTEL; M. TAKAGI; R.C. RAM; G. PRAKASH; PILLAI, J.S. Fields studies on the introduction off the mosquitoes predator *Toxorhynchites amboinensi*, 1985.

U.S. Environmental Protection Agency. N,N-diethyl-m-toluamide (DEET):Pesticide registration standard. U.S. **Environmental Protection Agency, Office of Pesticide and Toxic Substances**, Washington, D.C., Dec, 1980.

VAREJÃO, J. B; SANTOS, C. B; REZENDE, H. R.; BEVILACQUA, L. C.; FALQUETO, A. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) breeding sites in native bromeliads in Vitória City, ES. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C.; SPERB, A. F.; MONTEIRO, H. A. O.; TORRES, M. A. N.; SOUZA, M. R. S.; VASCONCELOS, H. B.; MARDINI, L. B. L. F.; RODRIGUES, S. G. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil, Southern Cone. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, Inglaterra, 2003.

VASUKI, V.; RAJAVEL, A. R.. Influence of short time exposure to an insect growth regulator, hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitoes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**, V.87, n.2, p.275-283, 1992.

WARE, G .W.; WHITACRE, D. M.. An Introduction to Insecticides (4th edition). **Extracted from The Pesticide Book, 6thed*. (2004), Published by Meister Pro Information Resources**, A division of Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.

<<https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>> acessado no dia 09 de agosto de 2020 as 23:00.

WILLIAMS, J.; FLOOD, L.; PRAULINS, G.; INGHAM, V.; MORGAN, J.; LEES, R.; RANSON, H.. Characterisation of *Anopheles* strains used for laboratory screening of new vector control products. **Rev. Parasites & Vectors**, 2019.

ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E. . Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Rev. Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Vol. 25(2), 391-404, 2016.

ANEXO

Anexo I – Certificado do Comitê de ética em pesquisa com animais (CEPA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do comportamento de tolerância ao N, N-dietilmetilbenzamida (DEET) em populações de *Aedes aegypti*, (Diptera: Culicidae)", registrada com o nº 57/2018, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Roseli La Corte dos Santos** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de **04/09/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/01/2019, Término: 30/05/2020
Espécie/linhagem/raça	Santa Inês
Nº de animais	12
Peso/Idade	25-20kg / 6 e 24 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Central da UFS.

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do comportamento de tolerância ao N,N-dietilmetilbenzamida (DEET) em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Pesquisador: Tamara Nunes de Lima Camara

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91218318.1.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública USP/SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.728.268

Apresentação do Projeto:

A pesquisa apresentada busca subsídios para a melhor compreensão do comportamento de fêmeas de *Aedes aegypti* em relação aos repelentes à base de DEET, o que permitirá demonstrar se a insensibilidade a esse tipo de repelente é uma característica herdável na população dessa espécie de mosquito.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivo investigar a tolerância ao DEET e sua manutenção em populações de *Aedes aegypti*.

Para se atingir o objetivo da proposta, voluntários serão selecionados. Esses voluntários serão ligados à área de saúde. Todos os voluntários devem estar saudáveis, apresentar idades entre 18 e 50 anos, não possuir alergia a repelentes e não estar gestante. Os voluntários não poderão fazer uso de nenhum produto de fragrância, como cremes, perfumes, repelentes ou fumar no dia teste.

O teste é realizado com a exposição do antebraço dos voluntários em duas situações: em um dos antebraços será aplicado uniformemente 0,5 mL de DEET a 20% de etanol e o outro servirá de controle, aplicando 0,5 mL de etanol, permitindo a sua evaporação por 30s.

A gaiola onde as fêmeas estarão dispostas possuirá um suporte de 1,5 cm na sua parte superior, para que o antebraço do voluntário não entre em contato com os mosquitos. O voluntário colocará o antebraço nesse suporte e permanecerá desta forma por dois minutos, para que o

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7779 E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

Continuação do Parecer: 2.728.268

comportamento dos mosquitos possa ser observado. As fêmeas de *Aedes aegypti* serão classificadas em duas categorias: sensíveis e insensíveis ao DEET.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo, já que os voluntários não entrarão em contato direto com os mosquitos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância em Saúde Pública

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE é apresentado e seu conteúdo está adequado.

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_1142963.pdf	11/06/2018 09:03:14		Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoPolyana.pdf	11/06/2018 09:02:21	Tamara Nunes de Lima Camara	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	04/06/2018 13:41:43	Tamara Nunes de Lima Camara	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFinal04jun18.doc	04/06/2018 13:41:30	Tamara Nunes de Lima Camara	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 01.246-904
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 Fax: (11)3061-7779 E-mail: ccep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP

Continuação do Parecer: 2.728.268

SÃO PAULO, 21 de Junho de 2018

Assinado por:
Kelly Polido Kaneshiro Olympio
(Coordenador)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 01.246-904
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 **Fax:** (11)3061-7779 **E-mail:** cosp@fsp.usp.br

Página 03 de 03

Anexo III- Parecer comsubstanciado do CEP da Universidade Federal de Sergipe

UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do comportamento de tolerância ao N,N-dietilmetilbenzamida (DEET) em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Pesquisador: Tamara Nunes de Lima Camara

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 91218318.1.3001.5546

Instituição Proponente: Universidade Federal de Sergipe

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.303.611

Apresentação do Projeto:

A Apresentação do Projeto foi retirada do documento postado na Plataforma Brasil: INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_1163926.

INTRODUÇÃO-O *Aedes aegypti* é de grande interesse para saúde pública, pois é o vetor de arbovírus, como a dengue, chikungunya e Zika. Além disso, é um mosquito que apresenta facilidade de adaptação a diversos ambientes, o que dificulta a sua eliminação. Uma forma de diminuir o número de mosquito e a incidência de doenças na área urbana é através da educação em saúde, controle biológico e controle químico, com utilização de inseticidas e repelentes. Os repelentes são considerados uma das melhores formas de se evitar a picadas, sendo os mais comercializados aqueles que possuem N,N-dietilmetilbenzamida (DEET) na fórmula, além de serem um dos mais estudados atualmente. Experimentos previamente realizados com o *A. aegypti* demonstram que o DEET não inibe completamente a ação, mas somente reduz a intensidade da

abordagem do mosquito. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo investigar a tolerância ao DEET e sua manutenção em populações de *A. aegypti*. Serão realizados testes de repelência com populações de *A. aegypti*. Em cada teste, serão utilizadas dez fêmeas para a resposta ao odor humano. As fêmeas serão colocadas em gaiolas de teste por cerca de duas horas, a fim de se adaptarem ao ambiente. Posteriormente,

será realizado o teste de repelência, que consistirá na exposição do mosquito a 0,5 mL de DEET a 20% em etanol ou 0,5mL de etanol (controle), que será aplicado uniformemente pelo antebraço

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7206

CEP: 49.060-110

E-mail: cephu@ufs.br

3) Verificar o tempo de adaptação das populações do campo ao repelente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo apresenta riscos mínimos, relacionados a eventuais reações alérgicas, devido à sensibilidade ao repelente. Nesse caso, o voluntário que apresentar reações de sensibilidade será afastado do ensaio. Para amenizar uma possível reação, o voluntário será orientado a lavar bem o braço com sabão neutro e será oferecido bolsa de gelo. Caso a irritação persista ou aumente, o voluntário será conduzido pelas pesquisadoras responsáveis ao Hospital Nestor Piva, para que receba a assistência gratuita. Este estudo não trará nenhum benefício direto para o participante, mas os resultados obtidos nos permitirão identificar o grau de sensibilidade da população de *Ae. aegypti* ao DEET.

Benefícios: Este estudo não trará nenhum benefício direto para o participante, mas os resultados obtidos nos permitirão identificar o grau de sensibilidade da população de *Ae. aegypti* ao DEET.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma pesquisa relevante, destinada à obtenção do grau de mestre pelo programa de Pós-graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, que se desenvolverá no Estado de Sergipe em regime de coparticipação com a UFS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Cronograma: A explicitação sobre a data de coleta de dados com seres humanos, solicitada em virtude de não constar nas Informações Básicas do Projeto, que nesta nova versão, ainda se apresenta assim: Coleta das amostras em campo 07/01/2019 a 29/03/2019; sem considerar a etapa com seres humanos. Verificamos que a correção foi postada apenas no documento: Projetofinalmodificado.doc, com a seguinte declaração: "O cronograma foi elaborado considerando a duração do curso de mestrado (janeiro de 2018 a maio de 2020) da discente Pollyana Conceição Romão Maia, que executará o projeto. As etapas que não incluem experimentações em humanos já foram iniciadas com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (protocolo 57/2018), enquanto a etapa envolvendo os seres humanos está prevista para o segundo trimestre de 2019, após a aprovação do CEP.*"

2-TCLE:

A) A pendência relativa aos riscos, meios de contorná-los e benefícios estão atendidas e transcritas do TCLE corrigido para esta relatoria no ITEM: Avaliação dos Riscos e Benefícios, deste Parecer. Gostaríamos de contribuir lembrando que testar o DEET em pequena área da pele do

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº**Bairro:** Sanatório**Cep:** 49.060-110**UF:** SE**Município:** ARACAJU**Telefone:** (79)3184-7208**E-mail:** cephu@ufs.br

humano. Esse estudo pode fornecer subsídios para a melhor compreensão do comportamento de fêmeas de *Ae.aegypti* em relação aos repelentes à base de DEET, permitindo testar se a insensibilidade a esse tipo de repelente é

uma característica herdável na população dessa espécie de mosquito. A resistência de algumas espécies vetores por determinados produtos químicos pode ocorrer como resposta a fatores genéticos e operacionais. Sendo assim, a resistência é uma característica genética de cada população, pois é levado em consideração os produtos a que esses insetos foram expostos (MACIEL et al., 2010). Nos últimos anos, os mosquitos vêm sendo constantemente expostos aos repelentes, podendo levar, consequentemente, à uma seleção para insensibilidade nas populações desses vetores. Dessa forma, haveria um prejuízo para uma das formas mais eficazes de proteção pessoal contra arboviroses na sociedade. Apesar da grande relevância dessa descoberta, pouco se sabe sobre a insensibilidade do *A.aegypti* e até mesmo de outras espécies em outras partes do mundo ao DEET. Devido à grande importância do *A. aegypti* para a saúde pública no Brasil, faz-se necessário o preenchimento dessa lacuna no conhecimento acerca da tolerância das populações desse mosquito vetor.

A Hipótese é que: "Nos últimos anos, *Aedes aegypti* está constantemente exposto aos repelentes, podendo levar, consequentemente, à uma seleção para insensibilidade nas populações desses vetores.

Critério de Inclusão: Os voluntários selecionados para a participação nesta pesquisa serão ligados à área de saúde. Todos os voluntários devem estar saudáveis, apresentar idades entre 18 e 50 anos, não possuir alergia a repelentes e não estar gestante. Os voluntários não poderão fazer uso de nenhum produto de fragrância, como cremes, perfumes, repelentes ou fumar no dia teste.

METODOLOGIA- O estudo será desenvolvido no estado de Sergipe, no município de Laranjeiras (Latitude: -10.8032. Longitude: -37.1696 10° 48 12 Sul, 37° 10 11 Oeste), localizado a 4 km da capital Aracaju. Esse local foi selecionado para a realização desse estudo, pois, no ano de 2017, foram confirmados casos de arboviroses, cujo vetor é o *Ae. aegypti*. Os ovos de *Ae. aegypti* serão coletados em campo através de armadilhas de oviposição (ovitrampas). Após a eclosão dos ovos, as larvas serão alimentadas com ração de peixe triturada, peneirada e esterilizada (0,5 g/ 300 larvas). As pupas formadas serão transferidas para copos de plásticos descartáveis (50ml), em quantidade de aproximadamente 50 pupas em cada recipiente. Os adultos

de *Ae. aegypti* terão a espécie confirmada por chave dicotômica de Consoli; Lourenço de oliveira (1994). Serão colocadas dez fêmeas de *Ae. aegypti* em cada gaiola de teste duas horas antes do início do experimento de repelência ocorrer, para que elas se adaptem ao ambiente com umidade

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

Cep: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7200

E-mail: cephu@ufs.br

UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE

Continuação do Parecer: 3.303.611

participante da pesquisa, um dia antes de iniciar, o procedimento descrito na metodologia, poderá evidenciar quem é potencialmente alérgico, sendo então excluído da pesquisa. O que implicaria em menos tarefas para a pesquisadora; evitando ter de contatar com um Pronto Atendimento, para combater o quadro alérgico. Necessitaria apenas de um contato com um (a) dermatologista para prescrever um anti-alérgico tópico, a ser usado na pequena área da pele submetida ao pré teste alérgico.

B) Em relação às normas da Res.466-2012 da CONEP/MS referentes à escrita do TCLE, local de assinaturas e contato dos Ceps avaliadores da pesquisa, verificamos que as pendências foram atendidas. No entanto, gostaríamos de contribuir esclarecendo que o endereço do CEP para seres humanos não está correto. E como os participantes da pesquisa se encontram em Sergipe, e não se tratam apenas de insetos, solicitamos a correção para viabilizar a comunicação, conforme está descrito na RES. 466-2012. No entanto, não solicitamos a exclusão do CEP de São Paulo, visto que percebemos ser uma pesquisa de Parceria.

Recomendações:

Recomendamos à pesquisadora que antes de entregar o TCLE aos participantes da pesquisa adicione o contato do CEP para Seres Humanos da UFS.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplicam.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com as RESOLUÇÕES 466-2012 e 510-2016 é de responsabilidade do pesquisador apresentar os relatórios Parcial e Final da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1163926.pdf	01/04/2019 10:50:33		Aceito
Outros	ProjetoFinalmodificado.doc	01/04/2019 10:49:58	Tamara Nunes de Lima Camara	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmodificado.docx	01/04/2019 10:34:37	Tamara Nunes de Lima Camara	Aceito
Folha de Rosto	RostoUFS.pdf	01/04/2019 10:26:45	Tamara Nunes de Lima Camara	Aceito

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CNPJ: 49.080-110

E-mail: cephu@ufs.br

Página 05 de 08