ISAIAS CABRINI

“DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA IMOBILIZAÇÃO DE DÍPTEROS E AVALIAÇÃO DE ADULTICIDAS – VALIDAÇÃO COM MOSQUITOS (DIPTERA – CULICIDAE) E MOSCAS (DIPTERA – CHLOROPIDAE)”

Campinas
2013

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ISAIAS CABRINI

"DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA IMOBILIZAÇÃO DE DÍPTEROS E AVALIAÇÃO DE ADULTICIDAS - VALIDAÇÃO COM MOSQUITOS (DIPTERA-CULICIDAE) E MOSCAS (DIPTERA - CHLOROPIDAE)"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Isaias Cabrini
31/01/2013
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. ANGELO PIRES DO PRADO

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C112d

Cabrini, Isaías, 1978-
Desenvolvimento de metodologia para imobilização de dípteros e avaliação de adulticidas: validação com mosquitos (Diptera: Culicidae) e moscas (Diptera: Chloropidae) / Isaías Cabrini. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ângelo Pires do Prado.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Suscetibilidade a doenças. 4. Resistência a inseticidas. 5. Bioensaios. 6. Anestesia. I. Prado, Ângelo Pires do, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital
Título em Inglês: Development of methodology to immobilization of dipteras and evaluation of adulticides: validation with mosquitoes (Diptera: Culicidae) and flies (Diptera: Chloropidae)
Palavras-chave em Inglês:
Aedes aegypti
Dengue
Disease susceptibility
Insecticide resistance
Bioassays
Anesthesia
Área de concentração: Parasitologia
Titulação: Doutor em Parasitologia
Banca examinadora:
Ângelo Pires do Prado [Orientador]
Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade
Eduardo José de Arruda
Marcelo da Costa Ferreira
Mohamed Ezz El Din Mostafa Habib
Data da defesa: 31-01-2013
Programa de Pós Graduação: Parasitologia

Campinas, 31 de janeiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Angelo Pires Do Prado (Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Fernando Salgueirosa De Andrade

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Da Costa Ferreira

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo José De Arruda

Assinatura

Prof. Dr. Mohamed Ezz El Din Mostafa Habib

Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen

Assinatura

Prof. Dr. Jairo Campos Gaona

Assinatura

Dra. Luciana Urbano Dos Santos

Assinatura

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me ajudado a chegar até aqui e que nos momentos mais difíceis fez-me entender que essa era a sua vontade na minha vida, não me deixando desistir no meio do caminho.

À minha amada esposa que suportou-me nos momentos de ansiedade e tudo fez para ajudar-me a desenvolver esse trabalho.

Ao meu filho João Pedro, 3 anos, que fez-me compreender que, as vezes, é preciso deixar tudo de lado para receber o carinho e o amor verdadeiro de um filho.

Aos meus familiares que souberam entender meus momentos difíceis e colaboraram para que eu finalizasse esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando S. Andrade por orientar essa tese com as idéias iniciais e críticas construtivas, além de incentivar a continuidade do trabalho demonstrando sempre que eu seria capaz de concluí-lo.

Ao Prof. Ângelo Pires do Prado que colaborou decisivamente para que pudesse ingressar no doutorado.

Às pesquisadoras Fabiana e Maria e minha esposa que me ajudaram na obtenção dos dados da pesquisa

RESUMO

Métodos para controlar e monitorar a susceptibilidade de insetos vetores tem sido estudados. Órgãos governamentais como *World Health Organization* (WHO) e *Center of Disease Control* (CDC) tem preconizado metodologias de bioensaios para avaliação em laboratório de resistência de mosquitos. O objetivo para se realizar testes de susceptibilidade é detectar a presença de indivíduos resistentes em uma população de inseto para que se possa, tão logo quanto possível, iniciar planos de controle alternativo, evitando-se assim os custos adicionais e problemas na redução da população do vetor. No entanto, alguns aspectos de tais metodologias são questionáveis e podem comprometer a metodologia como eficaz para revelar se uma população está resistente a um determinado inseticida. Por exemplo: 1) o Método do Papel Impregnado (WHO) possui algumas desvantagens como alto custo do material, falhas no contado do mosquito com a superfície tratada e possibilidade de perda de indivíduos durante o manuseio dos equipamentos; 2) O Método de Atividade Intrínseca do Inseticida (WHO) propõe a utilização de CO_2 e baixa temperatura para anestesiar os mosquitos e acetona como diluente e aplicação do inseticida com um micro-capilar que proporciona gotas de 0,1 µL. No entanto, os meios de anestesia levam ao estresse fisiológico, a baixa temperatura retarda a evaporação da acetona e o micro-capilar não libera o volume correto de solução e; 3) o Método da Garrafa Impregnada (CDC) permite que os mosquitos recebam o inseticida apenas pelo contato tarsal e dessa forma a quantidade de inseticida recebida pelo inseto pode não ser letal. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia que eliminasse tais desvantagens. Foi possível demonstrar que a exposição de machos e fêmeas de *Aedes aegypti* ao CO_2, baixa temperatura ou ambos, leva a uma mortalidade significativa. Um método de imobilização por meio de sucção foi desenvolvido, utilizando-se um aspirador de pó portátil. Esse método permitiu a imobilização de mosquitos e moscas (Chloropidae), havendo uma baixa mortalidade de mosquitos apenas após 60 min. de permanente imobilização, concluindo-se que o método de imobilização por sucção pode substituir os métodos de anestesia. Um método de aplicação líquida foi proposto, utilizando-se dispersores utilizados para aplicação de perfume, sendo que um dos

parâmetros avaliados foi o tamanho de gotas. Os resultados demonstraram que é possível a utilização desses dispersores para aplicação de inseticida, pois há homogeneidade no tamanho das gotas. Utilizando esse método de aplicação, avaliou-se a possibilidade de utilização de acetona ou álcool etílico como diluente de inseticidas, sendo que a acetona causou alta mortalidade em fêmeas e machos de *Ae. aegypti* e dessa forma foi proposto a utilização de álcool etílico. A metodologia aqui proposta foi utilizada para análise de susceptibilidade do mosquito *Aedes aegypti* (Culicidae) e mosca *Liohippelates nigrifons* (Chloropidae) aos inseticidas malation e deltametrina. Foi possível estabelecer a linha base de susceptibilidade, a CL_{50} e a concentração diagnóstico. Além disso, foi possível detectar a resistência de uma população de *Ae. aegypti* advinda do campo. Conclui-se que a metodologia de imobilização associada ao método de aplicação líquida pode ser utilizada para detecção de resistência de mosquitos.

Palavras-chaves – *Aedes aegypti*, Dengue, Susceptibilidade, Resistência, Bioensaio, Anestesia, Método.

ABSTRACT

Methods to control and monitor the susceptibility of vectors has been studied. Government agencies like World Health Organization (WHO) and Centers for Disease Control (CDC) has recommended methodologies bioassays for evaluating resistance in mosquitoes in the laboratory. The goal is to perform susceptibility testing is to detect the presence of resistant individuals in a population of insects so that we can, as soon as possible, initiate alternative control plans, thus avoiding additional costs and problems in reducing the vector population. However, some aspects of these methodologies are questionable and may denigrate as effective methodology to find out if a population is resistant to a particular insecticide. For example: 1) Method of Impregnated Paper (WHO) has some disadvantages such as high cost of material failures counted mosquito with the treated surface and the possibility of loss of individuals during handling equipment, 2) The Method of Intrinsic Activity of Insecticide (WHO) proposes the use of CO2 and low temperature to anesthetize mosquitoes and acetone as diluent and insecticide application with a micro-capillary that provides drops of 0.1 µl. However, the means of anesthesia leading to physiological stress, low temperature retards the evaporation of acetone and the micro-capillary will not release the correct volume of solution, and 3) the method of Impregnated bottle (CDC) enables receiving mosquito insecticide only by tarsal contact and thus the amount of insecticide received by the insect can not be sufficiently lethal. This study aimed to develop a methodology that would eliminate such disadvantages. It was possible to demonstrate that exposure of male and female *Aedes aegypti* CO_2, low temperature, or both leads to a significant mortality. A method of immobilization by suction was developed using a portable vacuum cleaner. This method allowed for the immobilization of mosquitoes and flies (Chloropidae), having a low mosquito mortality after only 60 min. permanent immobilization, concluding that the immobilization method by suction can override the methods of anesthesia. A liquid application method was proposed, using dispersers perfume, and one of the parameters evaluated droplet size. The results demonstrated that it is possible to use the dispersers for insecticide application, as there uniformity in droplet size. Using this application method, we evaluated the possibility to use acetone

or ethanol as diluent insecticides, and acetone caused high mortality in female and male *Ae. aegypti* and thus it was proposed to use alcohol. The methodology proposed here was used to analyze the susceptibility of the mosquito *Aedes aegypti* (Culicidae) and fly *Liohippelates nigrifons* (Chloropidae) to insecticides Malathion and Deltamethrin. It was possible to establish baseline susceptibility, and the LC_{50} concentration diagnosis. Moreover, it was possible to detect the resistance of a *Ae. aegypti* originating from the field. It is concluded that the method of immobilization associated liquid application method can be used to detect resistance of mosquitoes.

Key Words - *Aedes aegypti*, Dengue, Susceptibility, Resistance, Bioassay, Anesthesia, Method.

LISTA DE FIGURAS

1 - Esquema demonstrando o manuseio dos equipamentos para realização de bioensaios com papel impregnado (WHO, 1981). 69

2 - Modelo de placa fria proposta pela WHO para manutenção de mosquitos anestesiados. 72

3 - Mosquitos anestesiados recebendo a aplicação de uma gota de solução inseticida por meio de micro-capilar. 72

4- Placa fria feita com água congelada em recipiente de plástico. 88

5 - Mosquitos mantidos na placa fria confeccionada com água congelada em recipiente plástico. 89

6 - a) Recipiente de contenção de plástico acrílico transparente com tampa branca opaca. b e c) Recipiente de contenção de plástico acrílico com tampa onde o fundo de ambos foram cortados para fixação de uma tela de fios de nylon. 91

7 - Recipiente de contenção com cotonete. a) Vista lateral; b) Vista superior. 92

8 - Recipiente coletor com o tubo na tampa. 93

9 - Aspirador de pó automotivo com a parte superior, que consiste em um “copo” com um orifício para a entrada de ar e poeira e que foi retirado. 94

10 - a1) Parte do meio sem o “copo”; a2) localização da peneira e b) o anel de PVC 94

11 - a) Tubo de PVC com as extremidades abertas verticalmente; b) três hastes de metal. 95

12 - Fonte de alimentação 12 V. 95

13 - Orifício no fundo do recipiente. a) Vista da parte superior para a inferior, mostrando a parte interna do recipiente; b) Vista externa da parte inferior. 96

14 - Recipiente limitador encaixado no anel de PVC do imobilizador. 97

15 - Aspirador elétrico, movido a pilha e comercializado como aspirador para teclado de computador. 98

16 - Aspirador de coleta. a) fonte de alimentação 12V; b) anel de PVC e anel de borracha; c) recipiente coletor. 98

17 - Dispersores – Válvula pump com rosca estriada. 100

18 - Características de um dispersor do tipo válvula pump (Adaptado de: http://www.charterlinkhk.com/en/product3_2.htm). 101

19 - Conjunto – Dispersor com o recipiente. 102

20 - Dispersor – a) medição da altura; b) medição do diâmetro. 103

21 - Dispersores de cinco diferentes marcas comerciais com seus respectivos recipientes. 104

22 - Demonstração de funcionamento ideal do dispersor produzindo um jato completo. 105

23 - Esquema demonstrando o procedimento utilizado para medir o tamanho de gotas produzidas pelos dispersores. 107

24 - Esquema demonstrando o procedimento para determinação da distância de aplicação entre o dispersor e os insetos. 108

25 - Esquema mostrando o sistema proposto por Francisco (2005) para sexagem de moscas cloropídeos. 114

26 - a) recipiente coletor com mosquitos fêmeas coletados; b) recipiente coletor, com a tampa, no imobilizador. 126

27 - Mosquitos imobilizados no fundo do recipiente coletor. 127

28 - a) Recipiente coletor recebe a tampa telada, passando assim a ser considerado como recipiente de contenção. b) Recipiente de contenção, com a tampa para baixo, no imobilizador. 128

29 - Mosquitos imobilizados na tampa telada 128

30 - Imagens mostrando as manchas produzidas pelos dispersores em diferentes distâncias de dispersão 136

31 - Sequência de diluições em álcool etílico a partir do produto comercial malation para se obter quatro concentrações usadas nas avaliações de aplicação tópica em adultos de *Ae.aegypti* (Solução Estoque a 100 ppm: 100 mg malation em 1000 mL álcool etílico). 141

32 - Sequência de diluições em álcool etílico a partir do produto comercial malation para se obter quatro concentrações usadas nas avaliações de aplicação tópica em adultos de *Ae.aegypti* (Solução Estoque a 100 ppm: 100 mg malation em 1000 mL álcool etílico p.a.). 142

33 - Moscas cloropídeos sob sucção no imobilizador. 160

34 - Cálculos das diluições de malation em álcool etílico p.a. para obtenção das concentrações preliminares. 161

35 - Aspirador para amostragem de culicídeos adaptado por Nasci (1981). 175

36 - Aspirador de coleta proposto por Natal; Marucci (1984). 177

37 - Aspirador em forma de revólver desenvolvido por Aldridge et al. (2012). 177

LISTA DE GRÁFICOS

1 - Porcentagem média de mortalidade para machos (♂) e fêmeas (♀) de *Aedes. aegypti* após a anestesia com CO_2 por diferentes períodos. 119

2 – Porcentagem média de mortalidade de ♂ e ♀ expostos a baixa temperatura. 123

3 - Porcentagem média de mortalidade de ♂ e ♀ expostos ao CO_2 e baixa temperatura concomitantemente. 125

4 - Porcentagem média de mortalidade de ♀ e ♂ de *Aedes aegypti* após diferentes períodos da aplicação de um jato de acetona. 138

5 - Porcentagem média de mortalidade de ♀ e ♂ de *Aedes aegypti* após aplicação de um jato de álcool – leitura após diferentes períodos. 139

6 - Curvas de concentração-mortalidade de ♀ de *Aedes aegypti* ao malation após 1 h, 4 h, 8 h e 24 h da aplicação. 145

7 - Curvas de concentração-mortalidade de ♂ de *Aedes aegypti* ao malation após diversos períodos de leituras (1 h, 4 h, 8 h e 24 h). 148

8 - Curva tempo-mortalidade de ♀ de *Aedes aegypti* para duas concentrações (2,00 ppm e 2,15 ppm) de malation. 149

9 - Curva tempo-mortalidade de ♂ de *Aedes aegypti* para duas concentrações (1,50 ppm e 2,00 ppm) de malation. 150

10 - Curva de concentração-mortalidade de ♀ e ♂ de *Aedes aegypti* a deltametrina para todos os períodos de leitura. 155

11 - Curva tempo-mortalidade de fêmeas de *Aedes aegypti* para duas concentrações (0,31 ppb e 0,62 ppb) de deltametrina. 157

12 - Curva tempo-mortalidade de ♂ de *Aedes aegypti* para duas concentrações (0,31 ppb e 0,62 ppb) de deltametrina. 158

13 - Curvas de concentração-mortalidade de *Liohippelates nigrifons* ao malation após diversos períodos de leituras (1 h, 4 h, 8 h e 24 h). 164

14 - Curva tempo-mortalidade de choropídeos ao malation para três concentrações (0,18 ppb, 0,37 ppb e 0,75 ppb). 166

LISTA DE TABELAS

1 - Resumo dos dados citados nas bibliografias sobre aplicação tópica, demonstrando as DL_{50} (µg/g) para alguns inseticidas e peso (mg) de algumas espécies de insetos adultos. 74

2 - Tempo (d.p.) para que o primeiro indivíduo, fêmea ou macho de *Aedes aegypti* se recuperasse voltando a andar ou voar (T1R) após diferentes períodos de exposição à anestesia por CO_2. 117

3 - Tempo (d.p.) para que todos os indivíduos anestesiados se recuperassem (TRT) voltando a andar ou voar, em até 5 min., após o término da exposição a diferentes períodos de exposição à anestesia por CO_2. 118

4 - Tempo (d.p.) para que o primeiro indivíduo, fêmea ou macho de *Aedes aegypti* se recuperasse voltando a andar ou voar (T1R) após diferentes períodos de exposição à baixa temperatura (5ºC) em placa fria adaptada. 121

5 - Tempo (d.p.) para que todos os indivíduos se recuperassem (TRT) voltando a andar ou voar, em até 5 min., após o término da exposição por diferentes períodos à anestesia em baixa temperatura. 122

6 - Densidade média (desvio padrão) de mosquitos distribuídos em quatro áreas de 1 cm^2 da tampa do recipiente de contenção. 130

7 - Diâmetro, Altura e Volume (cm^3) dos dispersores utilizados no presente trabalho. 131

8 - Especificações técnicas dos dispersores. 132

9 - Diâmetro da mediana volumétrica (DMV), amplitude relativa (AR) e porcentagem do volume em gotas menores que 100 µm dos cinco dispersores avaliados. 134

10 - Área (cm^2) (média e desvio padrão) da elipse formada pelo jato dos dispersores à diferentes distâncias. 135

11 - Porcentagem média (desvio padrão) da mortalidade para um bioensaio com fêmeas de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidas à aplicação de malation em quatro diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm e 2,0 ppm) preliminares. 141

12 - Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade para três bioensaios com fêmeas de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidos a aplicação de malation em diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,25 ppm, 2,0 ppm e 2,75 ppm). 143

13 - Resultado médio das CL_{50} e CL_{99} para 3 bioensaios de aplicação de malation em fêmeas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller. 144

14 - Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade para o bioensaio preliminar com machos de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidos a aplicação de malation em quatro diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm e 2,0 ppm). 145

15 - Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade para três bioensaios definitivos com machos de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidos a aplicação de malation em diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm e 2,0 ppm). 146

16 - Resultados de dose/resposta dos bioensaios de aplicação de malation em macho de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. CL_{50} e CL_{99} médios. 147

17 - Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de malation em fêmea de *Aedes aeypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios. 148

18 - Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de malation em macho de *Aedes aeypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios. 150

19 - Porcentagem Média de mortalidade (desvio padrão), após 1 h, 4 h, 8 h e 24 h da aplicação de malation em fêmeas de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller – soluções armazenadas em baixa temperatura (5º C). 152

20 - Porcentagem Média de mortalidade (desvio padrão), após 1 h, 4 h, 8 h e 24 h da aplicação de malation em fêmeas de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller – soluções armazenadas a temperatura ambiente (25±2ºC). 152

21 - Porcentagens médias (desvio padrão) de mortalidade e porcentagens médias (desvio padrão) de mosquitos em knockdown, após 24 h, para três bioensaios com deltametrina aplicada em fêmeas e machos de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller. 154

22 - Resultados concentração-mortalidade dos bioensaios de aplicação de deltametrina em fêmeas e machos de *Aedes aeypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. CL_{50} e CL_{99} médios em ppb. 155

23 - Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de deltametrina em fêmea de *Aedes aeypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios. 156

24 - Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de deltametrina em macho de *Aedes aeypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios. 158

25 – Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade, para as concentrações preliminares, de *Liohippelates nigrifons* ao malation em diferentes concentrações (0,18 ppb, 0,37 ppb, 0,75 ppb, 1,51 ppb e 3,02 ppb) por meio de um jato de 0,12 mL de solução inseticida. 162

26 - Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade, para as concentrações definitivas, de *Liohippelates nigrifons* ao malation em diferentes concentrações (0,04 ppb, 0,09 ppb, 0,18 ppb, 0,37 ppb e 0,75 ppb)por meio de um jato de 0,12 mL de solução inseticida. 163

27 - Resultados de dose/resposta dos bioensaios de aplicação de malation em *Liohippelates nigrifons* para todos os bioensaios. CL_{50} e CL_{99} médios. 164

28 - Tempo Letal Mediano (minutos) de aplicação de malation de *Liohippelates nigrifons* para todos os bioensaios. TLs médios. 165

29 - Análises de correlação entre tamanho e volume em relação mortalidades de fêmeas e machos de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller demonstrando o r (Pearson) e a probabilidade em 0,05. MH = Mortalidade em relação aos períodos; MB = Mortalidade em relação aos bioensaios; MLB = Mortalidade em relação à linha base. 167

30 - Equipamentos para elaboração de um *kit* para realização de bioensaios de mortalidade. 201

SUMÁRIO

1. **Introdução** pág. 1
2. Revisão da Literatura pág. 6
2.1. A Necessidade dos Inseticidas na Saúde Pública pág. 6
2.2. Padrão de Uso dos Inseticidas pág. 7
2.3. Uso de Inseticidas no Controle do Mosquito *Aedes aegypti* pág. 7
2.4. Classificação e Modo de Ação dos Inseticidas pág. 8
2.4.1. Formulação dos Inseticidas pág. 14
2.5. Conceitos de Resistência em Artrópodes pág. 19
2.5.1. Alguns tipos de Resistência pág. 20
2.5.1.1. Resistência Bioquímica pág. 20
2.5.1.2. Redução na Taxa de Penetração do Inseticida pág. 20
2.5.1.3. Resistência Metabólica pág. 20
2.6. Aspectos da Resistência como Problema de Saúde Pública pág. 23
2.7. Histórico da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas pág. 27
2.8. Aplicação de Inseticida para Controle de Mosquitos – Método de Volume Ultra–Baixo (VUB) pág. 37
2.8.1. Tamanho de Gota pág. 38
2.8.2. Parâmetros do Tamanho de Gotas pág. 41
2.8.3. Técnicas para Medição do Tamanho de Gotas pág. 48
2.9. Equipamentos de Aplicação de Inseticidas pág. 51
2.10. Inseticidas para Pulverização Ambiental pág. 61
2.11. Necessidades Futuras para Estudos de Susceptibilidade de Insetos a Inseticidas pág. 62
2.12. Métodos de Controle do Mosquito *Aedes aegypti* pág. 62
2.13. Metodologia Utilizada para Avaliar o Impacto de Inseticidas no Controle, em Campo, de Mosquitos Adultos pág. 66
2.14. Metodologias Utilizadas para Avaliar o Impacto de Inseticidas no Controle, em Laboratório, de Mosquitos Adultos pág. 66

2.15. Efeito do CO_2 e Baixa Temperatura, Utilizados como Anestésicos em Insetos pág. 76
2.16. Moscas da Família Chloropidae pág. 78

3. **Objetivo Geral** pág. 83

4. **Objetivos Específicos** pág. 83
5. Criação e Manutenção dos Mosquitos Utilizados nos Experimentos pág. 84
6. Inseticidas Utilizados nos Experimentos pág. 85
7. Metas para o Desenvolvimento da Metodologia pág. 85

8. **Materiais e Métodos** pág. 86
8.1. Anestesia de Mosquitos com Dióxido de Carbono e Baixa Temperatura pág. 86
8.2. Desenvolvimento de um Método de Coleta e Imobilização de Pequenos Dípteros pág. 90
8.2.1. Medição da Velocidade do Vento Produzida pelo Imobilizador pág. 99
8.2.2. Avaliação de Mortalidade em Adultos de *Aedes aegypti* para Diferentes Períodos de Imobilização por Sucção pág. 99
8.2.3. Determinação da Densidade de Mosquitos no Recipiente de Contenção pág. 99
8.2.4. Ajustes para a Utilização do Aspirador de Coleta pág. 99
8.3. Proposta de um Método de Aplicação de Amostras em Líquido para Avaliação de Efeito Tópico em Mosquitos pág. 100
8.3.1. Especificações Técnicas dos Dispersores pág. 104
8.3.2. Parâmetros de Distribuição do Tamanho das Gotas Produzidas pelos Dispersores pág. 106
8.3.3. Determinação da Distância de Aplicação do Líquido pág. 107
8.4. Utilização de Acetona ou Álcool como Diluente para Aplicação de Inseticidas de Ação Tópica em Mosquitos pág. 109
8.5. Avaliação da Eficiência na Remoção de Resíduos da Aplicação de Inseticida nos Recipientes de Contenção pág. 109

8.6. Reaproveitamento dos Dispersores para Diferentes Bioensaios pág. 110
8.7. Procedimentos Comuns para Realização dos Bioensaios pág. 111
8.8. Linha Base de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* Linhagem Rockefeller ao Malation pág. 111
8.9. Bioensaios de Mortalidade de Mosquitos com Aplicação da CL_{50} de Malation por Diferentes Voluntários pág. 112
8.10. Reutilização de Soluções de Malation Armazenadas em Diferentes Temperaturas pág. 112
8.11. Linha Base de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* Linhagem Rockefeller a Deltametrina pág. 113
8.12. Avaliação de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* Linhagem Santarém a CL_{50} de Deltametrina pág. 113
8.13. Coleta e Identificação de Moscas da Família Chloropidae pág. 114
8.14. Imobilização de Moscas por meio de Sucção pág. 115
8.15. Linha Base de Susceptibilidade de Moscas *Liohippelates nigrifons* ao Malation pág. 115
9. **Resultados** pág. 117
9.1. Anestesia de *Aedes aegypti* com CO_2 e Baixa Temperatura pág. 117
9.2. Desenvolvimento de um Método de Coleta e Imobilização de Pequenos Dípteros pág. 125
9.2.1. Procedimento de Utilização da Metodologia de Imobilização pág. 125
9.2.2. Medição da Velocidade do Vento Proporcionado pelo Imobilizador pág. 129
9.2.3. Avaliação de Mortalidade em Diferentes Períodos de Imobilização pág. 129
9.2.4. Densidade de Mosquitos no Recipiente de Contenção pág. 129
9.2.5. Ajustes para Utilização do Aspirador de Coleta pág. 130
9.3. Proposta de um Método de Aplicação de Amostras em Líquido para Avaliação de Efeito Tópico em Mosquitos pág. 131
9.3.1. Especificações Técnicas dos Dispersores pág. 132
9.3.2. Parâmetros de Distribuição do Tamanho das Gotas Produzidas pelos Dispersores pág. 133
9.3.3. Determinação da Distância de Aplicação do Líquido pág. 134

9.4. Utilização de Acetona ou Álcool Etílico Absoluto como Diluente para Aplicação de Inseticidas de Ação Tópica em Mosquitos pág. 137
9.5. Avaliação da Eficiência na Remoção de Resíduos da Aplicação de Inseticida nos Recipientes de Contenção pág. 139
9.6. Reaproveitamento dos Dispersores após os Bioensaios pág. 140
9.7. Linha Base de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* Rockefeller ao Malation Grau-Técnico pág. 140
9.8. Bioensaios de Mortalidade de Mosquitos com Aplicação da CL_{50} de Malation por Diferentes Voluntários pág. 151
9.9. Reutilização de Soluções de Malation Armazenadas em Diferentes Temperaturas pág. 151
9.10. Linha Base de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* Rockefeller a Deltametrina pág. 152
9.11. Avaliação de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* Linhagem Santarém a CL_{50} de Deltametrina pág. 159
9.12. Coleta e Identificação de Cloropídeos pág. 159
9.13. Imobilização de Moscas por meio de Sucção pág. 159
9.14. Linha Base de Susceptibilidade de Moscas *Liohippelates nigrifons* ao Malation pág. 160
9.15. Análises de Correlação pág. 166

10. **Discussão** pág. 168
10.1. Anestesia de Mosquitos com CO_2 e Baixa Temperatura pág. 168
10.2. Desenvolvimento de um Método de Coleta e Imobilização de Pequenos Dípteros pág. 172
10.3. Avaliação de Mortalidade em Diferentes Períodos de Imobilização pág. 173
10.4. Ajustes para Utilização do Aspirador de Coleta pág. 174
10.5. Proposta de um Método de Aplicação de Amostras em Líquido para Avaliação de Efeito Tópico em Mosquitos pág. 179
10.5.1. Especificações Técnicas dos Dispersosres pág. 179

10.5.1.1. Parâmetros de Distribuição do Tamanho das Gotas Produzidas pelos Dispersores pág. 179
10.6. Utilização de Acetona ou Álcool Absoluto como Diluente para Aplicação de Inseticidas de Ação Tópica em Mosquitos pág. 184
10.7. Avaliação da Eficiência na Remoção de Resíduos da Aplicação de Inseticida nos Recipientes de Contenção pág. 185
10.8. Linha Base de Susceptibilidade de *Aedes agypti* Rockefeller ao Malation Grau-Técnico pág. 186
10.9. Bioensaios de Mortalidade de Mosquitos com Aplicação da CL_{50} de Malation por Diferentes Voluntários pág. 189
10.10. Reutilização de Soluções de Malation Armazenadas em Diferentes Temperaturas pág. 190
10.11. Linha Base de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* Rockefeller a Deltametrina pág. 193
10.12. Avaliação de Mortalidade de *Aedes aegypti* Linhagem Santarém a CL_{50} de Deltametrina pág. 195
10.13. Coleta e Identificação de Cloropídeos pág. 196
10.14. Imobilização de Moscas por meio de Sucção pág. 196
10.15. Linha Base de Susceptibilidade de Moscas *Liohippelates nigrifons* ao Malation pág. 197
11. Protocolo para Utilização da Metodologia para Avaliação de Susceptibilidade de Pequenos Dípteros Adultos a Inseticida pág. 199
12. Custos Aproximados para Montagem de um *Kit* da Metodologia Proposta pág. 201

13. **Conclusões** pág. 202
14. Referências Bibliográficas pág. 204

1. INTRODUÇÃO

Em uma população de mosquitos sob pressão de inseticidas, o desenvolvimento de resistência é um processo inevitável, que resulta do efeito seletivo de exposição a concentrações que matariam os indivíduos susceptíveis, sobrevivendo os indivíduos resistentes, que geneticamente transferem essa capacidade aos seus descendentes. Além dos vários mecanismos de resistência presentes nos insetos, que permitem sua sobrevivência após contato com o inseticida, há outra forma, chamada de comportamental, que define o processo de seleção de indivíduos com aptidão para evitar total ou parcialmente o contato com concentrações que resultariam letais (OMS, 1986). A experiência na utilização de inseticidas orgânicos em repetidas aplicações para controle de mosquitos mostra que a resistência a esses produtos tem surgido após um período de anos de uso contínuo. As atividades de controle requerem, então, o uso de novos inseticidas ou a sua substituição por métodos físicos e agentes biológicos, durante o maior período possível (OMS, 1992).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem divulgado o problema e as formas de retardar os processos de resistência, além de padronizar os métodos de detecção e vigilância desses processos de controle populacional. A detecção e o monitoramento de alteração da susceptibilidade em uma população de vetores podem ser realizados por ensaios biológicos, bioquímicos e moleculares. Os biológicos são importantes para detectar a alteração de resposta da população avaliada por meio das taxas de mortalidade obtidas nos ensaios; os bioquímicos e os moleculares podem detectar os mecanismos de resistências envolvidos, o que permite determinar a resistência cruzada a vários inseticidas, facilitando a escolha dos métodos alternativos (OMS, 1992).

Apesar de não ser possível evitar o desenvolvimento de resistência em populações de insetos expostas a inseticidas, é possível retardar esse processo. Medidas de manejo de resistência devem ser consideradas na construção das estratégias de controle de vetores. Os fatores envolvidos no processo de resistência podem ser agrupados em genéticos (genes que conferem resistência), biológicos (duração do ciclo biológico e dispersão) e operacionais (intensidade da exposição da população no tempo e espaço e nas várias fases do ciclo biológico) (GEORGHIOU e TAYLOR, 1976; OMS, 1976). A tecnologia atualmente existente restringe-se a reduzir o

impacto dos fatores operacionais, por meio de dois grupos de medidas: a implementação de estratégia de controle integrado que restrinja o máximo possível o uso de métodos químicos de controle vetorial; e o planejamento do componente de controle químico da estratégia, empregando metodologias que retardam o processo de resistência, como o uso de sinergistas, aplicação de inseticidas em mosaico, uso de misturas, rotações ou sucessões ótimas de inseticidas. Avaliações de programas e pesquisas operacionais devem ser implementadas, visando conhecer o impacto dos dois grupos de medidas na velocidade do desenvolvimento de resistência em populações de *Aedes aegypti*.

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), desde 1999 busca organizar e sistematizar atividades de monitoramento da resistência do *Ae. aegypti* aos inseticidas empregados. São poucos os municípios monitorados nas diversas unidades federadas e os ensaios têm se limitado basicamente a provas biológicas para larvas expostas ao temefós. Excetua-se desse contexto o monitoramento da resistência do *Ae. aegypti* realizado pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) no estado de São Paulo. As atividades sistematizadas de vigilância tiveram início em 1996, incluindo ensaios biológicos para larvas e adultos e, nos dois últimos anos, também ensaios bioquímicos (SUCEN, 2001).

As ações de vigilância desenvolvidas no Brasil, já mostram um quadro bastante preocupante de resistência do *Ae. aegypti* ao temefós. Em 2001, foram avaliadas populações de *Ae*. *aegypti* de 54 municípios, verificando-se resistência em 20 delas, distribuídos nas várias regiões brasileiras, com exceção da Região Sul. No Estado de São Paulo, as provas biológicas realizadas com adultos mostraram ampla resistência à Cipermetrina, com níveis mais elevados de alteração de resposta em municípios das regiões da Baixada Santista, Araçatuba, Barretos, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto. Considerando a situação epidemiológica do dengue no Brasil e as informações já existentes sobre resistência dos vetores a inseticidas, fica evidente a necessidade de avançar rapidamente na implementação de medidas dos dois grupos de manejo anteriormente citados, para retardar os processos de resistência. Além disso, é fundamental tornar parte integrante do programa de controle vetorial o monitoramento

sistematizado da resistência aos inseticidas em uso, pois as alternativas para o controle do *Ae*. *aegypti* em situações de emergência são poucas.

O controle do *Ae*. *aegypti* tem constituído um importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento. Segundo Halstead (1988), mesmo em situações em que os recursos destinados ao controle do vetor são apropriados para a implementação do programa, muitas vezes não se alcança sucesso, em função, principalmente, de cinco fatores: desejo de encontrar soluções fáceis, perda de habilidades técnicas e gerenciais do pessoal responsável pelo programa, agravamento da dimensão do problema, desconsideração de experiências anteriores e expectativa de fracasso, espelhada em outras experiências mal sucedidas no controle de dengue e de outras doenças transmitidas por vetores.

Nas últimas décadas, vem sendo continuamente reiterada a recomendação do controle integrado do *Ae*. *aegypti* com implementação descentralizada, envolvendo o poder público e a sociedade. Esse tipo de estratégia teria maior sustentabilidade que aquelas verticais centralizadas e baseadas em um único método (GUBLER, 1989a; HALSTEAD, 1988; OMS, 1992).

No controle integrado do *Ae*. *aegypti*, as medidas de controle preventivas são direcionadas principalmente aos criadouros, constituindo-se de ações simples e eficazes, especialmente aquelas que consistem em cuidados a serem adotados pela população. A tecnologia atualmente disponível abrange medidas de controle físico, químico e biológico, sendo os dois primeiros grupos mais intensamente utilizados (SUCEN, 2001; OMS, 1992). Medidas de controle químico com ação larvicida em formulação de liberação lenta vêm sendo empregadas mundialmente, destacando-se o temefós como o larvicida de mais ampla utilização (tratamento focal). A maioria dos programas de controle de *Ae. aegypti* empregam duas modalidades de controle químico adulticida: a pulverização de inseticida de ação residual denominada de tratamento perifocal, indicada para uso rotineiro específico em imóveis que, além de concentrarem muitos recipientes em condições que favorecem a proliferação de formas imaturas, contribuem para a dispersão passiva do vetor (MS, 1996; OMS, 1992; FUNASA, 2001a) e a aplicação espacial de inseticida a Volume Ultra-Baixo Volume (VUB), indicado para situações de transmissão. Embora se tenha conhecimento de que a sustentabilidade do

programa aumenta com a intensidade de incorporação das ações de controle físico e biológico, especialmente daquelas que possam ser implementadas com a participação da comunidade e de vários segmentos produtivos, o controle químico ainda assume papel importante na estratégia desenvolvida no Brasil, inclusive em períodos inter-epidêmicos (FUNASA, 2001a).

A insuficiência e inconsistência das informações sobre o vetor em função dos dados precários disponíveis e a supervalorização da cobertura obtida nas atividades de controle, atribuindo-se muitas vezes apenas a esse aspecto os resultados insatisfatórios, resulta na idéia simplista de que, para solucionar o problema, é suficiente intensificar o trabalho que está sendo realizado, e assim pouco se avança no aprimoramento da estratégia de controle, novos inseticidas e controles alternativos.

A complexidade da vida moderna, entremeada com a miséria e a falta de infraestrutura urbana na maioria dos municípios brasileiros, tem dificultado a organização das ações de controle dos vetores, mesmo em ocasiões com disponibilidade de recursos. A disponibilidade de incontáveis criadouros artificiais, a urbanização desordenada e a convivência com tantos outros problemas mais graves que a dengue, deixa a população alheia a mais esta mazela da Saúde Pública brasileira. Embora muitos sejam os determinantes envolvidos na ocorrência da dengue, a precariedade da vida nas cidades dificulta a atuação da área da saúde. A continuidade dos recursos repassados aos municípios, ações combinadas com envolvimento pluriinstitucional e articuladas regionalmente podem dar maior racionalidade ao controle da reinfestação nos vários cantos do país. Nesse sentido as instâncias regionais/estaduais têm um papel estratégico na condução e avaliação das medidas de campo, acompanhando indicadores de infestação e o impacto das ações, facilitando a representação dos municípios e o intercâmbio de experiências locais, conduzindo a integração das ações com o Sistema Único de Saúde, além de otimizarem o uso de equipamentos e os meios de comunicação de massa necessários às estratégias de Saúde Pública (DONALÍSIO, 1999). Os modelos de organização dos serviços de Saúde Pública para o controle de vetores e da transmissão viral são importante campo de reflexão e experimentação científica, em plena epidemia de dengue no país. Fica evidente a necessidade de se avaliar novas tecnologias e

estratégias de prevenção, de ações de rotina do campo e de medidas emergenciais em épocas epidêmicas. Há modelos técnico-assistenciais novos ou revisados da área da Saúde Pública a serem testados e avaliados para enfrentar novas e velhas endemias e epidemias brasileiras.

Equipamentos de aplicação de inseticidas são ferramentas necessárias para o trabalho de campo no sentido de controlar insetos pragas. Assim, estudos quanto a equipamentos e métodos de controle são importantes quanto ao desenvolvimento de novas tecnologias. Diversos trabalhos de natureza técnico-científica têm sido produzidos em torno da aplicação com pulverizadores. Tais trabalhos se inserem nos mais variados campos da tecnologia de aplicação e focam o uso de pulverizadores para a erradicação de vetores de doenças. Na literatura, contudo, não são identificados estudos específicos para a especificação técnica de conformidade, no entanto, é possível, diferenciar os tipos de tecnologias de aplicação e sua adequação à operação de controle de vetores.

Em 1974, a *World Health Organization* (WHO), esquematizou um procedimento de teste padrão, permitindo que diferentes tipos de dispersores de inseticidas, para diferentes aplicações, seguissem uma avaliação semelhante com o objetivo de definir se o aplicador de inseticida é adequado para uma dada operação de controle de vetores. Na avaliação e seleção de equipamentos de aplicação de inseticidas, os seguintes tópicos devem ser considerados: a adequação do equipamento (o tipo e o tamanho) para cada operação do controle de vetor a ser empreendida; o desempenho do equipamento no campo; os efeitos de diferentes fórmulas de inseticidas em componentes do equipamento; a simplicidade do projeto de operação e manutenção; a segurança do operador e do ambiente; a disponibilidade das peças de reposição para o modelo e de assistência técnica para manutenção na área do programa de erradicação; o custo, incluindo o custo das peças de reposição.

Metodologias para avaliação de susceptibilidade de insetos a inseticidas têm sido desenvolvidas principalmente pela OMS e apesar da ampla utilização mundial, algumas dificuldades tem surgido, conforme divulgado pela WHO (1992), como por exemplo: 1) a maioria dos métodos foram desenvolvidos para testar resistência a inseticidas de gerações iniciais, não sendo utilizáveis para os inseticidas com ação fumigante,

knockdown (KD) ou repelente; 2) o meio de exposição dos métodos são para superfícies tratadas e outras são baseadas na aplicação tópica de quantidade conhecida de inseticida sobre o tórax do vetor; 3) mosquitos são pequenos, por exemplo, *Ae. aegypti*, e frequentemente escapam pela tela dos tubos de exposição do *kit* para avaliação em mosquitos; 4) a aplicação tópica de soluções de inseticida envolve o uso de equipamentos especiais, sendo necessário anestesiar os insetos os quais frequentemente se recobram e escapam durante o procedimento; 5) em testes com a exposição de mosquitos em papéis impregnados com organoclorados, organofosforados e carbamatos, é adotado que se o tempo de exposição e a concentração são constantes, a mortalidade também será constante. Porém, isso tem sido verificado somente para alguns inseticidas e não é verdadeiro para outros compostos utilizados. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam trabalhar nessas condições das quais os métodos disponíveis atualmente não proporcionam resultados eficazes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A NECESSIDADE DOS INSETICIDAS NA SAÚDE PÚBLICA

Algumas doenças podem ser transmitidas para humanos por insetos, carrapatos e ácaros. Em documentos da WHO é relatado que o uso de inseticidas sintéticos pode reduzir o risco da veiculação de doenças por insetos (NAUEN, 2007). Em 1955 a malária infectou mais de 200 milhões de pessoas no mundo (WARE e WHITACRE, 2004) e o uso de inseticidas reduziu a taxa de mortalidade anual dessa doença e avanços semelhantes têm sido feitos no controle de outras doenças tropicais importantes como febre amarela, doença do sono e doença de Chagas.

Recentemente novos desafios têm ocorrido com a entrada de doenças transmitidas por insetos na América do Norte. Por exemplo, a Encefalite do Oeste do Nile, nos Estados Unidos vem ocorrendo desde 1999, sendo que em 2002, foram registrados 4.156 casos, com 284 óbitos; em 2003, ocorreram 9.862 casos, com 264 óbitos; em 2004, ocorreram 2.539 casos, com 100 óbitos; e, em 2008, foram notificados 1.338 casos e 43 óbitos, provenientes de 43 estados daquele país. No Canadá, em

2008 (até novembro), ocorreram 36 casos (Secretara de Vigilância em Saúde, 2012). Essas informações deixam claro que os esforços para controlar essas doenças continuarão e que os inseticidas constituem uma ferramenta importante para o sucesso nessa luta.

2.2. PADRÃO DE USO DOS INSETICIDAS

Os inseticidas são usados em maior volume na agricultura. Em 1999, essa área consumiu 77% dos inseticidas convencionais nos Estados Unidos. No Brasil, no período de 1998 a 1999 foram utilizadas 1143 toneladas (ton.) de ingrediente ativo de inseticida na cultura da soja no Paraná, sendo que desses os organofosforados foram aplicados em maior quantidade (852 ton. i.a.) em uma área de mais de um milhão de hectares (IBGE, 2010).

O mercado mundial de inseticidas movimenta cerca de 930 bilhões de dólares/ano, sendo que os Estados Unidos representam a maior parte desse montante. As quatro classes de inseticidas de maior importância (organofosforados, carbamatos, piretroides e neonicotenoides) contam 70% das vendas no mundo (NAUEN, 2006).

O custo para o desenvolvimento de novos inseticidas é elevado. Atualmente se gasta entre 50 e 100 milhões de dólares por inseticidas. Na média, um fabricante sintetiza cerca de 40 mil compostos e apenas um é registrado e vendido comercialmente. O tempo para o desenvolvimento está entre cinco e nove anos. Além disso, as restrições impostas pela legislação têm dificultado o desenvolvimento de novos produtos para o controle de pragas (KNIGHT e NORTON, 1989).

2.3. USO DE INSETICIDAS NO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Uma das formas de tratamento químico realizada para o mosquito *Ae. aegypti* é do tipo focal, e consiste na aplicação de larvicidas (inseticida químico, biológico ou hormonal) em recipientes que possam atuar como criadouros. São utilizados larvicidas de baixa toxicidade para humanos e demais mamíferos como o temefós (granulados a 1%). No método denominado tratamento perifocal é feita a aplicação de um inseticida de ação residual ao redor de recipientes que possam ser utilizados como criadouros. Este método é indicado para uso em pontos considerados estratégicos (borracharias,

ferros-velhos) com muitos recipientes que possam servir como criadouros e que contribuam para a dispersão passiva do vetor (OPS, 1995; FUNASA, 2001a, 2001b, 2002).

Para o controle de adultos, um dos métodos de aplicação de inseticida, denominado VUB, consiste na aplicação de gotas micropulverizadas dos inseticidas no ar. Devido ao processo de aplicação por pulverização das gotas é possível obter uma melhor cobertura da superfície tratada. Esse tipo de aplicação pode ser realizado com veículos e aviões (VUB-pesado) e com equipamentos portáteis do tipo mochila (VUB-portátil) (REITER e GUBLER, 1997; REITER e NATHAN, 2001; FUNASA, 2002). Nos anos 1970, pesquisas realizadas na Tailândia demonstraram redução da população de adultos de *Ae. aegypti* após a aplicação do inseticida malation com VUB-pesado, o que resultou na recomendação e ampla utilização do método no controle do mosquito, principalmente, durante epidemias (WHO, 1995).

Entretanto, a eficácia das aplicações com VUB é relativa. A cada aplicação grande parte dos insetos adultos é eliminada (máximo de 80%), mas não a totalidade, devido a fatores como existência de barreiras físicas (árvores, portas e janelas fechadas), que interferem na penetração do produto nos imóveis (BARATA et al., 2001; FUNASA, 2001b; WHO, 1997). De um modo geral, os municípios brasileiros utilizam o tratamento espacial para o bloqueio dos casos de dengue em períodos de surtos e/ou epidemias, entretanto, apesar de ter efeito rápido, o método não possui nenhum efeito residual (FUNASA, 2001a, b; OPAS, 1995; WHO, 1997). De acordo com Gubler (1989b), as aplicações de inseticida com VUB não são confiáveis para prevenir ou controlar epidemias da doença. Atualmente, no Brasil, se utilizam nas aplicações espaciais inseticidas do grupo dos piretroides (deltametrina) em todo o país e organofosforados (malation) no Estado de São Paulo, onde foi detectada resistência a piretroides (DONALÍSIO e GLASSER, 2002).

2.4. CLASSIFICAÇÃO E MODO DE AÇÃO DOS INSETICIDAS

Inseticidas são substâncias químicas usadas para controlar organismos considerados pragas e/ou vetores. A *Environmental Protection Agency* (EPA), principal agência reguladora nos Estados Unidos, define inseticida como: “uma substância ou

mistura de substâncias que serve para prevenir, repelir ou atenuar os danos causados por uma praga". Entre os 900 ingredientes ativos aprovados pela EPA, 25% são inseticidas (WARE e WHITACRE, 2004).

Os inseticidas podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas. Cada inseticida tem três nomes: o nome comum, o nome comercial e o nome químico. O nome comum é um nome genérico do ingrediente ativo determinado por uma sociedade científica. O nome comercial é o nome do produto dado à formulação particular do inseticida pelo fabricante ou o formulador. O nome químico descreve a composição e a estrutura química do ingrediente ativo, o qual deve estar de acordo com as regras da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

Os inseticidas podem ser classificados em grupos distintos conforme o ingrediente ativo, sendo:

- *Organoclorados*: são compostos à base de carbono, com radicais de cloro. São derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno. Ex.: dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), aldrin, endossulfan, lindane.

Os inseticidas organoclorados foram muito utilizados na agricultura, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido, por serem de lenta degradação, com capacidade de acumulação no meio ambiente (podem persistir até 30 anos no solo) e em seres vivos, contaminando o homem diretamente ou por intermédio da cadeia alimentar, assim como por apresentarem efeito cancerígeno em animais de laboratório.

Os organoclorados são produtos derivados do petróleo, sendo pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, o que os torna mais tóxicos e de alta absorção cutânea. Alem da via dérmica, são também absorvidos por via digestiva e respiratória. Devido à grande lipossolubilidade e à lenta metabolização, esses compostos acumulam-se na cadeia alimentar e no tecido adiposo humano. A eliminação se faz pela urina, cabendo destacar também a eliminação pelo leite materno.

Embora o modo de ação dos inseticidas organoclorados não tenha sido claramente estabelecido, sabe-se que ele atua no canal de sódio, provavelmente mantendo-o aberto e desequilibrando as ligações de íons sódio e potássio dos axônios,

impedindo, assim, a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos. Potenciais de ação repetitivos são desencadeados quando a despolarização atinge um limite. Os insetos morrem devido a hiperexcitação. Seu efeito é inversamente proporcional à temperatura: quanto mais baixa a temperatura, mais tóxico é o DDT para os insetos (WARE, 2000).

- *Organofosforados*: Nesse grupo classificam-se os inseticidas em três subgrupos: os alifáticos (malation, vapona, vidrin, etc.); os derivados de fenil (etil e metil paration, fenitrotion, etc.); e os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil, etc.). São amplamente utilizados em Saúde Pública por apresentarem vantagens sobre os organoclorados como: são biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos. Apresentam, porém, como principal desvantagem, a baixa estabilidade química, o que torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação. Além disso, são mais tóxicos para os vertebrados que os organoclorados, mesmo em concentraçãos relativamente baixas (PALCHICK, 1996; WARE, 2000). O malation é um organofosforado muito utilizado na área da saúde por ser bastante eficiente, entretanto é mais tóxico para os vertebrados que os piretroides. Alguns desses compostos possuem toxicidade elevada, enquanto outros apresentam baixa toxicidade, como é o caso do temefós, usado no tratamento focal. Os organofosforados atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase, causando o aumento dos impulsos nervosos e, posteriormente a morte do inseto (BLOOMQUIST, 1996; BROGDON e MCALLISTER,1998a; BISSET, 2002).

O organofosforado temefós, registrado nos EUA em 1965, para utilização em agricultura e controle de mosquitos, é o único larvicida desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos, recomendado pela OMS para uso até em água potável.

Os organofosforados atuam inibindo a acetilcolinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso central. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição de AChE resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Consequentemente, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado,

desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto.

- Carbamatos: Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico. Entre os mais utilizados está o carbaril. Assim como os organofosforados, os carbamatos têm ação letal rápida sobre os insetos, apesar de baixa capacidade residual. São sistêmicos para as plantas, por serem relativamente solúveis em água.

Como os organofosforados, também inibem a AChE, embora, nesse caso, a reação envolvida seja a carbamilação. Apesar de atuarem de forma muito similar nos sistemas biológicos, apresentam duas diferenças principais em relação aos organofosforados. Primeiramente, alguns carbamatos são potentes inibidores da aliesterase (uma esterase alifática, cuja função exata é desconhecida) e apresentam seletividade pronunciada contra as AChE de certas espécies. A segunda diferença é que a inibição da AChE pelos carbamatos é reversível.

- *Piretroides*: Os piretroides sintéticos, atualmente bastante estáveis, são derivados de petróleo produzidos em laboratório, sendo análogos a substância natural, o piretro, extraído de crisântemos *Chrysanthmum* (pyrethrum) *cinenariaefolium*.

São biodegradáveis, não cumulativos e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos, embora possam causar hipersensibilização e irritação das mucosas nesses animais. Para os animais aquáticos, entretanto, são extremamente tóxicos. Os piretroides contam, ainda, com as vantagens de serem muito ativos (atuam em pequenas concentraçãos) e desalojantes. Sua única desvantagem consiste no custo elevado (PALCHICK, 1996). Os piretroides são inseticidas neurotóxicos que alteram o tempo de abertura dos canais de sódio durante a despolarização da membrana neural. Com amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em pequenas concentraçãos e baixa persistência no meio ambiente, esses compostos são praticamente atóxicos para mamíferos, quando comparados a outros inseticidas, o que constitui importante fator para que sejam bastante utilizados na área da saúde (BISSET, 2002; BLOOMQUIST, 1996; BROGDON e MCALLISTER, 1998b; FUNASA, 2001b). Outra vantagem dos piretroides é que podem ser utilizados juntamente com sinergistas, o que aumenta a eficácia das aplicações. Alguns piretroides, como é o caso da deltametrina, possuem o chamado efeito KD que consiste

em um tipo especial de resistência resultante de mutações nos canais de sódio, com redução da sensibilidade ao inseticida. Depois de pouco tempo expostos ao inseticida os insetos caem como se estivessem mortos e, posteriormente, conseguem se recuperar caso a concentração não tenha sido apropriada (BROGDON e MCALLISTER, 1998a). Esse tipo de resistência já foi verificado em ensaios de campo (SRINIVASAN e KALYANASUNDARAM, 2006) e em laboratório (PEREIRA DA-CUNHA et al., 2005).

Os piretroides apresentam uma evolução interessante, dividida em quatro gerações. A primeira continha um só produto, aletrina, lançado no mercado em 1949, cuja síntese era muito complexa e envolvia 22 reações químicas até o produto final. A segunda geração incluía tetrametrina (1965), resmetrina (1967), bioresmetrina (1967), bioaletrina (1969) e phonotrina (1973). A terceira geração incluía fenvalerato e oermetrina, surgidos entre 1972-1973, que se tornaram os primeiros piretroides com uso agrícola, em função de sua alta atividade inseticida e fotoestabilidade. Na quarta e atual geração, altamente efetiva em concentraçãos baixas, incluem-se bifentrina, lambdacialotrina, cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, flucitrinato, fluvalinato, praletrina, taufluvalinato, teflutrina, tralometrina e zeta-cipermetrina, todos estes inseticidas fotoestáveis (WARE, 2000).

Os piretroides apresentam modo de ação similar ao do DDT. Atuam, aparentemente, mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios. Há dois tipos de piretroides: aqueles que, entre outras respostas fisiológicas, têm um coeficiente de temperatura negativo, assemelhando-se ao DDT (tipo 1); e os que apresentam coeficiente de temperatura positivo (tipo 2), ou seja, a mortalidade dos insetos a eles expostos varia diretamente com o aumento da temperatura. Os piretroides afetam o sistema nervoso periférico e central do inseto: estimulam as células nervosas a produzir descargas repetitivas e, assim causam paralisia ou KD. O efeito estimulante dos piretroides é muito mais pronunciado que o do DDT (WARE, 2000).

- *Reguladores de Crescimento* - são substâncias químicas que interrompem o crescimento e o desenvolvimento do inseto, resultando eventualmente na sua morte. São divididos em dois grupos: inibidores da formação de cutícula e substâncias que alteram a ação de hormônios reguladores do crescimento:

a) Inibidores de síntese de quitina - A quitina é um polissacarídeo formado por unidades de N-acetil-glucosamina (com algumas D-glucosaminas) ligadas por ligações glicosídicas do tipo ß-1,4. A biossíntese de quitina envolve um processo de polimerização catalizado pela enzima quitina sintetase. Os inseticidas inibidores da formação de cutícula são: a) *ureias substituídas (acilureias* ou *benzoilfenilureias)* que parecem interferir com transporte de UDP-N-acetilglucosamina pela biomembrana e também afetam o metabolismo de ecdisteroides. Ex. diflubenzurom, flufenoxurom, penflurom e triflumurom. Outros sítios de ação também parecem estar envolvidos como apontado a seguir: b) *buprofezina*: interfere na deposição de cutícula e afeta metabolismo de ecdisteroides; c) *nikkomicina e DU 1911*: bloqueiam síntese de quitina (parecem agir na quitina sintetase); d) outros: MON-0585: interfere na esclerotização, a ciromazina afeta o metabolismo da epiderme interferindo com o processo de esclerotização da cutícula.

Os possíveis mecanismos de ação de inibidores da síntese de quitina são: a) inibição da quitina sintetase no último passo da biossíntese de quitina (i.e. polimerização da quitina) resultando na redução de formação de quitina; ex: diflubenzurom; b) ativação de quitinase, enzima presente no fluido de muda dos insetos responsável pela quebra da cutícula antiga para que seja reabsorvida: ex. diflubenzurom e clorfuazurom e; c) aumento da atividade da fenoloxidase, enzima envolvida no endurecimento e escurecimento de exocutícula; ex. diflubenzuron.

b) *Substâncias que afetam a ação de hormônios reguladores do crescimento* - *a*s principais substâncias responsáveis pela modificação na ação dos hormônios de crescimento nos insetos são: 1) juvenoides: são análogos dos hormônios juvenis (HJ). Causa efeito, principalmente, durante muda de larva a pupa (metamorfose incompleta), afeta o sistema endócrino e leva a morfogênese anormal (ex. metoprene, inibe liberação de PTTH do cérebro, inibe atividade da glândula protoráxica no início da ecdise no último estádio larval, mas a estimula antes da pupação. Afetam a reprodução interferindo na regulação de vitelogenina para os oócitos e afetam a embriogênese bloqueando o desenvolvimento do embrião (efeito ovicida). Os principais produtos são o metoprene, hidropreno, quinopreno, fenoxicarbe e piriproxifem; 2) anti-HJ: são

baseados no princípio da ação antagônica. Competem por receptores de HJ (ex. allatostatina e gonadotropina). Causam injúria da corpora allata (ex. precoceno) e interferem na síntese de HJ (principal modo de ação); 3) ecdisteroides: são agonistas da ecdisona de insetos. O principal grupo é o das diacilhidrazinas que tem como representantes o metoxifenozide (RH-2485) e tebufenozide (RH-5992). Esses compostos se ligam a receptores de ecdisona ou de ecdisteroides nas células epidérmicas induzindo as larvas a entrarem em um ciclo de muda prematura e letal.

2.4.1. FORMULAÇÃO DOS INSETICIDAS

A formulação permite que o produto seja utilizado de modo a atingir o alvo. É, portanto a maneira de transformar um produto técnico numa forma apropriada de uso. Para isso, empregam-se alguns artifícios, misturando-os com inertes, sólidos ou líquidos. Assim, de forma geral a formulação é: produto técnico ou puro + inerte + adjuvantes.

Inertes: São substâncias de baixo custo, neutras e que servem para diluir o inseticida puro, para que possa ser empregado na forma de pó, funcionando, portanto como veículo do inseticida. No Brasil existem numerosas substâncias que podem ser empregadas como tal: apatita, areia, argila calcinada, atapulgita, bentonita, calcita, caolim, enxofre, talco, diluentes vegetais (polpas, farinhas e resíduos vegetais diversos) etc. Um inerte pode ser bom para formulação pó seco e não ser bom para pó molhável ou vice e versa. Se for higroscópico será bom para pó molhável e ruim para pó seco. Quando o inerte não é neutro, ele pode degradar o inseticida, podendo ocorrer fracasso no controle das pragas.

Algumas formulações disponíveis para controle de mosquitos são:

Pó seco (P): ou simplesmente pó para polvilhamento das plantas ou animais ou ainda solos ou sementes. A formulação pó seco contém, geralmente, de 1 a 10% de ingrediente ativo. Sendo empregada pelos agricultores conforme vem das fábricas, não devendo ser concentrada, pois é perigosa para o aplicador. Assim as autoridades não permitem concentrações muitas elevadas, dependendo do produto.

Pó molhável (PM): nesta formulação o inseticida é misturado a um agente molhante, substância de elevado grau de absorção a fim de permitir que na mistura com água, forme suspensões estáveis. Esta formulação contém, geralmente, de 20 a 80% de ingrediente ativo. O inerte empregado neste caso deve ter grande capacidade de absorção. O produto é aplicado em suspensão aquosa e o veículo neste caso é a água. Ela ajuda a adesão do produto na folha, mas o sólido precisa ter pequena dimensão, sendo o ideal o inerte (e muitas vezes o inseticida), micronizado em "moinho de vento". A formulação PM apresenta menor problema de decomposição catalítica que o pó seco, por estar em concentração mais elevada. Alguns produtos que não se adaptam às formulações líquidas por falta de um solvente adequado, são preparados como PM para mistura com água. Resumindo, temos: pó molhável + água = suspensão.

Pó solúvel (PS): formulação de ingrediente ativo sólido, solúvel em água sob a forma moída ou de pequenos cristais que para ser utilizada no campo necessita ser dissolvida em água. Esta formulação contém, geralmente, de 50 a 90% de ingrediente ativo. São pouco frequentes os inseticidas que podem ser assim formulados, pois são raros os produtos solúveis em água. É a formulação ideal, uma vez que a mistura é perfeita. É o caso do cartap, metomil e triclorfon.

Granulados (G): os inseticidas são formulados na forma de pequenos grânulos. Esta formulação contém, geralmente, de 1 a 10% de ingrediente ativo. São empregados para o controle das pragas do solo, ou no caso de sistêmicos granulados, para controle de algumas pragas sugadoras da parte aérea das plantas, pois são absorvidos através da raiz e translocados para os brotos, folhas e frutos. Podem ser formulados para: isca formicida – para saúvas e quenquéns, possuindo uma baixa concentração do inseticida. As substâncias que funcionam como isca pode ser: bagaço de laranja, farinha de mandioca etc. Inseticida de solo – usado em concentração máxima de 10% devido à baixa DL_{50} do produto. Citam-se como exemplo: forate granulado, aldicarb, carbofuran, tiofanox, os três últimos carbamatos sistêmicos e; Tratamento de plantas – a cana-de-açúcar e o milho podem receber granulados para controle de certas pragas em sua

parte aérea, pois os grânulos ficam retidos nas axilas das folhas. Existem os granulados: clorpirifos, diazinon etc. A grande vantagem da formulação granulada é a maior facilidade de aplicação e a segurança que oferece ao usuário. Os grânulos precisam ser preparados em máquinas especiais e secos em estufa. Podem ser fabricados de várias maneiras; geralmente é feita uma massa, mas alguns produtos requerem a absorção do ingrediente ativo líquido na superfície do inerte granulado. Pode-se também dissolver o ingrediente ativo em um solvente volátil e aplicar a solução ao inerte, evaporando em seguida o solvente. A formulação moderna é a base de celulose, sendo conhecida como Biodac.

Concentrados emulsionáveis (CE) ou emulsão (E) ou emulsão concentrada (EC) ou dispersões aquosas: os inseticidas são dissolvidos em determinados solventes, em concentrações geralmente elevadas, adicionados a substâncias emulsificantes. Em mistura com água formam emulsões, geralmente de aspecto leitoso. Esta é a formulação líquida mais antiga. Além do emulsificante, contém o ingrediente ativo, solvente e às vezes um estabilizador ou ainda um antiespumante. Os solventes são derivados do petróleo. Os líquidos são mais eficientes que os sólidos, porque as gotas aderem melhor às folhas. Geralmente são menos lavados pelas chuvas, pois após certo tempo, penetram nos tecidos das plantas. Sua concentração varia de 5 a 100% do ingrediente ativo e sua aplicação exige mistura em água.

Soluções concentradas: existem dois tipos: para diluição em água ou óleo e soluções em VUB. Diversos inseticidas sistêmicos são soluções para diluição em água; ex: morfotion, monocrotofos, dicrotofos etc. Os produtos para diluição em óleo, geralmente são herbicidas, mas o dimetoato pode ser diluído em água ou óleo A formulação em VUB não deve receber diluição no campo. O produto é oleoso e exige aparelhamento especial para sua aplicação, sendo mais eficiente quando aplicado por via aérea sendo que a economia de mão de obra é considerável, pois o inseticida é aplicado em concentração elevada, usando, no máximo, 8 litros/ha. Poucos são os inseticidas autorizados para uso nesse processo, especialmente quando destinados à aplicação aérea, devido aos riscos de toxicidade que podem apresentar. São eles: malation,

fenitrotion, clorpirifos, dimetoato, carbaril etc. Mais recentemente surgiu a formulação eletrodinâmica, conhecida por formulação ED, a qual consiste na aplicação de produtos com pulverizadores especiais, cujas formulações em óleo recebem cargas elétricas, ao serem pulverizadas no alvo desejado. O volume a ser aplicado varia de 0,2 a 2,0 L/ha e o produto vem acondicionado em recipiente próprio, descartável ("*Bozzle*") com um bico que permite a vazão pré-determinada. As gotas pulverizadas, sendo dotadas de carga elétrica positiva, contrária a das folhas cuja carga é negativa, são atraídas por elas e se fixam sem perda no solo. As gotas atingem inclusive a face inferior das folhas.

Suspensões concentradas (SC): existe no comércio uma formulação denominada Sevimol. O produto é um preparado concentrado contendo basicamente, melaço + carbaril e água, controlando as pragas na fase adulta por ingestão. Pragas importantes como o curuquerê-do-algodão e a lagarta-da-maçã da mesma cultura podem ser controlados por esse processo.

Aerossóis: os inseticidas são embalados em recipientes para resistirem a pressões, pois juntamente com estes, colocam-se solventes altamente voláteis que em contato com o meio ambiente, evaporam-se, deixando os inseticidas em suspensão no ar, na forma de finíssimas partículas.

Gasosos: embora os inseticidas sejam encontrados no comércio, na forma líquida ou sólida, dentro de embalagens hermeticamente fechadas, a exclusiva ação fumigante dos mesmos, em contato com o ar, restringe o seu uso também para ambientes confinados. Algumas pragas de solo podem ser controladas com o uso da fosfina, na forma de pastilha. Quando se coloca esse produto a certa profundidade, nas proximidades do local da praga, em pouco tempo dá-se a fumigação do ambiente, não sendo fitotóxico. Também, podem ser utilizados no controle de cupins e brocas, fumigando-se objetos, como móveis e livros, em ambientes fechados.

Suspensão líquida "(*Flowable*)": formulação de ingrediente ativo sob a forma de uma dispersão de partículas sólidas micronizadas, em meio líquido, para uso no campo após

diluição em veículo líquido que pode ser água ou uma emulsão de óleo em água. Quando o veículo dispersante da formulação é somente água, ela é também designada "*flowable*". Se o veículo dispersante da formulação é óleo, ela passa a ser uma suspensão oleosa ou preparação oleosa. O carbofuran 350F para tratamento de sementes apresenta esta formulação e neste caso, é utilizado sem diluição em água ou óleo.

Pasta: formulação de ingrediente ativo sob forma pastosa, para ser utilizada sem diluição, sobre partes vegetais. Como exemplo, pode ser citado a fosfina em pasta utilizada para controle de coleobrocas.

Microencapsulada: formulação onde as partículas do inseticida são envolvidas por uma mesma parede fina e porosa composta de um material do grupo químico dos polímeros. Este revestimento é chamado microcápsula e permite a liberação mais lenta do produto com maior segurança ao aplicador. Usada principalmente para o controle de pragas em ambientes domissanitários. Ex. Demand 2,5. As formulações em pós molháveis, pós-solúveis, concentrados emulsionáveis, dispersões aquosas, suspensões líquidas, microencapsuladas e soluções concentradas, são aplicadas em pulverização por meio de água.

Fog ou Fogging: permite que o produto puro seja submetido a altas temperaturas, não ocorrendo a sua degradação, sendo usado para o controle de formigas cortadeiras em termonebulização. A eficácia de termonebulização do inseticida propoxur no controle de *Ae. aegypti* foi avaliada através de testes realizados no Município de São José do Rio Preto, SP. Estudos comparativos monitorados por mosquitos — *Culex quinquefasciatus* — presos em gaiolas, indicaram que o horário de aplicação do inseticida teve forte influência na mortalidade dos mosquitos, que não ultrapassou 43% quando as aplicações foram feitas entre 17 h e 17:30 h, enquanto que para as aplicações feitas após às 19 h a mortalidade média foi de 73%. Nos testes realizados à noite foi constatada uma mortalidade média não inferior a 95% nas gaiolas posicionadas em dependências com as portas e janelas abertas e naquelas onde as

portas e janelas estavam fechadas observou-se uma mortalidade média não superior a 13%. Mudando-se a concentração do inseticida de 1:12 para 1:9, a mortalidade dos mosquitos não diferiu de forma significativa (GEBARA e ALMEIDA, 1988).

2.5. CONCEITOS DE RESISTÊNCIA EM ARTRÓPODES

Não há uma definição exata para caracterizar o que é resistência de um artrópodo a uma ou várias classes de inseticidas.

Ball (1981) provavelmente foi o primeiro a definir resistência considerando a falha de um inseticida para controle de populações no campo, uma vez que o mesmo produto controlou adequadamente anteriormente. Essa definição pode facilmente ser estendida para outros materiais químicos ou biológicos usados para manejar uma doença, comportamento ou processo fisiológico.

Uma definição tradicional pode ser citada como “o desenvolvimento de uma linhagem capaz de sobreviver a concentrações letais para a maioria dos indivíduos em uma população normal” (FFRENCH-CONSTANT e ROUSH, 1990).

Outras definições de resistência: “um atributo desenvolvido em uma população de inseto como resposta ao tratamento contínuo com um inseticida” (BROWN e PAL, 1971); “uma modificação genética em resposta a seleção por um determinado inseticida que prejudica o controle de campo” (SAWICKI, 1987); “uma adaptação evolutiva recente a mudanças ambientais, ocorrendo em menos de um século, em resposta a aplicações sequenciais de inseticidas químicos” (CUI, 2006); “uma resposta quantitativa, em populações de uma espécie de artrópodo, com bases genéticas e modificações moleculares, bioquímicas ou comportamentais” (ROBERTSON et al., 2007) e; “seleção de uma característica hereditária em uma população de inseto que resulta em repetidas falhas de um inseticida no controle conforme o nível desejado” (NAUEN e McCAFFERY, 2010).

No entanto, é importante ressaltar que resistência é diferente de tolerância. Essa é uma habilidade natural de uma população resistir ao efeito tóxico de um inseticida particular, podendo ser desenvolvida entre uma geração como resultado de adaptação fisiológica, por exemplo, indução enzimática. Nesse caso, a tolerância é perdida quando os insetos deixam de ser expostos ao inseticida por um longo período. A resistência é

herdada geneticamente, sendo que indivíduos resistentes estão em uma população natural de um inseto e o gen da resistência pode ser selecionado por pressão com um inseticida.

2.5.1. ALGUNS TIPOS DE RESISTÊNCIA

2.5.1.1. RESISTÊNCIA BIOQUÍMICA

Apesar dos muitos estudos documentados sobre a resistência, o número de mecanismos envolvidos é bastante pequeno incluindo diminuição da taxa de penetração pela cutícula, detoxificação metabólica aumentada e diminuição da sensibilidade do sítio alvo. Todos esses mecanismos são inespecíficos e, geralmente, conferem resistência cruzada a outro inseticida estruturalmente relacionado (FERRARI, 1996).

2.5.1.2. REDUÇÃO NA TAXA DE PENETRAÇÃO DO INSETICIDA

Este mecanismo de resistência, associado a vários insetos, foi estudado na mosca doméstica. Quando comparado com outros mecanismos, é considerado de importância secundária por conferir, tão-somente, um baixo nível de resistência (OPPENOORTH, 1985). Não obstante, em combinação com outros mecanismos, pode resultar em um incremento da resistência. A base bioquímica da redução da taxa de penetração de um inseticida não está clara, embora tenha sido proposto que a composição protéica do tegumento tenha papel relevante.

2.5.1.3. RESISTÊNCIA METABÓLICA

Há muitos casos descritos de resistência decorrentes do aumento da capacidade de metabolização de inseticidas, que leva à formação de produtos menos tóxicos. O incremento do metabolismo pode ser o resultado de alteração, seja da enzima existente, tornando-a mais eficaz na degradação dos inseticidas, seja dos mecanismos reguladores, que aumentam a produção de moléculas de enzimas já disponíveis em insetos susceptíveis, embora em quantidades muito pequenas (BROGDON e MCALLISTER, 1998b; FERRARI, 1996).

Geralmente, as enzimas envolvidas no metabolismo de inseticidas podem ser

divididas em enzimas de Fase 1 e enzimas de Fase 2. As enzimas de Fase 1 reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, introduzindo um grupo polar reativo na molécula, o que dá origem a substrato para as enzimas de Fase 2. A detoxificação que contribui para a resistência a inseticidas é realizada por enzimas de Fase 1, como as monooxigenases e esterases, ou de Fase 2, caso das glutationa s-transferases.

Monooxigenases - O metabolismo oxidativo aumentado é implicado como o principal mecanismo de resistência para todas as classes de inseticidas, com exceção dos ciclodienos, e é um dos mecanismos mais comuns de resistência. As enzimas associadas com o metabolismo oxidativo aumentado são as monooxigenases dependentes de citocromo P450 especialmente concentradas no intestino, no corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi dos insetos.

Evidência inicial do envolvimento de metabolismo oxidativo com a resistência pode ser obtida com a adição, em bioensaios com inseticidas, de inibidores de oxidases, como o butóxido de piperonil (que atua, aqui, como sinergista). Nesses casos, avalia-se a capacidade do sinergista de reduzir a magnitude da resistência. Embora essa técnica não seja conclusiva, é valiosa como uma primeira indicação de que o aumento da atividade de monooxigenases está contribuindo para a resistência (BERGÉ et al., 1998; SCOTT, 1999).

Esterases - Vários inseticidas que contém o grupamento éster na sua estrutura química (organofosforados, carbamatos e piretroides) são susceptíveis à reação de hidrólise. As enzimas que catalisam essas reações são coletivamente chamadas de hidrolases ou esterases. São também chamadas carboxilesterases quando hidrolisam compostos que apresentam ésteres carboxílicos na estrutura, como a maioria dos organofosforados, que são ésteres de ácido fosfórico. O envolvimento das esterases com a resistência pode ser verificado com a adição de inibidores em ensaios com os inseticidas, como o S,S,S-tributil fosforotioato (BROGDON e MCALLISTER, 1998a; HEMINGWAY e KARUNARATNE, 1998).

Glutationa S-transferases (GST) - São enzimas multifuncionais capazes de detoxificar um grande número de inseticidas. Essas enzimas catalisam a conjugação do grupo hidrofílico SH da glutationa reduzida (GSH) ao centro eletrofílico de compostos

lipofílicos (HEMINGWAY e RANSON, 2000). Várias formas dessas enzimas são conhecidas em mosquitos, mosca doméstica, *Drosophila* e outros insetos (CLARK et al, 1984; CLARK et al, 1985; TOUNG et al, 1990).

Alteração do sítio-alvo - Resistência de uma população de insetos pode ser decorrente de alteração desses sítios, de forma a impedir – ou dificultar – a ligação com o inseticida.

Acetilcolinesterase (AchE) - É o sítio-alvo de organofosforados e carbamatos. Essa enzima é a responsável pela degradação de acetilcolina, neurotransmissor que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Em situação normal, após a cessação do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptação ou por degradação enzimática, sendo a acetilcolinesterase a enzima responsável. Organofosforados e carbamatos atuam inibindo a AChE e, em consequência, a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso não cessa, levando o inseto à morte. Nestes casos, a resistência está relacionada com afinidade reduzida da AChE pelo inseticida, o que permite a interrupção normal – ou quase – do estímulo nervoso (FERRARI, 1996; FFRENCH-CONSTANT et al., 1998; HEMINGWAY e RANSON, 2000).

Canais de sódio - São os principais sítios-alvo dos piretroides e de alguns organoclorados [como os difenil-alifáticos (DDT) e o hexaclorociclohexano (BHC)]. A ligação desses inseticidas mantém os canais de sódio na conformação aberta e, consequentemente, há propagação contínua do impulso nervoso, levando o inseto à morte. A resistência é resultante de sensibilidade reduzida do canal de sódio a esses compostos (BLOOMQUIST, 1996; HEMINGWAY e RANSON, 2000). Mais conhecido como mecanismo KD, esse tipo de resistência ao DDT e aos piretroides foi registrado para várias espécies (VAIS et al., 2000), mas é mais bem caracterizado em moscas domésticas, para as quais diversas variantes de KD são descritas inclusive o fator super-KD (FARNHAM et al., 1987).

Por causa da resistência cruzada entre DDT e piretroides, ensaios biológicos que identificam resistência a ambas as classes de inseticidas podem ser úteis como um indicador de resistência do tipo KD.

Receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) - São o sítio-alvo dos ciclodienos e organoclorados. Pertencem a uma superfamília de receptores presentes nas junções sinápticas do sistema nervoso central e das sinapses neuromusculares de insetos. Os inseticidas atuam sobre os receptores de GABA, impedindo a entrada de íons cloro para o meio intracelular e, com isso, provocando a emissão de impulsos espontâneos que levam à contração muscular, convulsões, paralisia e morte. A resistência, ocasionada por insensibilidade do receptor de GABA aos inseticidas, já foi associada com mutação de um único par de bases do receptor, ocasionando substituição de um aminoácido (alanina por serina) (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

2.6. ASPECTOS DA RESISTÊNCIA COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

A resistência em populações de vetores é dependente do volume e frequência de aplicações de inseticidas e as inerentes características da espécie do inseto envolvida. Espécies cujo ciclo de vida é rápido, produzindo várias gerações em pouco tempo, tendem a adquirir resistência rapidamente e vice versa para as espécies cujo ciclo de vida é lento.

O desenvolvimento de métodos padronizados WHO permitiu o aumento de confirmações de casos de resistência a partir de 1957, principalmente entre os anofelinos. Entre os principais inseticidas utilizados nessa época (DDT, dieldrin e organofosforados), o aumento nos casos de resistência entre 1956 e 1969 foi de 32%, sendo que várias espécies de baratas e mosquitos desenvolveram resistência aos três inseticidas.

Desde que o DDT foi descoberto com efetivo poder inseticida, foi possível diminuir e até mesmo erradicar insetos transmissores de doença. No entanto, o efeito da resistência surtiu efeitos devastadores em Saúde Pública.

Inicialmente, o uso de DDT para controlar a mosca doméstica na Itália teve grande sucesso em 1946, fazendo com que houvesse diminuição de gastroenterite. Porém, o início da resistência ao DDT em 1947 resultou no recrudescimento da doença e a taxa de mortalidade infantil voltou a aumentar. Em 1949, a mosca doméstica também já estava resistente ao DDT na Palestina, resultando no aumento da incidência

de disenterias, tracomas e conjuntivites. A redução de infecções por *Shigella* e seu efeito no controle de diarréias na Geórgia, Estados Unidos, foi completamente anulado pela resistência das moscas ao DDT e ao dieldrin em pouco mais de um ano de aplicação A redução dos casos de conjuntivite aguda obtida pelo tratamento larval com organoclorados no Egito não persistiu além de 1950, quando ocorreu a resistência de *Musca domestica vicina* (LINDSAY et al., 1953).

Para o controle de mosquitos, o DDT foi introduzido em 1946. No entanto, já em 1947 ocorreram os primeiros casos de resistência a esse inseticida em *Aedes tritaeniorhynchus* e *Aedes solicitans* (BROWN, 1986). Desde então, mais de 100 espécies de mosquitos foram relatadas como resistente a um ou mais inseticidas, sendo que mais de 50 dessas espécies são anofelinos (WHO, 1992).

A resistência causou um grande impacto nas campanhas de controle da malária. Em 1955 a WHO propôs o programa de erradicação global dessa doença, utilizando o inseticida residual DDT aplicado nas casas. No entanto, tal euforia finalizou em 1976 quando a WHO mudou, oficialmente, o discurso de erradicação para controle da malária, sendo que a maior causa da mudança foi a ocorrência da resistência ao inseticida de escolha (HEMINGWAY e RANSON, 2000). As falhas no efeito do DDT sobre *Anopheles sacharovi* na Grécia foi observado em 1951 e o gradual e constante acúmulo de resistência a esse inseticida e ao dieldrin resultou na persistência do *Plasmodium vivax* por quase 15 anos após o início das aplicações nas casas. Nos anos de 1956 a 1958, o desenvolvimento da resistência ao dieldrin pelo *Anopheles gambiae*, após aplicações nas paredes das casas, resultou em falha na redução da transmissão da malária na Nigéria e várias outras partes do Oeste da África. Nas áreas de savana, onde as casas são feitas de paredes de barro, a aplicação de DDT foi ineficaz devido a perda por absorção e a resistência ao dieldrin prejudicou a esperança de que os inseticidas clorados pudessem interromper a transmissão naquelas áreas.

As consequências da resistência do *Anopheles stephensi* se tornaram sérias em vários países do Oriente Médio. No Iraque, várias epidemias de malária se seguiram após a aparição da resistência ao DDT e ao dieldrin em 1957 (GRAMICCIA et al., 1958). Na Índia, a resistência do *Anopheles culicifacies* ao dieldrin resultou em um surto de malária em 1958 e levou ao abandono das aplicações contra *Anopheles sundaicus*,

resultando também em surtos em 1960. Nessas espécies, bem como em *Anopheles pharoensis*, *An. stephensi* e *Anopheles albimanus*, a resistência passou a ser cruzada para o DDT e dieldrin. No Egito, a pré-existência de resistência do *An. pharoensis*, produzida por inseticidas aplicados na agricultura ditou o uso de organoclorados quando a campanha de erradicação da malária iniciou em 1966.

Nas Américas, a resistência cruzada de *An. albimanus* tem impedido a erradicação da malária em El Salvador e países vizinhos. Semelhantemente, a erradicação não pôde ser completa no México, onde *Anopheles pseudopunctipennis* adquiriu tolerância ao DDT, bem como ao dieldrin. Na Venezuela, a resistência ao Dieldrin por *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitarsis* resultou na persistência da malária.

Além disso, resistência tem desempenhado um papel importante em dificultar as campanhas de controle do *Ae. aegypti* nas Américas. Na década de 1950, países como México e Brasil, que estavam livres do mosquito vetor da dengue, foram reinfestados com linhagens resistentes ao dieldrin e DDT. Quanto aos organofosforados, foi encontrado tolerância ao malation e também ao temefós.

A resistência também ocasionou falha no controle do *Culex pipiens fatigans*, transmissor da filariose. O problema maior foi a ocorrência de tolerância natural ao DDT nas populações de mosquitos, o que levou, consequentemente, a resistência.

Analisando o panorama geral da resistência, considera-se que as falhas no controle estão ocorrendo mesmo antes do reconhecimento da resistência. Pois, a aplicação de produtos sem a devida atenção as concentrações corretas, aplicações em intervalos de tempo pequenos, impedindo o fluxo gênico entre as populações, e o uso continuado de um mesmo ingrediente ativo, tem proporcionado a ocorrência de resistência. Isso leva a custos exorbitantes nos programas de controle além de investimentos urgentes no desenvolvimento de novos produtos.

A Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *Ae. aegypti* a Inseticidas foi instituída em 1999 pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) visando organizar e sistematizar atividades para o monitoramento da resistência do *Ae. aegypti* aos inseticidas utilizados no país. Inicialmente foram realizados bioensaios expondo larvas a concentração diagnóstico do temefós (FUNASA, 2000, 2002; OMS, 1981).

Entre 1999 e 2000, foram avaliadas populações de *Ae. aegypti* de 67 municípios do país, tendo sido detectada resistência ao temefós, principalmente, em municípios das Regiões Sudeste e Nordeste. Posteriormente, foram realizados ensaios do tipo concentração-resposta para quantificar a resistência detectada e estudos bioquímicos para determinar os mecanismos envolvidos na resistência. Mais recentemente cerca de 80 municípios do país vêm sendo avaliados bianualmente. A resistência ao temefós tem sido detectada em muitas das populações avaliadas e em todas as regiões do país (BRAGA et al., 2004; LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 2003).

No Brasil, para monitoramento da resistência a piretroides em indivíduos adultos, é utilizado protocolo do CDC (BROGDON e MCALLISTER, 1998a) para bioensaios com garrafas impregnadas e protocolo da WHO para bioensaios com papel impregnado (WHO, 1981). O primeiro tem o objetivo de avaliar o período gasto pelo inseticida para penetrar no mosquito, atravessar os tecidos intervenientes, atingir o sítio alvo e atuar em mosquitos expostos a garrafas impregnadas com o produto avaliado. Também é possível avaliar a concentração adequada para matar a população dos mosquitos estudados. PEREIRA-DA-CUNHA et al. (2005) realizaram algumas modificações no procedimento de avaliação para diferir efeito KD de mortalidade nesse ensaio. Os bioensaios com papel impregnado também avaliam a susceptibilidade dos insetos ao produto testado, sendo realizados com papéis impregnados com inseticida colocados dentro de tubos plásticos cilíndricos (WHO, 1981).

No entanto, alguns fatores são determinantes para a realização de avaliações de susceptibilidade em populações de campo como, por exemplo: 1) As características dos programas de controle anteriores, onde são estudadas a freqüência de aplicação do inseticida (havendo aplicações em maior número em cada geração do inseto alvo, haverá consequentemente o aumento da pressão de seleção; a porcentagem tratata da população do inseto alvo (tratando alta porcentagem da população resultará em poucos indivíduos susceptíveis com domínio de indivíduos resistentes); os tipos de inseticidas utilizados (inseticidas com maior residual proporcionam maior pressão de seleção, além da possibilidade de ocorrência de resistência cruzada). 2) As características do inseto alvo como número de gerações/ano, número de descendentes, estágio de vida exposto, proporção da população exposta e porcentagem da vida do inseto que estará exposta

ao inseticida; 3) Inseticidas advindos da agricultura onde, populações de campo são expostas diretamente a aplicações desses inseticidas e indiretamente no próprio local de criação (ex., mosquitos que utilizam campo de arroz como criadouro) (USAEHA, 1992).

2.7. HISTÓRICO DA RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* A INSETICIDAS

A resistência do mosquito vetor da dengue e febre amarela foi relatada pela primeira vez em 1950 quando *Ae. aegypti*, de Plum Mitan em Trinidad, não morreram após o tratamento com DDT. Inicialmente, larvas e adultos susceptíveis ao DDT eram controlados, sendo que a Concentração Letal Mediana (CL_{50}) para linhagem de campo era de 0,01 ppm para larvas e 1,0% para adultos em uma hora e 24 h pós-exposição. A CL_{50} modificou, sendo que em Aranguez e El Socorro ocorreram concentrações de 9 ppm, em Carupano e Caracas, ocorrem 0,5 ppm e 5 ppm, respectivamente. Em 1964, todas as populações na Venezuela eram DDT-resistentes. Testes feitos em vários pontos de Porto Rico revelou que a CL_{50} de DDT foi de 0,5 ppm em 8 das 13 populações e, nas Ilhas Virgens, a CL_{50} excedeu 2,5 ppm. Nos Estados Unidos, *Ae. aegypti* foi DDT-susceptível até 1960, quando ocorreu tolerância em Miami. Nos anos seguintes, outras localidades foram encontradas com larvas tolerantes, assim como para os adultos de Alabama e Georgia (BROWN e PAL, 1971).

Field et al. (1984) avaliaram a atividade de esterases em ambos os sexos de *Ae. aegypti* tolerante e susceptível ao malation. Concluíram que houve uma correlação entre a banda 6 de esterase e os indivíduos tolerantes.

Três organofosforados - malation, folition e temefós e dois piretroides - alfametrina e deltametrina – foram usados para o monitoramento da susceptibilidade de larvas e adultos de seis espécies de mosquitos vetores. Adultos de *Ae. aegypti* foram 100% susceptíveis a concentração discriminante de malation e larvas demonstraram resistência aos piretroides (DORTA et al., 1993).

A susceptibilidade de *Ae. aegypti* de Townsville, Austrália, foi avaliada. Os bioensaios larvais demonstraram diminuição na susceptibilidade a organofosforados (malation, fenitrotion, fention e clorpirifós) e ao propoxur. Na comparação com os resultados da linhagem susceptível Rockefeller, houve confirmação da resistência ao

malation e fention. Os bioensaios com adultos demonstraram mudança na susceptibilidade a deltametrina, permetrina, fenitrotion, malation e propoxur (CANYON e HII, 1999).

Alguns resultados do programa de monitoramento de susceptibilidade aos inseticidas utilizados no controle do *Ae. aegypti* no Estado de São Paulo foram apresentados por MACORIS et al. (1999). Avaliações de susceptibilidade ao temefós e fenitrotion têm sido feitas e os resultados demonstraram que, para a concentração diagnóstica, todas as populações foram susceptíveis, exceto Campinas, na qual houve uma leve alteração para o temefós.

Wirth e Georghiou (1999) avaliaram a susceptibilidade ao temefós em larvas de populações de ilhas britânicas em encontraram resistência. Além disso, foi encontrada alta resistência cruzada a permetrina e níveis mais baixos a outros organofosforados e carbamatos.

Coto et al. (2000) determinaram o nível de susceptibilidade de *Ae. aegypti* em alguns países da América Latina (Cuba, Venezuela, Costa Rica e Jamaica) e encontraram todas as populações susceptíveis ao malation, sugerindo a continuidade do uso desse inseticida nos programas de controle do vetor da dengue nesses países.

Campos e Andrade (2001) avaliaram a susceptibilidade ao temefós em larvas de área não sujeita a pressão de seleção – Campinas, SP – e outra área sujeita a pressão – Campo Grande, MS. Os resultados demonstraram que pode ocorrer resistência a população de Campinas, que recebeu a concentração diagnóstico de 0,04 ppm. A população de Campo Grande foi totalmente susceptível ao inseticida usado nos bioensaios.

Bioensaios com malation foram feitos com adultos de populações do Sri Lanka expostos ao inseticida em papel impregnado na concentração de 5% v/v. Os resultados demonstraram que *Ae. aegypti* foi susceptível, provavelmente pelo baixo nível de exposição, porque as aplicações de inseticidas nessa localidade são feitas tratando-se as paredes com o organofosforado (KARUNARATNE e HEMINGWAY, 2001).

Bisset et al. (2003) determinaram os níveis de resistência de adultos (papel impregnado) e larvas a organofosforados e piretroides de duas localidades no Panamá. Os resultados permitiram demonstrar que as larvas foram resistentes nas duas

localidades somente ao pirimifós-metil e susceptível para os outros inseticidas testados. Os adultos demonstraram susceptibilidade.

Macoris et al. (2003) detalha que o uso de inseticidas organofosforados no Estado de São Paulo iniciou na metade da década de 1980. Em 1996 iniciou-se o programa de monitoramento de susceptibilidade do *Ae. aegypti* e avaliações em larvas de populações desse Estado, utilizando temefós e fenitrotion, foram realizadas. Dentre as populações avaliadas, somente Marília e Presidente Prudente foram susceptíveis para ambos inseticidas. A população de Bauru foi susceptível ao temefós e a de Campinas ao fenitrotion. Alteração na resposta foi encontrada para as outras cinco populações avaliadas e somente para uma, Santos, houve resistência para ambos inseticidas.

Rodriguez et al. (2003) fizeram pressão de seleção para evolução da resistência ao malation em uma linhagem de campo de Santiago de Cuba, por meio de bioensaios em larvas. Posteriormente foram feitos bioensaios com outros inseticidas para determinação de resistência cruzada. Os resultados demonstraram que não houve resistência cruzada para o organofosforados fention, temefós e fenitrotiom. No entanto, houve elevado nível de resistência para os piretroides lambdacialotrina, cipermetrina e ciflutrina.

De acordo com os dados do Programa Integrado de Monitoramento da Resistência do *Ae. aegypti*, larvas dessa espécie tem sido avaliadas quanto a susceptibilidade ao temefós em 12 municípios dos Estados de Rio de Janeiro, Alagoas e Sergipe. Os resultados têm demonstrado que há resistência em todas as localidades estudadas, com porcentagem de mortalidade menor do que 62% (BRAGA et al., 2004).

O monitoramento da resistência tem sido feito em adultos de populações brasileiras, no período de 2001 a 2003, ao piretroide cipermetrina, utilizando o método da garrafa. Analisando a mortalidade e KD, observou-se uma leve alteração na susceptibilidade, sendo mais relevante na cidade do Rio de Janeiro. O mecanismo de resistência foi incriminado como sendo alteração no sítio de ligação (DA-CUNHA et al., 2005).

Em 2005, Dorta et al. avaliaram a susceptibilidade de *Ae. aegypti* adultos da cidade de Havana, Cuba, aos inseticidas lambdacialotrina, cipermetrina e clorpirifós e

determinaram que essa população foi susceptível aos inseticidas.

Avaliação de susceptibilidade tem sido feita em adultos e larvas em quatro áreas atingidas pelo tsunami na Tailândia. Bioensaios larvais com temefós demonstraram susceptibilidade, exceto para uma área onde ocorreu tolerância. Os bioensaios com papel impregnado em adultos, em todas as áreas não ocorreu resistência ao fenitrotion, mas ocorreu para os piretroides permetrina, ciflutrina e deltametrina (PAEPORN et al., 2005).

O método da garrafa foi utilizado para determinação de resistência ao temefós em adultos de seis locais diferentes na Tailândia. Esse método determina o tempo de mortalidade, sendo que somente para um local houve diferença significativa entre a população de campo e a de laboratório, usado como referência, significando resistência (SAELIM et al., 2005).

Na China, o DDT e o BHC foram aplicados desde 1950 até 1983, quando sua produção foi proibida e *Ae. aegypti* demonstrou resistência. Já, apesar de malation ser usado mais frequentemente na agricultura, a pressão de seleção em *Ae. aegypti* tem ocorrido, levando a resistência na China. Além disso, os bioensaios tem demonstrado que há resistência e tolerância aos piretroides deltametrina e permetrina na China (CUI et al., 2006).

Lima et al. (2006) avaliaram a susceptibilidade de larvas ao temefós no Estado do Ceará, Brasil, sendo que em todas a localidades onde foram coletados as populações para as avaliações, houve forte resistência, com razão de resistência entre 8 e 16, quando comparado com a população Rockefeller susceptível.

Macoris et al. (2007) avaliaram a susceptibilidade de populações brasileiras a concentração diagnóstica (0,8% i.a./1h) de malation, utilizando o método do papel impregnado. Dentre as 17 populações avaliadas, cinco foram consideradas resistentes.

Montella et al. (2007) estudaram os mecanismos bioquímicos de resistência de larvas ao temefós de várias regiões do Brasil no período de 2001 a 2004. As alterações ocorreram entre as enzimas α e β-esterase em todas as populações estudadas e a glutationa S-transferase sofreu alteração somente na região norte do país.

Rodriguez et al. (2007) avaliaram a susceptibilidade de oito populações de países da América Latina a organofosforados e piretroides Os bioensaios larvais

demonstraram que, exceto para Nicarágua e Venezuela, a resistência foi alta para temefós. Já, para malation, fention e fenitrotion, houve susceptibilidade em todas as populações testadas. Quantos aos piretroides, houve resistência moderada nas populações da Jamaica e Costa Rica a ciflutrina e alta resistência de Peru e Venezuela a deltametrina.

Wondji et al. (2008) encontraram dois alelos mutantes no gene do canal de sódio consistindo no sítio alvo para DDT e piretroides. Essa mutação levou a resistência ao KD de *Cx. quinquefasciatus* em populações do Sri Lanka.

Garcia et al. (2009) tem detectado o aumento na freqüência de alelos de resistência a permetrina em *Ae. aegypti* no México a partir de populações coletadas entre 1996 e 2009.

Luz et al. (2009) utilizando modelos matemáticos concluíram que aplicação contínua de inseticica larvais e adulticidas e utilização de armadilhas letais durante um ano são suficientes para aumentar, de forma preocupante, a resistência de uma população local de *Ae. aegypti*.

Alvarez et al. (2010) analisaram a resistência de quatro populações de *Ae. aegypti* a deltametrina e as enzimas associadas a tal situação na Venezuela, utilizando o método da garrafa e ensaios bioquímicos e encontraram que três populações foram resistentes com um excedente da enzima glutaniona-s-transferase.

Serrano e Goenaga-Olaya (2010) avaliaram a susceptibilidade de quatro populações de *Ae. aegypti*, utilizando o método da garrafa, a ciflutrina e a permetrina na Colômbia e encontraram que todas as populações foram susceptíveis a esses piretroides.

Silva et al. (2010) utilizaram métodos bioquímicos para identificar os mecanismos de resistência de sete populações de *Ae. aegypti* do México, sendo que as taxas de resistência variaram entre 103 e 6753 vezes para D-fenotrina, permetrina, deltametrina, lambdacialotrina, bifentrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina e z-Cipermetrina sendo que as enzimas envolvidas no processo de resistência foram as esterases com maior freqüência, além de glutationa-s-transferase e oxidases.

Roldan e Brochero (2010) avaliaram a susceptibilidade de sete populações de *Ae. aegypti* da Colômbia, utilizando o método da garrafa, ao DDT e aos piretroides

lambdacialotrina, deltametrina, ciflutrina e permetrina, sendo que todas as populações demonstraram resistência ao DDT, a lambdacialotrina e permetrina.

Flores et al. (2010) analisaram a susceptibilidade de sete populações de campo de *Ae. aegypti* do México, a nove piretroides, utilizando o método da garrafa. Os autores encontraram alta resistência ao KD a oito compostos avaliados, exceto para bifentrina.

Larvas de oito populações de *Ae. aegypti* de Trinidad e Tobago foram avaliados quanto a susceptibilidade ao temefós, malation e fention utilizando-se o método da garrafa. A susceptibilidade variou entre as populações sendo que para algumas houve alta resistência a três inseticidas avaliados enquanto para outras não houve resistência, incorrendo os autores a concluir que tais variações na susceptibilidade estão relacionadas a erros na aplicação dos inseticidas em campo (POLSON et al., 2010).

Wan-Norafikah et al. (2010) estudaram o status de resistência a permetrina de uma linhagem de laboratório, uma linhagem selecionada para resistência a permetrina e três linhagens de campo de *Ae. aegypti* de Kuala Lumpur, Malásia. As avaliações foram feitas utilizando os métodos propostos por WHO para bioensaios com larvas e adultos, além de ensaios enzimáticos para a enzima oxidase. Os valores de resistência para a população selecionada e para as de campo variaram entre 1,86 a 5,57 vezes, além do que houve aumento na CL_{50} para todas as populações estudadas.

Um total de 13 populações de *Ae. aegypti* da Colômbia foram avaliadas quanto a susceptibilidade a deltametrina e lambacialotrina e ao DDT, além da identificação dos mecanismos bioquímicos associados a resistência. Utilizou-se o método do papel e garrafas impregnados e nas populações reconhecidas como resistentes utilizou-se os métodos enzimáticos para esterases, oxidases e acetilcolinesterases. Os resultados demonstraram que todas as populações foram resistentes ao DDT e a resistência a lambdacialotrina foi evidente na maioria das populações do que para deltametrina. Os métodos bioquímicos demonstraram que sete das 11 populações tiveram elevada concentração de esterases e somente uma demonstrou elevado nível de oxidase. Também foi encontrada resistência cruzada entre DDT e lambdacialotrina (VARON et al., 2010).

No Estado de Atlantico, Colômbia, populações de *Ae. aegypti* foram avaliadas

quanto a susceptibilidade a diversos inseticidas utilizados na últimas três décadas para controle em campo. Os resultados demonstraram que todas as populações foram susceptíveis ao malation e a deltametrina, cinco populações ao fenitrotion, quatro ao propoxur e duas a lambdacialotrina demonstrando que as aplicações de inseticidas em campo não têm afetado significativamente a susceptibilidade do vetor da dengue nessa localidade (MAESTRE et al., 2010).

Rivero et al. (2010) analisaram qual a importância da resistência no controle de mosquitos. Os autores consideraram algumas modificações fisiológicas como, diminuição da longevidade do vetor, diminuição na infecciosidade ou mudança de comportamento, todas as quais irão reduzir a capacidade vetorial do inseto e dessa forma a resistência será um fator positivo. No entanto, a resistência a inseticidas pode ter o efeito contrário, aumentando a capacidade vetorial, o que pode levar a um aumento dramático na transmissão da doença e assim a resistência se torna um fator negativo para o controle.

Populações de *Ae. aegypti* de Trinidad e Tobago foram avaliadas quanto a susceptibilidade ao DDT, permetrina e deltametrina utilizando-se o método da garrafa. Todas as populações demonstraram resistência ao DDT, duas populações demonstraram resistência inicial a deltametrina e três a permetrina. Exceto três populações, todas demonstraram elevação no nível de beta-esterases e glutationa-S-transferase, além de resistência a KD (POLSON et al., 2011).

Chuaycharoensuk et al. (2011) avaliaram a susceptibilidade de 32 populações de *Ae. aegypti* e cinco de *Aedes albopictus* da Tailândia, por meio do método do papel impregnado, a permetrina, deltametrina e lamdacialotrina. Todas as populações de *Ae. aegypti* e quatro de *Ae. albopictus* demonstraram resistência a permetrina. A maioria das populações de *Ae. aegypti* demonstraram susceptibilidade a deltametrina e todas as populações foram susceptíveis a lambdacialotrina.

Populações do Ceará foram avaliadas quanto a susceptibilidade ao temefós e a cipermetrina sendo que os resultados demonstraram que as três populações avaliadas estão resistentes ao temefós e somente duas estão resistentes ao cipermetrina (LIMA et al., 2011).

Na Colômbia foi avaliada a susceptibilidade de 12 populações de *Ae. aegypti*

como parte do programa “Rede Nacional de Vigilância da Resistência a Inseticidas”. Os bioensaios foram feitos utilizando os métodos da WHO e CDC e os resultados demonstraram susceptibilidade de todas as populações ao malation, deltametrina e ciflutrina e alta resistência ao DDT e etofenprox. Ocorreu também uma resistência moderada a lambdacialotrina, permetrina e fenitrotion em duas populações. Os ensaios bioquímicos demonstraram altos níveis de monoxigenase P450 e esterases não específicas (FONSECA-GONZALEZ et al., 2011).

Populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* da África Central foram avaliadas quanto ao nível de resistência a inseticidas utilizados em aplicações no campo. Os bioensaios larvais demonstraram que ambos os vetores são susceptíveis ao temefós. A resistência foi encontrada por meio de bioensaios com adultos, ocorrendo tal condição fisiológica em uma população de *Ae. aegypti* e duas populações de *Ae. albopictus* ao DDT e deltametrina. Não foi encontrado aumento no tempo de KD (KAMGANG et al., 2011).

Em Bangkok, Tailândia, foram coletadas larvas de *Ae. aegypti* em casas de pacientes infectados com dengue, sendo que essas foram avaliadas quanto a susceptibilidade ao temefós. Adultos foram obtidos e avaliados quanto a susceptibilidade a três piretroides, malation e DDT. As larvas não demonstraram resistência, porém, os adultos foram altamente resistentes ao malation e ao DDT e algumas populações demonstraram resistência a deltametrina e permetrina (KOMALAMISRA et al., 2011)

Ae. aegypti foi submetido a pressão de seleção com malation por 45 gerações aumentando o nível de resistência em 52,7 vezes para adultos e 3,24 vezes para larvas. Testes de resistência cruzada demonstraram alta resistência ao DDT e fenitrotion, resistência moderada ao propoxur, tolerância a permetrina e lamdacialotrina e baixa resistência a ciflutrina (HIDAYATI et al., 2011).

A susceptibilidade de *Ae. aegypti* de três locais da cidade de Abidjan na Costa do Marfim foi avaliada para permetrina, deltametrina, lambdacialotrina e propoxur. Foi encontrada susceptibilidade aos piretroides e resistência ao propoxur (KONAN et al., 2012).

Ae. aegypti foi selecionado para resistência a lambdacialotrina por sete

gerações e depois avaliado quanto a resistência cruzada. A taxa de resistência quando da seleção foi de 1,25 vezes passando de 100% para 35% de mortalidade. Não ocorreu resistência cruzada com o temefós e malation, mas sim para permetrina (CHAVERRA-RODRIGUEZ et al., 2012).

Segundo Juntarajumnong et al. (2012), estabelecer a linha base de susceptibilidade a inseticidas é crucial para determinar com precisão a susceptibilidade e as mudanças nos padrões temporais de resposta fisiológica em populações de mosquitos. Esses autores estabeleceram a concentração diagnóstico para *Ae. aegypti* e demonstraram que, comparado aquelas propostas pela WHO, as concentrações diagnóstico de lambdacialotrina e permetrina para as populações da Tailândia são 2,5 e 1,7 vezes menores, respectivamente. Os autores propõem que, se possível, as concentrações diagnóstico devem ser estabelecidas para todos os insecticidas.

Segundo Martins et al. (2012) a resistência a inseticidas tem um importante valor adaptativo, porém, alguns mecanismos selecionados para essa condição podem influenciar nos processos biológicos, levando a um alto custo fisiológico quando na ausência da pressão pelo inseticida. Os autores avaliaram a dinâmica da resistência e o potencial custo fisiológico de cinco populações e uma linhagem selecionada para resistência a deltametrina por nove gerações. Os parâmetros analisados foram: o desenvolvimento larval, a taxa sexual, longevidade do adulto, quantidade relativa de sangue ingerido, taxa de oviposição, tamanho dos ovos e viabilidade dos ovos. Os resultados demonstraram que nas cinco populações naturais os sinais quanto aos parâmetros relacionados a vida dos insetos foram discretos, mas diretamente proporcional ao nível de resistência. No entanto, os parâmetros de viabilidade foram fortementes afetados pela seleção com o inseticida. Os autores sugerem que os mecanismos selecionados para resistência a organofosforados e piretroides devem ter causado acúmulo de alelos com efeitos negativos sobre os parâmetros relacionados a vida do inseto e isso corrobora com a hipótese de que a resistência a inseticida está associada com alto custo fisiológico.

A distribuição da resistência e seus mecanismos de nove populações de *Ae. aegypti* de Martinica foram estudados. Os bioensaios demonstraram um alto nível de resistência ao temefós e a deltametrina. Os ensaios bioquímicos mostraram elevados

níveis de atividade de enzimas de detoxificação do tipo monooxigenases, carboxilesterases e glutationa-S-transferases. Também foram encontradas mutações no gene de resistência a KD (MARCOMBE et al., 2012).

O tempo letal mediano de *Ae. aegypti* da Malásia para piretroides, organofosforados, carbamatos e organoclorados foi calculado para determinação de resistência. Os resultados demonstraram que o mosquito avaliado é resistente ao DDT e susceptível aos piretroides, carbamatos e aos organofosforados (RONG et al, 2012).

Gonzalez et al. (2012) avaliaram a susceptibilidade de populações mexicanas de *Ae. aegypti* a piretroides e ao temefós. Bioensaios pelo método da garrafa demonstraram altos níveis de resistência a todos os inseticidas testados, além de elevados níveis enzimáticos e mutações no alelo para resistência ao KD.

Larvas de *Ae. aegypti* de 12 populações da Indonésia foram avaliadas quanto a resistência ao temefós. Os resultados demonstraram que todas as populações estão resistentes quando utilizada a concentração proposta por WHO, sendo 0,012 mg/L (MULYATNO et al., 2012).

Segundo Montella et al. (2012) uma maior capacidade de detoxificar inseticidas, devido ao aumento na expressão ou atividade de três principais famílias de enzimas, também conhecida como resistência metabólica, é um dos principais mecanismos de resistência. A família de enzimas esterases hidrolizam ligações ésteres, que estão presentes numa vasta gama de inseticidas; portanto, essas enzimas devem estar envolvidas na resistência aos principais produtos químicos empregados em programas de controle. Historicamente, a resistência a inseticidas tem impulsionado a pesquisa sobre esterases de insetos e esquemas para a sua classificação. Atualmente, várias nomenclaturas diferentes são usadas para descrever as esterases de espécies distintas e não existe uma classificação padrão universal. A família de genes de esterase parece estar evoluindo rapidamente e cada espécie de inseto tem um complemento de genes de desintoxicação única com apenas alguns poucos ortólogos entre as espécies.

Linhagens de *Ae. aegypti* foram alimentadas com sangue contendo ivermectina. Os resultados demonstraram que tal produto reduziu a sobrevivência, a fecundidade e taxa de oviposição em todas as sete linhagens tratadas. No entanto, as linhagens resistentes a permetrina foram menos susceptíveis a ivermectina. Os autores

concluíram que a ivermectina induz aumento na mortalidade de adultos e diminuição da taxa de oviposição por diferentes mecanismos. Além disso, as análises de correlação entre as linhagens sugerem que pode haver resistência cruzada entre permentrina e ivermectina (DEUS et al., 2012).

2.8. APLICAÇÃO DE INSETICIDA PARA CONTROLE DE MOSQUITOS – MÉTODO DE VOLUME ULTRA-BAIXO (VUB)

Intervenções baseadas em inseticidas podem ter como alvo as larvas ou os adultos. O controle larval constitui na aplicação de inseticidas nos criadouros, induzindo a uma mortalidade inicial alta, que decai ao longo do tempo. Embora o controle larval possa reduzir a abundância de mosquitos adultos, o atraso entre a implementação e o subsequente impacto sobre os mosquitos faz com que essa intervenção seja menos apropriada quando do surgimento de uma epidemia, por exemplo, de dengue. Assim, quando uma rápida redução na população de adultos de mosquitos é necessária, aplicações de inseticida por meio do método de VUB tem sido sugerido como uma intervenção adequada (PONTES et al. 1991).

Os método denominado ultra-baixo volume (VUB) consiste na formação de uma densa “nuvem” de ingrediente ativo associada a um óleo vegetal que, quando vaporizado, é espalhado no ar e atinge o inseto pousado ou em voo. A aplicação em VUB é utilizada para controle de mosquito adulto e mosca tsé-tsé devido a necessidade de aplicar rapidamente volumes mínimos de inseticida em grandes áreas (CLAYTON e SANDER, 2002)

2.8.1. TAMANHO DE GOTA

Um dos principais requisitos dessa técnica de aplicação é o tamanho das gotas da calda de inseticida. Sayer (1959) desenvolveu um equipamento para aplicação terrestre a VUB, para o controle de gafanhotos, que aplicava 300 mL/ha de dieldrin a 20%, produzindo gotas maiores que 40 µm e com diâmetro mediano de 69 µm. Himes e Moore (1967), em aplicações aéreas, mostraram que 93% das gotas que se fixavam nos insetos, tinham menos de 50 µm de diâmetro. Em geral, gotas com diâmetro inferior

a 30 µm não se depositam, deixando o ingrediente ativo em suspensão no ar, sobretudo em ambientes fechados. Estudos conduzidos na Alemanha demonstraram que partículas contendo ingrediente ativo de inseticidas, resultantes de aplicações domésticas por meio de aerossóis, permaneceram em suspensão por duas semanas após a aplicação (COX, 2002).

Brescia (1946) estabeleceu que gotas de 6 a 14 µm de diâmetro podem atender ao controle de *An. quadrimaculatus* em ambiente de floresta. Latta et al. (1947) já havia calculado, com base na lei de Stokes, que a eficiência de um inseticida para um mosquito pousado era proporcional ao quadrado do diâmetro da gotícula, até o limite de 16 µm.

Mount (1970) revisou a literatura sobre gotas de aerossol e confirmou o tamanho ótimo para mosquitos entre 11 e 20 µm, concluindo que uma grande parte das gotas deveria atingir as asas. Alguns anos depois, Lofgren et al. (1973), borrifando mosquitos com óleo de soja, aplicado com máquina Leco e examinando os mosquitos com microscópio eletrônico de varredura verificaram que a maioria das gotas se depositava nas asas e nas antenas, e que seu diâmetro variava entre 2 e 16 µm.

A influência do tamanho das gotas na eficácia de controle em uma aplicação começou a ser estudado a partir da Segunda Guerra Mundial. O principal objetivo desses estudos foi a procura de inseticidas para substituição do piretro, obtido da margarida-do-campo, cuja produção tornou-se insuficiente para atender as necessidades militares, pois, no Mediterrâneo e no Extremo Oriente, era necessário proteger as tropas contra as moscas e os mosquitos.

Lofgren (1970) mostrou que mosquitos podem morrer quando atingidos por gotas menores que 20 µm e que, essas gotas atingem principalmente as asas e as antenas. Dessa forma, recebem uma concentração alta de inseticida, sugerindo que as concentrações para aplicação em VUB podem ser menos concentradas para o controle desses insetos.

Haile et al. (1982) determinou que há ocorrência de maior mortalidade quando as gotas estão entre 10 µm e 15 µm e que, com o aumento das distância do ponto de aplicação, a mortalidade de mosquitos em gaiolas diminui.

Robinson (2001) fez comparações entre aplicações aéreas com bicos de jato

plano, típico de pulverização, e um sistema de alta pressão com bico hidráulico para analisar a deposição de gotas de inseticida no terreno, bem como a mortalidade de mosquitos em gaiolas suspensas perto do solo. As aplicações foram feitas em distâncias de até 8 km do ponto de lançamento. Ficou demonstrado que, a deposição no terreno foi pequena, com o sistema de alta pressão, mas a mortalidade na gaiola foi alta com o bico de jato plano, sendo que com esse mesmo bico obtiveram deposições altas no terreno em até 3 Km quando a favor do vento, mas a mortalidade total foi baixa na gaiola. Isso mostra a importância do controle de tamanho de partícula para minimizar a contaminação do solo e depósitos de água, resguardando a fauna aquática não-alvo.

Os tratamentos do ambiente são efetivos apenas enquanto as gotas se mantiverem suspensas no ar. Dependendo do tamanhos, as gotas cairão devido à gravidade e algumas ficarão depositadas em superfícies horizontais, enquanto a maioria será perdida na atmosfera especialmente em uma pulverização em ambiente externo. Para que as gotas permaneçam suspensas no ar, é necessário que o equipamento de aplicação produza um espectro de gotas. Tal espectro é considerado homogêneo quando todas as gotas são do mesmo tamanho, e heterogêneo, quando o tamanho das gotas é diferente. Uma pulverização heterogênea com espectro de gotas resultará por um lado, em gotas grandes que escorrerão pelos alvos, representando perda de produto químico e poluição ambiental e por outro lado, gotas pequenas que serão levadas pelos ventos (deriva) e finalmente uma quantidade pequena de gotas que será aproveitada.

A vantagem de operar com gotas pequenas é evidenciada pela densidade teórica, obtida com um litro de solução sobre uma superfície plana. O tamanho da área de cobertura é inversamente proporcional ao tamanho das gotas. Assim, gotas de 10 µm atingirão uma área de cobertura de 1,5 mm^2, ocorrendo 19 mil gotas por cm^2. Já, gotas bem maiores, com 400 µm, atingirão uma área de 0,038 mm^2, produzindo 0,3 gotas por cm^2.

Os equipamentos pulverizadores normalmente utilizados na agricultura, que utilizem bicos, discos, cilindros rotativos, ou se baseiem no princípio da pulverização pneumática, geram gotas com diâmetros variados. A amplitude deste espectro depende da qualidade do equipamento e de diversas características operacionais. O

comportamento, a distribuição e a deposição das gotas são consideravelmente afetados pelo seu tamanho. Desse modo, ao selecionar um equipamento para dado tratamento, é essencial o conhecimento do tamanho das gotas produzidas e quando elas atingem o alvo. A velocidade em que cada gota cai é determinada pela massa da gota, por exemplo, uma gota de 20 µm de diâmetro cairá a 0,012 metros por segundo, levando 14 minutos para cair 10 metros com o ar parado, enquanto que uma gota de 100 µm cairá a 0,279 metros por segundo, levando apenas 36 segundos para cair a mesma distância.

Gotas maiores que 30 µm no diâmetro são menos eficazes, pois elas não se mantêm suspensas por tempo suficiente. Gotas menores que 5 µm no diâmetro não entram imediatamente em contato com insetos voadores, pois o movimento dessas gotas menores é afetado pela turbulência de ar criada pelo voo do inseto. Em geral, é aceito que as gotas devem ser geradas entre 10 µm e 30 µm, sendo assim, mesmo com alguma evaporação e após algum tempo, elas permanecem na escala adequada para a suspensão adequada pelo ar e impacto do inseto (BARBER et al., 2004).

Em climas secos, especialmente se o inseticida está diluído em um transportador volátil (como a água), a evaporação do diluente causará a diminuição das gotas; gotas ligeiramente maiores são assim desejáveis.

Para um dado volume de mistura de *spray*, as gotas de tamanho menores implicam em um maior número de gotas. Se 1 mL de mistura de *spray* é disperso em gotas de 20 µm (cada uma contendo 4,2 picolitros), haverá 239 milhões de gotas produzidas, enquanto se o mesmo volume é disperso em gotas de 100 µm (534 picolitros) haverá 1,9 milhões de gotas. O grande número de gotas aumenta imensamente as suas chances de fazerem contato com um inseto voador, pois a densidade de gotas por unidade de volume de ar será muito maior.

O tamanho ideal das gotas contra os mosquitos para a pulverização do ambiente é de 10 µm a 20 µm. Para insetos maiores, como por exemplo, a mosca tsé-tsé, o tamanho ideal é de 30 µm (CLAYTON e SANDER, 2002). No entanto, o tipo de aplicação influencia na decisão do tamanho das gotas a serem aplicadas, sendo que para uma aplicação de campo utilizando máquinas sobre veículos, Mount et al. (1996) considera que uma amplitude de tamanho de gotas entre 5 µm a 25 µm é conveniente

para o controle de mosquitos, já essa amplitude não se aplica quando da utilização de aplicação aérea, uma vez que a turbulência do ar influenciará na dispersão das gotas.

2.8.2. PARÂMETROS DO TAMANHO DE GOTAS

Muitos parâmetros são utilizados para caracterizar o tamanho das gotas, que em contrapartida são influenciados pelo projeto do bico de aplicação do equipamento e modo de operação.

Densidade de Gota - Refere-se à quantidade de gotas por unidade de área. Esse parâmetro tem grande importância no controle de pragas e doenças, quando se utilizam na aplicação baixo volume e VUB. Com o uso de gotas cada vez menores e com produtos mais concentrados, as gotas tornam-se mais letais e o número de gotas por unidade de área, juntamente com o volume mediano, dão a quantidade de ingrediente ativo depositado sobre o alvo.

Como parâmetros, utilizam-se as seguintes coberturas para produtos não sistêmicos ou de baixa translocação, atendendo ainda as condições climáticas existentes. Herbicida - 20 a 30 gotas/cm^2 com diâmetros de 200 a 300 µm. Inseticida - 50 a 70 gotas/cm^2 com diâmetros de 50 a 200 µm. Fungicida - 70 a 100 gotas/cm^2 com diâmetros de 100 a 200 µm.

À medida que se reduz o volume de aplicação, a tendência é utilizar gotas menores. O número e tamanho de gotas que se depositam por unidade de área do solo ou da superfície foliar desempenham um papel preponderante na eficácia das aplicações.

Diâmetro do Volume Mediano (DVM) - Esse parâmetro, expresso em µm, é aquele que divide o jato (*spray*) em dois volumes iguais, metade contendo gotas menores que o diâmetro, e a outra contendo gotas maiores. Algumas gotas grandes podem mudar consideravelmente o DVM. O valor do DVM não indica a escala do tamanho das gotas.

Diâmetro do Número Mediano (DNM) - É um valor que divide o jato em duas partes iguais pelo número de gotas, para que metade das gotas seja maior e a outra metade

seja menor que o diâmetro definido. O DNM é mais difícil de medir e os resultados podem variar para diferentes técnicas de medição por amostragem.

Coenficienta de Uniformidade - É determinado a partir do valor do diâmetro das gotas de 90% (V_{90}) do volume, menos o valor do diâmetro das gotas de 10% do volume (V_{10}), dividido pelo DVM. Segundo WHO (2003), o parâmetro do valor do intervalo dá uma indicação da uniformidade do tamanho das gotas. O valor do intervalo é de preferência menor que 2. Enquanto o DVM, DNM e o intervalo indicam a qualidade da névoa, o fator crítico é a maximização do número de gotas na escala de tamanho adequada.

Faixa de Deposição - Define a quantidade de ingrediente ativo ou de gotas aplicadas por unidade de área, ao longo de uma faixa tratada longitudinal e transversalmente. Essa distribuição de gotas na faixa é de grande importância na análise de um tratamento. A melhor distribuição é aquela que acompanha o mais próximo possível a localização da praga ou vetor a ser controlado e o faz de maneira contínua. Dizemos que uma faixa de deposição é descontínua quando numa mesma área tratada, encontramos pontos em que a dosagem do ingrediente ativo ou a quantidade de gotas depositadas é diferente.

Deriva das Gotas - A “velocidade de queda livre” de uma gota é o resultado da ação do peso da gota e da resistência do ar no movimento da mesma, quando cessa o seu impulso inicial de lançamento. A “redução do diâmetro” da gota aumenta a resistência do ar em relação ao peso; acarretando menor velocidade de queda livre.

Por outro lado, o vento lateral e as correntes ascendentes de ar, tendem a “carregar” ou “arrastar” as gotas. Este arraste é tanto maior quanto menor for a gota.

Uma gota com determinado diâmetro arrastada pelo ar terá uma predeterminada velocidade de queda, ao passo que, em um ar completamente parado, (condição que jamais existe), a depender da altura de queda de onde foi liberada, do seu tamanho e do seu peso, ela se depositará numa superfície horizontal após certo tempo, influenciada pela gravidade.

Outro fenômeno que varia constantemente é o movimento do ar, seja ele

horizontal ou vertical. O tamanho de gotas mais propenso à ação das forças mencionadas é aquelas inferiores a 100 µm. Existem bicos desenhados de modo a eliminar a maior parte dessas gotas "deriváveis". Entretanto, na maioria dos bicos, quer seja cônico ou leque, o maior número de gotas formadas é geralmente o de menor tamanho, porém este número corresponde apenas a uma pequena parte do volume total pulverizado. Gotas de tamanho inferior a 100 µm ficam sujeitas às variações das correntes de ar, sejam estas ascendentes, descendentes ou laterais (deriva).

Taxa de Fluxo - A maioria dos equipamentos usados para aplicação de jato no ambiente produzirá uma gama de diferentes tamanhos de gotas. O DVM geralmente aumenta quando a taxa de fluxo aumenta. Contudo, com algumas máquinas, um aumento na taxa de fluxo pode ser compensado pelo aumento da pressão do ar. Portanto, é essencial checar diferentes espectros de gotas em diferentes taxas de fluxo. Se o tamanho da gota for dobrado, o número de gotas é reduzido à oitava parte. Isto pode reduzir seriamente a eficácia do jato, pelo fato de que haverá pouquíssimas gotas no ar por um tempo de ação insuficiente. Assim para se manter a eficiência, um balanço entre o tamanho e o número de gotas (regulados pela taxa de fluxo) torna-se necessário.

Cobertura de Penetração - É a capacidade do defensivo aplicado atravessar as camadas externas da folhagem, atingindo os pontos do interior da planta. De maneira geral, as gotas pequenas penetram melhor nas plantas com grande densidade de folhas. Tanto o vento natural como o vento produzido por ventiladores, influem auxiliando diretamente na penetração e distribuição do defensivo.

Para se efetuar uma boa cobertura depende-se de algumas variáveis como, características da praga ou vetor visado e do produto usado. Quando as pragas são lagartas que se movimentam continuamente e estão sempre expostas na superfície das folhas, o contato dessas com os inseticidas é muito fácil, mesmo que a deposição seja irregular. Por outro lado, quando a praga ou vetor é de pouca ou nenhuma mobilidade, o contato com o defensivo só é obtido quando se efetua uma boa cobertura. Com relação ao produto utilizado, obtêm-se diferenças quando da aplicação, podendo ter uma ação de contato ou sistêmica. Na ação de contato, é necessário que o produto

atinja diretamente a praga, ou que esta entre posteriormente em contato com o inseticida, daí a necessidade de uma boa cobertura. No segundo caso, ação sistêmica, o produto é absorvido pelas folhas e translocado através da seiva, que leva até a localização da praga.

Hoffmann et al. (2008) avaliou a penetração de gotas de óleo em gaiolas com mosquitos dentro de túneis de vento. Primeiramente, concluiu que a velocidade do vento diminui quando passando por dentro da gaiola e, além disso, houve uma diminuição de 50% a 70% de gotas penetrando nas gaiolas.

Concentração da Névoa - As recomendações dos fabricantes objetivando a quantidade dos ingredientes ativos por unidade de área devem necessariamente permanecer dentro de uma escala especificada em metros quadrados. No entanto, a concentração da névoa e a taxa de aplicação podem ser ajustadas. Qualquer diluição da formulação deve necessariamente ser compensada por um aumento no volume da névoa por unidade de área, ou seja, a quantidade de inseticida deve ser mantida constante para a área alvo (isto pode ser atingido pelo aumento na taxa de volume da máquina, redução da velocidade do movimento da máquina ou reduzindo o comprimento de abrangência).

Para um inseto voador ser morto, ele deve adquirir necessariamente uma concentração letal de inseticidas em gotas que seja absorvida por ele. A menor concentração de ingredientes ativos requer, portanto, maior número de gotas de um dado tamanho para atingir uma concentração letal.

A nebulização de VUB objetiva, em grande parte por razões operacionais, diminuir o volume total de inseticida diluído aplicado (300 mL/ha). A tendência atual é reduzir o volume de líquido aplicado, o que leva à necessidade de gotas menores para melhor cobertura. Os trabalhos mais recentes mostram que partículas em torno de 80 a 100 µm dão o mais alto índice de uniformidade de deposição, para a maioria das velocidades do ar.

A pulverização a VUB utiliza um volume médio da ordem de 60 µm. O importante é que pouca ou nenhuma deposição é feita com partículas menores que 30 µm. Por outro lado, gotas muito grandes acarretam desperdício de inseticida, os quais são depositados em excesso nas superfícies externas das plantas, não atingindo os pontos

internos (alvos). A redução do volume de líquidos leva à necessidade de uma tecnologia mais apurada, tanto da parte do construtor do equipamento, quanto da parte do técnico em aplicação.

Atualmente existe um consenso entre os principais pesquisadores que a denominação “volume alto” seja dada à aplicação feita até além da capacidade de retenção das folhas, de tal modo que haja escorrimento. Nesse tipo de aplicação, o depósito de produto químico é proporcional à concentração da calda utilizada e independente do volume. Portanto, a indicação de dosagem para a modalidade de alto volume ou mais corretamente volume alto, é mencionada via concentração (por exemplo, 200 g/100 L de água – ou 0,2%).

Em contraposição ao volume alto, o volume baixo ou VUB é hoje definido como o volume mínimo por unidade de área para se alcançar um controle, independente de um limite.

A densidade e queda de gotas de névoa, aplicada a taxa de um litro por hectare seguem um padrão, sendo que gotas de 1 µm possuem densidade de 19120 gotas por cm^3 e demoram 93,7 h para cair 10 m. O contrário ocorre quando a gota é maior, sendo que gotas de 100 µm possuem densidade de 0,019 gotas/cm^3 e demoram 36 seg. para cair 10 m.

Velocidade do Vento - A velocidade do vento tem um efeito profundo na distribuição das gotas e ação nos insetos. Na maioria das situações, uma velocidade do vento de 1 a 4 metros por segundo (aproximadamente 3,6 a 15 km/h) é necessária para as gotas flutuarem ao vento a partir da linha de deslocamento. A pulverização não deve ocorrer quando a velocidade do vento excede 15 km/h. A velocidade do vento pode ser medida usando um anemômetro de mão.

O tipo de terreno e vegetação afeta o movimento do ar e assim a distribuição das gotas. Maiores efeitos de dispersão podem ser obtidos em terreno aberto com vegetação relativamente esparsa do que em áreas urbanas onde a obstrução causada pelos edifícios altera o fluxo do ar. A penetração de gotas dentro da casas depende do projeto da casa e também se suas janelas, portas e o beiral estão abertos.

Em áreas urbanas a disposição da circulação determina a rota, contudo, isto

pode não corresponder à efetiva dispersão pelo vento. Um aumento na taxa de aplicação do volume pode ser necessário para compensar a reduzida penetração das gotas dentro de áreas de vegetação. Para fins práticos, a maioria dos fabricantes considera 50 metros (para distância em que a névoa é eficaz) de dispersão como a base para calcular as taxas de aplicação recomendadas.

Direção do Vento - Com o uso de veículos na pulverização de uma área, a rota do *spray* deve necessariamente levar em conta a direção do vento para maximizar sua distribuição através da área alvo. Com a direção do vento em ângulos menores que 25°, a pulverização não é recomendada, pois sua disseminação é prejudicada devido à pequena dispersão da névoa.

Efeito da Temperatura - A superfície de uma gota é relativamente grande quando comparada ao seu volume. Isto faz com que a taxa de evaporação de uma gota cresça com a diminuição do diâmetro da mesma. Fato esse, de que para um dado volume de líquido, quanto menor o tamanho das gotas produzidas por um determinado pulverizador, maior a superfície coberta pelas mesmas, a qual é (quanto maior a superfície, maior a evaporação), diretamente influenciada pela temperatura e umidade relativa do ar.

Os sistemas atuais de VUB utilizam como veículo do ingrediente ativo, formulação com óleos minerais o que diminui o índice de evaporação da mistura do líquido disperso. Em aplicações aéreas de piretrina em ambiente desértico, houve diminuição na deposição de gotas aquosas e consequentemente redução na mortalidade de mosquitos sentinelas. Por isso, para melhorar os resultados, Lothrop et al. (2007) utilizou óleo com consequente diminuição na evaporação.

O efeito da temperatura sobre as gotas está diretamente relacionado a elevação da temperatura do ar. O solo é aquecido com a luz do sol incidindo diretamente. Isto provoca a elevação do ar. Ao meio dia as aplicações em ambientes externos são em grande parte desperdiçadas, já que as gotas de névoa tendem a subir ao invés de flutuarem horizontalmente. O ar mais frio próximo ao chão ocorre geralmente no início da manhã após a temperatura do solo ter caído durante a noite, mas também, pode

ocorrer no fim da tarde quando o sol se puser e a temperatura do solo começar a cair. Durante uma inversão térmica as gotas de névoa flutuam próximo ao solo. Dessa forma, as características do ar ideais para pulverização a partir do solo e do ar, podem ser observadas por meio da fumaça subindo de chaminés ou fogueira, ou pode ser constatada usando geradores de fumaça, que indicam se a fumaça gerada esta sendo deslocada horizontalmente pelo ar.

Período de Tratamento - O conhecimento local do período de pico da atividade de voo da espécie alvo é crucial para assegurar que o tratamento do ambiente seja planejado para coincidir, tanto quanto for possível, com esses períodos. Afortunadamente, a atividade de pico de muitos vetores é no decorrer do crepúsculo e/ou ao anoitecer, quando as condições do clima são mais favoráveis para o tratamento do ambiente. Contudo, alguns insetos notadamente moscas e espécies similares são mais ativas durante o dia e antes do amanhecer. O *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, são ativos durante o período do dia, com picos de atividades de voo durante a manhã e a tarde. Com estas espécies é, geralmente, acertada uma nebulização no começo da manhã e outra no fim da tarde (CLAYTON e SANDER, 2002). O horário é menos importante se a aplicação for conduzida em interiores de edificações. O tratamento é geralmente conduzido pela manhã antes da temperatura se tornar muito elevada, quando outros insetos voadores estão ativos durante o dia, e as condições não são ideais para a pulverização devido a altas temperaturas.

2.8.3. TÉCNICAS PARA MEDIÇÃO DO TAMANHO DE GOTAS

Técnicas baseadas no Laser - Muitos dispositivos usam um feixe de laser como fonte para medição do espectro de gotas produzido por diferentes dispersores. Isso inclui técnicas de difração da luz para medir gotas amostradas dentro uma seção do feixe de laser (amostragem espacial). Alternativamente, o tamanho das gotas passando na intersecção de dois fachos de laser pode ser utilizado (amostragem temporal). Em outros dispositivos, uma imagem digital das gotas é capturada e analisada para medir o

espectro de gotas da névoa. Os fabricantes podem providenciar informações detalhadas do desempenho de seus equipamentos com diferentes taxas de fluxo e líquidos pulverizados. Como eles são equipamentos caros e essencialmente instrumentos de laboratório, não são utilizados para checar se o equipamento está mantendo o seu desempenho especificado no campo.

Anemometria de Fio Quente - Esse é um método eletrônico que é ao mesmo tempo prático e eficiente. Com esse tipo de dispositivo, gotas são medidas pelo gotejamento por meio de um fino fio quente em uma sonda inserida dentro da torrente da névoa. Como a superfície de amostragem é extremamente pequena, ela é adequada principalmente para usar relativamente próximo ao aerosol do bico, emitindo um grande número de gotas, se movendo entre 5 e 10 m/s o instrumento é ligado a um laptop e sendo portátil pode, ainda, ser utilizado para checar o espectro de gotas produzidos por pulverizadores de névoa fria. Entre leituras a sonda deve necessariamente ser lavada com um solvente, por exemplo, acetona. A anemometria de fio quente não é adequada para ser utilizada em pulverizadores de névoa quente. Medições de gotas são, normalmente, requeridas a cada 50 a 100 horas de operação da máquina ou após um longo período de seu uso. Este pulverizador deve ser operado por um período anterior a amostragem para que, qualquer partícula sólida no sistema, seja retirada antes que ela possa danificar o fio quente.

Técnica de Lâminas - Se equipamentos modernos não estão disponíveis, avaliações simples podem ser feitas com a técnica de lâminas, utilizando lâminas de vidro com revestimentos microscópicos. Há três revestimentos, óxido de magnésio, silício ou teflon. Óxidos de magnésio são adequados para todas as formulações para pulverizações a base de água. O revestimento de silício tem sido utilizado exclusivamente para formulações de inseticidas não voláteis à base de óleo. As crateras no óxido de magnésio ou gotas não voláteis nos revestimento das lâminas de vidro são então examinadas sob um microscópio, e os parâmetros DVM e DMN são dessa forma calculados, levando em conta qualquer fator de difusão.

Os revestimentos de óxido de magnésio são preparados pela queima de duas

faixas de papel de magnésio, cada uma com 10 cm de comprimento, abaixo de uma lâmina de vidro para assegurar que a área central seja revestida uniformemente. Isto é feito com a lâmina em contato com um suporte de metal para evitar aquecimento desigual e ruptura do vidro. No impacto com o óxido de magnésio uma gota de inseticida (20 – 200 µm) forma uma cratera que é 1,15 vezes maior que o tamanho verdadeiro da gota (as gotas se dispersam ligeiramente no impacto do óxido de magnésio). A reciprocidade do fator de dispersão é utilizada para as medições das crateras (deformação) para o tamanho real. O fator de correção do óxido de magnésio é 0,86, ou seja, deve-se multiplicar o diâmetro obtido na lâmina pelo fator, com o objetivo de corrigir o aumento de 1,15 vezes do diâmetro obtido na lâmina. Contudo, com gotas de inseticidas menores, o fator de dispersão é reduzido para 0,8 e 0,75 para aqueles medindo 15 – 20 µm e 10 – 15 µm, respectivamente. Lâminas revestidas de óxido de magnésio são menos satisfatórias para gotas menores que 10 µm, devido a necessidade de oscilar a lâmina através da névoa para aumentar a velocidade de impacto. A adição de um corante facilita a observação das gotas nas superfícies brancas.

Lâminas revestidas de teflon podem ser reutilizadas, mas têm de ser lavadas com solvente, por exemplo, acetona, para remover qualquer traço da amostra anterior.

Um clipe é usado para prender a lâmina a uma vara de um metro de comprimento, para permitir que uma pessoa fique ao lado quando se desloca através da névoa, a uma distância de 1-2 metros do bocal.

A técnica de lâminas não é eficiente na amostragem de pequenas gotas. Lâminas podem ser acopladas a um dispositivo giratório para aumentar a velocidade em que ela faz a amostragem do *spray* com o objetivo de aprimorar a eficiência de amostragem.

Em geral, cinco amostras separadas e pelo menos 200 gotas são medidas sob um microscópio. Um reticulado adequado é colocado na peça de observação e calibrado com um micrometro para ampliação usada. O diâmetro da cratera produzida pelas gotas na lâmina são medidas pela comparação com as marcas do reticulado.

Os cálculos necessários para determinar o DVM e DNM de uma névoa, utilizando uma lâmina revestida de óxido de magnésio com um fator de dispersão de

1,15, são feitos por meio de ΣNdm^3 e ΣN (onde Σ é a soma, N é a quantidade na escala do tamanho, dm é o diâmetro médio das gotas classificadas de acordo com o reticulado), expressos em porcentagem, e são comparados aos tamanhos verdadeiros das gotas em um gráfico de probabilidade logarítmica. Nesse exemplo específico, o DNM e DVM são por volta de 19 e 22 µm, respectivamente.

A partir do tamanho médio do reticulado (dm), pode-se definir a distribuição de gotas por volume e quantidade, isso é possível a partir da percentagem acumulada da quantidade (ΣN) e volume (Σdm^3) de gotas. A percentagem da quantidade de gotas é definida para cada número do reticulado, dessa forma, é possível definir a porcentagem acumulada para o reticulado, onde esta é relacionada ao tamanho médio dele (dm). De forma similar, para o número do reticulado, a porcentagem acumulada do volume é feita a partir do tamanho médio do reticulado, assim associando esta percentagem ao tamanho médio do reticulado tem-se a distribuição de gotas por volume. Como o diâmetro de volume médio e o diâmetro de número médio são calculados a partir da distribuição do volume e número de gotas pelo tamanho das gotas, respectivamente, logo a partir do gráfico é possível definir os valores de DVM e DNM para 50% da distribuição. Note que de forma análoga, os valores de 10% e 90% da distribuição do diâmetro de volume médio, podem ser utilizados para calcular o intervalo.

Onde água estiver sendo utilizada para diluir a névoa, faixas de papéis sensíveis podem ser usadas para coletar gotas para medição de seu tamanho, porém, como as deformações com o tempo podem aumentar em diâmetro, seu uso é indicado apenas para o tamanho, sendo, portanto menos precisa que outras técnicas. O tratamento dos papeis sensíveis à água com acetato de etila tornarão as deformações mais duráveis. O fator de dispersão varia de acordo com a formulação e o tamanho da gota. Papéis que são sensíveis a óleos e certos solventes também podem ser utilizados.

2.9. EQUIPAMENTOS DE APLICAÇÃO DE INSETICIDAS

Durante a guerra do Vietnã foram usadas máquinas costais motorizadas, desenvolvidas pelos militares americanos, para controlar os anofelinos transmissores da malária (HOLWAY et al., 1967). Esse trabalho também relata o emprego de malation a 57%, em aplicações feitas com helicóptero a 715 mL/ha e com avião a 560 mL/ha.

Esses autores referem essas aplicações como a médio volume, porém, de acordo com a norma americana, que também é adotada na agricultura brasileira (MATUO, 1982), elas são a VUB. Essa também foi a primeira aplicação de inseticida fosforado, misturado com o solvente óleo mineral, a VUB.

O emprego de máquinas portáteis de aplicação a VUB não é muito mencionado na literatura de Saúde Pública. Pant et al. (1971) relataram o emprego de máquinas portáteis para aplicar malation a VUB, contra *Ae. aegypti,* em pequenas áreas da Tailândia, que não podiam ser atingidas por veículos. Posteriormente, Sánchez et al. (1978) aplicaram fenitrotion, contra *Ae. aegypti,* com três modelos de máquinas portáteis. Nesses dois trabalhos as aplicações foram feitas no interior de todos os cômodos das casas. No entanto, as gotas eram grandes entre 38 µm e 150 µm. Esse trabalho foi o primeiro a repetir 10 vezes a aplicação do inseticida, o que é indispensável no caso de *Ae. aegypti,* pois, os ovos existentes nos depósitos eclodem aos poucos (CHRISTOPHERS, 1960).

Pant et al. (1974) utilizou um equipamento portátil para aplicação VUB de fenitrotion para controle de *Ae. aegypti*. Tal equipamento produziu gotas entre 19 µm e 109 µm, com DVM de 60 µm. Nessa amplitude de tamanho de gotas, houve maior deposição horizontal do que vertical. Quanto ao controle, a mortalidade larval variou entre 79,5% e 97,5%, dependendo do criadouro. Já, para os mosquitos adultos em gaiolas houve 100% de mortalidade. Também, foi possível demonstrar que o efeito residual do inseticida foi de 10 a 12 dias nos criadouros larvais.

O uso de máquinas portáteis para aplicação de inseticida no método VUB tem sido intensamente utilizado no Brasil. Quando da infestação de Belém por *Ae. aegypti,* em 1967, por exemplo, os criadouros situados nos buracos das grandes mangueiras que arborizam as avenidas daquela cidade, foram controlados com aplicações de inseticidas fosforados por máquinas de VUB portáteis e, atualmente, elas estão sendo muito úteis no controle desse mosquito nas favelas do Rio de Janeiro. O primeiro método para eliminação de triatomíneos nas habitações tem sido feito por meio do uso de máquinas portáteis. O método convencional de aplicar BHC ou outro inseticida na superfície das paredes é uma transcrição do sistema utilizado para controlar os anofelinos transmissores da malária, que visa atingir o inseto, quando ele pousa na

parede. Para o triatomíneo, entretanto, a parede é um local de passagem quando ele vai se alimentar. Os seus locais de abrigo são as frestas das paredes ou de outras estruturas, que não são perfeitamente atingidas pela borrifação do pó molhável que é a formulação mais adequada para o caso. Já o jato do aerossol aplicado dentro da casa, contra a parede, tem maior facilidade de penetrar nas frestas e, depois, as partículas menores que ficam flutuando dentro da casa, podem atingir todos os pontos onde o inseto possa se abrigar. Essa técnica foi desenvolvida na Argentina por Martinez et al. (1975) e depois aplicada com êxito, no Brasil, por Sherlock e Muniz (1975).

Atualmente, existem máquinas muito boas, tanto importadas, quanto fabricadas no país, entretanto persiste um problema sério. Como o motor tem que trabalhar em alta rotação, o desgaste é muito grande. Mesmo com manutenção constante o período de duração das máquinas é curto. Além disso, essas máquinas são projetadas para a lavoura e a experiência acumulada pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (Sucam), nas favelas do Rio de Janeiro, tem mostrado que é necessário diminuir a vazão do inseticida e o tamanho das gotas.

Em todas as máquinas terrestres de VUB o inseticida é pulverizado por pressão de ar. A *Imperial Chemical Industries* desenvolveu uma máquina portátil, onde o fracionamento da formulação é feito por uma descarga elétrica. Porém como as gotas são grandes, com um mínimo de 50 µm e o alcance é pequeno, não servem para mosquitos.

A seleção do equipamento apropriado para a pulverização do ambiente depende do tamanho e acessibilidade da área alvo, assim como, dos recursos humanos e capacidades operacionais do programa. Algumas vezes, máquinas menores podem ser necessárias em conjunto com um equipamento montado em um veículo, para que se possa operar em trilhas ou outras áreas inacessíveis a veículos ou protegidos do deslocamento predominante do ar como o interior de prédios e residências.

Aplicações aéreas para pulverização do ambiente podem ser justificadas onde o acesso com o equipamento de solo é difícil e/ou áreas extensas que precisam ser tratadas muito rapidamente. Isto, contudo, requer conhecimento em pulverização aérea, o qual não é disponível na maioria dos programas de controle, sendo assim, esta opção em geral deve ser rejeitada. Em 2006, a Prefeitura Municipal de São Paulo fez

aplicações aéreas de *Bacillus sphaericus* (Vectolex G, na concentração de 10 Kg/ha a 20 Kg/ha) sobre o rio Pinheiros, utilizando uma aeronave modelo Ipanema (EMB202), para controle de *Cx. quinquefasciatus*, porém, com diversas dificuldades relacionadas a chuvas (MARQUES FILHO, 2010).

A seleção do equipamento deve ser de maneira ideal baseada na familiaridade, adequação e desempenho. Avanços no projeto de equipamentos devem ser considerados quando for comprado um equipamento, essas melhorias devem ser pesquisadas consultando e comparando os equipamentos existentes no mercado, por meio de consultas a fabricantes de equipamentos. Tendo em vista a existência de diversos modelos e fabricantes de pulverizadores, a definição de um procedimento de teste padrão é necessária na aquisição de equipamentos que atendam a exigência de um programa de controle do *Ae. aegypti.* Em 1989 a WHO, apresentou as especificações dos componentes de controle de vetores, abordando o tema de forma normativa para cada parte de um pulverizador. Os componentes de um pulverizador passaram então a ser descritos de acordo com suas necessidades de operação, evidenciando-se a necessidade de abordagens distintas para o projeto de cada componente de um pulverizador.

Em WHO (1990), são descritos os métodos de nebulização com aplicações térmicas e frias. Em aplicações térmicas, uma névoa é criada pelo aquecimento do líquido aspergido seguida pela condensação instantânea, mas, apesar das altas temperaturas envolvidas no processo, o resfriamento é muito rápido, permitindo a não destruição do inseticida da solução (óleo e inseticida) aspergido. Na aspersão fria, são utilizados bicos de alta pressão para a quebra da mistura, formando a nuvem de gotas sem seu aquecimento. A despeito das aplicações térmicas, na aspersão fria a solução aspergida pode ser constituída por água e inseticida. O uso dessa técnica permite manter mínimo o volume do *spray*, gerando a aplicação em VUB.

Com o objetivo de evitar a propagação da dengue e de outras doenças, o controle da propagação do vetor, vem sendo realizado por pulverizadores do tipo VUB nas últimas décadas para erradicar o vetor em sua fase adulta. A técnica é considerada ambientalmente segura, pois não utiliza óleos na formulação aspergida e possui um espectro de gotas adequado para combater o inseto. Outras características favoráveis

são a visibilidade mínima da nuvem formada, menor custo de aplicação, dentre outras.

Da Costa (2002), avaliou experimentalmente as vazões médias produzidas por um pulverizador pneumático costal motorizado sob diferentes condições de operação. Os resultados obtidos consideram a combinação de diferentes diâmetros de orifício dos discos restritores e ângulo de posicionamento da lança pulverizadora. O autor conclui que, discos dosadores de maior diâmetro implicam em menor uniformidade de vazão e que a variação de rotação não afeta os resultados da vazão média, havendo, contudo, uma correlação preponderante entre a pressão medida próxima ao bico aspersor e a vazão média. O estudo descreve o pulverizador usado no controle da forma alada do mosquito *Ae. aegypti,* onde é utilizada a aplicação de aerossol de partículas suspensas líquidas, que atingem os insetos que estão no espaço tratado.

Devido ao desgaste dos componentes, muitos em contato com inseticidas corrosivos, a durabilidade dos equipamentos depende da disponibilidade das peças de reposição, implicando em uma logística de aquisição de equipamentos e suas peças. Os testes de pulverizadores podem ser feitos a partir da medição dos parâmetros principais de entrada e saída dos componentes do sistema de pulverização. Um guia prático para a aplicação espacial de inseticidas é apresentado pela WHO (2003). No guia são expostos os métodos possíveis de aplicação de inseticida, onde são providenciadas informações de como controlar a infestação de insetos voadores vetores de doenças, pela aplicação adequada de inseticida. O objetivo dessas aplicações é a redução rápida da população de insetos vetores de doenças. Para haver sucesso no controle de vetores é necessário produzir gotas de tamanho adequado e colocá-las na área alvo durante o período de atividade do inseto. A combinação de gotas de pequeno diâmetro e o volume reduzido de inseticida têm se mostrado eficaz no controle do *Ae. aegypti*, não acarretando dano ambiental.

Dentre os equipamentos de aplicação de inseticida pelo método do VUB, destaca-se: 1) *Puverizador Costal Motorizado* - é um equipamento que aplica líquido dividido em gotas de diversos tamanhos, possui motor próprio e é transportado no dorso do operador. Para um completo entendimento do modo de operação deste tipo de equipamento, visando assegurar uma alta eficiência de controle, se torna necessário o exame de todos os aspectos que contribuem para otimizar a aplicação de inseticidas.

O tamanho de gotas geradas por esses equipamentos, varia em função do fluxo de ar e do fluxo de líquido. Como o fluxo de ar é basicamente constante (embora com relação ao volume e velocidade de ar gerado por eles, exista uma variação dependendo do fabricante e de suas especificações técnicas), pois os pulverizadores motorizados devem trabalhar com toda a aceleração, o tamanho de gotas varia em função do fluxo de líquido, este, não é constante, pois depende do dosador ou da posição da torneira que o regula. Geralmente os pulverizadores costais motorizados vêm acompanhados por uma série de dosadores de diferentes vazões ou são equipados com torneira graduada, com vazões crescentes, à medida que se abre o seu curso. A vazão é a quantidade de líquido aplicado por unidade de tempo. Ex: cinco litros por minuto. Este conhecimento é importante para definir o volume de calda inseticida a ser aplicado. Nesses pulverizadores, as gotas são formadas nos bicos, os quais apresentam características e potencialidades diferentes de acordo com cada fabricante (bicos VUB, Longo alcance, Curto alcance, etc...). O líquido (calda) que se deseja aplicar é lançado numa corrente de ar de alta velocidade que é fragmentado. O líquido que se encontra no tanque, pode chegar até os bicos de duas maneiras: a) Através de força, de gravidade ou pressão aplicada (pressão positiva – variável). b) Efeito venturi (sucção – pressão negativa – variável); 2) *Pulverizador a Pressão com Jato Lançado* - costal manual (pulverizador costal manual) e *Pulverizador de Pressão Retida e Jato Lançado* – costal. Equipamentos de tanque metálico totalmente vedado para não ocorrer perda de ar. Usam ar comprimido, mas não tem bomba pneumática incorporada ao aparelho. É mais comum serem de aço inoxidável resistente a elevada pressão injetada juntamente com a calda ou após esta. Para maior eficiência devem conter uma válvula reguladora de pressão e; 3) *Pulverizador a Pressão e jato lançado* – costal de compressão prévia. Esses equipamentos possuem uma bomba pneumática para adicionar pressão ao tanque. O tanque é vedado para evitar perda de ar. Antes da pulverização o operador deve colocar pressão suficiente no tanque.

Bicos de Pulverização - Os bicos são órgãos essenciais aos pulverizadores de pressão. Todo o esforço na defesa fitossanitária e no controle de vetores não leva ao efeito desejado se os bicos não são apropriadamente selecionados, instalados e

conservados. Além de atuar sobre a vazão, a pressão ainda determina o tamanho das gotas pulverizadas. O diâmetro das gotas é reduzido com o aumento da pressão e adição de tensoativos na formulação. Um exemplo, seria a utilização de CO_2 para aumentar a pressão e assim produzir gotas de menor tamanho.

Nos bicos o líquido sob pressão passa ao exterior através de um orifício, produzindo uma película que vai aumentando gradativamente a sua superfície e consequentemente diminuindo a espessura, até romper-se em pequenas gotas.

A pressão de pulverização tem efeito direto sobre a vazão, no diâmetro de gotas e nas características de deposição. Na maioria dos bicos, a vazão se aproxima de uma relação diretamente proporcional à raiz quadrada da pressão. Gotas pequenas podem ser obtidas pelo aumento da pressão ou pela redução do diâmetro do orifício de saída.

O formato do bico e a maneira como o líquido passa através do mesmo, tem influência sobre a faixa de deposição e sobre o espectro de gotas. Bico com orifício circular apresenta jato cônico e deposição circular, bico com orifício em forma de rasgo origina jato em forma de leque e deposição linear.

É necessário frisar que o aumento da pressão acima da pressão recomendada pelo fabricante, não leva necessariamente as gotas a uma distância maior. Podendo acontecer o inverso, ou seja, aumentando a pressão, haverá a diminuição do tamanho das gotas as quais terão pouco peso e a distância percorrida pelas mesmas diminuirá, não importando a força com que sejam lançadas.

Os bicos mais utilizados são: 1) Bicos Cônicos - são denominados de cone sólido quando o cone é preenchido. Nos de cone vazio, o centro é desprovido de pulverização. São os mais recomendados na aplicação de inseticidas, fungicidas e herbicidas de contato. São conhecidos dois tipos de bicos de cone vazio: a) Tipo Disco, que opera a pressão elevada e é indicado para aplicação de suspensões, como é o caso da calda cúprica; b) Tipo Ponta, que opera a menor pressão e apresenta pulverização mais fina. É recomendado para aplicação de emulsões e soluções; 2) Bicos de Leque - como se pode inferir da denominação, estes bicos lançam a pulverização sob a forma de leque; 3) Bicos de Impacto ("*Floodjet*") - São de uso corrente na aplicação de herbicidas, devido à produção de gotas grandes, que apresentam menor arraste pelo vento.

Equipamentos para Produção de Névoas Térmicas - Os inseticidas usados em névoas térmicas são diluídos em um líquido de transporte, que é usualmente a base de óleo. Gás quente é usado para aquecer o *spray* de inseticida, diminuindo a viscosidade do óleo de transporte, vaporizando-o juntamente com o inseticida dissolvido. A solução quando sai do bico é afetada pelo ar mais frio e condensa, formando uma nuvem densa e branca, essas gotas em sua maioria são menores que 20 µm. As gotas têm seu tamanho afetado pela interação entre a formulação a taxa de fluxo e a temperatura no bico do pulverizador (geralmente >500°C). O volume da mistura do *spray* aplicado no controle de vetores é geralmente de 5 a 10 litros por hectare, com um máximo absoluto de 50 litros por hectare. A emissão de gás quente é obtida a partir da exaustão de um motor comum ou de um motor *pulse jet*. A seguir são descritas as vantagens e desvantagens dessa técnica: Vantagem - Névoa facilmente avistada, conhecida como fumacê, logo a dispersão e penetração da névoa podem ser imediatamente observadas e monitoradas; boas relações públicas, uma vez que as pessoas podem ver algo sendo feito a respeito do problema; baixa concentração de ingrediente ativo na mistura do *spray*, com uma exposição reduzida do operador ao inseticida. Desvantagem - grandes volumes de solventes orgânicos, ex. óleo diesel, são usados como diluentes, que podem ter odor ruim e resultarem em marcas; alto custo de diluentes e aplicação de *spray*; moradores podem se opor à aplicação e obstruir a penetração da névoa dentro de suas casas com fechamento de portas e janelas; risco de incêndio devido à operação de máquinas a altas temperaturas com solventes inflamáveis; podem causar congestionamento de trânsito em áreas urbanas.

Outros equipamentos produzem a chamada névoa fria, onde as gotas são formadas pela separação mecânica da mistura aspergida, passando por bicos de alta pressão ou pela passagem de um lento fluxo da mistura por meio de um vórtex de ar a alta velocidade. Alguns equipamentos são ajustados com bicos giratórios de alta velocidade. As gotas do *spray* são geradas sem qualquer calor externo. Nesse caso, o volume de *spray* é mantido mínimo. Formulações de inseticidas de VUB são comumente usadas para tais aplicações. A seguir são descritas as vantagens e desvantagens dessa técnica: Vantagens - a quantidade de diluente é mantida mínima,

resultando em um custo de aplicação mais baixo e um aumento de sua aceitabilidade. Algumas formulações são disponibilizadas prontas para serem utilizadas, reduzindo dessa forma a exposição do operador; podem ser usadas formulações a base de água ou diluída em água, que confere um pequeno risco de incêndio, sendo também ambientalmente mais seguro; devido ao volume de líquido empregado ser mais baixo, a aplicação é mais eficiente; não provoca congestionamentos de trânsito, pois a nuvem de *spray* é praticamente invisível. Desvantagens - a dispersão da nuvem de *spray* é de difícil visualização; maiores capacitações técnicas e calibrações regulares são requeridas para operação eficiente do equipamento.

Pulverizadores Térmicos Portáteis - Estes são utilizados para tratamentos em casas e em algumas áreas externas de acesso ou tamanho limitado, como mercados, hotéis e parques. Existem dois tipos de pulverizadores térmicos portáteis: jatos pulsantes (*pulse jet*) e atrito em chapas (*frictional plate*).

Jatos Pulsantes (Pulse Jet) - Estas máquinas são equipadas com uma bomba (pistão, elétrica, etc) e uma bateria acoplada a um formador de centelha. Para acionar o motor, é usado um interruptor para conectar a bateria ao formador de centelha e acionar a bomba. Quando o combustível entra em ignição na câmara de combustão devido ao formador de centelha, as baterias não são mais utilizadas já que os gases quentes da exaustão incendeiam cargas subsequentes de combustível e ar. Um motor de jatos pulsantes (*pulse jet*) irá continuar a operar enquanto o combustível continuar sendo suprido pelo carburador. Os gases da combustão se movem através de um longo tubo até o bico, onde o inseticida é injetado dentro dos gases aquecidos. A máquina opera com um barulho pulsante muito grande. Uma válvula controla a taxa de fluxo na maioria das máquinas. Taxas de fluxo próximas a 25 litros por hora podem ser atingidas. As máquinas devem ser equipadas com uma válvula de segurança para interromper o fluxo de inseticida para o bico quando o motor interrompe sua operação.

Atrito em Chapas - Este tipo de máquina consiste de um motor de dois ciclos de 1–3 hp acionando chapas de atrito dentro do tanque de inseticida que pré-aquece a mistura de

óleo combustível e inseticida. Esta placa também é parte da bomba que envia o líquido para a exaustão do motor. Os gases quentes da exaustão geram e dispersam a névoa. Placas de fricção operam com temperaturas mais baixas que os motores a jato pulsante.

Pulvrerizadores de Névoas Térmicas Montados em Veículos - Grandes pulverizadores térmicos usam um motor refrigerado a ar para fazer funcionar um soprador, uma bomba de combustível e bomba de inseticida. Ar proveniente do soprador é injetado dentro da câmara de combustão. Na câmara, a gasolina vaporizada é misturada com o ar e incendiada para que a temperatura chegue entre 426°C e 648°C. O líquido inseticida diluído é bombeado através de uma válvula e injetado dentro de uma cuba na extremidade pulverizadora ou diretamente dentro do bico. O líquido inseticida é vaporizado pela explosão dos gases quentes. Apesar da alta temperatura, testes com alguns inseticidas recolhidos da ponta do jato mostraram muito pouca degradação do ingrediente ativo. Isto é devido ao tempo transcorrido, que a essa temperatura é apenas uma fração de segundo, o que não é um tempo longo o suficiente para causar uma degradação séria. Os gases quentes então são ejetados da máquina. Como o óleo quente é descarregado por meio de um bico relativamente grande para o ar externo mais frio, o óleo condensa, formando pequenas gotas de uma névoa densa. Taxas de descargas de aproximadamente 10 litros por minuto podem ser alcançadas com máquinas maiores.

Aplicação de Névoas Térmicas por Avião - Para aplicação de névoas térmicas por avião, o exaustor do avião é alimentado com uma formulação diluída de inseticida. O exaustor é adaptado com aletas para turbilhonar a névoa enquanto ela é formada. A aplicação de névoas térmicas por avião tem sido muito limitada.

Equipamentos para Aplicação de Névoas Frias - A maioria dessas máquinas possui motores a gasolina de 1 a 3 hp, de dois ciclos, que aciona um soprador para descarregar ar por um bico. O ar pode ainda pressurizar levemente o tanque de formulação de inseticida para que o líquido seja alimentado através de uma válvula

para o bocal.

Contudo, a pressão negativa gerada pela passagem do fluxo de ar pelo bico permite que o líquido flua do tanque. Essas máquinas são pequenas e pesam entre 6 e 11 kg. Além disso, para unidades portáteis, são disponíveis unidades de névoa fria em forma de mochilas, como também, vários modelos são acionados eletricamente.

A taxa de fluxo varia de 1 a 4 Litros por hora. Uma válvula calibrada ou preferencialmente um orifício fixo ou móvel controla a taxa de fluxo. Essas máquinas são ideais para tratamentos de ambientes internos e de áreas externas pequenas, onde o acesso de veículos é limitado.

Pulverizadores de Névoa Fria Montados em Veículos - Nos pulverizadores de névoas frias montados em um veículo, um soprador de grande volume é acionado por um motor a gasolina de 5 a 20 hp de 4 ciclos, forçando o ar a uma taxa de aproximadamente de 6 m^3 por minuto a baixa pressão (50 kPa) para um ou mais bicos. O ângulo de projeção da névoa fria desse bico pode ser ajustado. Bombas de deslocamento positivo podem ser usadas, ou ainda, o recipiente de inseticida pode ser pressurizado para forçar a formulação para o bico.

As bombas de deslocamento positivo podem ser ligadas eletricamente ao veículo, com o objetivo de variar o bombeamento em função da velocidade do veículo. Em particular a nebulização cessa quando o veículo está parado.

Aplicação de Névoas Frias com Avião - Tanto aviões quanto helicópteros têm sido utilizados para aplicar névoas frias. Bicos convencionais de baixo volume (como *flat fan*) têm sido utilizados em aviões para criar *sprays* finos, usando pressões moderadas ou altas. Contudo, o espectro de gotas é geralmente pobre, dessa forma, é dada preferência ao uso de atomizadores rotativos ou sistemas de alta pressão.

Um atomizador rotativo possui uma tela metálica cilíndrica que roda a alta velocidade por meio de um motor elétrico ou por meio de uma hélice de ventilação acionada pela velocidade do avião. O ângulo das hélices pode ser ajustado, sendo assim, a velocidade de rotação do atomizador pode ser ajustada em relação à velocidade do avião. Além da produção de gotas devido à força centrífuga, o ar

turbulento divide o líquido em gotas menores.

2.10. INSETICIDAS PARA PULVERIZAÇÃO AMBIENTAL

Rathburn (1979) dá uma relação das formulações de inseticidas, registradas nos Estados Unidos, onde figuram uma de Dibrom a 10% em nafta aromática ou óleo de soja, para ser aplicada a VUB. Esses registros são para mosquitos e outros dípteros, e neles o malation a VUB figura sempre a 91%. No Brasil há um registro de uso do Naled a 85% (GALVÃO, 1978), porém nunca foi usado contra mosquitos. Por sua vez o catálogo da Sumitomo dá uma formulação de Sumitiom (fenitrotion) VUB a 40%.

A OMS (1984) informa que, em aplicações a VUB terrestres ou aéreas, o malation a 40 g/L e o pirimifós metílico a 16 g/L, em solução oleosa, são eficientes contra mosquitos. Nessa mesma publicação a OMS declara que, contra o *Ae. taeniorhyncus,* uma solução de malation a 10% deu o mesmo resultado que o produto técnico. Por área, as concentraçãos de ingrediente ativo foram 41 g/ha e 249 g/ha.

Formulações para a pulverização do ambiente tem sido tradicionalmente a base de óleo. O óleo de transporte inibe a evaporação de pequenas gotas de névoa. Somente inseticidas com alto ponto de fusão devem ser utilizados para a nebulização térmica.

As formulações para pulverização do ambiente são:

Concentração de pulverização quente (CQ). A formulação adequada para aplicação pelo equipamento de pulverização térmica pode ser a mesma ou diluída.

Líquido de VUB. Um líquido homogêneo pronto para o uso por meio de um equipamento de VUB, que é formulado especificamente para baixa volatividade.

Emulsão, óleo em água (EA). Uma formulação de fluído heterogêneo consistindo de uma solução de inseticida em um líquido orgânico dispersado em glóbulos finos em uma fase contínua de água.

Concentrado emulsificável (CE). É uma formulação homogênea líquida aplicada como uma emulsificação após diluição em água e óleo.

Formulações tais como pó solúvel em água, concentrados suspensos e grânulos dispersos em água não são aplicáveis para aspersão do espaço. Uma formulação apropriada deve necessariamente ser escolhida e a instruções no rótulo

cuidadosamente seguidas para todas as aplicações.

2.11. NECESSIDADES FUTURAS PARA ESTUDOS DE SUSCEPTIBILIDADE DE INSETOS A INSETICIDAS

A necessidade de informações para a vigilância sobre resistência é global. Internacionalmente, será necessário o aumento na diversidade de medidas de controle de vetores, por meio do desenvolvimento de métodos simples e informativos. BROGDON e MCALLISTER (1998b) questionam a possibilidade de aprimoramento nos métodos moleculares e bioquímicos de detecção que estejam relacionados com as técnicas de bioensaios. Além disso, perguntam como os métodos de detecção de resistência podem ser simplificados para que pessoas relativamente não treinadas possam usá-los?

2.12. MÉTODOS DE CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*.

A principal forma de controle da dengue é o combate ao vetor. O controle visa reduzir suas populações a níveis que não representem risco para a Saúde Pública (OPAS, 1995) e tem como principais objetivos: 1) manejar os problemas existentes como, surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade; 2) prevenir epidemias ou a re-introdução da doença e; 3) reduzir os fatores de risco ambiental da transmissão. Para que esses objetivos sejam atingidos é necessário ter informações sobre o hospedeiro humano, a doença, o vetor e o ambiente e dispor dos recursos necessários para a aplicação oportuna (BRAGA et al., 1999; FUNASA, 2001a).

Controle Mecânico - Visa o controle de vetores a partir de ações como saneamento básico (qualquer modificação do ambiente que reduza as populações de insetos vetores) e educação ambiental para remoção ou destruição dos insetos, por meio da redução do número de criadouros artificiais no ambiente (pneus, vasos de plantas, coleta adequada de lixo). Segundo a OMS, o saneamento pode ser feito com três objetivos: 1) modificação do meio como, por exemplo, adequação dos serviços de água potável; 2) manipulação do meio com tratamento de dejetos sólidos e; 3) medidas para reduzir o contato humano com o vetor, como a instalação de telas em janelas,

mosquiteiros e uso de repelentes (OPAS, 1995).

Ações Educativas - Objetiva a conscientização dos agentes de campo e da população sobre medidas de prevenção da dengue através do controle do vetor. A participação e adesão aos programas e ações de controle pela população é essencial para o controle do mosquito uma vez que dela depende a diminuição no número de criadouros artificiais (FUNASA, 2001a, 2001b). A conscientização da população pode ser feita através da mídia, das escolas, de associações comunitárias e de cursos (OPAS, 1995). Brassolati e Andrade (2002) avaliaram uma abordagem educativa para a prevenção da dengue em Campinas, SP, sendo que professores do ensino fundamental foram treinados, por meio de um curso, onde receberam materiais didáticos e agentes biológicos de controle para ações educativas com os alunos e desses para os familiares. Os resultados demonstraram um aumento do conhecimento, porém tal conhecimento não foi repassado de forma a causar impacto significativo nos conceitos sobre o controle da doença.

Controle Biológico - É baseado na utilização de inimigos naturais ou patógenos do vetor como agentes de controle, resultando na redução da proliferação do mosquito. Dentre as metodologias existentes, as mais utilizadas para o controle de *Ae. aegypti* são o emprego de peixes larvívoros (*Gambusia affinis* e *Poecilia* spp.) e inseticidas biológicos a base de *Bacillus thurigiensis* var. *israelensis* (Bti) sorotipo H-14 e o *Bacillus sphaericus* (Bs) (OPAS, 1995).

Descoberto na década de 1970 o Bti encontra-se disponível comercialmente como larvicida (OPAS, 1995) e é mais eficiente no controle de *Ae. aegypti* que o Bs (DONALÍSIO e GLASSER, 2002). Esse microorganismo produz uma toxina que se degrada exclusivamente em ambiente alcalino, como o encontrado no sistema digestório dos dípteros da subordem Nematocera, apresentando eficácia comprovada em programas de controle de dengue (OPAS, 1995). Atualmente, o Bti vem sendo utilizado no Brasil em regiões em que já foi detectada resistência do *Ae. aegypti* ao temefós (BRAGA et al., 2004; FUNASA, 2001b; LIMA et al., 2003). Também já foi demonstrado que ninfas de Odonata, copépodos, planárias e larvas de mosquitos do

gênero *Toxorhynchites* sp. podem ser usados como predadores de larvas de *Ae. aegypti* em programas que dependem da sua introdução e monitoramento em criadouros que não podem ser eliminados.

O controle biológico é vantajoso no que diz respeito à não-contaminação do ambiente com produtos químicos, a especificidade da atividade contra o organismo controlado e a autodispersão em locais de difícil acesso. No entanto, só pode ser utilizado contra as formas imaturas dos vetores, o que nem sempre está relacionado com a capacidade de transmissão de doenças (FUNASA, 2001b; OPAS, 1995).

Controle Legal - O controle legal está relacionado com o uso de instrumentos jurídicos (leis e portarias) que exigem, regulamentam ou restringem determinadas ações (FUNASA, 2001b). Para o controle de *Ae. aegypti* existem códigos sanitários, leis gerais de saúde e regulamentações para o controle sanitário internacional que se aplicam a qualquer programa de controle epidemiológico. Como exemplos podem se citar a limpeza de terrenos baldios, medidas relacionadas à educação ambiental e destino adequado de resíduos sólidos (OPAS, 1995). Em 2001, o reitor Hermano Tavares, Unicamp, assinou a Portaria GR nº 084 onde ficaram estabelecidos os seguintes artigos: Artigo 1º - Fica proibida a existência de recipientes, plantas ou quaisquer objetos que possam se tornar criadouros dos vetores da Dengue tanto no ambiente interno quanto externo das unidades dos campi; Artigo 2º- Ficam designados como responsáveis pelo controle da eliminação e criadouros nas unidades os seus respectivos diretores-coordenadores; Artigo 3º - Ficam desde já designados para o trabalho de rastreamento dos ambientes interno e externo das unidades os servidores pertencentes à Cipa, Seesmet, Cecom e Prefeitura do Campus que, para tanto, deverão receber treinamento adequado; Artigo 4º - A criação da Comissão Permanente de Controle da Dengue na Unicamp, composta por: Coordenador do Cecom, Prefeito do Campus, um docente do IB e um docente da FCM ligados ao assunto.

Controle Químico - O controle químico se baseia no uso de produtos químicos para eliminar ou controlar vetores e oferece como principais vantagens, a rapidez e a facilidade com que atuam. Esse tipo de controle é realizado para o *Ae. aegypti* desde o

início do século passado, com a primeira campanha contra a febre amarela realizada em Cuba e no Panamá quando as residências foram tratadas com petróleo e piretrina. Na década de 1940 o DDT se destacou como o principal agente químico utilizado nos programas de erradicação do mosquito realizados no continente americano. A partir do surgimento de resistência ao DDT, na década de 1960, inseticidas organofosforados começaram a ser utilizados (OPAS, 1995).

Atualmente, o emprego desse método é limitado, sendo a última alternativa de controle a ser utilizada, uma vez que ações menos agressivas e eficazes devem ser prioritárias. Seu uso é recomendado em caso de emergência ou quando não houver outra ferramenta disponível (FUNASA, 2001a, 2001b; OPAS, 1995).

Controle Integrado - O controle integrado é direcionado aos criadouros (DONALÍSIO e GLASSER, 2002) e sua realização é feita pela combinação de vários métodos de controle (OPAS, 1995; WHO, 2004). As medidas preventivas se constituem principalmente de ações simples e eficazes, especialmente aquelas que consistem em cuidados a serem adotados pela população (DONALÍSIO e GLASSER, 2002). São elementos do controle integrado: controlar a população natural de mosquitos a partir do controle de fatores limitantes a sua sobrevivência; educação sanitária, visando a participação comunitária; saneamento básico para eliminação de criadouros; controle biológico aplicado; barreiras mecânicas e controle químico (FUNASA, 2001b; OPAS, 1995).

Integração de Controle de Aedes aegypti com outros Vetores - Podem ser utilizadas medidas que visem o controle de várias espécies de vetores, sendo uma delas de importância conhecida pela comunidade local. Um exemplo é o controle de *Aedes* sp. e *Cx. quinquefasciatus* em regiões em que o segundo represente risco para transmissão de doenças de conhecimento dos moradores (OPAS, 1995).

2.13. METODOLOGIA UTILIZADA PARA AVALIAR O IMPACTO DE INSETICIDAS NO CONTROLE, EM CAMPO, DE MOSQUITOS ADULTOS.

Dois fatores devem ser considerados para avaliar a eficácia do uso de inseticidas em determinada área: a redução da taxa de transmissão da doença e a redução da população local do vetor (quantidade de fêmeas, quantidade de mosquitos capturados por dia, avaliação de paridade e idade fisiológica) (GEBARA e ALMEIDA, 1988; REITER e NATHAN, 2001).

O modelo de avaliação proposto por Reiter e Nathan (2001) e preconizado pela OMS baseia-se na detecção do vetor na área tratada. Essa detecção é feita pela captura de mosquitos adultos através de aspirador costal e uso de armadilhas de oviposição, antes e após a realização do tratamento químico, para mensurar possíveis variáveis na população do vetor. Para avaliar o efeito da aplicação na população-alvo, os autores propõem a realização de bioensaios com mosquitos em gaiolas expostas ao inseticida durante a aplicação.

2.14. METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA AVALIAR O IMPACTO DE INSETICIDAS NO CONTROLE, EM LABORATÓRIO, DE MOSQUITOS ADULTOS.

O objetivo para se realizar testes de susceptibilidade é detectar a presença de indivíduos resistentes em uma população de inseto para que se possa, tão logo quanto possível, iniciar planos de controle alternativo, evitando-se assim custos adicionais e problemas na redução da população do vetor.

A WHO tem desenvolvido *kits* para realização de bioensaios, tanto em adultos quanto em larvas, com o objetivo de padronizar tais experimentos e obter respostas passíveis de serem analisadas.

Em 1981, WHO estabeleceu que dois fatores são necessários serem avaliados para reconhecimento de resistência em população. Primeiro, é necessário o estabelecimento da linha base de susceptibilidade de populações normais (entende-se por população normal aquela que nunca foi submetida a pressão por inseticidas e que a presença de indivíduos resistentes são raros). A linha base é determinada expondo-se uma população a uma série de concentrações ou a uma série de tempos de leitura para uma única concentração. O resultado é analisado transformando as concentrações ou

tempo em logaritmo e as mortalidades em probit. A partir desses resultados, é possível extrapolar a concentração ou tempo que proporcionou 100% de mortalidade na população normal, obtendo-se assim a concentração ou tempo diagnóstico. Segundo, aplicando-se a concentração ou tempo diagnóstico em uma população submetida a pressão de seleção, deve ser possível a detecção de indivíduos tolerantes, ou mesmo resistentes, e até o monitoramento das mudanças na frequência de ocorrência dessas anormalidades.

A seguir serão descritos os detalhes dos métodos propostos por WHO em diferentes anos para avaliação de susceptibilidade de mosquitos a inseticidas:

Método do Papel Impregnado (WHO)

Em 1981 foi proposto que, nos testes com indivíduos do campo, sejam utilizadas fêmeas (preferencialmente alimentadas com sangue - ingurgitadas), pois se sugere que haja diferença na susceptibilidade entre os sexos. Sugere-se que fêmeas sobrevivem melhor, ocorrendo menor mortalidade na testemunha.

Se não houver mosquitos em quantidade suficiente (no mínimo 100 indivíduos), pode-se usar uma mistura de fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas. De outro modo, na continuidade de escassez de indivíduos, podem-se coletar larvas e partir de então obter-se os adultos. Fêmeas sem alimentação sanguínea podem ser utilizadas desde que recentemente emergidas.

Em 2006 a metodologia foi detalhada com utilização de papel filtro Whatman® nº 1 ou equivalente de 12 x 15 cm (180 cm^2) impregnado com uma concentração diagnóstico de um inseticida grau-técnico ou produto formulado.

Para impregnação de cada folha de papel deve ser utilizada uma dada quantidade (mg) do inseticida (exemplo: 5,25 mg i.a. de malation) adicionada a 648 mg de óleo de oliva e 2 mL de acetona. Dessa forma é possível obter a concentração diagnóstica expressa em porcentagem (no caso do volume de malation exemplicado acima, obtém-se uma concentração de 0,8%). Esses valores podem ser multiplicados para a obtenção de um volume maior de solução.

A impregnação é feita liberando o volume de 2 mL de solução inseticida sobre a folha de papel por meio de pipeta. Para isso o papel é colocado sobre uma placa de

papelão com alfinetes, de forma que o papel fique suspenso, apoiado somente na ponta dos alfinetes. Após a impregnação, o papel é colocado para secar à temperatura ambiente por 24 h e após a secagem é armazenado em geladeira. Cada folha de papel impregnado não deve ser utilizada mais do que cinco vezes. Para avaliação na testemunha o papel será impregnado somente com 2 mL de acetona.

O bioensaio utilizando papel impregnado consiste na utilização de grupos de 25 fêmeas, não alimentadas com sangue, com 2-5 dias de idade que são introduzidas em um tubo de armazenagem e mantidas por 1 hora à 25±2ºC e 80±10% de umidade relativa, no escuro e sem alimentação açucarada. Após esse período as fêmeas são transferidas para um tubo de exposição com o papel impregnado por mais 1 hora, no escuro e sem alimentação açucarada. Após a exposição ao inseticida, as fêmeas são novamente transferidas para o tubo de armazenagem onde serão mantidas por 24 h com alimentação açucarada e mesma temperatura e umidade relativa anterior (Figura 1). A avaliação de mortalidade é feita após 24 h. São feitas quatro repetições para o papel impregnado e para a testemunha, sendo que o ensaio deverá ser repetido três vezes.

As medidas dos tubos são 125 mm de altura x 44 mm de diâmetro, sendo que uma das extremidades é fechada com uma tela de malha 16. Na outra extremidade há uma placa com um orifício de 20 mm. Esse orifício serve para a introdução das fêmeas após a coleta com aspirador (Figura 1). Os papéis impregnados devem ser posicionados contra a parede do tubo e fixados com clips de aço.

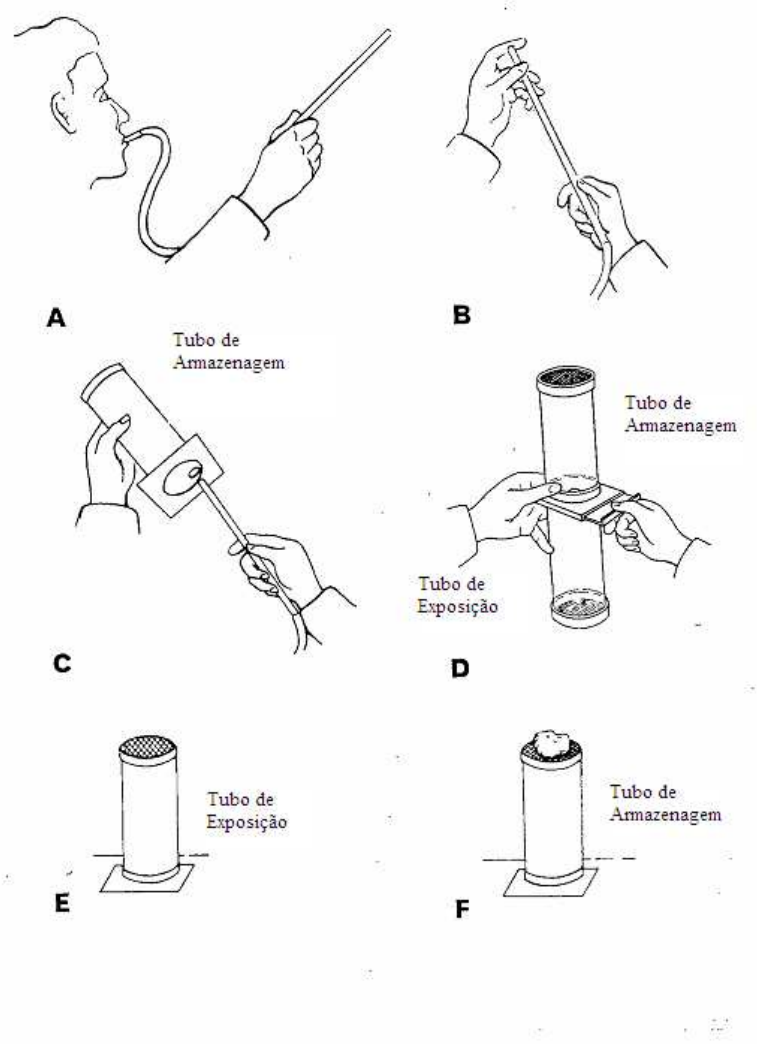


Figura 1 – Esquema demonstrando o manuseio dos equipamentos para realização de bioensaios com papel impregnado (WHO, 1981).

A susceptibilidade de *Ae. aegypti* da República Dominicana ao malation, propoxur, DDT, permetrina e resmetrina foi avaliada utilizando-se o método do papel impregnado (Mekuria et al., 1991). Mekuria et al., 1994 determinaram a susceptibilidade de *Ae. taeniorhynchus* e *Ae. sollicitans* da Carolina do Sul (Estados Unidos) utilizando papel impregnado com malation, fenitrotion, propoxur e permetrina. Karunaratne e Hemingway (2001) utilizaram esse método para determinar os níveis de resistência ao malation de alguns vetores no Sri Lanka. Paeporn et al. (2005) avaliaram a susceptibilidade de *Ae. aegypti* ao fenitrothion, permetrina, deltametrina, ciflutrina e

DDT em área afetada pelo tsunami na Tailândia e Chaiyasit et al. (2006) determinaram a susceptibilidade de *Ae. aegypti* da Tailândia a permetrina e lambdacialotrina.

- **Desvantagens do método, segundo o autor do presente trabalho**

Custo do material: A WHO disponibiliza para compra *kits* com os equipamentos citados acima, além do papel já impregnado. Porém, ainda não é possível comprar via internet, assim como cartão de crédito. A forma de pedido consiste no preenchimento de um formulário e envio via Correios e depósito bancário em conta na Malásia. Nesse tipo de transação existem cotas tarifárias que não permitem depósitos menores do que US$ 106, tornando a compra do material ainda mais custosa, o que muitas vezes inviabiliza a negociação. Além disso, para impregnação é necessário o uso do papel Whatman® nº1, o que no Brasil é de custo elevado. *Contato tarsal com o papel*: A metodologia do papel impregnado permite que os mosquitos, quando expostos ao inseticida, tenham contato com o papel somente por meio dos tarsos recebendo assim uma pequena concentração do inseticida. *Possibilidade do não contato dos mosquitos com o papel*: como o papel fica posicionado nas bordas do recipiente, é possível que algum mosquito não entre em contato com o papel, ficando posicionado na tela da extremidade do recipiente, mascarando assim o resultado da mortalidade. *Possibilidade do escape de mosquitos*: como há necessidade de transferir os mosquitos entre o recipiente com papel e aquele sem papel há possibilidade de que mosquitos escapem nesse procedimento.

Método de Atividade Intrínseca do Inseticida (WHO) A susceptibilidade de mosquitos a inseticidas utilizando esse método tem sido muito pouco utilizada. Os motivos alegados para isso são em geral problemas técnicos, como a imobilização pelo Dióxido de Carbono (CO_2), o uso de placa fria (*Chill Table* – Catálogo BioQuip n. 1429, preço US$550) (Figura 2) e o tempo para que os mosquitos adultos sejam tratados com uma concentração de inseticida sobre seu dorso. Em função disso, as bibliografias enfocando tais métodos são escassas. No entanto, uma das razões para se dedicar a esse método é que se pode estabelecer de fato Doses Letais, sabendo-se exatamente o quanto de inseticida o mosquito recebeu em cada aplicação, ao contrário de outros

métodos, como o da garrafa (*Bottle Assay* - CDC Method, BROGDON e MCALLISTER, 1998a) ou do Papel Impregnado, que resultam em Concentrações Letais. A metodologia de aplicação tópica já foi re-adaptada de trabalhos da WHO na África, com borrachudos, para a detecção de resistência ao Temephos em *Simulium pertinax* no litoral do Estado de São Paulo (ANDRADE e CASTELLO BRANCO JR., 1990).

Meisch et al. (1994) avaliaram a resposta de *An. quadrimaculatus* à permetrina e à resmetrina, utilizando para a aplicação tópica uma micro-seringa de 25 µL regulada para dispensar, repetidamente, 0,5 µL da solução dos inseticidas em acetona. As aplicações iniciaram sempre a partir da dose mais baixa, e após o tratamento de 10 indivíduos por repetição, a solução restante era descartada e a micro-seringa lavada com acetona por três vezes. Para ajudar na visualização do mosquito, uma lupa foi colocada sobre a placa fria, onde ficavam posicionados os mosquitos. Os pesquisadores utilizaram fêmeas grávidas, que eram mantidas em um recipiente, colocado dentro de outro recipiente maior. O conjunto era colocado em um *freezer* por 5 min e, logo após as fêmeas ficarem imobilizadas, eram colocadas sobre a placa fria (0-2ºC). A mortalidade foi verificada após 24h.

Alguns anos após, em 1996, a WHO publicou o *"Report of the WHO Informal Consultation on the Evaluation and Testing of Insecticides"* no qual estão descritas as metodologias preconizadas para avaliação de susceptibilidade utilizando mosquitos adultos. O manual informa que a metodologia de aplicação tópica consiste na aplicação de uma micro-gota de 0,1 µL de uma solução de inseticida diluída em acetona. Indica também que a micro-gota deve ser aplicada sobre o pronoto do mosquito por meio de micro-pipetas, de forma a proporcionar a obtenção e dispensa do volume acima citado. Nesse manual há ainda a descrição de que um micro-capilar, semelhante ao disponível no *kit* para testes com mosca-doméstica (0,36 µL), pode ser cortado (ou quebrado) de forma a dispensar 0,1 µL para os testes com mosquitos. Segundo ainda a WHO (1996) os mosquitos deverão ser anestesiados com CO_2 e mantidos na placa fria durante todo o teste (Figura 3). Recomenda-se a utilização de 30 fêmeas não alimentadas com sangue, com 2 a 5 dias de idade para cada repetição, sendo que para a obtenção da curva de mortalidade devem ser avaliadas 5 doses com três repetições cada dose. Segundo o manual, a Dose Letal Mediana (DL_{50}) e a Dose Letal que mata 95% dos

mosquitos (DL_{95}) serão calculadas a partir do peso médio das fêmeas e determinada em nanogramas de inseticida por miligrama de peso de mosquito fresco.

Figura 2 – Modelo de placa fria proposta pela WHO para manutenção de mosquitos anestesiados.

Figura 3 – Mosquitos anestesiados recebendo a aplicação de uma gota de solução inseticida por meio de micro-capilar.

Cruz et al. (1997) utilizando o método de atividade intrínsica descrevem que os resultados obtidos para determinação de susceptibilidade de *Anastrepha fraterculus* (Diptera) ao fention se mostraram inconsistentes devido ao uso dos diluentes álcool e acetona os quais proporcionaram mortalidade maior do que 10%. Segundo os autores, esse tipo de método não é adequado para determinar a toxicidade de *An. fraterculus* assim como não permite o estabelecimento de uma CL_{50} e nem uma CL_{90}.

Mais recentemente, Bonnet et al. (2004) avaliaram a resistência de *An. gambiae* a piretroide e organofosforados, utilizando também o método de aplicação tópica. As

avaliações foram feitas utilizando a metodologia descrita pela OMS em 1996, porém não há descrição detalhada do equipamento utilizado para aplicação da micro-gota de 0,1 µL, indicando-se apenas o uso de um tubo micro-capilar.

WHO (2006a) publicou o "*Guidelines for Testing Mosquito Adulticides for Indoor Residual Spraying and Treatment of Mosquito Nets"* no qual há a descrição mais detalhada para avaliação de susceptibilidade de mosquitos a inseticidas por meio de aplicação tópica. Nesse guia, recomenda-se que 50 mosquitos sejam pesados para a determinação do peso fresco médio. Micro-gotas de 0,1 µL podem ser aplicadas com micro-capilar. Recomenda-se cortar em 5 pedaços um capilar maior, de capacidade 0,5 µL e 32 mm de comprimento (Drummond Microcaps®), para que fiquem com 6,4 mm e dispensem o volume de 0,1 µL. No entanto, alternativas para dispensar a micro-gota podem ser utilizadas.

As orientações da WHO (2006a) para mosquitos *Anopheles* são para o uso de um total de 50 fêmeas (dois grupos de 25 indivíduos) não alimentadas com sangue, com 2 a 5 dias de idade para cada dose. Uma amplitude de 5 doses é conveniente para que possa cobrir uma faixa de 5% a 99% de mortalidade e fazer os cálculos das DL_{50} e DL_{95}. Os mosquitos deverão ser anestesiados com CO_2 e mantidos na placa gelada a 4ºC. Após o tratamento, os indivíduos devem ser transferidos para um recipiente com solução de mel a 10% e mantidos por 24 h em temperatura de 27±2ºC e umidade relativa de 80±10%. A mortalidade será assim aferida após 24 h da aplicação, e cada ensaio deverá ser realizado três vezes para os cálculos.

Conforme descrito acima a metodologia de atividade intrínseca de inseticidas em mosquitos está preconizada pela WHO. Porém, não há citações mais recentes da WHO sobre o estabelecimento de Linhas Base de Susceptibilidade para os inseticidas mais comumente usados em Saúde Pública. Os valores que direcionam a obtenção de Linha Base são citados em WHO (1968), sendo que para o *Ae. aegypti* são: DL_{50} = 2,1 µg/g de mosquito para fention; DL_{50} = 4 µg/g de mosquito para malation; e DL_{50} = 3,7 µg/g de mosquito para propoxur. O peso médio de cada fêmea é de 2,0 mg segundo FISK (1950).

Existem ainda outros trabalhos que podem servir de base para o desenvolvimento dessas Linhas Base. Estenik e Federle (1975), por exemplo,

descrevem a susceptibilidade de libélulas (*Ischnura verticalis*) (Odonata) a inseticidas, sendo que a DL_{50} (12 h após a aplicação) para malation foi de 1,7 µg/g de indivíduo; portanto seriam essas libélulas bem mais sensíveis ao malation do que o *Ae. aegypti* (DL_{50} = 4 µg/g). No mesmo artigo é citado que dados de aplicação tópica em insetos aquáticos são escassos e poucos valores têm sido encontrados para comparação com *Ischnura.* Mencionam, por exemplo, para *Cx. quinquefasciatus* a DL_{50} de 1,1 µg/g de fention (GEORGHIOU e METCALF, 1961); portanto também mais sensíveis do que o *Ae. aegypti* (DL_{50} = 2,1 µg/g). Para *An. quadrimaculatus* o peso médio por inseto é citado como sendo 2,3 mg, e a DL_{50} para malation é 4,2 µg/g de indivíduo (JEFFEERY, 1956; LUDVIK, 1953); valor praticamente igual ao de *Ae. aegypti*. Esses dados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos dados citados nas bibliografias sobre aplicação tópica, demonstrando as DL_{50} (µg/g) para alguns inseticidas e peso de algumas espécies de insetos adultos.

Espécie	**Peso (mg)**	**Inseticida**	**DL_{50} (µg/g)**
Ischnura verticalis (libélula)			
- Fêmeas heterocromáticas	13,1±1,9		
- Fêmeas homeocromáticas	19,2 ±2,1	malation	1,7
- Machos	15,1 ±1,6		
Culex quinquefasciatus	?	fention	1,1
Anopheles quadrimaculatus	2,3	malation aletrina	4,2 3,5
Aedes aegypti	2,0	malation fention propoxur	4,0 2,1 3,7

- <u>Desvantagens do método, segundo o autor do presente trabalho</u>

Anestesia com CO_2 – Induz ao estresse. *Placa gelada* – Induz estresse adicional. E o mais importante, retarda a evaporação da acetona (que é apenas o veículo do inseticida) aumentando também a mortalidade na testemunha. De fato, nessas condições, tem-se que trabalhar com um volume menos preciso, de 0,1 µL de solução inseticida. *Micro-capilar Drummond* - Tanto o 'pedaço' cortado (1/5 de capilar 0,5 µL) quanto o capilar de 0,1 µL, funcionam mais por capilaridade. Para aspirar, precisam encostar-se ao líquido. E para dispensar, precisam encostar (tocar) no mosquito. Isso produz estresse e leva à mortalidade por fator mecânico. Necessita de muito treinamento para que a gota não espirre; não se pode utilizar muita força nos dedos por que o micro-capilar recebe mais líquido do que o necessário. Ainda, não se tem certeza de que a micro-gota liberada é realmente de 0,1 µL, pois em avaliações com o micro-capilar de 0,5 µL encontramos diferença no volume dispensado quando comparado com uma micro-pipeta automática calibrada. Para avaliação desse parâmetro foram feitas 10 aplicações de micro-gotas de tinta nanquim em papel filtro tanto para o capilar quanto para a micro-pipeta, sendo que para o capilar Drummond o tamanho médio da gota foi de 3 mm e para a micro-pipeta foi de 4,1 mm.

Método da Garrafa (CDC) - O método da garrafa foi desenvolvido para determinação do Tempo Letal. Esse método consiste em uma garrafa de 250 mL com tampa onde, internamente, é espalhada uma concentração de inseticida em acetona com pipeta. Grupos de 10-20 mosquitos são liberados dentro da garrafa e leituras de mortalidade são feitas em intervalos de 10 min. Logo após, as garrafas são lavadas para se possa utilizar novamente (BROGDON e MCALLISTER, 1998a).

Sames et al. (1996) determinaram a susceptibilidade de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* do Texas e México ao malation, clorpirifos, resmetrina e permetrina. Os mosquitos adultos foram coletados em campo com aspirador, anestesiados com CO_2 e mantidos em uma placa fria para separação das fêmeas e espécies. Seis concentrações para cada inseticida foram preparadas em acetona para a impregnação da garrafa.

Lima et al. (2003) avaliaram a susceptibilidade de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro

e Espírito Santo a organofosforados. Três garrafas foram impregnadas com 40, 90 e 80µL de uma solução estoque em acetona de 10 mg/mL de malation, temefós e fenitrotion, respectivamente e uma garrafa apenas com acetona. A mortalidade foi determinada em intervalos de 15 min., finalizando em 45 min. para malation e 75 min. para temefós e fenitrotion. Em caso de resistência as leituras se seguiram até 120 min. Cada ensaio foi repetido 3 vezes.

Apesar de o método da garrafa ter sido descrito para estudos com mosquito, Santamaria et al. (2003) utilizaram o método para avaliar a susceptibilidade de flebotomíneos a lambdacialotrina. Para isso fizeram algumas modificações para observação do comportamento dos insetos dentro da garrafa, sendo que os flebotomíneos foram liberados em garrafas limpas, sem qualquer adição de solvente ou inseticida, garrafas com dois volumes de acetona. Posteriormente, as garrafas foram impregnadas com o inseticida.

- **Desvantagem do método, segundo o autor do presente trabalho**

Contato tarsal: da mesma forma que o papel impregnado, o método da garrafa permite que os mosquitos recebam o inseticida apenas pelo contato tarsal.

2.15. EFEITO DO CO_2 E BAIXA TEMPERATURA, UTILIZADOS COMO ANESTÉSICOS EM INSETOS.

A WHO (2006a) recomenda que mosquitos *Anopheles* sejam anestesiados com CO_2 durante 30 seg. e mantidos sobre uma placa resfriada a 4°C para aplicação de uma gota de inseticida e assim a determinação de susceptibilidade.

Ambas formas de imobilização são comumente utilizadas em laboratório para, por exemplo, determinar o sexo. Ashburner e Thompson (1978) citam que os três métodos mais comuns de imobilização de insetos são: CO_2, éter e resfriamento (colocando insetos sobre gelo por curto período de tempo). Eles concluem que o CO_2 e o resfriamento são preferíveis ao éter, mas nenhum desses métodos está livre de algum problema como aumento no tempo de desenvolvimento e diminuição do peso seco.

Em *Drosophila melanogaster*, o CO_2 eleva o nível de atividade motora (NICOLAS e SILLANS, 1989) e afeta o comportamento reprodutivo das fêmeas, reduzindo a

receptividade sexual (ASHBURNER et al., 1989; BARRON, 2000), a longevidade e a fecundidade (PERRON et al., 1972). Dióxido de carbono pode causar dano no tecido e mortalidade em *Drosophila* recém eclodida, se a cutícula não estiver suficientemente endurecida para impedir a entrada de CO_2 e consequentemente à ruptura do estômago (ASHBURNER, 1989). Esse gás é extramente tóxico para moscas infectadas com o vírus sigma (ROBERTS, 1986). A exposição de insetos a altas concentrações afeta negativamente os processos neurológicos e o comportamento de alimentação (NICOLAS e SILLANS, 1989; BARRON, 2000). Embora anestesia utilizando CO_2 não causou mortalidade em baratas, o movimento e consumo de alimentos pode ser afetado durante horas ou dias após a recuperação da anestesia (TANAKA, 1982; BRANSCOME et al., 2005).

Em baixas concentrações, CO_2 pode ser atraente para insetos. Vespas *Manduca sexta* (Hymenoptera), por exemplo, podem ser atraídas para flores recém-abertas, as quais liberam CO_2, aumentando o forrageamento dessa espécie (GUERENSTEIN et al., 2004). É bem conhecida a atratividade de CO_2, liberado pelo hospedeiro, para fêmeas de mosquitos para alimentação sanguínea (WARNES e FINLAYSON, 1985; NUÑEZ, 1982; LEHANE, 1991; EIRAS e JEPSON, 1991; BARROZO e LAZZARI, 2004; CABRINI e ANDRADE, 2010). No entanto, em algumas concentrações maiores, o efeito atraente do CO_2 pode se tornar anestésico. SUH et al. (2004) sugeriram que CO_2 causa estresse em *Drosophila* levando ao comportamento de evitar o sexo exposto.

Badre et al. (2005) avaliaram diferentes concentrações de CO_2 em larvas de *Drosophila* e demonstrou que, durante e após a exposição direta de 100% de CO_2 por cinco minutos nos espiráculos das larvas, em menos de um minuto, todos os indivíduos estavam anestesiados, não respondendo a nenhum estímulo mecânico. Os indivíduos assumiram alguns aspectos comportamentais como, ficar em posição curvada, em posição alongada e corpo flácido e posição contraída. Na ausência do CO_2, as larvas recobraram rapidamente a locomoção em menos de 10 min.

Mesmo causando menos efeitos deletérios ao inseto, baixas temperaturas podem afetar a memória em alguns insetos (QUINN e DUDAI, 1976; VAN BAAREN et al., 2005) e impedir a entrada do esperma em fêmeas de *Drosophila* (ASHBURNER et al, 2005).

Temperaturas abaixo de um determinado limite podem causar inativação e destruição de enzimas ou de nutrientes com maior rapidez do que são sintetizados, afetando os processos metabólicos dos insetos (HOWE, 1966). A exposição do inseto, em determinadas fases da vida, a baixas temperaturas pode fazer com que os danos acumulados se manifestem na fase seguinte do ciclo biológico. A morte do inseto, nessas condições pode ser causada por acúmulo de produtos tóxicos, ausência de absorção de nutrientes, desidratação e injúria mecânica por cristais de gelo nos fluídos corporais (MULLEN e ARBOGAST, 1983).

Crespigny e Wedell (2008) demonstram que grupos de *D. melanogaster* anestesiada com CO_2 e depois transferida para baixa temperatura tiveram uma porcentagem de sobrevivência de 4%.

Outra utilização para o CO_2 e baixa temperatura consiste no controle de insetos, principalmente na agricultura, eliminando pragas de grãos armazenados e frutas estocadas. O método utilizado nessa situação é denominado de atmosfera controlada, que se baseia na alteração da composição gasosa de um ambiente (JAY, 1983; NICOLAS e SILLANS, 1989; JAYAS et al., 1991).

Spratt (1979) observou que *Sitophilus zeamais* (Coleoptera) presentes em grãos de milho em ambiente com O_2, CO_2 e N_2 na proporção de 1:1:8, respectivamente, apresentou algumas alterações, como: atraso no desenvolvimento, redução na fecundidade e consequentemente na descendência. A nova geração, por sua vez, apresentou menor taxa de eclosão, maior mortalidade pós-eclosão e redução na postura. Guedes et al. (1996) demonstrou que a mortalidade de *S. zeamais* aumenta de acordo com a concentração de CO_2 e que mesmo na menor concentração houve mortalidade.

2.16. MOSCAS DA FAMÍLIA CHLOROPIDAE

As moscas que compõem a Família Chloropidae são chamadas vulgarmente de mosquito-ramela e mosquinha-lambe-olho, sendo que tanto as larvas quanto os adultos são comuns em matéria orgânica em decomposição. Os adultos se caracterizam pelo pequeno tamanho, com cerca de 1 a 3 mm e são incômodos ao homem e animais principalmente pelo hábito de pousar nos olhos e orelhas para se alimentar das

secreções corporais e feridas abertas (HARWOOD e JAMES, 1979; SABROSKY, 1987). A família é cosmopolita, com aproximadamente 2000 espécies já descritas, classificadas em três subfamílias: Siphonellopsinae, Chloropinae e Oscinellinae, estando nesta última os gêneros *Hippelates* e *Liohippelates.*

As moscas dessa família não são vetoras de doenças que possam causar grandes epidemias, no entanto, são responsáveis por veicularem algumas doenças principalmente pelo seu hábito alimentar. Os gêneros *Liohippelates* e *Hippelates* são importantes na região Neotropical, principalmente no Brasil por causarem conjuntivite aguda endêmica, sendo que a espécie de maior incriminação é *Liohippelates flavipes*.

Francisco (2005) descreveu uma revisão sobre cloropídeos como vetores de doenças, como seguem:

Nicholls (1912) cita os cloropídeos como transmissores mecânicos de *Treponema pertenue*, o agente etiológico da bouba.

Em 1933, Bengtson registrou a ocorrência de conjuntivite aguda no sudeste americano, causada por *Haemophilus aegyptius* e transmitida por *Liohippelates pusio*.

Kumm et al. (1935) citam *Hippelates pallipes* como transmissor mecânico de *Treponema pertenue* na Jamaica. Os autores encontraram espiroquetas móveis 24 horas após a infecção de *Hi. pallipes*, no intestino anterior e probóscide.

Segundo Sanders (1940), moscas do gênero *Hippelates* e *Musca domestica*, são potenciais vetores da mastite bovina, determinando grandes prejuízos na produção de leite.

Davis e Pittman (1950) relataram a possível transmissão mecânica de *Haemophilus* sp. por *Liohippelates pusio,* visto que a incidência de conjuntivite parecia coincidir com a distribuição geográfica e a variação sazonal destes insetos.

Os surtos de conjuntivite causados pelo *Ha. aegyptius* foram concomitantes com os picos de maior densidade de *Liohippelates collusor* (Dawson 1960).

Taplin et al. (1967), mostraram que os cloropídeos são capazes de transmitir os agentes da estreptococcemia beta hemolítica e a estafilococcemia coagulase-positiva, as quais causam piodermias no Panamá.

Basset (1970), em Trinidad, isolou *Streptococcus pyogenes* de cloropídeos associados com infecções estreptocóccicas da pele. Concluiu-se que estes insetos

provavelmente contribuem para a rápida distribuição da estreptococcemia na ilha.

No Brasil, os casos de uma doença que acometia crianças na faixa etária de 2 meses a 10 anos, caracterizando-se clinicamente por início súbito, com febre alta associada a vômitos e dor abdominal, geralmente evoluindo em 12 a 48 h para o aparecimento de púrpura, colapso vascular, necrose de pele foram notificados no Estado de São Paulo, segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria da Saúde, ocorrendo na sua maioria em áreas periféricas de pequenos municípios do interior paulista, abrangendo as regiões administrativas de Bauru e Marília em 1984-1985 e além desta última, as de Ribeirão Preto, Presidente Prudente, São José do Rio Preto e Campinas em 1986. Casos semelhantes foram notificados em 1984, no município de Londrina, Estado do Paraná (Irino et. al., 1987). De outubro de 1984 a março de 1985 e novamente durante o primeiro semestre de 1986, foi detectada a ocorrência da doença apresentando sintomas conforme àqueles notificados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, apresentando alta letalidade (superior a 60 %). Estudos preliminares desses episódios demonstraram a concomitância de casos desse agravo com epidemias de conjuntivite purulenta em um estudo realizado nos municípios de Alto Taquarí e Cuiabá – Estado do Mato Grosso (Tondella et al., 1994). A investigação laboratorial dos casos suspeitos ocorridos em 1984 e 1985, em que foi possível a obtenção de sangue e líquor, revelou através de exames bacteriológicos e testes de imunodiagnóstico negativos para os agentes freqüentemente associados a quadros clínicos semelhantes à meningococcemia. Tal enfermidade recebeu a denominação de Febre Purpúrica Brasileira (FPB). Somente em 1986, durante uma epidemia de FPB ocorrida em Serrana-SP, foi caracterizada a etiologia da doença, quando se isolou o microorganismo *Ha. aegyptius* de líquidos estéreis de crianças, cujos sintomas clínicos correspondiam a definição de casos de FPB, anteriormente descritos (Irino et al., 1987; Tondella *et al*. 1994). A cepa invasiva de *Ha. aegyptius* encontrada na FPB difere da forma “não invasiva” por possuir um plasmídio com padrão eletroforético distinto. Antes da descoberta da FPB, raríssimas são as citações de *H. aegyptius* como agente bacteriano de enfermidades sistêmicas.

Em 2007, Reilly et al. estudaram a transmissão de *Chlamydia trachomatis*, causadora de tracoma, por moscas cloropídeos e encontraram relação positiva entre a

prevalência da doença e a densidade de moscas, confirmando que moscas da família Chloropidae são os vetores responsáveis por essa doença em localidades com ausência de condições sanitárias adequadas.

A espécie *Siphunculina funicola* é considerada bastante incômoda e persistente ao tentar se alimentar, sendo que Chansang et al. (2010) comprovaram a transmissão de diversas espécies de bactérias (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Kocuria*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*) isoladas nos próprios insetos considerando-se assim a condição vetorial desse cloropídeo na Tailândia.

A transmissão de doenças e o incômodo têm levado pesquisadores a estudarem meios de proteção. Imidacloprida, tiametoxam (inseticidas neonicotinóides de primeira e segunda geração) e espinosade (um insecticida de origem natural) foram avaliados em laboratório contra adultos de *Liohippelates cothisor*. Bioensaios de ingestão revelaram que a toxicidade foi maior para o tiametoxam. Quando os inseticidas foram incorporados em soluções de sacarose a 5%, a mortalidade foi significativamente maior em comparação com as mesmas concentrações de soluções aquosas dos inseticidas. Bioensaios de contato revelaram que tiametoxam mais tóxico, seguido por imidacloprida e espinosade. O aumento no tempo de exposição de 15 min a 30 min aumentou significativamente a mortalidade (JIANG e MULLA, 2006).

A mosca oriental *Siphunculina funicola* é extremamente irritante e possui o comportamento de se agregar em substratos pendurados, perto de habitações humanas e abrigos de animais. Repelentes a base de permetrina e inseticidas aerossóis de uso doméstico têm sido aplicados nos locais de agregação. O tratamento com permetrina causou completa ausência de moscas em até 23 h. No entanto, outros locais foram escolhidos para a agregação. Os aerossóis produziram completa mortalidade das moscas em até 48 h após a aplicação (CHANSANG e MULLA, 2008).

Cloropídeos tem sido considerados pragas de algumas culturas, entre elas o trigo nos Estados Unidos onde as larvas causam percas econômicas consideráveis. Por isso, aplicações de inseticidas têm sido feitas para controle dessas moscas. Knodell et al. (2009) aplicaram lambdacialotrina nas folhas e tiametoxam nas sementes, além de associações entre esses inseticidas. Os resultados demonstraram uma redução

significativa quando da utilização dos inseticidas associados, porém quando aplicados individualmente houve baixa eficácia. Além disso, cloropídeos tem sido considerados como pragas em culturas de cebola (KILICI e YOLDAS, 2012).

Atualmente, a maioria dos estudos envolvendo as moscas da Família Chloropidae estão relacionados a sistemática, espécies sinonímias, aspectos cladísticos e, principalmente, a descrição de novas espécies, sendo que nos últimos 6 anos foram descritas 65 espécies e 4 gêneros em todo o mundo (KUBIK, 2006; NA e YANG, 2007; WHEELER, 2007; NA e YANG, 2008; WHEELER, 2008; MERZ, 2008; NARTSHUK e PRZHIBORO, 2009; OZEROV, 2009; NA e YANG, 2009a, 2009b; MELO e WHEELER, 2009; CUI e YANG, 2009; NARTSHUK, 2009; NARTSHUK, 2010a, 2010b; MLYNAREK e WHEELER, 2010; CARVALHO FILHO e ESPÓSITO, 2010; LIU et al., 2011; EICHINER, 2011; CUI e YANG, 2011a, 2011b; NARTSHUK, 2012; TAILLEFER e WHEELER, 2011; LIU e YANG, 2012a, 2012b; RICCARDI e AMORIM, 2012).

3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para imobilizar pequenos dípteros e aplicar formulações inseticidas de contato em forma de *spray* nos insetos imobilizados de modo que seja simples, de baixo custo e reprodutível.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Desenvolver um sistema de imobilização de pequenos dípteros adultos.

b) Desenvolver um método de aplicação de inseticidas líquidos de contato.

c) Utilizar o conjunto: "sistema de imobilização + método de aplicação" para realização de bioensaios de mortalidade em machos e fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* e fêmeas da mosca *Li. nigrifons* a inseticidas em laboratório.

d) Estabelecer a linha base de susceptibilidade e concentração diagnóstica para machos e fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* a um organofosforado (malation) e a um piretroide (deltametrina), utilizando a metodologia proposta.

e) Validar a metodologia utilizando linhagem resistente de *Ae. aegypti* a um dos inseticidas utilizados nesse projeto.

f) Estabelecer a linha base de susceptibilidade e concentração diagnóstica para moscas *Li. nigrifons* ao malation, utilizando a metodologia proposta.

5. CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MOSQUITOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Os métodos descritos a seguir são comuns para os todos os experimentos do presente projeto e são apresentados com o intuito de evitar sua repetição.

Duas linhagens do mosquito *Ae. aegypti* foram utilizadas nos experimentos:

1) Rockefeller - originária do *Center of Disease Control*, Atlanta, Estados Unidos, disponibilizada pelo Laboratório de Culicídeos da Superintendência de Controle de Endemias (Marília, SP) e mantida no Departamento de Biologia Animal, prédio da Zoologia, desde 1999. Essa é a linhagem padrão susceptível e;

2) Santarém - originária do município de Santarém, Estado do Pará, Brasil e disponibilizada pelo Laboratório de Entomologia da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ), sendo que essa linhagem é resistente a deltametrina, conforme notificação do pesquisador José Bento Pereira Lima.

As larvas foram mantidas em recipientes plásticos com cerca de 1,5 L de água mineral, sendo alimentadas com ração triturada para cães misturada com levedo de cerveja. Os adultos foram mantidos em gaiolas de 93 x 43 x 75 cm e alimentados diariamente com pedaços de maçã. Uma vez por semana foi oferecido sangue humano, pela exposição das mãos do pesquisador, para a linhagem Rockefeller e codorna para a linhagem Santarém. Ambas as fases de desenvolvimento foram mantidas à temperatura de 27±2ºC e umidade relativa de 80±5%.

Para homogeneização da idade e condições fisiológicas dos mosquitos, um conjunto de cerca de 200 fêmeas adultas foram alimentadas com sangue por um período de aproximadamente 30 min. Após a alimentação sanguínea essas fêmeas foram mantidas em gaiolas de criação, alimentadas com pedaço de maçã. Recipientes com papel filtro para oviposição foram expostos *ad libidum* durante um período de três dias, sendo que os papéis foram trocados a cada 24 h. Desses ovos foram obtidos machos e fêmeas, sendo que nos bioensaios foram utilizados os indivíduos com 3 a 5 dias e fêmeas não alimentadas com sangue.

6. INSETICIDAS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Utilizou-se malation grau-técnico 1000 EC Cheminova (100% m/v) e deltametrina (99,1%), disponibilizada pela SUCEN, Marília.

7. METAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA

a) Desenvolver um método de imobilização de insetos que não necessite de CO_2 e placa fria.
b) Desenvolver um método de aplicação líquida que seja prático para manipulação e confiável quanto ao volume dispensado e produção dos resultados.
c) Desenvolver uma metodologia de baixo custo e reutilizável indeterminadamente.
d) Desenvolver uma metodologia que possa ser utilizável por diferentes pessoas.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. ANESTESIA DE MOSQUITOS COM CO_2 E BAIXA TEMPERATURA

A OMS recomenda para os testes com adulticidas a anestesia ou imobilização de grupos de 25 fêmeas de *Anopheles* com CO_2 pela exposição durante 30 segundos. Logo após serem anestesiados, os indivíduos devem ser colocados sobre uma placa fria (não há especificação do material de fabricação dessa placa) com temperatura de 4°C "*para manter a anestesia durante as manipulações*" (WHO, 2006a). No entanto, alguns aspectos dessa metodologia são questionados no presente trabalho como segue:

1) Não foi encontrada a descrição do efeito que o CO_2 e baixa temperatura (menos de 10ºC) causam sobre mosquitos adultos e pelo menos para as moscas *D. melanogaster*, é classicamente conhecido que algumas viroses podem ser ativadas pela imobilização pelo CO_2.
2) Questiona-se o tempo de exposição ao CO_2, ou seja, se a exposição poderia ser menor do que 30 seg., proporcionando menos estresse aos mosquitos.
3) Questiona-se a recomendação de utilização somente de fêmeas, pois os machos também são alvos das aplicações de adulticidas.
4) Questiona-se o tempo de exposição à baixa temperatura, de indivíduos anestesiados pelo CO_2, fator de estresse adicional.

Os estudos no presente trabalho visam analisar a possível ocorrência de mudanças comportamentais visíveis e mortalidade causadas em adultos, machos e fêmeas, de *Ae. aegypti* após a anestesia por CO_2 e manutenção em baixa temperatura, em diferentes períodos de exposição.

Os estudos foram divididos conforme o tipo de anestesia: 1) CO_2, 2) baixa temperatura e 3) CO_2 associado à baixa temperatura.

ESTUDOS COM CO_2

Utilizou-se CO_2 contido em um extintor de 2 Kg carregado com produto grau alimentício (99,9% de pureza) sendo que na saída do gás foi conectado uma mangueira de borracha com 30 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro. Grupos de 30 indivíduos, machos ou fêmeas, foram capturados com aspirador elétrico e liberados dentro de um recipiente plástico transparente de 300 mL com um pequeno chumaço de algodão embebido em solução de mel a 10%. Logo após, o recipiente foi fechado com tampa com rosca, sendo que na tampa foi feito um orifício para inserção da mangueira do extintor dentro do recipiente. Tal orifício foi vedado com uma placa de borracha maleável e perfurada de modo que quando a mangueira era retirada o orifício voltava a se fechar. O CO_2 foi liberado em períodos entre 5 seg. e 45 seg., em intervalos de 10 seg. Para cada intervalo de tempo foram utilizados 10 grupos de machos ou fêmeas. Como testemunha mosquitos foram capturados e mantidos no recipiente plástico transparente de 300 mL com um chumaço de algodão embebido em solução de mel a 10% sem receberem nenhum tratamento.

Os parâmetros avaliados foram: 1) tempo para que todos os indivíduos fossem anestesiados; 2) tempo para que o primeiro indivíduo se recuperasse; 3) tempo para que todos os indivíduos se recuperassem em até cinco minutos e; 4) mortalidade após 24 h.

ESTUDOS COM BAIXA TEMPERATURA

Para os estudos com baixa temperatura, grupos de 30 indivíduos, machos ou fêmeas, foram capturados com aspirador elétrico e os recipientes de coleta foram colocados em congelador (0^{o}C) até que todos os indivíduos caíssem no fundo do recipiente. Logo após, os recipientes de coleta foram retirados do congelador e mantidos a temperatura ambiente para confirmar que não haveria mortalidade. Repetiu-se esse procedimento por 10 vezes, sempre com novos grupos de mosquito.

Confeccionou-se uma placa fria utilizando-se água congelada em um recipiente plástico de 100 mL com a superfície de 7,5 cm de diâmetro. Nesse recipiente foi colocado 90 mL de água de torneira e mantido em congelador durante 48 h. No momento da utilização da placa fria, o recipiente foi retirado do congelador, colocou-se

um pedaço de papel filtro Gramatura 80, recortado de forma a encaixar-se sobre a boca do recipiente mantendo-se em contato direto com o gelo (Figura 4). Após 5 min. de contato do papel com o gelo, a temperatura na superfície do papel foi determinada com um termômetro digital. As medições de temperatura foram repetidas a cada 5 min. durante 40 min.

Figura 4 – Placa fria feita com água congelada em recipiente de plástico

Novos grupos de 30 mosquitos machos ou fêmeas foram capturados, mantidos no congelador até caírem anestesiados e logo em seguida colocados sobre a placa fria (Figura 5). A partir disso, determinaram-se os efeitos da anestesia pelo frio para os seguintes períodos de exposição (30 seg., 60 seg., 3 min., 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. e 30 min). Após a exposição aos diferentes períodos, os mosquitos foram colocados em recipientes de 300 mL com um chumaço de algodão embebido em solução de mel a 10%. Para cada período de exposição utilizou-se 10 grupos de machos ou fêmeas.

Figura 5 – Mosquitos mantidos na placa fria confeccionada com água congelada em recipiente plástico,

Os parâmetros avaliados foram: 1) tempo para que todos os indivíduos fossem anestesiados; 2) tempo para que o primeiro indivíduo se recuperasse; 3) tempo para que todos os indivíduos se recuperassem em até cinco minutos e; 4) mortalidade após 24 h.

Como testemunha foram capturados e mantidos 10 mosquitos no recipiente plástico transparente de 300 mL com um chumaço de algodão embebido em solução de mel a 10% sem receber nenhum tratamento.

ESTUDOS UTILIZANDO CO_2 E BAIXA TEMPERATURA CONCOMITANTEMENTE

Logo após serem anestesiados, os mosquitos foram colocados sobre a adaptação da placa fria usualmente utilizada. O tempo de exposição, tanto para o CO_2 quanto para baixa temperatura foram semelhantes. Nesse experimento o parâmetro avaliado foi somente a mortalidade 24 h após a exposição.

Como testemunha 10 mosquitos foram capturados e mantidos no recipiente plástico transparente de 300 mL com um chumaço de algodão embebido em solução de mel a 10% sem receber nenhum tratamento.

8.2. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE COLETA E IMOBILIZAÇÃO DE PEQUENOS DÍPTEROS

Para o presente trabalho, o sistema foi desenvolvido em cinco partes, sendo: 1) recipiente de contenção; 2) recipiente coletor; 3) imobilizador; 4) recipiente limitador e; 5) aspirador de coleta.

RECIPIENTE DE CONTENÇÃO: consiste em um recipiente de plástico acrílico transparente de 4,7 cm de altura x 3,7 cm de diâmetro com tampa branca opaca e com rosca de 40 mL (Figura 6a). O fundo do recipiente e da tampa foram retirados, sendo que no fundo do recipiente foi deixado uma aresta de 2 mm que serviu para apoiar uma tela. Dessa forma, o diâmetro aberto do fundo do recipiente ficou com 3,5 cm. A tela utilizada é formada por fios de *nylon* (malha 15) sendo que essa foi colada ao recipiente com cola para tecido. O mesmo procedimento foi feito para a tampa (Figura 6b e c). Dentro do recipiente foi colocado um cotonete (Figura 7 a – vista lateral e b – vista superior) que serviu para ser embebido em solução açucarada a 10% para alimentação dos mosquitos.

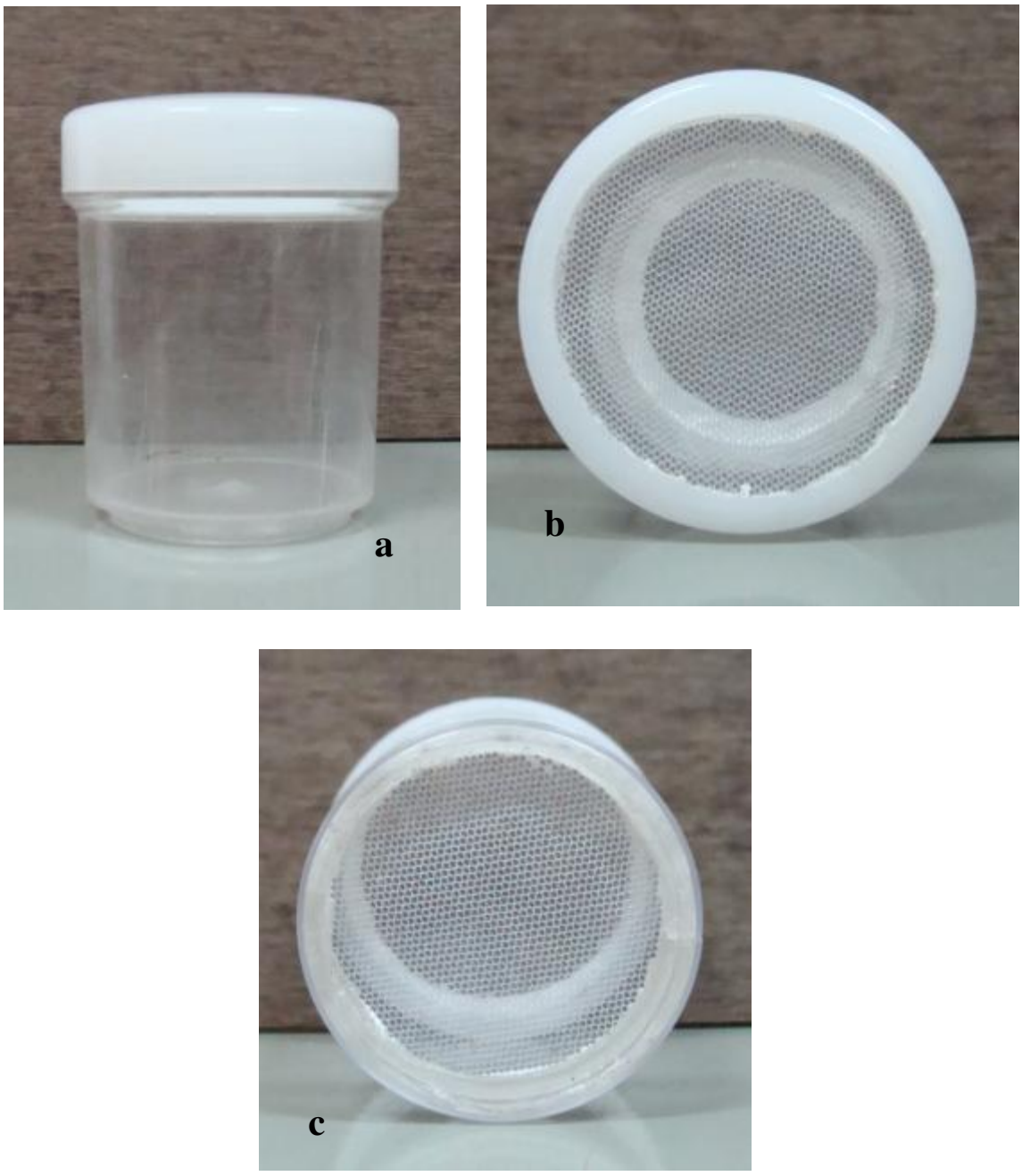


Figura 6 – a) Recipiente de contenção de plástico acrílico transparente com tampa branca opaca. b e c) Recipiente de contenção de plástico acrílico com tampa onde o fundo de ambos foram cortados para fixação de uma tela de fios de *nylon*.

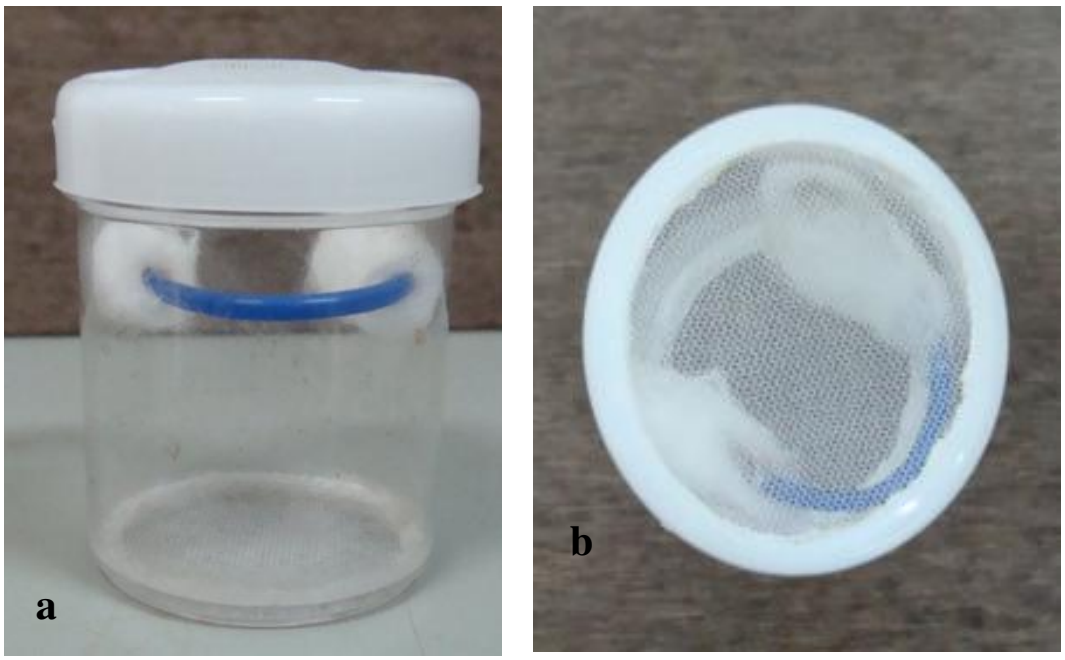


Figura 7 – Recipiente de contenção com cotonete. a) Vista lateral; b) Vista superior.

RECIPIENTE COLETOR: consiste em um recipiente do mesmo tamanho e forma do recipiente de contenção, porém, com tela somente no fundo. Na tampa foi feito um orifício de 0,8 cm de diâmetro onde foi fixado um tubo de 10 cm de comprimento x 0,7 cm de diâmetro, atravessando 4,2 cm na tampa em direção ao fundo do recipiente. Dessa forma, a extremidade inferior do tubo (dentro do recipiente) ficou a 0,5 cm da tela e 5,3 cm para fora do recipiente (Figura 8).

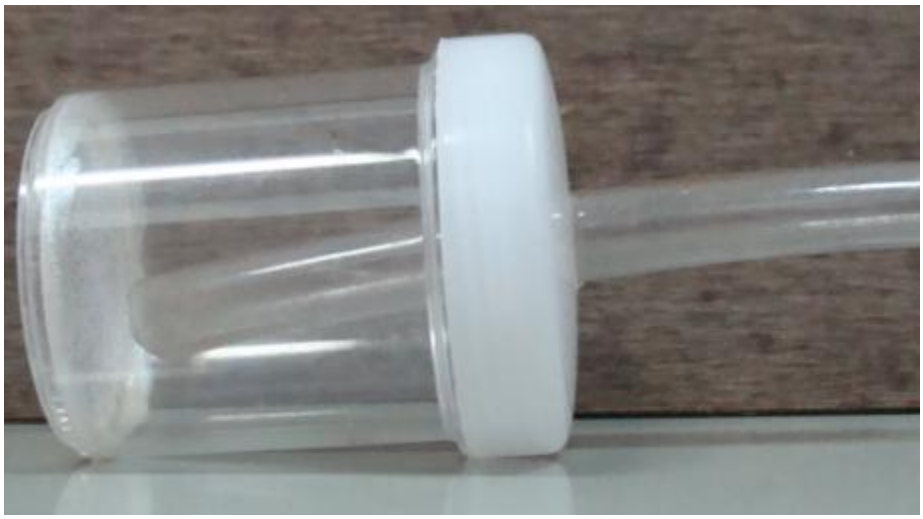


Figura 8 – Recipiente coletor com o tubo na tampa

IMOBILIZADOR: consiste em um aspirador de pó automotivo da marca Tramontina (12 V e 90 W de potência) ligado a uma fonte 12 V. A parte superior do aparelho, que consiste em um “copo” com um orifício para a entrada de ar e poeira (Figura 9), foi retirada. A parte do meio, que consiste na hélice e no motor, é envolta por um acabamento de plástico (Figura 10 a1). Sobre a hélice há uma peneira de plástico e tela (Figura 10 a2), sendo que essa foi retirada. No lugar da peneira foi colocado um anel de PVC com 1,5 cm de altura livre x 3,8 cm de diâmetro (Figura 10b). Ao redor do acabamento de plástico (6 cm de diâmetro) foi fixado um tubo de PVC de 8 cm de diâmetro x 10 cm de altura com as extremidades abertas verticalmente (Figura 11a). No tubo foi fixado três hastes de metal de 13 cm de comprimento (Figura 11b). Essas hastes foram fixadas em uma fonte de alimentação 12 V (marca Lune) (Figura 12). Assim, o aspirador foi posicionado verticalmente de forma que o ar é sugado de cima para baixo.

Figura 9 - Aspirador de pó automotivo com a parte superior, que consiste em um “copo” com um orifício para a entrada de ar e poeira e que foi retirado.

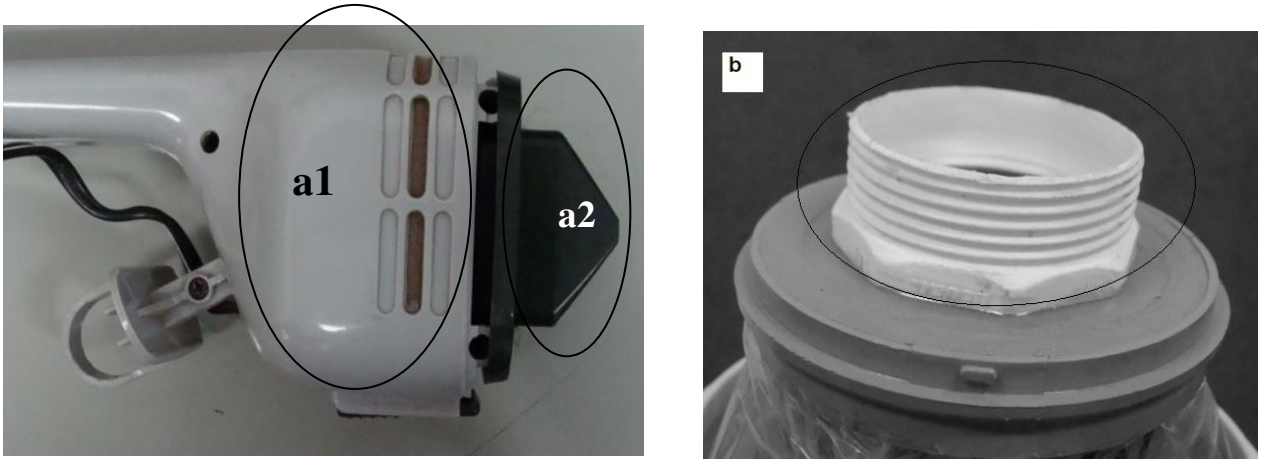


Figura 10 – a1) Parte do meio sem o “copo”, 2) localização da peneira e; b) o anel de PVC

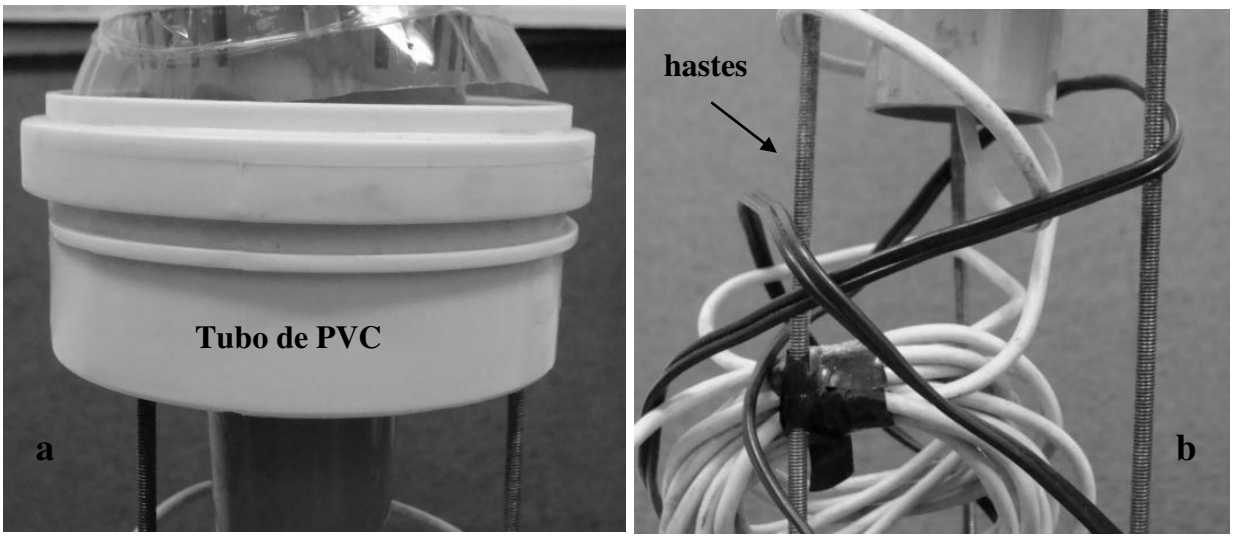


Figura 11 – a) Tubo de PVC com as extremidades abertas verticalmente; b) três hastes de metal

Figura 12 - Fonte de alimentação 12 V

RECIPIENTE LIMITADOR: Sobre o anel de PVC (Figura 10b), foi fixado um recipiente com 25 cm de altura x 20 cm de diâmetro na extremidade superior e 13,5 cm de diâmetro na extremidade inferior. Na extremidade de menor diâmetro foi aberto um orifício de 3,8 cm de diâmetro para encaixe no anel de PVC (Figura 13a - Vista da parte superior para a inferior e b - Vista externa da parte inferior). Esse orifício serve para encaixe do recipiente limitador no anel de PVC do imobilizador (Figura 14). Utilizado principalmente para aplicação de produtos à distância, esse pode ser retirado proporcionando condição para que os insetos sejam manuseados.

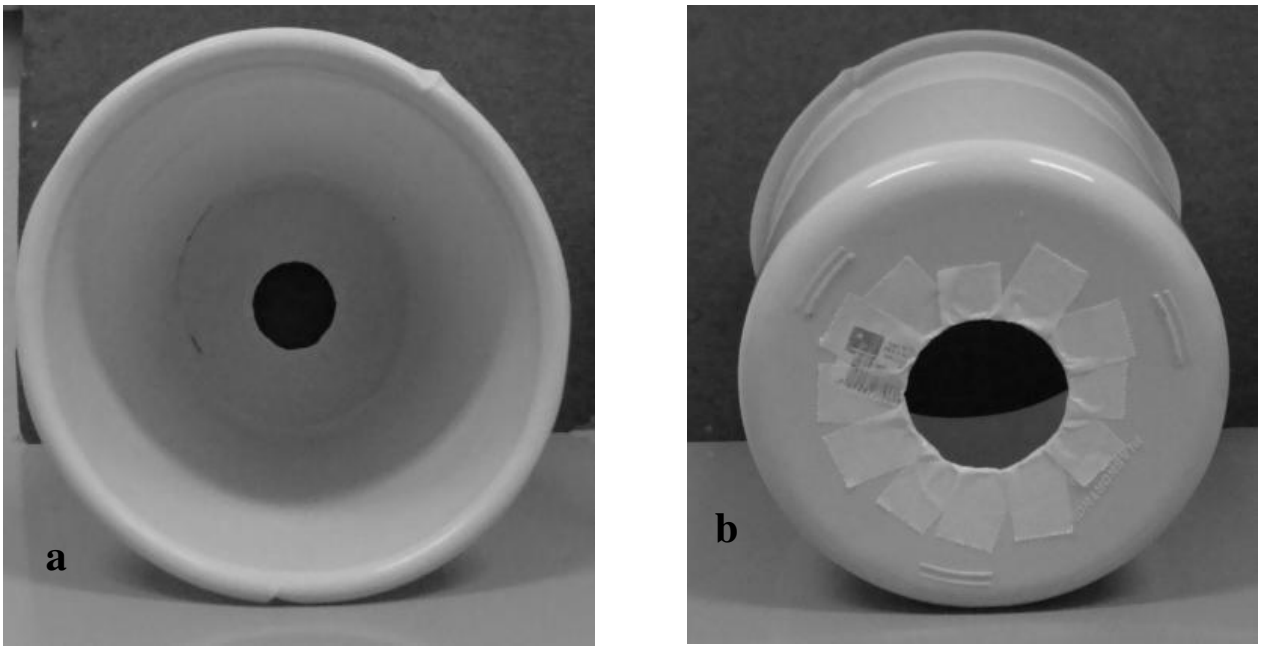


Figura 13 – Orifício no fundo do recipiente. a) Vista da parte superior para a inferior, mostrando a parte interna do recipiente; b) Vista externa da parte inferior.

Figura 14 – Recipiente limitador encaixado no anel de PVC do imobilizador

ASPIRADOR DE COLETA: foi adaptado para coletar os insetos nas gaiolas de criação e para utilização do recipiente coletor. Utilizou-se um aspirador elétrico, comercializado para limpeza de teclado de computador, marca Multilaser AC048 (Figura 15). Esse aparelho é movido por quatro pilhas (AAA), porém foi adaptado para utilização em tomada de energia elétrica, usando uma fonte de alimentação 12 V (Figura 16a). Outra adaptação necessária foi a retirada da parte superior, por onde ocorre a entrada de ar e acoplamento de um anel de PVC de 4,5 cm de altura x 3,8 cm de diâmetro e um anel de borracha (Figura 16b), onde é encaixado o recipiente coletor (Figura 16 c).

Fonte: http://r.twenga.com.br

Figura 15 – Aspirador elétrico, movido a pilha e comercializado como aspirador para teclado de computador.

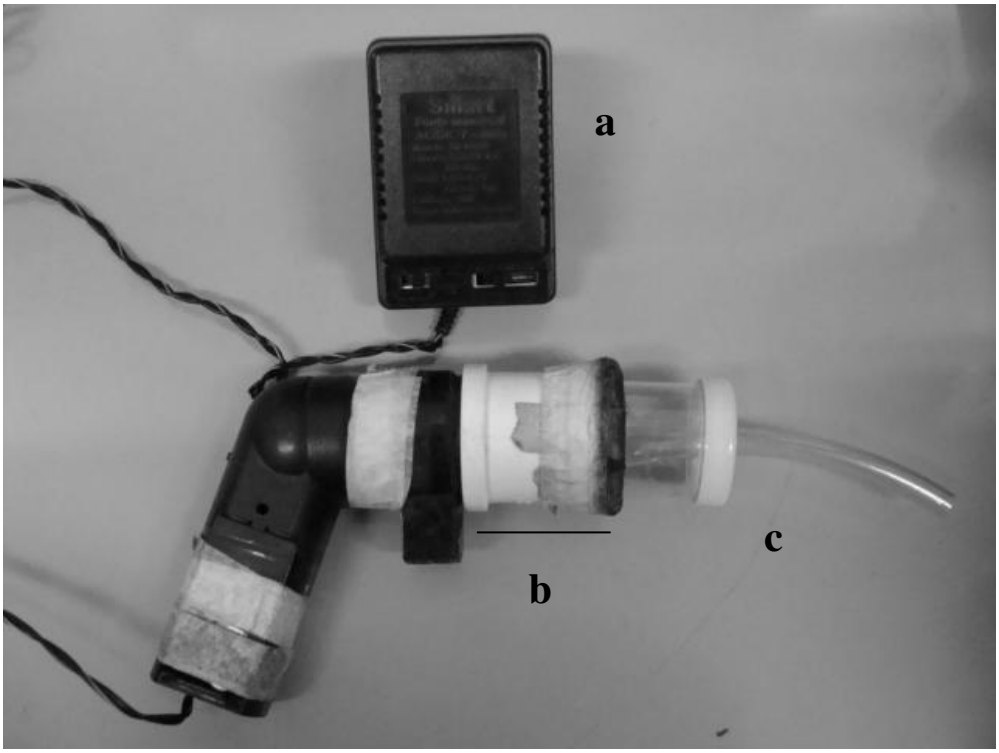


Figura 16 – Aspirador de coleta. a) fonte de alimentação 12V; b) anel de PVC e anel de borracha; c) recipiente coletor.

8.2.1. MEDIÇÃO DA VELOCIDADE DO VENTO PRODUZIDA PELO IMOBILIZADOR

A velocidade do vento, que proporciona a sucção necessária para imobilizar os insetos, foi determinada posicionando um anemômetro (marca Dwyer®) a 2,0 cm da saída de ar na parte inferior do aspirador, sendo que tais medições foram repetidas 10 vezes.

8.2.2. AVALIAÇÃO DE MORTALIDADE EM ADULTOS DE *Aedes aegypti* PARA DIFERENTES PERÍODOS DE IMOBILIZAÇÃO POR SUCÇÃO

Para a avaliar o efeito da imobilização por sucção sobre a mortalidade em machos ou fêmeas de mosquitos, foram realizadas avaliações submetendo-se grupos de adultos de *Ae. aegypti* durante diferentes períodos. Grupos de 30 indivíduos, machos ou fêmeas, foram mantidos imobilizados constantemente durante os períodos de 10 seg., 60 seg., 5 min., 30 min. e 60 min. Logo após, foram mantidos no recipiente de contenção com disponibilidade de alimentação açucarada a 10%. Para cada período de imobilização foram feitas 10 repetições. Como testemunha, os mosquitos foram mantidos no recipiente de contenção sem serem submetidos a sucção e com a mesma disponibilidade de alimentação açucarada. Os recipientes de contenção com os mosquitos foram mantidos em posição horizontal para facilitar o acesso dos mosquitos a solução açucarada.

8.2.3. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE MOSQUITOS NO RECIPIENTE DE CONTENÇÃO

Em cada tampa do recipiente de contenção já encaixada no imobilizador foram liberados 30 indivíduos, fêmeas ou machos, para serem imobilizados. Áreas imaginárias de 1 cm^2/área foram estabelecidas e a quantidade de indivíduos/área foi determinada. Essa contagem foi feita para 10 tampas.

8.2.4. AJUSTES PARA A UTILIZAÇÃO DO ASPIRADOR DE COLETA

Notou-se que dependendo do comprimento do tubo dentro do recipiente coletor e sua consequente proximidade com a tela do fundo do recipiente (distância da inserção do tubo entre a tela e a tampa do recipiente coletor) os mosquitos eram jogados de um

lado para outro e ao final da coleta haviam mosquitos mortos. Além disso, devido ao espectro de voltagens da fonte de alimentação (1,5 V, 3 V, 4,5 V, 9 V e 12 V), ocorreu a hipótese de que essas poderiam influenciar na rapidez de coleta e na mortalidade dos mosquitos. Dessa forma foram feitas avaliações comparando a distância de inserção do tubo (0,5 cm a 4,2 cm) com a voltagem, para determinação de tempo para coletar e mortalidade de 30 indivíduos fêmeas ou machos após 5 min. da coleta. Tal experimento foi repetido 10 vezes para cada comparação.

8.3. PROPOSTA DE UM MÉTODO DE APLICAÇÃO DE AMOSTRAS EM LÍQUIDO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO TÓPICO EM MOSQUITOS

O método de aplicação líquida aqui proposto consiste na utilização de dispersores que produzem jatos do tipo *spray* e são comercializados para aplicação de perfume. Esses dispersores são comercializados com a denominação de “válvula pump”. Tais dispersores podem ter rosca (lisa e estriada) ou não. Na Figura 17 é demonstrada uma das válvulas utilizadas no presente trabalho com a rosca estriada.

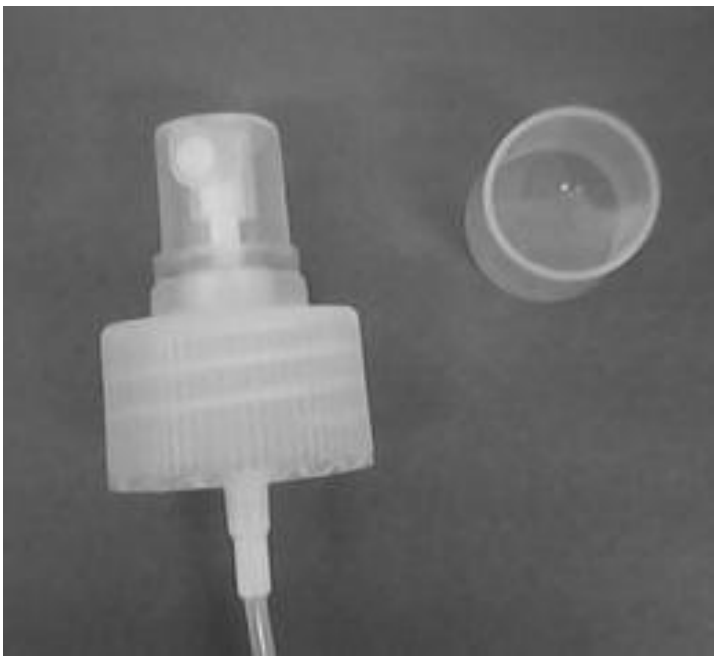


Figura 17 - Dispersores – Válvula pump com rosca estriada

As características desse tipo de dispersor do tipo válvula pump para perfume estão demonstradas na Figura 18.

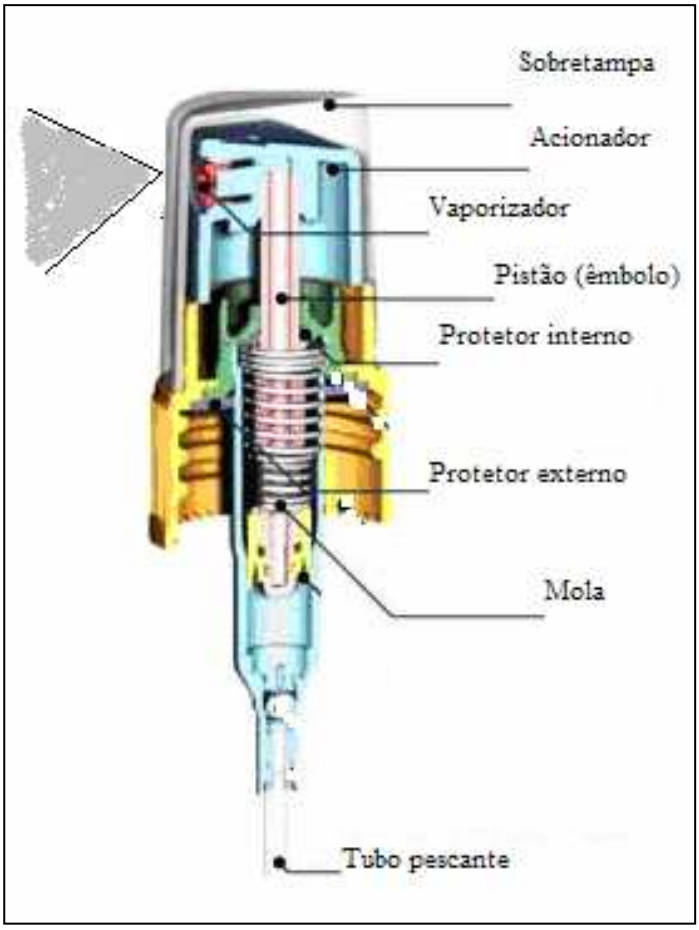


Figura 18 – Características de um dispersor do tipo válvula pump (Adaptado de: http://www.charterlinkhk.com/en/product3_2.htm)

O dispersor é acompanhado de um recipiente onde é colocado o líquido a ser pulverizado (Figura 19).

Figura 19 – Conjunto – Dispersor com o recipiente

Esses dispersores são diferenciados de acordo com a altura (Figura 20a) e o diâmetro (Figura 20b) e é comum encontrar em sites de comercialização desses produtos a indicação do dispersor utilizando-se essas medidas. Dessa forma, tais medidas foram determinadas para cada dispersor aqui utilizado sendo feita apenas uma medição de um dispersor/marca.

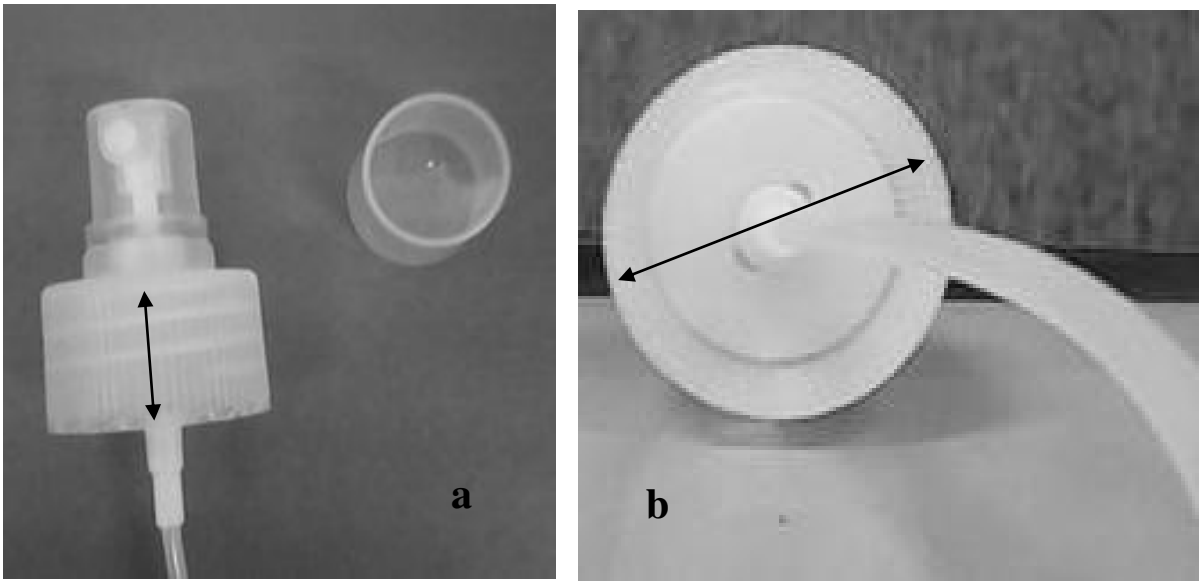


Figura 20 – Dispersor – a) medição da altura; b) medição do diâmetro.

Industrialmente, para determinação do correto funcionamento, tais especificações técnicas são determinadas: vazão, pressão de abertura, acionamento a seco, acionamento com produto, início do funcionamento, vida útil, temperatura de operação, comprimento do pescante. No presente trabalho foram utilizados dispersores de cinco diferentes marcas comerciais (Figura 21), cada um com seu respectivo recipiente, os quais foram obtidas no mercado nacional. As especificações técnicas possíveis de serem obtidas no presente trabalho estão descritas abaixo.

Figura 21 – Dispersores de cinco diferentes marcas comerciais com seus respectivos recipientes.

8.3.1. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DOS DISPERSORES

Para cada especificação utilizaram-se cinco dispersores de cada marca e álcool etílico absoluto p.a. (99,5% marca Synth).

INÍCIO MÉDIO DE FUNCIONAMENTO

OBS: o funcionamento foi considerado ideal quando o acionador (ver Figura 18) foi apertado até o limite máximo e o líquido liberado saiu com pressão máxima, produzindo um jato completo (Figura 22). O funcionamento não foi considerado ideal quando, após o acionamento o líquido não foi liberado ou saiu sem pressão.

Figura 22 – Demonstração de funcionamento ideal do dispersor produzindo um jato completo.

Os recipientes foram cheios com álcool, o acionador foi apertado até que um jato completo fosse liberado e a quantidade de acionamentos foi contada. Logo após, o sistema foi esvaziado apertando-se o acionador sem o contato com o líquido. Retornou-se o dispersor no líquido e acionou-se até que houvesse liberação de um jato completo novamente. Esse procedimento foi repetido 10 vezes para cada dispersor.

VIDA ÚTIL MÉDIA - os recipientes foram cheios e o acionador foi apertado a quantidade de vezes que fosse necessário para sobrar um mililitro do líquido no recipiente. Novamente o recipiente foi cheio e assim sucessivamente até que houvesse falha na liberação de um jato completo.

VAZÃO - o recipiente foi cheio e o conjunto (dispersor + recipiente) foi pesado em balança analítica. Logo após o dispersor foi acionado por 10 vezes, contando a partir do primeiro jato completo, e o conjunto foi pesado novamente. Repetiu-se esse procedimento por 15 vezes. Para obtenção do volume de líquido liberado para cada aplicação, calculou-se o maior peso subtraído do menor e o resultado foi dividido por

10. Ao final, obteve-se 15 volumes do qual se calculou a vazão média. Além disso, com o objetivo de analisar a possibilidade de haver diferença no valor da vazão entre diferentes pessoas, o mesmo procedimento descrito acima foi feito por quatro diferentes pessoas, utilizando-se dispersores de uma única marca.

8.3.2. PARÂMETROS DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS GOTAS PRODUZIDAS PELOS DISPERSORES

A análise do espectro de gotas liberadas pelos dispersores foi realizada de forma direta, utilizando-se um analisador de partículas (Mastersizer S®, Malvern Instruments Co.), lente focal de 300 mm, comprimento de onda de laser de 0,5 a 900 nm, que se baseia na difração da luz após o choque dessas com as gotas, em que o diâmetro das gotas é proporcional ao ângulo do desvio sofrido pelo raio laser (CAMARA et al., 2008). Utilizou-se álcool como líquido a ser aplicado para as medições.

Para as medições utilizou-se o recipiente limitador (Figura 14) posicionado horizontalmente com o feixe de laser passando no centro do orifício no fundo do recipiente, sendo que esse foi posicionado à 0,5 cm do laser. O dispersor foi posicionado na outra extremidade do recipiente limitador com a saída do vaporizador à 1,5 cm do recipiente (Figura 23), sendo que somente as gotas que passaram pelo orifício do recipiente limitador foram medidas.

Os parâmetros de maior importância para a determinação do espectro de gotas são: o diâmetro do volume mediano (DVM), a amplitude relativa (AR) e a porcentagem de gotas com diâmetro inferior a 100 µm. Essas características conjuntamente definem o potencial de deriva de gotas, a homogeneidade de gotas e o tamanho característico das gotas produzidas por um determinado bico de pulverização. Quanto maior o valor da AR maior é a faixa de tamanho das gotas pulverizadas. Espectro de gotas homogêneo tem valor de amplitude relativa que tende a zero. Os valores de DVM e AR devem ser analisados conjuntamente para a caracterização da pulverização. Isoladamente, o DVM é um valor de referência e não determina a dispersão dos dados em torno do valor (VIANA et al, 2010).

Utilizaram-se cinco dispersores sendo que, para cada dispersor foram realizadas cinco medições. O diâmetro das gotas (µm) foi avaliado para a obtenção do DVM, a AR

e a porcentagem de gotas com diâmetro inferior a 100 µm.

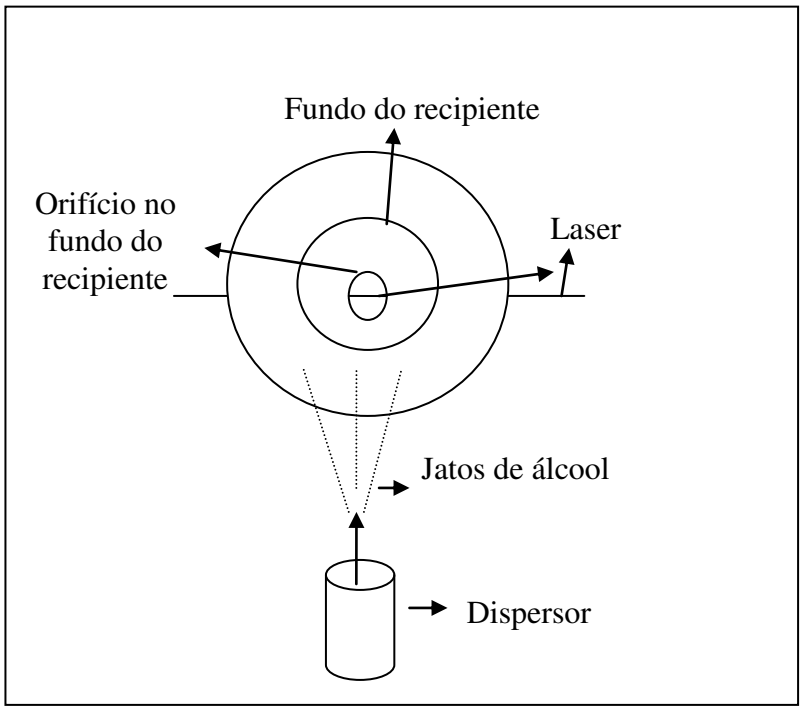


Figura 23 – Esquema demonstrando o procedimento utilizado para medir o tamanho de gotas produzidas pelos dispersores.

8.3.3. DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA DE APLICAÇÃO DO LÍQUIDO

A metodologia desenvolvida no presente trabalho foi validada por meio da aplicação de inseticida sobre mosquitos adultos. Para isso, foi necessário aplicar o inseticida a uma distância previamente determinada de forma que os mosquitos não recebessem muita ou pouca quantidade do inseticida, sendo possível assim determinar a susceptibilidade. A distância em questão foi determinada por meio de um jato completo e diferentes espaçamentos entre a saída do vaporizador (ver Figura 18) e os insetos, com o objetivo de obter a distância em que haveria melhor dispersão das gotas. As distâncias de aplicação para avaliação foram estipuladas a partir de 5 cm até 30 cm, com intervalos de 5 cm. Foram efetuadas cinco repetições para cada distância.

A dispersão das gotas foi obtida pulverizando um quadro de 320 cm^2, formado por duas folhas de papel Gramatura 80 de 40 cm x 40 cm cada folha fixadas entre si. Esse quadro foi fixado na parede sobre uma bancada, sendo que a extremidade inferior

ficou posicionada a uma altura de 20 cm da bancada. O dispersor, junto com seu recipiente, foram fixados em um suporte de modo que o orifício de saída do jato foi posicionado a uma altura de 40 cm, tendo como o alvo o centro do quadro. O dispersor foi posicionado verticalmente de forma que o jato de uma solução feita com Giemsa e acetona, na proporção de 1:1, foi direcionado ao papel sendo aspergido horizontalmente (Figura 24). O parâmetro "área da mancha", produzida por cada dispersor foi determinado estabelecendo visualmente a circunferência da mancha e medindo sua largura e seu comprimento.

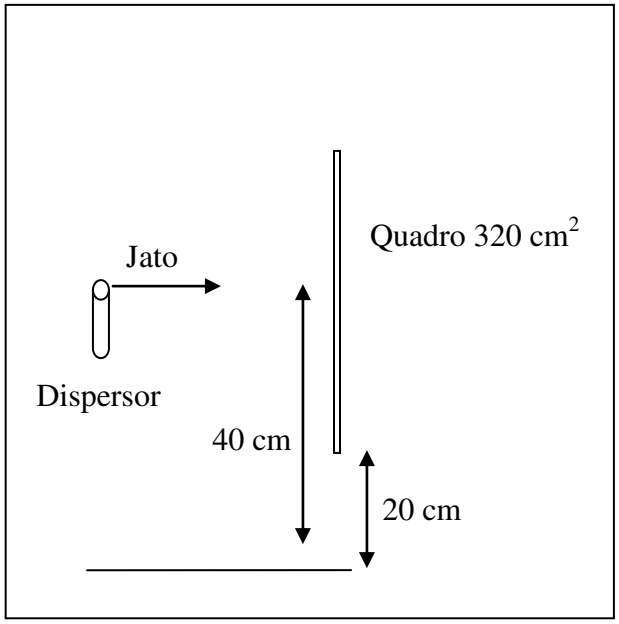


Figura 24 – Esquema demonstrando o procedimento para determinação da distância de aplicação entre o dispersor e os insetos.

A Densidade de Deposição foi determinada conforme Payne et al. (1997), sendo que para cada distância de aplicação a quantidade de gotas e 10 áreas de 1 cm^2 da mancha produzida pelos dispersores foi determinada em microscópio esteroscópico. Essas 10 áreas foram estabelecidas dentro de um espaçamento circular de 13,5 cm que se refere ao diâmetro inferior do recipiente limitador (ver item 8.2 – RECIPIENTE LIMITADOR).

8.4. UTILIZAÇÃO DE ACETONA OU ÁLCOOL COMO DILUENTE PARA APLICAÇÃO DE INSETICIDAS DE AÇÃO TÓPICA EM MOSQUITOS.

A WHO (2006a) determina o uso de acetona, produto analítico (p.a.) para as diluições das soluções inseticidas e para ser aplicada pura nos mosquitos no grupo testemunha, tanto para o método do papel impregnado quanto de atividade intrínsica. No entanto, em experimentos prévios no presente trabalho, grupos de 30 indivíduos machos receberam a aplicação de um jato de acetona e após um breve período, sofreram elevada mortalidade. Por isso, questiona-se o uso de acetona como diluente, pela hipótese de significar importante fator de mortalidade e propôs-se o uso de álcool etílico absoluto p.a.

No presente estudo foram realizados bioensaios aplicando-se acetona p.a. ou álcool etílico p.a. sobre mosquitos, machos ou fêmeas de *Ae. aegypti*, por meio do método de aplicação em *spray* aqui proposto. Como testemunha utilizou-se água destilada. Diferentes grupos de 30 indivíduos foram imobilizados e receberam um jato de um dos líquidos. O bioensaio contou com 10 repetições e as avaliações foram feitas até 24 h após a aplicação. Foram realizados três bioensaios para cada situação.

8.5. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA NA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DA APLICAÇÃO DE INSETICIDA NOS RECIPIENTES DE CONTENÇÃO

Quando do uso do método aqui proposto para avaliação de adulticidas de contato em mosquitos, uma quantidade de inseticida certamente ficará como resíduo nas telas dos recipientes de contenção. Considerou-se, portanto que nas telas das tampas pode acumular-se alguma quantidade significativa de inseticida que não atingiu os mosquitos, e interferir nos resultado de outras avaliações feitas com o mesmo recipiente. E assim, um processo de lavagem com a remoção ou inativação do inseticida é necessário para que os frascos de contenção possam ser usados muitas vezes.

No presente estudo as tampas dos recipientes utilizados nos bioensaios com malation, para todas as concentrações, foram submetidas a lavagem por meio de neutralização utilizando-se solução de hidróxido de sódio a 5% (SILVA et al., 2008).

Após 24 h dos bioensaios, as tampas dos recipientes de contenção foram submersas na solução a ser avaliada e mantidas por uma hora. Logo após foram retiradas e enxaguadas rapidamente (máximo 5 seg.) em água corrente. As tampas foram então mantidas em estufa a 30ºC durante 24 h para secagem.

Avaliação da remoção ou inativação do inseticida foi aferida pela mortalidade em adultos de *Ae. aegypti.* Foram imobilizados durante um minuto grupos de 30 indivíduos, fêmeas ou machos, nos recipientes lavados. Após essa exposição pelo contato com as telas, os mosquitos foram transferidos para recipientes novos, ainda não utilizados em bioensaios, e a verificação de mortalidade foi feita após 24h. Para testemunha, mosquitos foram imobilizados em recipientes não lavados utilizados nos bioensaios com malation/fêmea na concentração de 2,75 ppm. Esse procedimento foi repetido cinco vezes para três bioensaios.

8.6. REAPROVEITAMENTO DOS DISPERSORES PARA DIFERENTES BIOENSAIOS

No sentido de se otimizar o uso de equipamentos e insumos para as avaliações de susceptibilidade de mosquitos a inseticidas de contato, e ainda reduzir a quantidade de material descartado, o presente estudo tratou de avaliar se os dispersores poderiam ser reaproveitados para vários bioensaios mesmo com inseticidas de diferentes ingredientes ativos. Para comprovar essa condição, os dispersores utilizados nos bioensaios com malation, na concentração de 2,75 ppm, foram limpos com álcool etílico absoluto p.a. Os recipientes foram assim cheios com álcool e o dispersor foi acionado cinco vezes contando a partir da liberação do primeiro jato completo.

Para a realização de bioensaios de mortalidade para comprovação da limpeza dos dispersores, não seria conveniente a utilização de álcool como tratamento para aplicação sobre os mosquitos. Utilizou-se assim água de torneira como tratamento. Os recipientes foram cheios com água e os dispersores acionados até a liberação de um jato completo. Grupos de 25 indivíduos, machos ou fêmeas, foram imobilizados e receberam essa aplicação. Foram realizadas 5 repetições e a leitura de mortalidade foi feita após 24 h. Como testemunha, aplicou-se álcool etílico p.a., utilizando-se os dispersores não lavados e utilizados na concentração de 2,00 ppm de malation.

8.8. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* LINHAGEM ROCKEFELLER AO MALATION.

Foi adotada para a determinação dessa linha base a metodologia desenvolvida e proposta no presente trabalho, consistindo no método de imobilização por sucção e aplicação de líquido por *spray*. Essa metodologia foi validada por meio de bioensaios de mortalidade em mosquitos e moscas à inseticidas conforme apresentado anteriormente. Assim, a linha base de susceptibilidade ao malation da linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti* foi estabelecida e as concentrações para a realização dos primeiros bioensaios foram determinadas baseando-se em Penner (2005).

As aplicações foram realizadas imobilizando-se grupos de 30 indivíduos, machos ou fêmeas, e aplicando-se um jato de solução inseticida para cada concentração. Logo após a aplicação os mosquitos foram retirados da imobilização e mantidos no recipiente de contenção com alimentação açucarada a 10%.

Inicialmente foi realizado um bioensaio preliminar, para fêmeas e outro para machos, de forma a nortear as próximas decisões. Em seguida foram realizados três bioensaios com novas concentrações para fêmeas e três bioensaios com machos e com as mesmas concentrações já utilizadas anteriormente nos bioensaios definitivos. Em todos os bioensaios foram feitas cinco repetições para cada concentração. A mesma quantidade de repetições e bioensaios foi adotada para a testemunha, aplicando-se apenas álcool etílico p.a.

As avaliações de mortalidade iniciaram-se a partir do momento em que o primeiro indivíduo sofreu o efeito do inseticida e foi abatido, sendo considerado morto se não conseguisse permanecer equilibrado sobre as pernas. A verificação da mortalidade foi acompanhada até 8 h após a aplicação e depois de 24 h após, quando se realizou a última avaliação do bioensaio. Ao final foram calculadas as porcentagens de mortalidade para três ou quatro períodos após o tratamento: 4 h, 8 h e 24 h para o bioensaio preliminar e 1 h, 4 h, 8 h e 24 h para os bioensaios definitivos.

As concentrações letais CL_{50} e CL_{99} bem como os tempos letais medianos (TL_{50}) foram calculadas utilizando-se o programa POLO-PC (LEORA, 1987).

8.9. BIOENSAIOS DE MORTALIDADE DE MOSQUITOS COM APLICAÇÃO DA CL_{50} DE MALATION POR DIFERENTES VOLUNTÁRIOS

A linha base de susceptibilidade representada pelas concentrações letais bem como uma proposta de Concentração Diagnóstico (CD), foram estabelecidas em bioensaios onde um único pesquisador manipulou os equipamentos, mosquitos e o inseticida. Quando da utilização da metodologia aqui proposta espera-se que os resultados sejam semelhantes independente da pessoa que realizar o bioensaio. Para se confirmar esse pressuposto os bioensaios de mortalidade foram realizados por três diferentes pesquisadores utilizando-se a CL_{50} de malation para 24 h, obtida no presente trabalho.

Todo o procedimento, desde a coleta dos mosquitos, a imobilização pelo método de sucção, a aplicação do inseticida e a transferência dos mosquitos para o recipiente de contenção foi feito pelos respectivos pesquisadores. Uma das cinco marcas de dispersor aqui avaliada foi escolhida e cada voluntário utilizou um dispersor diferente. Utilizou-se a mesma solução inseticida dos outros bioensaios. Foram realizadas cinco repetições e três bioensaios para cada voluntário com fêmeas de *Ae. aegypti*. A mesma quantidade de repetições e bioensaios foi adotada para a testemunha. Avaliações de mortalidade foram feitas após 24 h da aplicação sendo que cada diferente pesquisador fez sua avaliação individualmente.

8.10. REUTILIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE MALATION ARMAZENADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

As soluções de malation em álcool foram armazenadas em geladeira à 10ºC em recipientes de vidro envoltos em papel alumínio durante três meses. No entanto, ocorreu a hipótese de que a temperatura de armazenamento da solução poderia influenciar na mortalidade dos mosquitos. Por isso, foi realizado um bioensaio de mortalidade com as soluções de malation armazenadas em duas diferentes temperaturas: 1) Baixa temperatura (±10ºC) e; 2) Temperatura ambiente (25±2ºC). A solução foi mantida em temperatura ambiente durante 30 dias. Os bioensaios foram realizados em cinco repetições, 30 indivíduos fêmeas cada e avaliações de mortalidade até 24 h da aplicação.

8.11. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* LINHAGEM ROCKEFELLER A DELTAMETRINA

Para a validação da metodologia de diagnóstico de resistência proposta no presente trabalho e confirmação da sua viabilidade, o presente estudo trata da realização de bioensaios usando-se uma população desse inseto já reconhecidamente resistente. E dessa forma, utilizou-se uma linhagem resistente a deltametrina. Para se conhecer as Concentrações Letais locais para *Ae. aegypti n*o entanto, foi necessário o estabelecimento da linha base de susceptibilidade, para populações não resistentes, o que foi feito com a linhagem Rockefeller.

Três bioensaios de mortalidade com cinco concentrações e cinco repetições para cada concentração foram realizados, utilizando-se a metodologia aqui proposta, onde grupos de 30 mosquitos (machos ou fêmeas) foram imobilizados e receberam aplicações do inseticida por meio de *spray*. A mesma quantidade de repetições e bioensaios foi realizada para a testemunha.

O inseticida deltametrina é um piretroide e classicamente proporciona o efeito de abatimento conhecido como *knockdown* (KD) (WONDJI et al., 2008). Devido ao efeito KD, foi avaliada a quantidade de mosquitos abatidos logo após as aplicações, contando-se os indivíduos caídos no fundo do recipiente de contenção, mas ainda não mortos, com nítidos movimentos de partes do corpo. Mosquitos nas seguintes situações foram considerados em KD: 1) aqueles caídos de dorso, com as pernas para cima, ainda trêmulas; 2) aqueles que estavam com a cabeça apoiada no fundo do recipiente e com abdome para cima e; 3) aqueles que estavam com a cabeça para cima, porém com as pernas dobradas em posição de prostração. O número de indivíduos nessas condições foi usado para cálculo do tempo mediano de KD (TK_{50}). Para o cálculo de mortalidade, desconsiderou-se o período em que os mosquitos estiveram em KD.

8.12. AVALIAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* LINHAGEM SANTARÉM A CL_{50} DE DELTAMETRINA

A CL_{50} calculada para fêmeas e machos de *Ae. aegypti* da linhagem susceptível Rockefeller foi aplicada à linhagem resistente Santarém dessa espécie de mosquito. Grupos de 30 indivíduos, machos ou fêmeas, da linhagem Santarém foram imobilizados

e receberam a aplicação de um jato de solução de deltametrina em álcool etílico conforme metodologia desenvolvida no presente trabalho. Foram feitas cinco repetições. A mesma quantidade de repetições foi realizada para o grupo testemunha.

8.13. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE MOSCAS DA FAMÍLIA CHLOROPIDAE

Moscas da Família Chloropidae foram utilizadas como exemplares adicionais de confirmação da viabilidade da metodologia desenvolvida no presente trabalho.

Durante os meses de Outubro e Novembro/2010 foram feitas coletas diárias no crepúsculo matutino (entre 6:00 h e 8:00 h) e vespertino (entre 18:00h e 20:00h) durante 20 dias/mês. As coletas foram feitas no município de Cosmópolis, SP, à 30 Km do município de Campinas, SP. Utilizaram-se um cão como isca e aspirador elétrico para coletar os indivíduos que pousavam na isca.

Os indivíduos foram separados por sexo utilizando-se o método de FRANCISCO (2005). Tal método consiste na utilização de um tubo de ensaio associado a um tubo de ensaio menor com as extremidades abertas. Em uma das extremidades do tubo menor é colocado um chumaço de algodão e ambos são colocados dentro do tubo maior (Figura 25). Dessa forma é possível observar, em lupa, os detalhes da mosca que fica aprisionada entre o algodão e o fundo do tubo maior.

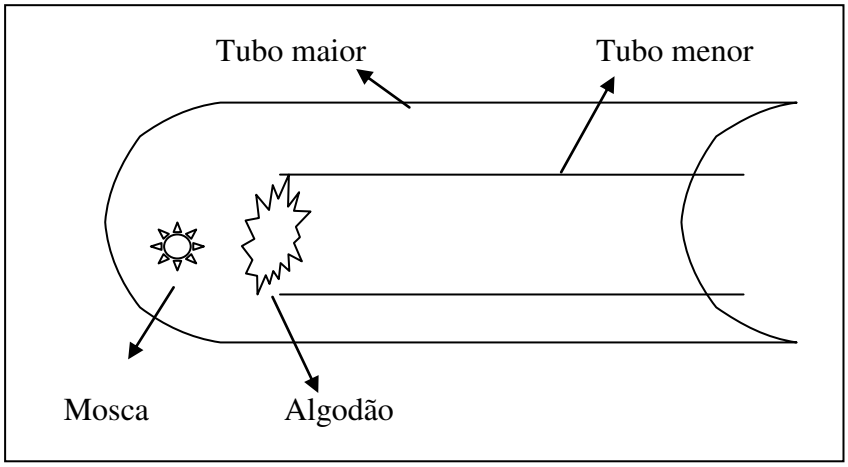


Figura 25 – Esquema mostrando o sistema proposto por Francisco (2005) para sexagem de moscas cloropídeos.

Para identificação, uma amostra das moscas foram mortas em vidro letal e fixadas em triângulo e alfinete entomológico. As identificações foram feitas utilizando-se a chave para identificação de moscas do gênero *Hippelates* e *Liohippelates* do município de Campinas proposta por FRANCISCO (2005).

Logo após a sexagem e identificação, os indivíduos, separados por sexo, foram liberados em gaiola de 30 cm x 30 cm x 20 cm e foi oferecida solução de mel a 10% embebido em pedaços de algodão como meio nutritivo.

8.14. IMOBILIZAÇÃO DE MOSCAS POR MEIO DE SUCÇÃO

Grupos diferentes de 60 indivíduos fêmeas foram mantidos sob sucção durante os períodos de 10 seg., 60 seg., 5 min., 30 min. e 60 min. Para cada período foram feitas 10 repetições. Após o período de imobilização, as moscas foram mantidas em recipientes com solução de mel à 10%.

8.15. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE MOSCAS *Liohippelates nigrifons* AO MALATION.

As moscas da família Chloropidae não são consideradas como praga de grande importância a ponto de necessitar de controle por meio de aplicação de inseticidas. Dessa forma, não se encontram em literatura científica, concentrações de algum inseticida que possa servir para os cálculos das concentrações para a linha base de susceptibilidade.

Utilizou-se a Dose Letal Mediana (DL_{50}) proposta por Andrade e Castello-Branco Jr. (1990) para aplicação tópica em borrachudo da espécie *Simulium perflavum* (Diptera) como proposta inicial devido a proximidade no tamanho de borrachudos e cloropídeos.

Grupos de 60 fêmeas foram capturados das gaiolas de criação utilizando-se aspirador elétrico e mantidos em imobilização para receberem uma aplicação de solução de malation em álcool. Como testemunha, as moscas receberam um jato de álcool absoluto p.a.

As concentrações preliminares foram calculadas e aplicadas sobre as moscas para nortear a seqüência dos experimentos para determinação da linha base. Para

essas concentrações foi feito um único bioensaio e uma testemunha. A partir dos resultados utilizando as concentrações preliminares, as concentrações definitivas foram calculadas. Nesse caso, as concentrações foram avaliadas em três bioensaios com 5 repetições e uma testemunha para cada bioensaio.

9. RESULTADOS

9.1. ANESTESIA DE *Aedes aegypti* COM CO_2 E BAIXA TEMPERATURA

ESTUDOS COM CO_2

Parâmetro 1) Tempo para que todos os indivíduos fossem anestesiados

O tempo médio para anestesia pelo CO_2 de fêmeas de *Ae. aegypti* foi de 108,50 seg. (d.p. 23,68) e para machos foi de 120,20 seg. (d.p. 29,07). O teste estatístico não demonstrou diferença significativa ($t = -1,81$, $p > 0,05$) entre fêmea e macho, por isso considera-se que ambos os sexos possuem a mesma condição fisiológica no sentido de suportar a exposição ao CO_2 e serem anestesiados por esse gás.

Parâmetro 2) Tempo para que o primeiro indivíduo se recuperasse da anestesia

Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Tempo médio (d.p.) para que o primeiro indivíduo, ♀ ou ♂ de *Aedes aegypti* se recuperasse voltando a andar ou voar (T1R) após diferentes períodos de exposição à anestesia por CO_2.

	Períodos de exposição ao CO_2.								
	30 seg	60 seg	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
					♀				
T1R	86,3 (24,8)	89,3 (18,8)	100,5 (16,2)	89,0 (22,9)	105,4 (13,3)	88,0 (17,3)	96,3 (22,3)	88,0 (33,7)	82,1 (15,9)
					♂				
T1R	87,1 (32,0)	111,7 (31,3)	99,2 (16,5)	98,9 (20,5)	104,9 (12,9)	107,9 (11,4)	108,5 (27,5)	139,8 (46,6)	114,1 (23,9)

T1R= Tempo para primeira recuperação

Observa-se que não parece haver uma diferença entre machos e fêmeas para períodos menores de exposição, no entanto o teste estatístico demonstrou diferença

significativa (t = -3,890, p<0,05) para uma média geral entre todos os períodos de exposição avaliados. Quando fêmeas e machos foram comparados quanto ao tempo para o primeiro indivíduo se recuperar, a média geral para fêmeas foi de 91,65 seg. (d.p. 21,64) e para machos foi de 108,06 seg. (d.p. 29,10). A presença de algumas fêmeas com uma condição fisiológica melhor parece ter feito com que no geral elas apresentassem um indivíduo mais rápido para se recuperar da anestesia por CO_2.

Parâmetro 3) Tempo para que todos os indivíduos se recuperassem

Os resultados são apresentados na (Tabela 3).

Tabela 3 – Tempo médio (d.p.) para que todos os indivíduos anestesiados se recuperassem (TRT) voltando a andar ou voar, em até 5 min., após o término da exposição a diferentes períodos de exposição à anestesia por CO_2.

	Períodos de exposição ao CO_2.								
	30seg	60 seg	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
					♀				
TRT	103,0 (3,30)	149,0 (10,9)	189,8 (39,3)	163,0 (25,9)	182,7 (22,6)	245,5 (27,35)	298,6 (4,09)	300,0 (0,0)	300,0 (0,0)
					♂				
TRT	103,6 (5,9)	139,6 (16,2)	173,9 (39,9)	170,4 (20,9)	181,9 (20,1)	256,5 (26,07)	300,0 (0,0)	300,0 (0,0)	300,0 (0,0)

TRT= Tempo para recuperação total

O teste estatístico não demonstrou diferença significativa (t = 0,240, p>0,05) na comparação entre fêmeas e machos para uma média geral entre todos os períodos de exposição. Os resultados permitem indicar que ambos os sexos possuem uma capacidade fisiológica semelhante para se recuperar do efeito da anestesia ao CO_2.

As porcentagens médias (d.p.) de machos ou fêmeas não recuperados após os 3 maiores períodos de exposição foram sempre abaixo de 3%. Para fêmeas expostas por 20 min. = 1,88% (2,75); 25 min. = 2,08% (3,16) e para 30 min. = 2,80% (4,57). Para

machos esses valores médios foram de: 20 min. = 0,92 % (1,64); 25 min. = 2,52% (2,41) e para 30 min. = 2,60% (2,84).

Parâmetro 4) Mortalidade

Os resultados são apresentados no Gráfico 1. Não houve mortalidade nos mosquitos mantidos como testemunha, e para as fêmeas tratadas pelo CO_2, uma mortalidade baixa ocorreu apenas a partir de 15 min. de exposição, sendo as médias (d.p.) de: 15 min. = 0,83% (0,42); 20 min = 1,20% (0,48); 25 min. = 2,00% (0,53) e por último 30 min. = 4,0% (1,15). Já, para machos ocorreu também uma mortalidade muito baixa, mas somente a partir de 20 min. de exposição, sendo os valores médios (d.p.): 20 min. = 0,20% (0,71); 25 min. = 0,36% (1,20) e finalmente 30 min. = 0,52% (1,57).

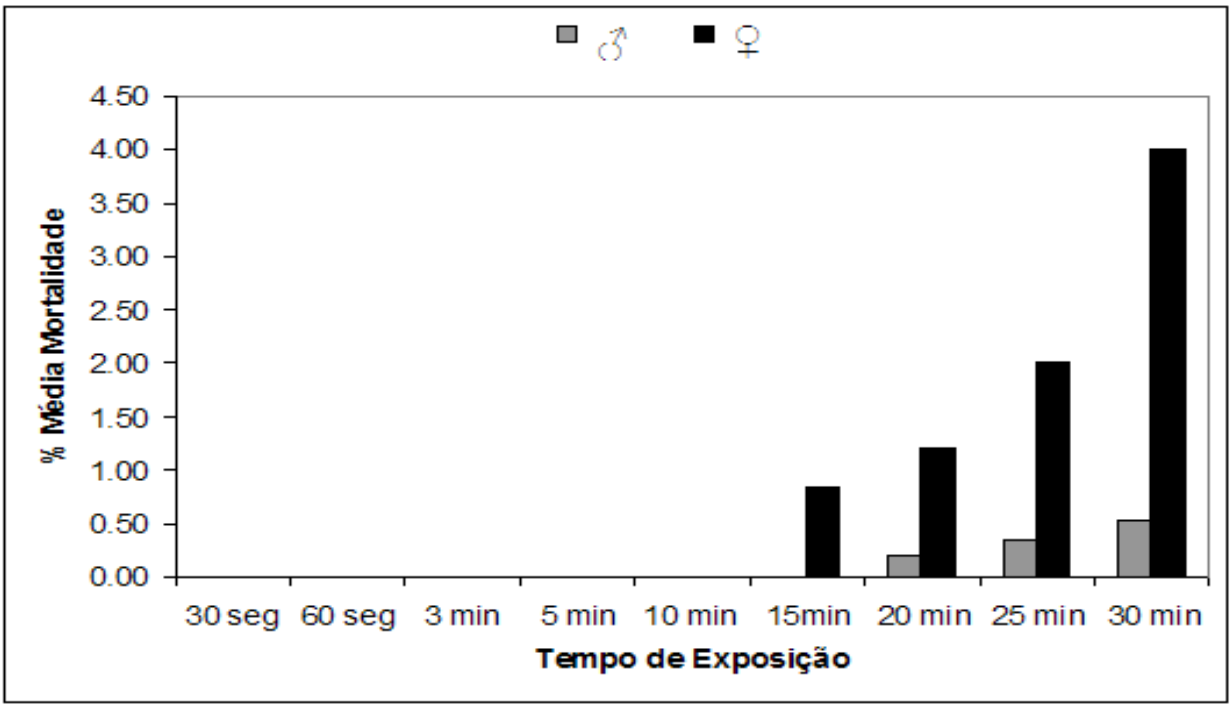


Gráfico 1 – Porcentagem média de mortalidade para machos(♂) e fêmeas (♀) de *Aedes aegypti* após a anestesia com CO_2 por diferentes períodos.

O teste estatístico não demonstrou diferença significativa (t= -0,770, p>0,05) para a mortalidade geral entre fêmeas e machos. Apesar da mortalidade em fêmeas ter se iniciado para um período de exposição (15 min.) inferior a aquele que ocorreu para os

machos (20 min.), os resultados demonstram que ambos os sexos possuem semelhante capacidade de tolerar a anestesia, respondendo com baixas mortalidades e apresentando uma resposta fisiológica ao CO_2 aceitável, pelo menos para períodos de exposição de até trinta minutos.

ESTUDOS COM BAIXA TEMPERATURA

As medições de temperatura do papel filtro sobre o gelo na placa fria adaptada demonstraram constância para todos os intervalos de medições, permanecendo com uma média (d.p.) de 5,0°C (0,05).

Não houve mortalidade entre aos mosquitos que foram mantidos em congelador (0 ºC) até caírem e foram depois mantidos em temperatura ambiente, sendo que em um período médio (d.p.) de 60 seg. (1,03) todos os indivíduos estavam recuperados.

Parâmetro 1) Tempo para que todos os indivíduos fossem anestesiados

O tempo médio (d.p.) para a anestesia a frio das fêmeas foi de 125,6 seg. (28,53) e para machos foi de 114,7 seg. (30,67). O teste estatístico demonstrou não haver diferença significativa ($t = 1,0431$, $p > 0,05$) entre fêmeas e machos tratados, indicando que ambos os sexos respondem de maneira semelhante quando expostos a baixa temperatura para anestesia.

Parâmetro 2) Tempo para que o primeiro indivíduo se recuperasse

Os resultados para o tempo necessário para que um primeiro indivíduo se recupere da anestesia em placa fria adaptada estão na Tabela 4.

Tabela 4 – Tempo médio (d.p.) para que o primeiro indivíduo, fêmea ou macho de *Aedes aegypti* se recuperasse voltando a andar ou voar (T1R) após diferentes períodos de exposição à baixa temperatura (5ºC) em placa fria adaptada.

	Períodos de exposição à baixa temperatura								
	30 seg	60 seg	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
	Fêmeas								
T1R	90,2 (14,9)	90,7 (20,2)	101,2 (11,6)	89,1 (19,9)	97,7 (16,9)	77,3 (19,9)	104,7 (16,7)	105,7 (21,5)	71,3 (22,9)
	Machos								
T1R	93,4 (23,3)	92,8 (15,8)	102,3 (10,5)	92,1 (19,5)	85,6 (26,1)	86,6 (24,1)	98,0 (19,0)	105,7 (21,5)	82,4 (17,5)

T1R= Tempo para primeira recuperação

O teste estatístico demonstrou não haver diferença significativa ($t = -0,5455$, $p>0,05$) na comparação entre os tempos para uma primeira recuperação entre fêmeas e machos de *Ae. aegypti* quando expostos por diferentes períodos à baixa temperatura de placa fria adaptada para anestesia. Os resultados permitem indicar que a maioria dos indivíduos de ambos os sexos suportam a baixa temperatura em condição fisiológica semelhante.

Parâmetro 3) Tempo para que todos os indivíduos se recuperassem.

Os resultados para a avaliação do tempo necessário para a recuperação de todos os indivíduos, seja, machos ou fêmeas estão na Tabela 5.

Tabela 5. Tempo médio (d.p.) para que todos os indivíduos se recuperassem (TRT) voltando a andar ou voar, em até 5 min., após o término da exposição por diferentes períodos à anestesia em baixa temperatura.

	Períodos de exposição à baixa temperatura								
	30 seg	60 seg	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
				Fêmeas					
TRT	109,0 (6,9)	147,3 (10,1)	197,6 (13,1)	161,4 (23,6)	173,6 (16,8)	247,9 (25,5)	300,0 (0,0)	300,0 (0,0)	300,0 (0,0)
				Machos					
TRT	107,1 (9,7)	132,4 (8,0)	136,4 (16,5)	156,8 (40,2)	152,6 (34,2)	194,7 (33,0)	300,0 (0,0	300,0 (0,0)	300,0 (0,0

TRT= Tempo para recuperação total

O tempo médio (d.p.) geral para todas as fêmeas se recuperarem do tratamento a frio foi de 215,2 seg. (71,18) e para machos foi de 197,7 seg. (d.p. 78,77). O teste estatístico demonstrou haver diferença significativa ($t = 5,0319$, $p<0,05$) sendo que machos se recuperaram mais rápido do que as fêmeas após a exposição à baixa temperatura.

A porcentagem média (d.p.) de fêmeas não recuperadas após 5 minutos de observação foi baixa para os três maiores períodos de exposição: 20 min.= 1,48% (3,19); 25 min. = 1,87 (2,95) e para o maior período, 30 min. = 2,91 (5,77). E a porcentagem de machos que não se recuperaram após os 5 minutos de observação foi bastante semelhante: 20 min. = 1,44% (2,12); 25 min. = 1,80% (2,58) e finalmente para 30 min. = 2,24% (3,31).

Parâmetro 4) Mortalidade

Os resultados para a mortalidade de adultos de *Ae. aegypti* sujeitos à anestesia em placa fria modificada por diferentes períodos de exposição estão no Gráfico 2.

Analisando a mortalidade para fêmeas, após a anestesia em baixa temperatura, encontrou-se que poucos indivíduos já morreram após a exposição por 60 segundos. Fêmeas também mostraram a maior porcentagem de mortalidade para o maior período

de exposição (de 30 minutos), mas de qualquer forma em baixa proporção e da ordem de 4%. Os valores médios (d.p.) encontrados para fêmeas foram: 60 seg. = 0,41% (0,32); 3 min. = 0,74% (0,42); 5 min. = 0,80% (0,42); 10 min. = 1,20% (0,48); 15 min. = 1,60% (0,52); 20 min. = 2,30% (0,52); 25 min. = 3,33% (0,63) e; 30 min. = 3,91% (3,04). Já para machos, as porcentagens encontradas foram: 10 min. = 1,04% (0,67); 15 min. = 2,00% (0,85); 20 min. = 2,00% (0,85); 25 min. = 2,30 % (0,84) e 30 min. = 2,30% (0,84).

Mesmo que fêmeas tenham respondido mais rapidamente, com conseqüente maior mortalidade, o teste estatístico não demonstrou diferença significativa (t = 1,25, p>0,05) na comparação entre fêmeas e machos, ocorrendo que ambos os sexos respondem na mesma proporção quando expostos a baixa temperatura. Não houve mortalidade na testemunha.

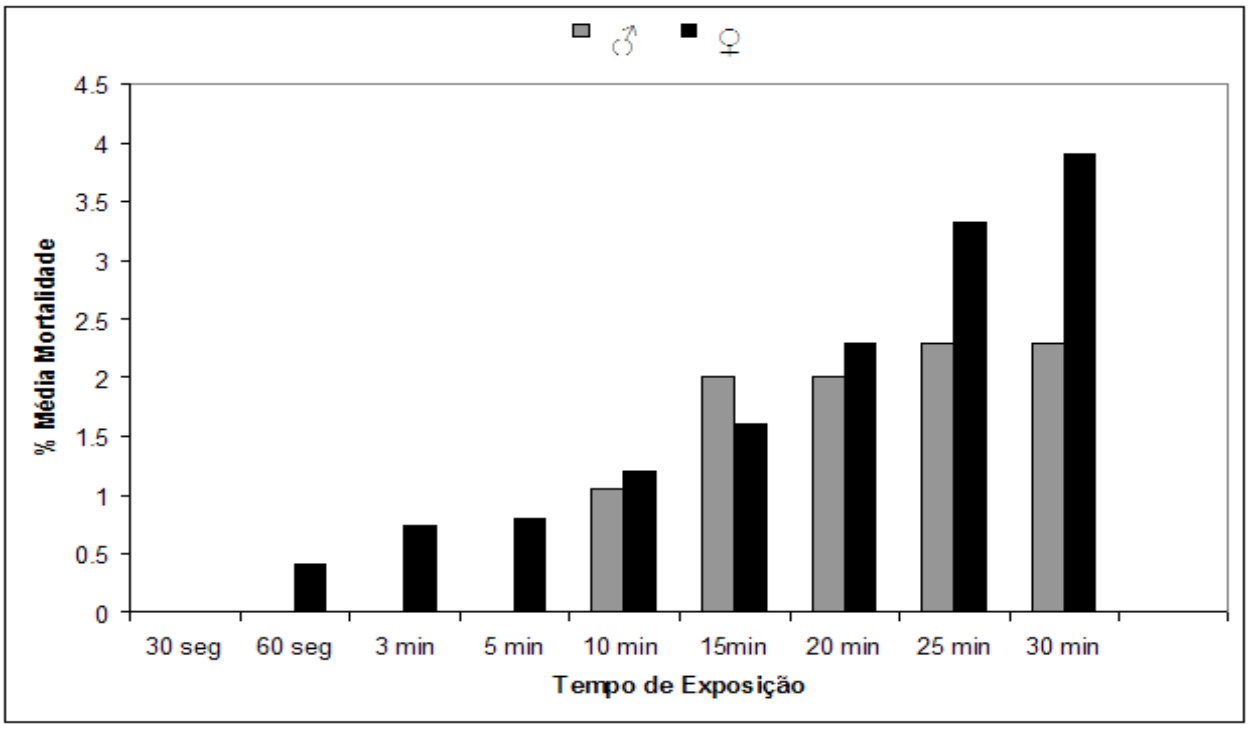


Gráfico 2 – Porcentagem média de mortalidade de ♂ e ♀ expostos a baixa temperatura.

ESTUDOS UTILIZANDO CO_2 E BAIXA TEMPERATURA CONCOMITANTEMENTE

A mortalidade para fêmeas e machos está exposta no Gráfico 3. Em geral, a mortalidade foi baixa, ficando sempre menor do que 5%, situação que em geral é assumida como não sendo necessárias fórmulas de correção de mortalidade, como a de Abbott (WHO, 1998). Para as fêmeas e todos os tempos de exposição as médias (d.p.) de mortalidades encontradas foram 60 seg. = 0,38% (0,32); 3 min. = 0,80% (0,42); 5 min. = 0,80% (0,42); 10 min. = 1,15% (0,48); 15 min. = 1,66% (0,52); 20 min. = 2,40% (0,52); 25 min.= 3,20% (0,63) e para 30 min. = 4,00% (0,82).

Para os mosquitos machos avaliados os valores de mortalidade para todos os tempos de exposição concomitante ao CO_2 e baixa temperatura ficaram também abaixo de 5%. A mortalidade também se iniciou em 60 seg. de exposição e foram como segue: 60 seg. = 0,38% (0,32); 3 min. = 0,80% (0,42); 5 min. = 0,80% (0,42); 10 min. = 0,76% (0,42); 15 min. = 0,83% (0,42); 20 min. = 1,20% (0,48); 25 min.= 4,00% (0,82) e finalmente a maior mortalidade, 30 min. = 4,40% (0,99).

O teste estatístico não demonstrou diferença significativa ($t = 0,5188$, $p>0,05$) para os valores de mortalidade entre ambos os sexos, que respondem na mesma proporção quando expostos ao CO_2 e baixa temperatura concomitantemente. Não houve mortalidade na testemunha não exposta a essas condições experimentais de anestesia.

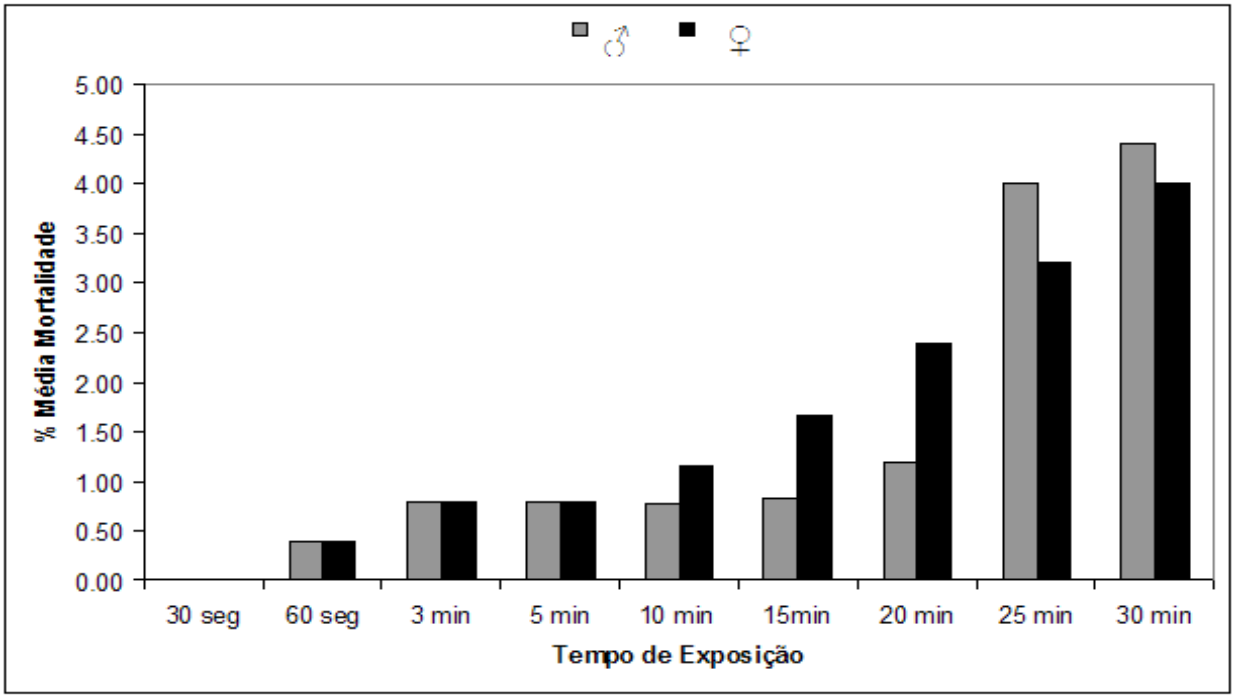


Gráfico 3 – Porcentagem média de mortalidade de ♂ e ♀ expostos ao CO_2 e baixa temperatura concomitantemente.

9.2. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE COLETA E IMOBILIZAÇÃO DE PEQUENOS DÍPTEROS

9.2.1. PROCEDIMENTO DE UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE IMOBILIZAÇÃO

O procedimento para utilização do método de imobilização avaliado no presente trabalho consiste em coletar os insetos com o aspirador elétrico e o recipiente coletor. O recipiente coletor com os mosquitos (Figura 26a) é retirado do aspirador e com a tela para baixo é colocado sob sucção no imobilizador (Figura 26b) ainda com a tampa. Dessa forma os insetos ficam imobilizados. Em seguida, retira-se a tampa do recipiente coletor, sendo que os mosquitos permanecem imobilizados (Figura 27), e a substitui pela tampa telada. Agora, o recipiente é considerado como recipiente de contenção (Figura 28a), sendo retirado da sucção. No momento da aplicação de um produto ou

manuseio dos insetos, o recipiente de contenção é colocado sob sucção com a tampa para baixo (Figura 28b), sendo que os mosquitos ficarão imobilizados na tampa telada (Figura 30). Ao final, conecta-se o recipiente com o algodão do cotonete já embebido em solução açucarada e retiram-se os insetos da sucção.

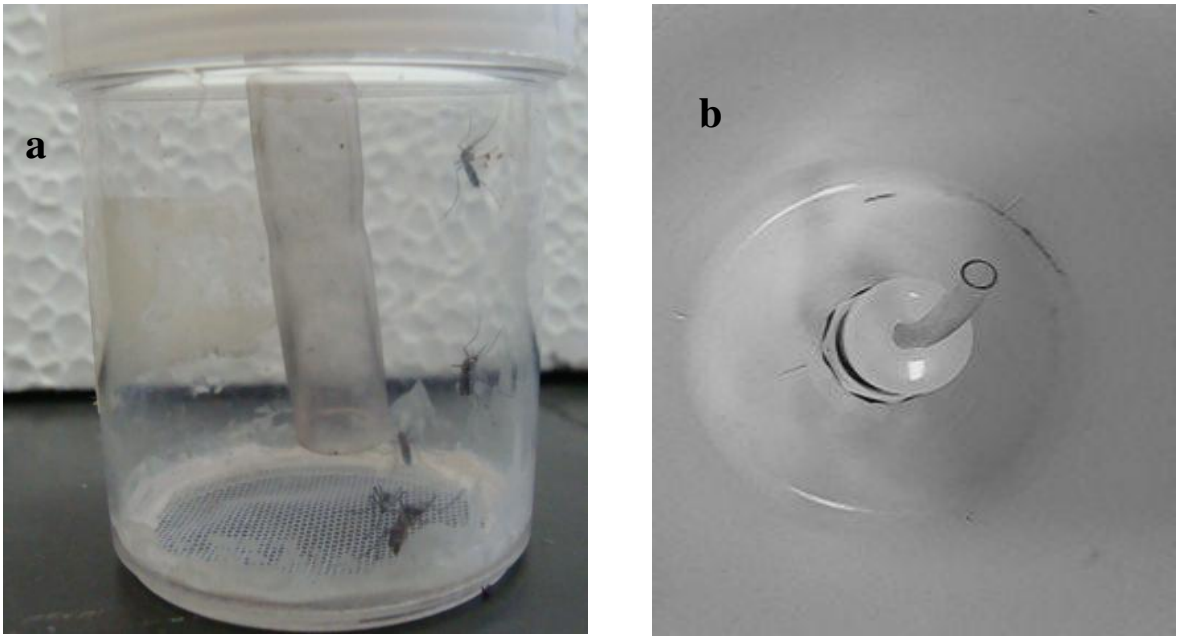


Figura 26 – a) recipiente coletor com mosquitos fêmeas coletados; b) recipiente coletor, com a tampa, no imobilizador.

Figura 27 – Mosquitos imobilizados no fundo do recipiente coletor.

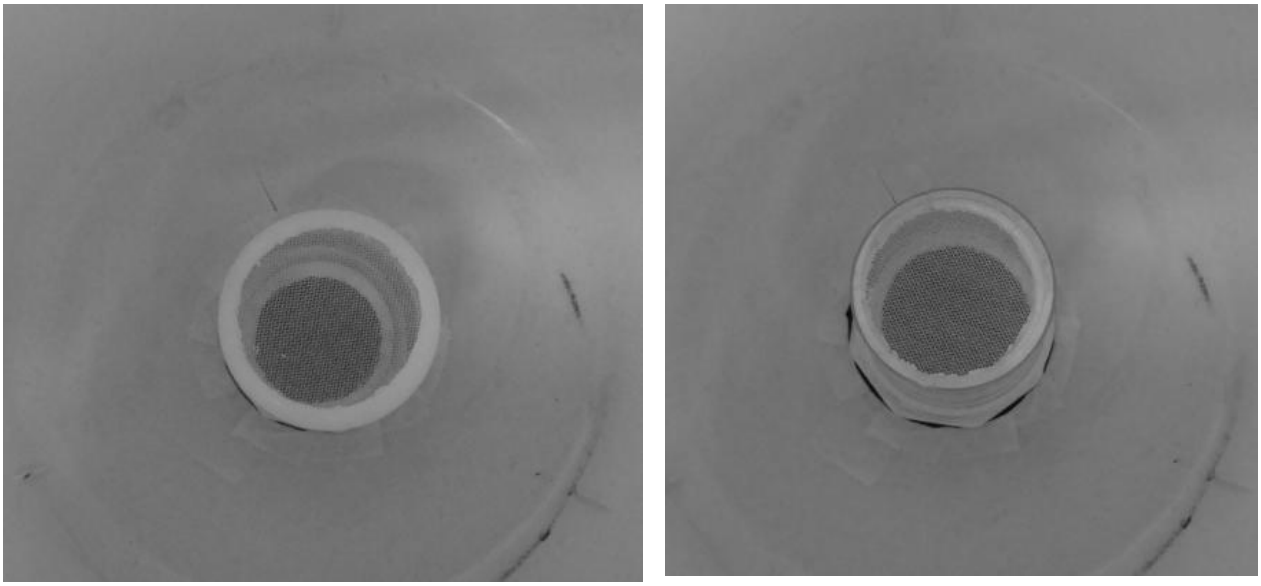


Figura 28 – a) Recipiente coletor recebe a tampa telada, passando assim a ser considerado como recipiente de contenção. b) Recipiente de contenção, com a tampa para baixo, no imobilizador.

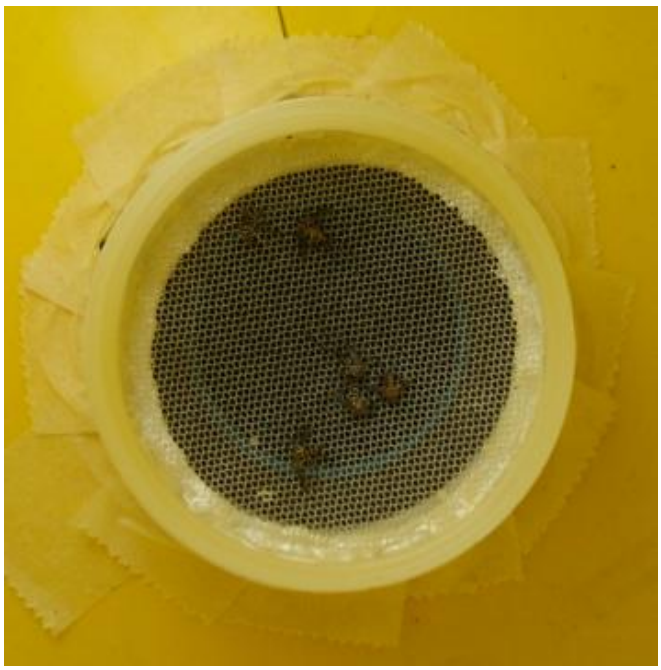


Figura 29. Mosquitos imobilizados na tampa telada.

9.2.2. MEDIÇÃO DA VELOCIDADE DO VENTO PROPORCIONADO PELO IMOBILIZADOR

O aspirador de pó comercializado para uso em automóveis, utilizado na posição de sucção da parte superior para a inferior, produziu na situação experimental proposta no presente trabalho um vento com velocidade média de 30,12 Km/h (d.p. 0,16). Nessa velocidade de fluxo de ar todos os mosquitos ficaram imobilizados, distribuídos pela área do recipiente, não havendo alteração comportamental visível após a retirada da sucção. Em geral, ambos os sexos de mosquitos ficaram completamente aderidos a tela, tanto no fundo do recipiente (Figura 27) quanto na tampa (Figura 29), deixando várias partes do corpo expostos para aplicação do produto a ser avaliado.

9.2.3. AVALIAÇÃO DE MORTALIDADE EM DIFERENTES PERÍODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Para os mosquitos expostos a essa avaliação, a porcentagem média de mortalidade em 60 min. foi de 0,66% (d.p. 0,42) para machos e de 0,32% (d.p. 0,31) para fêmeas. Na comparação entre macho e fêmea não houve diferença significativa ($t = 0,5735$, $p>0,05$). Não houve mortalidade na testemunha.

9.2.4. DENSIDADE DE MOSQUITOS NO RECIPIENTE DE CONTENÇÃO

Os resultados estão apresentados na Tabela 6. A média para todas as tampas de indivíduos imobilizados por centímetro quadrado foi: Fêmea: 5,35 (d.p. 0,88) indivíduos/cm^2 e Macho: 5,40 (d.p. 0,76) indivíduos/cm^2, não havendo diferença significativa ($p = -0,3487$, $p > 0,05$) entre fêmea e macho.

Tabela 6. Densidade média (desvio padrão) de mosquitos distribuídos em quatro áreas de 1 cm^2 da tampa do recipiente de contenção.

					Fêmea					
Tampa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Média	5,75	4,75	5,50	5,50	5,25	5,00	5,25	5,50	4,75	6,25
d.p.	0,50	0,96	0,58	1,00	0,96	0,82	1,26	1,29	0,50	0,96
					Macho					
Tampa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Média	5,25	4,25	6,00	5,25	5,00	5,75	5,50	5,75	5,25	6,00
d.p.	0,96	0,50	0	0,96	0,82	0,50	1,29	1,26	0,50	0,82

9.2.5. AJUSTES PARA UTILIZAÇÃO DO ASPIRADOR DE COLETA

Para todas as comparações possíveis aquela que proporcionou menor tempo para coleta e menor mortalidade foi a que o tubo distava 3,5 cm da tampa e a voltagem era de 4,5 V. O tempo médio de coleta foi de 22,10 seg. (d.p. 2,13) e a mortalidade média decorrente foi de 0,33% (d.p. 0,31) para fêmeas. Para os machos, foi respectivamente de 23,20 seg. (d.p. 1,45) e 0,66% de mortos (d.p. 0,22). Logo após os 5 min. de espera para registro de mortalidade, cada indivíduo morto foi visualmente marcado, o recipiente coletor foi colocado sob sucção com a tampa para baixo e cada indivíduo morto foi retirado com pinça. Logo após, conectou-se o recipiente na tampa e os indivíduos mortos foram substituídos sendo coletado no mesmo recipiente junto aos outros já coletados.

9.3. PROPOSTA DE UM MÉTODO DE APLICAÇÃO DE AMOSTRAS EM LÍQUIDO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO TÓPICO EM MOSQUITOS

As medidas (diâmetro e altura), importadores e comercializadores dos dispersores aqui utilizados estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 – Diâmetro, Altura e Volume (cm^3) dos dispersores utilizados no presente trabalho.

Dispersor (Imp. & Com.)	Diâmetro (cm)	Altura (cm)	Volume (cm^3)
A (Vitrium)	2,4	4,0	79,2
B (Fu Xing)	1,6	3,5	12,6
C (Embagel)	1,8	3,6	30,7
D (Farma Química)	2,7	4,1	281,9
E (Hislas)	1,7	3,6	28,3

Os dispersores descritos na Tabela 7 serão citados abaixo utilizando-se, respectivamente, as letras A, B, C, D e E.

Analisando-se o diâmetro dos cinco dispersores avaliados, observa-se uma diferença de 1,1 cm entre o menor e maior diâmetro. Já, a diferença entre a menor e maior altura foi de 0,6 cm. No entanto, essas diferenças não interferem no volume liberado por cada válvula. Dessa forma, entende-se que essas medidas devem estar relacionadas ao tamanho do recipiente e consequentemente ao volume de líquido que se pode utilizar, como por exemplo, para o dispersor D, que possui os maiores valores para as três medidas.

9.3.1. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DOS DISPERSORES

As especificações técnicas dos dispersores que foram determinadas no presente trabalho estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Especificações técnicas dos dispersores.

	Dispersores				
	A	B	C	D	E
IMF (acionamentos)	3,86 (0,16)	3,58 (0,20)	4,12 (0,30)	3,48 (0,10)	3,90 (0,67)
VUM (acionamentos)	7401,4 (213,90)	7507,4 (7,53)	7237,0 (207,80)	7501,0 (2,23)	7343,0 (198,38)
VM (mL)***	0,118 (0,009)	0,100 (0,0006)	0,117 (0,003)	0,119 (0,0006)	0,128 (0,004)

*IMF – Início Médio de Funcionamento/ **VUM – Vida Útil Média/ *** Vazão Média

INÍCIO MÉDIO DE FUNCIONAMENTO – A média para todos os dispersores foi de 3,82 (d.p. 0,29) acionamentos. Pelo teste estatístico foi possível fazer 10 comparações entre os dispersores, sendo que em 70% dessas obteve-se diferença significativa ($t = 0,229$, $p<0,05$). Isso mostra que não há homogeneidade quanto ao início médio de funcionamento no sistema de liberação do *spray* para cada válvula. Significa também que não é possível padronizar a quantidade de acionamentos necessários para se iniciar a liberação de um jato completo.

VIDA ÚTIL MÉDIA - A média de acionamentos para todos os dispersores foi de 7.398,0 (d.p. 111,0) acionamentos sendo que nos testes estatísticos, para as 10 comparações possíveis, houve 20 % com diferença significativa ($t = 0,493$, $p<0,05$). Apesar de não haver homogeneidade de 100% dos dispersores quanto à vida útil média, a quantidade acima de 7.000 acionamentos permite que tais válvulas sejam utilizadas por um longo período e repetidas vezes antes de ocorrer algum problema na liberação do jato completo. Todos os dispersores, portanto mostraram-se adequados à proposta de utilização aqui feita.

VAZÃO - A média para todos os dispersores e todos os voluntários foi de 0,116 mL (d.p. 0,003). Para cada voluntário a vazão média foi: Voluntário 1 = 0,116 mL (d.p. 0,01); Voluntário 2 = 0,118 mL (d.p. 0,01); Voluntário 3 = 0,117 mL (d.p. 0,009) e Voluntário 4 = 0,117 mL (0,01).

A análise estatística de t de Student demonstrou não haver nenhuma diferença significativa ($t = -0,308$, $p>0,05$) para as comparações entre os voluntários. A ausência de diferença significativa demonstra que os dispersores podem ser utilizados por diferentes pessoas sem haver modificação no resultado final de um bioensaio que possa ser relacionado ao fator humano de acionamento dos sprays.

9.3.2. PARÂMETROS DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS GOTAS PRODUZIDAS PELOS DISPERSORES

Considerando que o comprimento do recipiente limitador é de 25 cm, a distância entre a saída do líquido do dispersor e o feixe de laser foi de 26,5 cm.

O DVM foi de 30,16 µm a 65,68 µm (Tabela 9). Para efeito de comparação, observa-se que o menor DVM está relacionado ao maior dispersor (27 cm de diâmetro e 4,1 cm de altura) e, o maior DVM está relacionado ao menor dispersor (1,6 cm de diâmetro e 3,5 cm de altura). O teste estatístico t de Student demonstrou diferença significativa ($t = 3,160$, $p<0,05$) para 80% das comparações entre os dispersores. Isso demonstra que o tamanho das gotas entre os dispersores de diferentes marcas não é igual e que, ao aplicar uma solução líquida sobre um inseto utilizando diferentes dispersores pode ocorrer variação no volume de líquido que o inseto receberá. A porcentagem do volume de gotas menores de 100 µm variou de 79,9% a 92,4%.

Tabela 9 - Diâmetro do volume mediano (DVM), amplitude relativa (AR) e porcentagem do volume em gotas menores que 100 µm (% < 100) dos cinco dispersores avaliados.

Dispersor	DVM (µm)	AR	% < 100
A	49,98	1,67	92,0
B	65,68	3,80	92,4
C	57,16	3,80	88,7
D	30,16	2,88	79,9
E	40,37	2,35	85,4

A AR indica o grau de uniformidade do diâmetro das gotas produzidas. A uniformidade máxima do jato é obtida quando a AR se iguala a zero (SILVA et al., 2009). Assim, a AR no presente trabalho variou de 1,67 a 3,80, demonstrando que a amplitude do diâmetro de gotas dos dispersores aqui utilizados não são uniformes, havendo menor uniformidade nos menores dispersores. Na análise estatística t de Student, 20% das comparações demonstraram diferença significativa ($t = -3,164$, $p<0,05$), demonstrando que a amplitude do tamanho das gotas dos dispersores tem grande variação o que leva a possibilidade de erro na interpretação do resultado de um bioensaio quando da utilização de diferentes marcas de dispersores. No entanto, o dispersor A (Vitrium) seria mais conveniente de ser escolhido por apresentar menor AR.

9.3.3. DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA DE APLICAÇÃO DO LÍQUIDO

Os dispersores aqui utilizados produzem um jato em forma de cone, no entanto, nas distâncias de aplicação aqui avaliadas, observou-se que o tamanho do espalhamento não formava um círculo mais sim uma elipse (Figura 30). Assim a área da elipse foi calculada utilizando-se a fórmula “PI x r1 x r2” onde, r1 e r 1 = raios da elipse (Tabela 10).

Tabela 10 – Área (cm^2) (média e desvio padrão) da elipse formada pelo jato dos dispersores à diferentes distâncias para o dispersor A (Vitrium).

Distância (cm)	Média	d.p.
5	186.69	24.814
10	445.46	42.852
15	812.47	76.431
20	1218.23	246.92
25	1436.49	241.64
30	1582.20	302.58

A Densidade de Deposição foi estabelecida a partir da distância de 10 cm, pois em 5 cm a agregação das gotas formaram manchas muito densas não sendo possível a contagem de gotas individualizadas.

Os resultados foram (média e desvio padrão): 10 cm = 23,30 (d.p. 2,11) gotas; 15 cm =16,90 (d.p. 2,13) gotas; 20 cm =7,60 (d.p. 1,84) gotas; 25 cm =3,70 (d.p. 1,49) gotas e 30 cm =2,20 (d.p. 1,03) gotas

Considerando que a média de mosquitos/cm^2 obtida foi de 5,37 adotou-se que a distância de 20 cm seria adequada para aplicação de uma quantidade de gotas suficiente para atingir todos os mosquitos imobilizados. Por isso, utilizou-se o recipiente limitador conforme descrito no item 18.2.

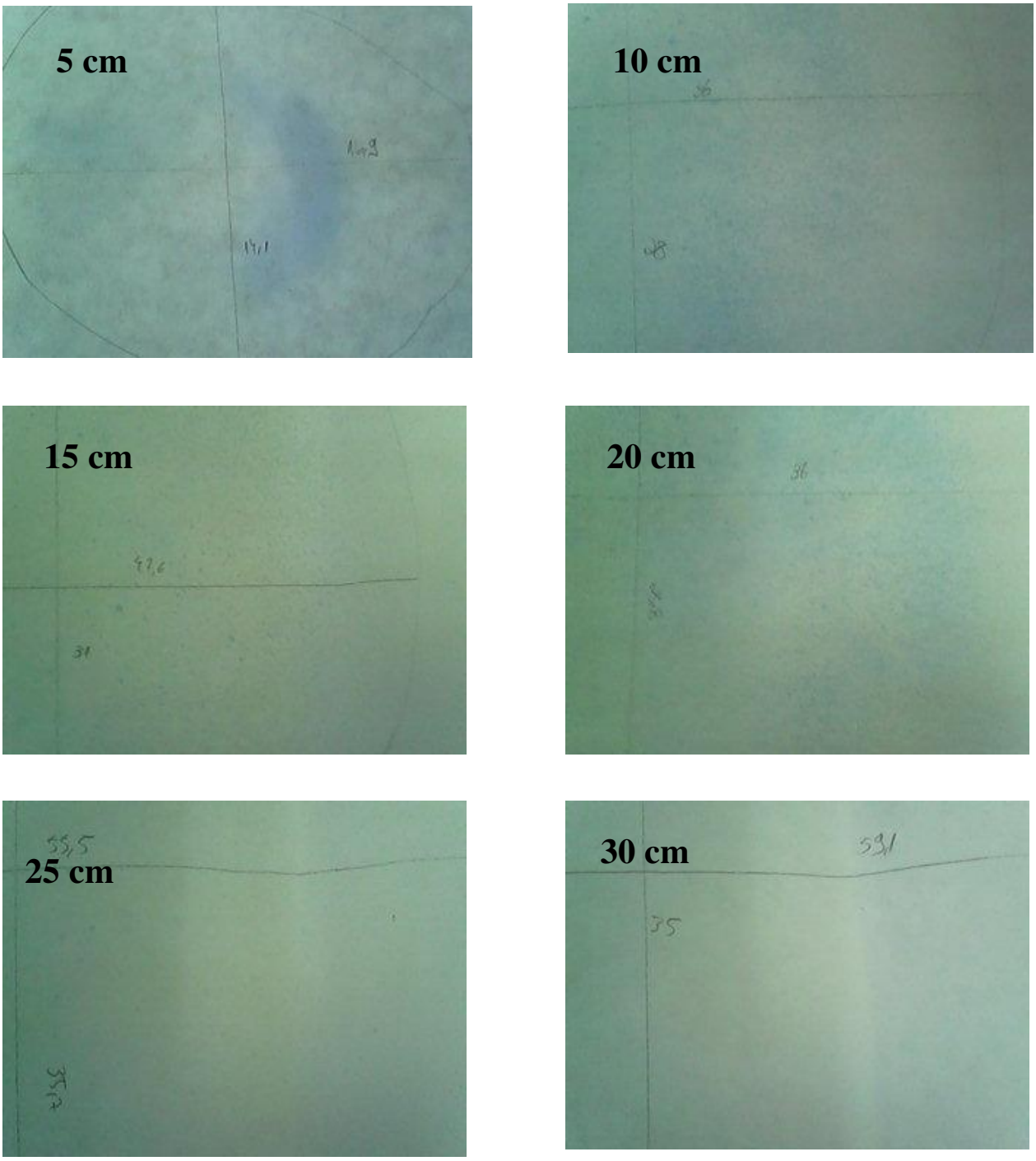


Figura 30 – Imagens mostrando as manchas produzidas pelos dispersores em diferentes distâncias de dispersão

9.4. UTILIZAÇÃO DE ACETONA OU ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO COMO DILUENTE PARA APLICAÇÃO DE INSETICIDAS DE AÇÃO TÓPICA EM MOSQUITOS.

ANÁLISES UTILIZANDO ACETONA ABSOLUTO

Os resultados de mortalidade para ambos os sexos de mosquitos após a aplicação de acetona estão apresentados no Gráfico 4. Observa-se que para as fêmeas a mortalidade média iniciou-se após 60 seg. da aplicação com apenas 0,1% (d.p. 0,2), manteve-se abaixo de 5% até 4 horas após e atingiu um máximo de 61,0% (d.p. 12,5) após 24 h. Já, para os machos ocorreu uma baixa mortalidade média logo após 10 seg. da aplicação (0,1%; d.p. 0,2) atingindo mais de 50% após 4 horas da aplicação e um máximo de 81,6% (d.p. 17,5) após 24 h. Observa-se ainda que, a partir de 300 min. (5 horas) a mortalidade de fêmeas passa a ser superior a 20% e para macho isso ocorre em 60 min. após a aplicação. Não houve mortalidade na testemunha. Comparando os ensaios para fêmea houve diferença significativa ($t = -5,413$, $p<0,05$) para todas as comparações. Já, para machos, houve diferença significativa ($t = -3,609$; $p<0,05$) para duas das três comparações. Comparando os ensaios entre macho e fêmea, houve diferença significativa ($t = -5,379$, $p<0,05$).

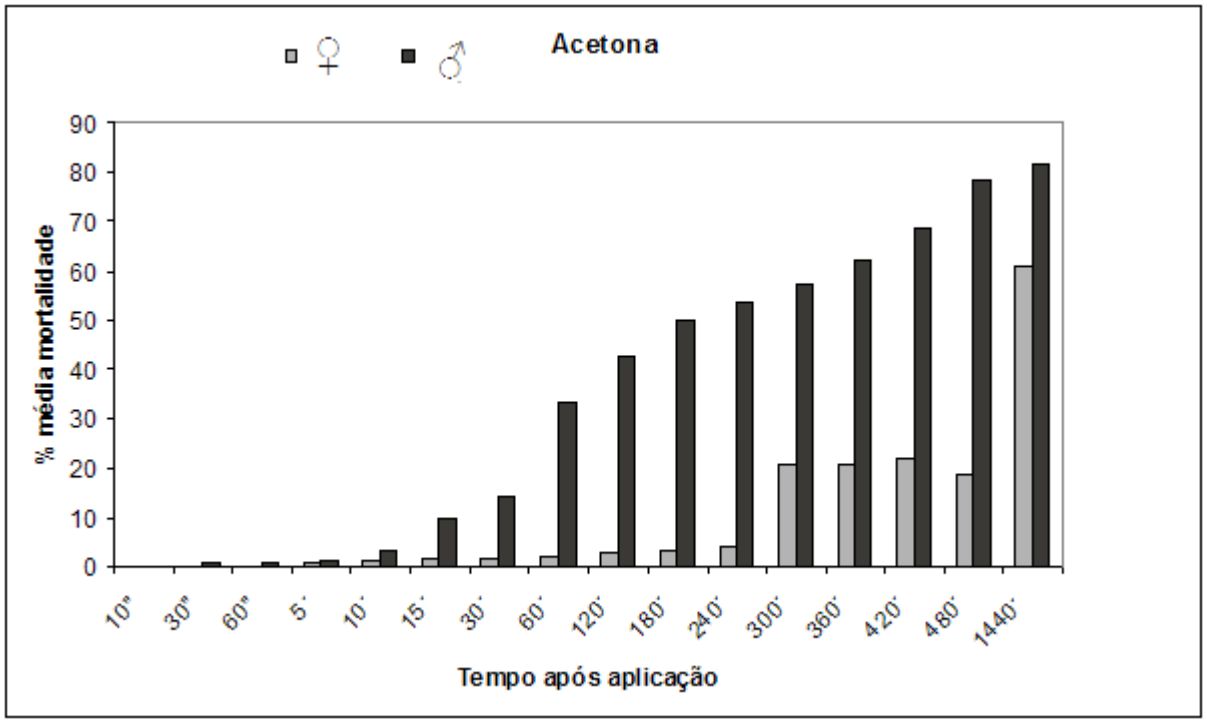
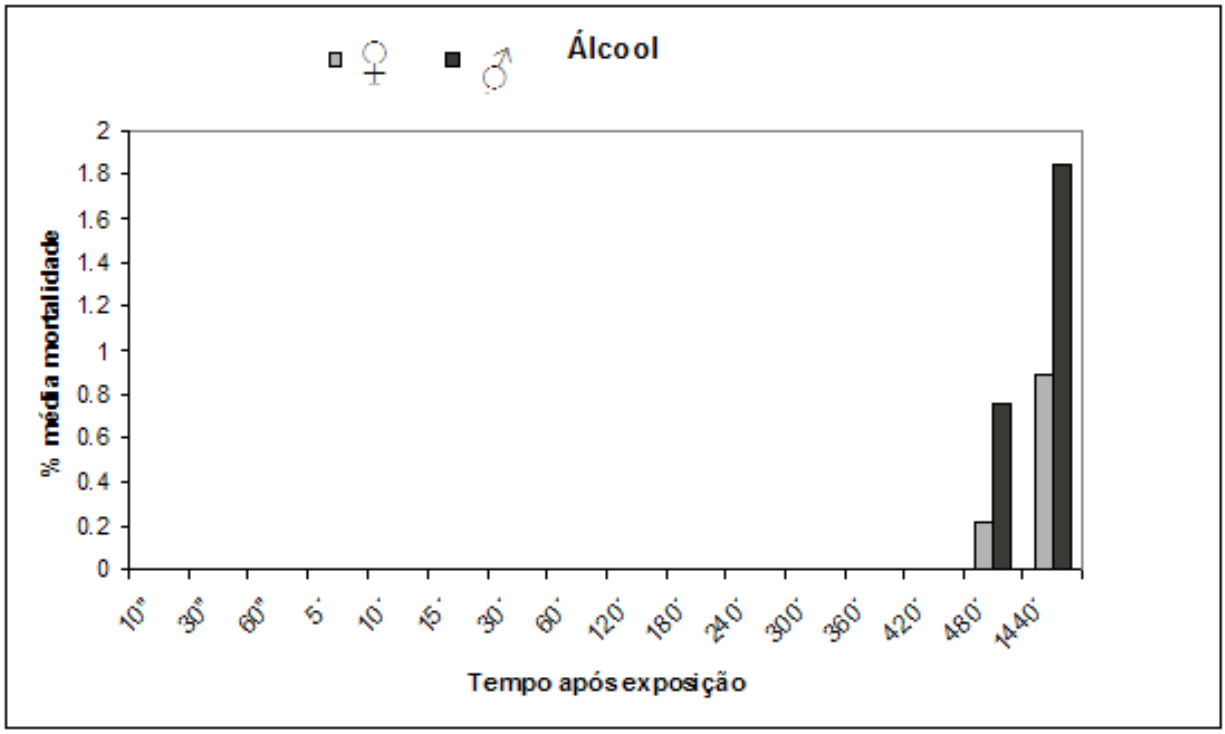


Gráfico 4 – Porcentagem média de mortalidade de ♀ e ♂ de *Aedes aegypti* após diferentes períodos da aplicação de um jato de acetona.

ANÁLISES UTILIZANDO ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO

Os resultados de mortalidade para fêmea e macho de mosquitos após a aplicação de álcool etílico absoluto estão apresentados no Gráfico 5. Observa-se que a mortalidade para fêmeas ocorreu apenas para 8 horas após (480 min.), sendo ainda bastante baixa e igual a 0,2% (d.p. 0,4) e ainda para 24 horas após (1440 min.), sendo igualmente baixa e igual a 0,9% (d.p. 0,4) em média. Semelhantemente, para machos a mortalidade iniciou-se em 8 horas (480 min.) sendo 0,8% (d.p. 0,67) e ainda 24 horas (1440 min.), sendo também bastante baixa 1,8%, (d.p. 1,6). Esses resultados confirmam o pressuposto de um menor efeito nocivo do álcool etílico e uma importante vantagem na sua utilização como diluente de inseticidas para aplicação sobre adultos de mosquitos. Um forte indicativo para isso, é que as mortalidades máximas de 1,8% em machos e 0,9% em fêmeas ficam dentro dos padrões permitidos para mortalidade de um bioensaio para que não sejam necessárias as aplicações de fórmulas de correção como as de ABBOTT (1925), DAVIDSON e ZAHAR (1973) e WHO (1998). Não houve mortalidade na testemunha. A análise estatística não demonstrou diferença

significativa (t = -1,000, p>0,05) entre as comparações dos bioensaios para fêmeas. Já, para macho houve diferença significativa (t = 15,264, p<0,05) para uma das comparações e, na comparação entre fêmea e macho não houve diferença significativa (t = -1,303, p>0,05) indicando que houve homogeneidade nos bioensaios e machos e fêmeas respondem de forma semelhante.



Gráficos 5 – Porcentagem média de mortalidade de ♀ e ♂ de *Aedes aegypti* após aplicação de um jato de álcool – leitura após diferentes períodos.

9.5. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA NA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DA APLICAÇÃO DE INSETICIDA NOS RECIPIENTES DE CONTENÇÃO

Nas avaliações de mortalidade, não foi encontrado nenhum indivíduo morto, tanto macho quanto fêmea após a imobilização nos recipientes lavados. Já, para a testemunha, que consistiu nos recipientes não lavados, a porcentagem média de mortalidade para fêmea foi de 3,30% (d.p. 1,85) e para macho foi de 4,76% (d.p. 1,80).

9.6. REAPROVEITAMENTOS DOS DISPERSORES APÓS OS BIOENSAIOS

Não houve mortalidade de machos ou fêmeas no tratamento com água enquanto na testemunha com álcool, morreram um macho e uma fêmea. Isso demonstra que, apesar da baixa mortalidade, é conveniente que os dispersores sejam lavados com álcool etílico p.a.

9.7. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* ROCKEFELLER AO MALATION GRAU-TÉCNICO

Penner (2005) estabelece a concentração de campo de malation para aplicação em VUB como sendo 356 g i.a./ha. A partir dessa informação foram feitos os cálculos para determinação de uma concentração inicial em mg/L (ppm) como segue:

356 g – 10.000 m^2
35,6 mg – m^2
35.600 µg – 10.000 cm^2

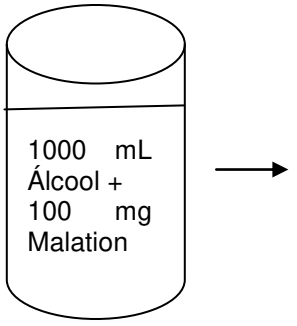
Área Jato à 20 cm	1200 cm^2
Volume Jato	0,12 mL
Volume Recipiente	20 mL

35600 µg – 10.000 cm^2
X - 1.200 cm^2
X = 4.272 µg

4272 µg – 0,12 mL
X - 20 mL
X= 712.000 µg ou 712 mg
712 mg – 20 mL
X - 1.000 mL
X = 35.600 mg/L (ppm) (equivalente a dose de campo)

Como os bioensaios no presente trabalho foram feitos para avaliações em laboratório, foi necessário novos cálculos para se chegar a uma redução dessa concentração de campo, obtendo-se concentrações factíveis para aplicação sobre os mosquitos. Assim, a concentração de campo foi dividida por um fator q = 2, ficando no

frasco 17.800 ppm. Novas diluições foram feitas em álcool etílico de forma a se obter cinco concentrações, sendo a mais fraca 0,5ppm e a mais forte 2 ppm i.a. (Figura 31).



Solução Estoque (mL)	Álcool (mL)	Concentração (ppm)
1	19	0,5
2	18	1,0
3	17	1,5
4	16	2,0

Malation 100 ppm

Figura 31. Sequência de diluições em álcool etílico a partir do produto comercial malation para se obter quatro concentrações usadas nas avaliações de aplicação tópica em adultos de *Aedes aegypti* (Solução Estoque a 100 ppm: 100 mg malation em 1000 mL álcool etílico)

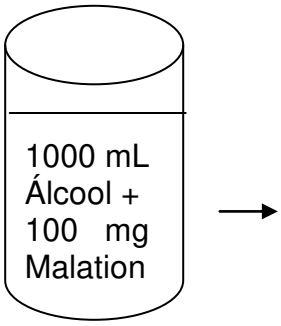
As porcentagens médias (desvio padrão) de mortalidade para fêmeas de *Ae. aegypti* às quatro concentrações estabelecidas estão expostas na Tabela 11.

Tabela 11 - Porcentagem média (desvio padrão) da mortalidade para um bioensaio com ♀ de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidas à aplicação de malation em quatro diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm e 2,0 ppm) preliminares.

	Concentração (ppm)				
Horas após	0,5	1,0	1,5	2,0	Testemunha
4	4,0 (4,9)	48,4 (15,7)	38,4 (25,5)	81,0 (6,2)	2,1 (4,5)
8	6,6 (6,8)	56,1 (15,7)	50,0 (25,6)	88,6 (5,2)	2,9 (6,2)
24	19,3 (14,4)	57,7 (17,8)	59,2 (19,0)	94,0 (2,9)	2,9 (6,2)

Os resultados obtidos demonstraram que o sistema de aplicação pode ser validado, em função de uma baixa mortalidade nas testemunhas, abaixo de 3% e não necessitando correções. A mortalidade das fêmeas para as quatro concentrações do inseticida malation seguiu de forma a variar entre um mínimo de 4% e um máximo de 90%, não variando muito para as concentrações 1,0 ppm e 1,5 ppm e os períodos de leitura 8 h e 24 h após o tratamento. Além disso, a mortalidade para a concentração 2,0 ppm foi baixa entre 8 h e 24 h após o tratamento, indicando não ser adequada, uma vez que se espera para as linhas base de susceptibilidade respostas que sejam representativas como letais à maioria dos indivíduos, ou seja, acima de 95%. A partir desses resultados novas concentrações foram estabelecidas de forma a se obter mortalidades próximas a 100% e melhorar os valores para a linha base de fêmeas de *Ae. aegypti* ao malation.

As novas diluições foram feitas a partir da solução estoque 100 ppm de malation, como segue, de forma a se obter um gradiente entre 0,5 e 2,75 ppm, que foram avaliadas em três bioensaios (Figura 32).



Malation 100 ppm

Solução Estoque (mL)	álcool (mL)	Concentração (ppm)
1	19	0,5
2,5	17,5	1,25
4	16	2,0
5,5	14,5	2,75

Figura 32. Sequência de diluições em álcool etílico a partir do produto comercial malation para se obter quatro concentrações usadas nas avaliações de aplicação tópica em adultos de *Aedes aegypti* (Solução Estoque a 100 ppm: 100 mg malation em 1000 mL álcool etílico)

Os resultados de mortalidade nos bioensaios com as quatro novas concentrações estabelecidas para fêmeas estão expostos na Tabela 12. Observa-se uma melhor distribuição dos valores de mortalidade entre as quatro concentrações para todos os períodos de leitura, sendo que em 8 h após a aplicação, a mortalidade atinge 91%. No entanto, para a determinação de uma CL_{50} com maior peso foi necessário esperar até 24 h, quando a mortalidade chegou em 94,75%.

Tabela 12 – Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade para três bioensaios com ♀ de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidos a aplicação de malation em diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,25 ppm, 2,0 ppm e 2,75 ppm).

	Concentrações (ppm)				
Horas após	0,5	1,25	2,0	2,75	Testemunha
1	0,0 (0,0)	14,09 (8,63)	36,96 (12,65)	66,23 (11,02)	0
4	0,79 (1,20)	40,64 (13,27)	63,48 (13,38)	88,24 (8,34)	0
8	1,05 (1,59)	45,83 (11,35)	68,55 (12,94)	91,10 (6,05)	0
24	1,84 (9,96)	52,21 (12,86)	76,86 (14,83)	94,75 (4,01)	0

Novamente os resultados obtidos permitem validar o sistema de aplicação, não resultando nessas avaliações em mortalidade nas testemunhas. As CL_{50} e CL_{99} médias para os três bioensaios estão expostas na Tabela 13. Analisando-se ambas as concentrações letais, observa-se que há diminuição nos valores da mortalidade à medida que aumenta o tempo após a aplicação.

Tabela 13 – Resultado médio das CL_{50} e CL_{99} para 3 bioensaios de aplicação de malation em ♀ de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller.

Horas após	CL_{50} ($IC_{0,05}$)	CL_{99} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
1	2,173 (1,994 – 2,710)	9,414 (6,237 – 21,362)	0,227 ± 0,747	95,760	47
4	1,462 (1,250 – 1,683)	5,220 (3,897 – 8,766)	0,192 ± 0,555	131,95	47
8	1,338 (1,144 – 1,533)	4,745 (3,615 – 7,659)	0,184 ± 0,051	134,13	48
24	1,239 (1,048 – 1,423)	4,021 (3,121 – 6,250)	0,191 ± 0,512	135,94	47

A concentração diagnóstica (CD) foi calculada conforme a base estabelecida pela WHO (2006a) e pode ser adotada para qualquer período de avaliação após a aplicação entre 4 h e 24 h. Assim para fêmeas de *Ae. aegypti*, a CD determinada por meio da metodologia do presente trabalho, é aqui proposta como sendo 9,5 ppm, equivalente à duas vezes a CL_{99} para as avaliações após 4 h de tratamento.

As semelhanças entre as inclinações das retas das curvas de concentração-mortalidade (Gráfico 6) demonstram que há uma boa homogeneidade nas respostas de fêmeas ao malation para esse método de aplicação.

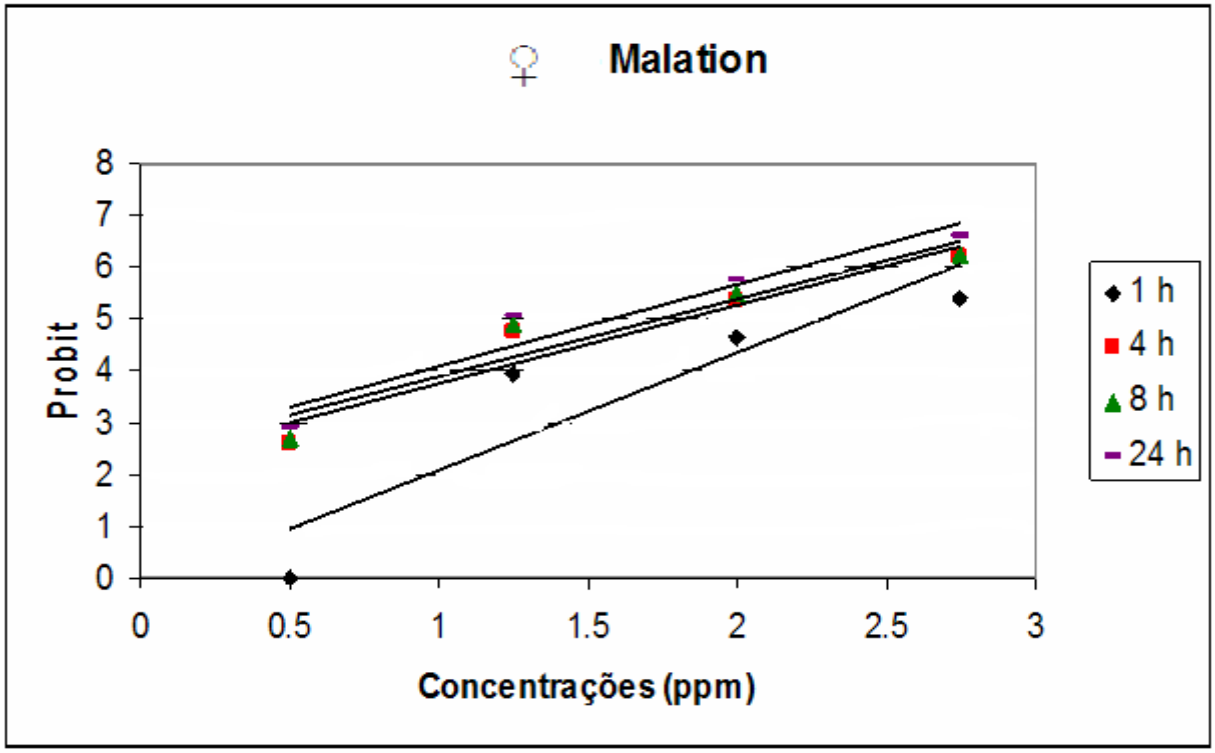


Gráfico 6 – Curvas de concentração-mortalidade de ♀ de *Aedes aegypti* ao malation após 1 h, 4 h, 8 h e 24 h da aplicação.

As porcentagens médias (desvio padrão) de mortalidade de machos para as cinco repetições no bioensaio preliminar estão expostas na Tabela 14.

Tabela 14 - Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade para o bioensaio preliminar com ♂ de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidos a aplicação de malation em quatro diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm e 2,0 ppm).

	Concentração (ppm)				
Horas após	0,5	1,0	1,5	2,0	Testemunha
4	1,9 (2,9)	41,3 (13,4)	61,2 (18,9)	87,8 (9,5)	0
8	3,2 (2,3)	47,9 (13,4)	70,9 (17,8)	97,3 (2,8)	0
24	9,0 (8,5)	55,3 (7,6)	85,6 (13,4)	98,6 (1,8)	0

Esses resultados demonstram que a distribuição da porcentagem de mortalidade entre as concentrações foi adequada e, como foi feito um único bioensaio, esperou-se que com a realização de bioensaios adicionais, as médias seriam favoráveis para o delineamento da linha base e consequentemente o cálculo de uma CL_{50}.

Assim, quando da realização dos bioensaios definitivos, os resultados de mortalidade para machos (Tabela 15) demonstraram que as concentrações aqui utilizadas são boas indicativas de uma linha base para machos uma vez que a mortalidade ficou distribuída de forma a abranger um espectro aproximado entre 1% e 95%. No período de leitura de 24 h, os resultados se demonstraram melhor distribuídos, entre 10% e 95%. Esses resultados demonstram que machos de *Ae. aegypti* responde de forma diferenciada às fêmeas, sendo mais susceptíveis ao inseticida malation.

Tabela 15 – Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade para três bioensaios definitivos com ♂ de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) submetidos a aplicação de malation em diferentes concentrações (0,5 ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm e 2,0 ppm).

	Concentrações (ppm)				
Horas após	0,5	1,0	1,5	2,0	Testemunha
1	0,87 (1,08)	7,93 (2,34)	27,97 (8,96)	44,69 (10,35)	0
4	3,46 (3,06)	35,47 (12,13)	59,98 (15,12)	78,34 (10,79)	0
8	4,34 (2,63)	44,83 (10,46)	70,28 (18,20)	89,26 (7,71)	0
24	10,43 (7,85)	54,91 (9,44)	83,27 (15,11)	94,84 (7,05)	0

As CL_{50} e CL_{99} médias para os três bioensaios estão expostas na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados de dose/resposta dos bioensaios de aplicação de malation em ♂ de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. CL_{50} e CL_{99} médios.

Horas após	CL_{50} ($IC_{0,05}$)	CL_{99} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
1	2,163 (1,933 – 2,623)	8,288 (5,683 – 18,256)	0,260 ± 0,058	65,275	56
4	1,307 (1,182 – 1,453)	4,802 (3,636 – 7,727)	0,183 ± 0,038	120,24	56
8	1,128 (1,017 – 1,242)	3,512 (2,808 – 5,077)	0,193 ± 0,038	135,15	56
24	0,956 (0,823 – 1,071)	2,865 (2,318 – 4,316)	0,193 ± 0,037	171,18	56

Considerando-se os intervalos de confiança ($IC_{0,05}$) para os 4 períodos de avaliação após o tratamento, nota-se diferença entre as CL_{99} e as CL_{50}. Verifica-se assim que ao contrário das fêmeas que após 4 horas do tratamento têm uma estabilização da mortalidade, o malation continua causando mortalidade nos machos até 24 horas após. Nesse caso, e baseado na indicação da WHO (2006a), pode-se, portanto propor a adoção de CDs para bioensaios com machos que deverão ser entretanto relativas ao tempo de avaliação pós-tratamento. Assim, a CD para 4 h após o tratamento pode ser aqui proposta como sendo também 9,5 ppm, a mesma que a proposta para as fêmeas. Já para 8 e 24 h após, as CDs propostas são respectivamente 7,0 ppm e 5,5 ppm.

O teste estatístico comparando as CDs relativas a fêmeas e machos, em avaliações 4 h após, não demonstrou diferença signicativa ($t = 0,6797$, $p > 0,05$).

As curvas de concentração-mortalidade (Gráfico 7) para machos mostraram-se mais homogêneas estando paralelas entre si. Observa-se, no entanto, que as retas indicam claramente mortalidades diferenciadas para os diferentes períodos de 1 h a 24 h.

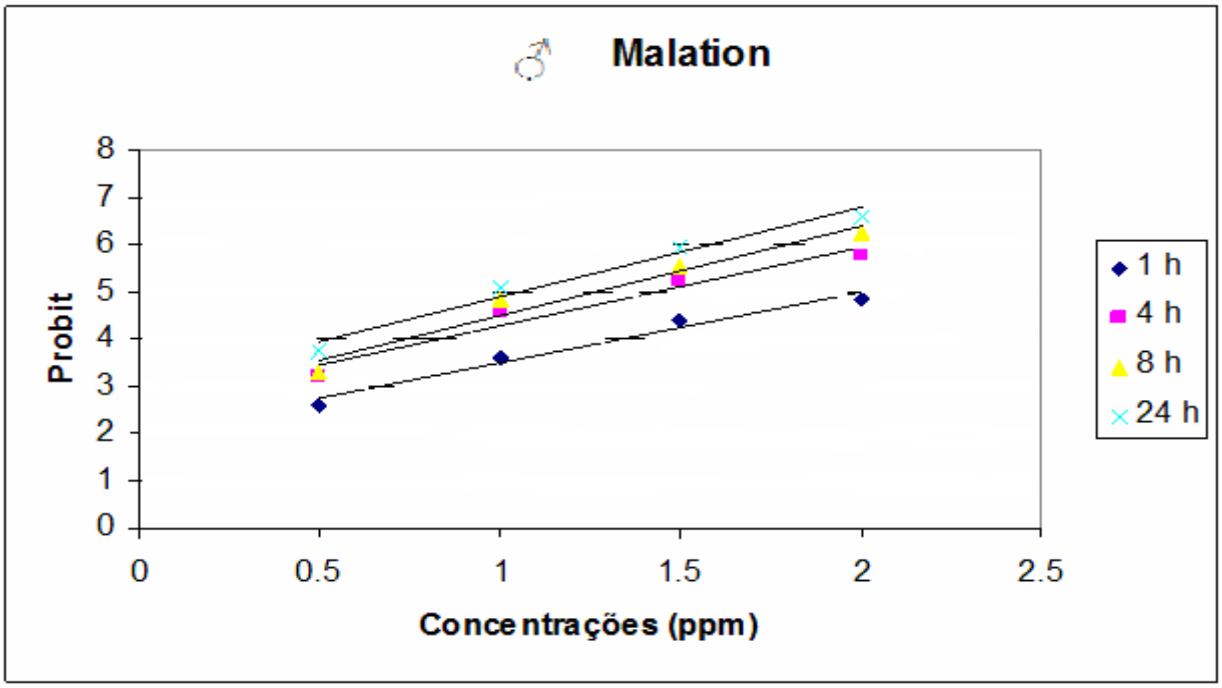


Gráfico 7 – Curvas de concentração-mortalidade de ♂ de *Aedes aegypti* ao malation após diversos períodos de leituras (1 h, 4 h, 8 h e 24 h).

Os resultados quanto ao Tempo Letal Mediano (TL_{50}) para fêmea foram calculados para 2,00 ppm e 2,75 ppm, sendo que coerentemente o tempo para matar 50% das fêmeas foi maior para a menor concentração. Os resultados não demonstraram igualdade e paralelismo, sendo que a concentração mais forte (2,75 ppm) foi confirmada pelo menor coeficiente angular (2,321) (Tabela 17).

Tabela 17 – Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de malation em ♀ de *Aedes aeypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios.

Concentração (ppm)	TL_{50} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
2,00	110,2 (94,7 – 131,6)	1,80±0,06	396,10	153
2,75	51,8 (46,5 – 55,7)	2,32±0,07	418,57	168

No Gráfico 8 está exposto a curva tempo-mortalidade demonstrando uma forte sobreposição entre as retas, sendo que aparece somente uma reta e a outra está exatamente sobreposta a essa. Isso demonstra que os resultados de resposta de fêmeas ao malation é semelhante nas duas concentrações aqui avaliadas.

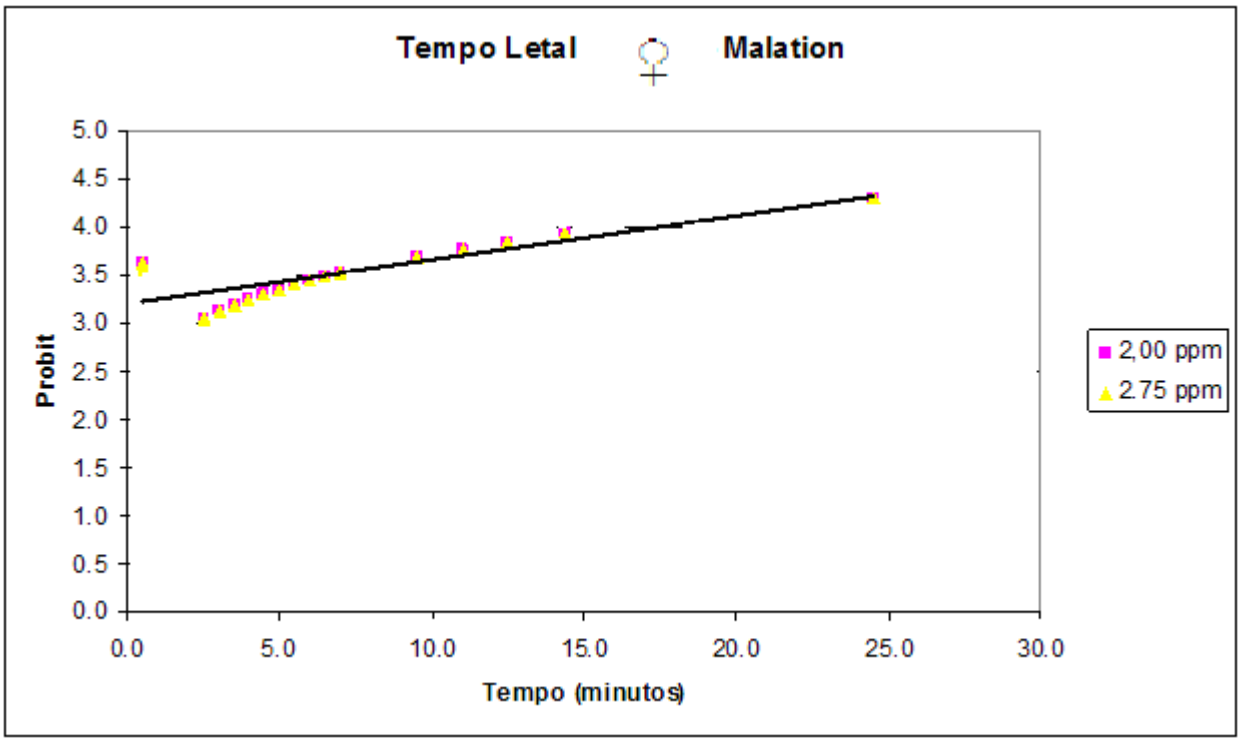


Gráfico 8 - Curva tempo-mortalidade de ♀ de *Aedes aegypti* para duas concentrações (2,00 ppm e 2,15 ppm) de malation.

Já, os TL_{50} para machos (Tabela 18) foram bastante semelhantes ao de fêmea demonstrando que para malation as concentrações devem ser maiores para que ambos os sexos tenham respostas semelhantes quanto a TL_{50}. Para 1,50 ppm houve paralelismo entre os bioensaios, no entanto para 2,00 ppm não houve nem igualdade e nem paralelismo.

Tabela 18 – Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de malation em ♂ de *Aedes aeypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios.

Concentração (ppm)	TL_{50} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
1,50	137,3 (95,3 – 204,2)	1,330±0,106	171,41	33
2,00	66,9 (41,4 – 95,6)	1,491±0,113	121,49	33

No Gráfico 9 estão expostos a curvas de tempo-mortalidade de machos em resposta ao malation. Observa-se que as retas de macho são semelhantes as da fêmea, havendo sobreposição entre as retas e resposta de tempo iguais para as duas concentrações.

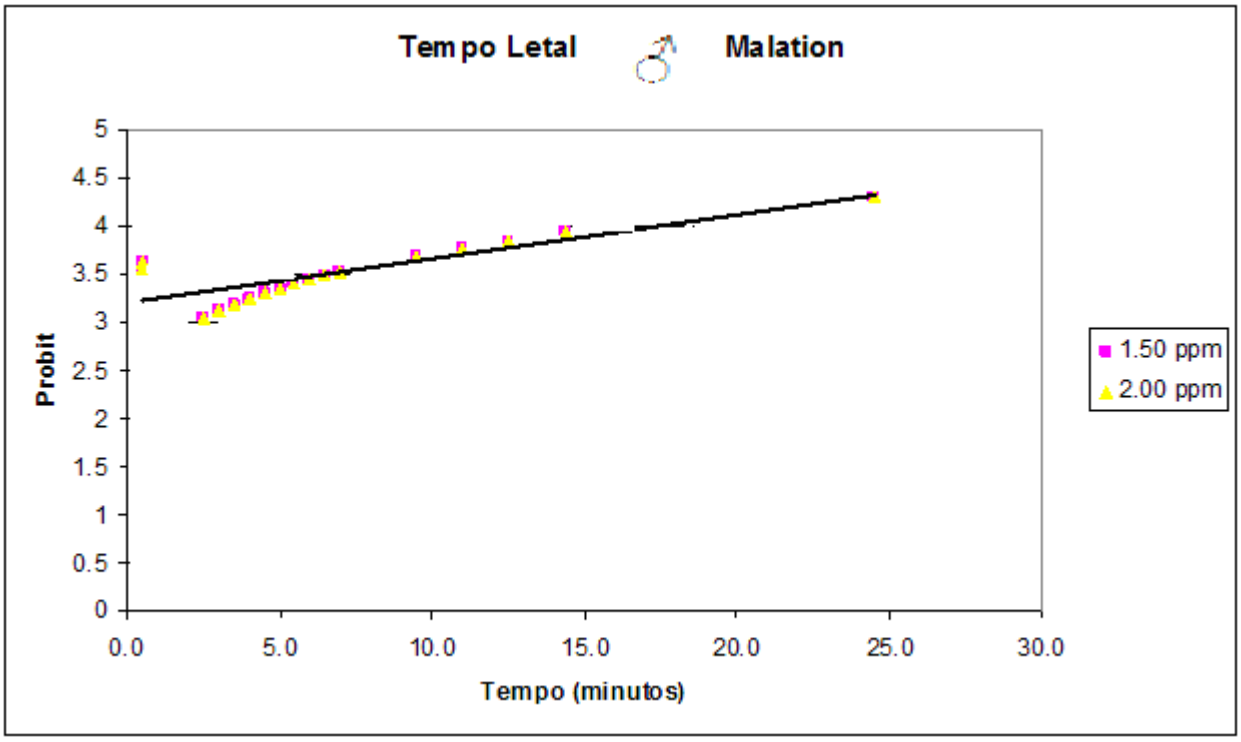


Gráfico 9 - Curva tempo-mortalidade de ♂ de *Aedes aegypti* para duas concentrações (1,50 ppm e 2,00 ppm) malation.

9.8. BIOENSAIOS DE MORTALIDADE DE MOSQUITOS COM APLICAÇÃO DA CL_{50} DE MALATION POR DIFERENTES VOLUNTÁRIOS

A CL_{50} utilizada nesses experimentos foi 1,239 ppm que equivale a aquela obtida para fêmea e 24 h após a aplicação. Concentração Letal Mediana significa que essa mata aproximadamente 50% dos indivíduos, no entanto, devido ao intervalo de confiança, considera-se que essa porcentagem pode ser maior ou menor. A mortalidade para cada voluntário foi: Voluntário A – 70,34% (d.p. 6,06); Voluntário B – 74,40% (d.p. 4,66); Voluntário C – 83,28% (d.p. 8,19) e a análise estatística não demonstrou diferença significativa ($t = -1,532$, $p>0,05$).

9.9. REUTILIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE MALATION ARMAZENADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Observa-se que a mortalidade causada pela solução armazenada sob temperatura ambiente foi mais alta (Tabela 19) do que sob baixa temperatura (Tabela 20), sendo que o teste estatístico para as comparações entre as concentrações para todos os períodos de leituras demonstrou diferença significativa para as comparações entre 0,5 ppm ($t = 5,421$, $p<0,05$) e 2,75 ppm ($t = 2,966$, $p<0,05$). Desse modo, considera-se que é conveniente manter as soluções armazenadas em baixa temperatura.

Tabela 19. Porcentagem Média de mortalidade (desvio padrão), após 1 h, 4 h, 8 h e 24 h da aplicação de malation em ♀ de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller – soluções armazenadas em temperatura ambiente (25±2ºC).

	Concentrações (ppm)			
Após (h)	0,50	1,25	2,00	2,75
1	1,27 (1,74)	37,27 (9,96)	53,04 (12,87)	72,86 (8,86)
4	2,56 (2,75)	52,06 (14,02)	74,35 (18,06)	86,55 (8,23)
8	3,22 (2,35)	56,01 (11,68)	76,97 (16,26)	89,59 (7,03)
24	3,22 (2,35)	59,30 (10,18)	77,66 (16,99)	89,59 (7,03)

Tabela 20. Porcentagem Média de mortalidade (desvio padrão), após 1 h, 4 h, 8 h e 24 h da aplicação de malation em ♀ de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller – soluções armazenadas a baixa temperatura (5ºC).

	Concentrações (ppm)			
Após (min)	0,50	1,25	2,00	2,75
1	0 (0)	33,32 (5,17)	50,36 (11,06)	68,95 (5,23)
4	0,74 (1,65)	48,70 (12,68)	74,81 (15,94)	89,55 (4,96)
8	0,74 (1,65)	60,04 (11,48)	81,43 (14,47)	93,53 (5,87)
24	0,74 (1,65)	64,68 (9,97)	84,08 (14,43)	95,49 (5,22)

9.10. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* ROCKEFELLER A DELTAMETRINA

As concentrações iniciais de deltametrina foram 0,62 ppb, 0,31 ppb, 0,15 ppb, 0,075 ppb e 0,035 ppb. Quando da inserção dos dados no programa POLO foi necessário passar os valores de ppm para ppb para que dessa forma fosse possível

demonstrar os intervalos de confiança reais. A análise dos resultados demonstrou não ser possível a determinação da mortalidade antes de 24 h, pois entre as repetições houve variação no número de indivíduos em KD, ao longo do período de leitura.

Na definição de concentrações para estabelecimento de uma linha base de susceptibilidade, considera-se uma concentração próxima à que causa 50% de mortalidade, e em geral, duas concentrações menores e duas maiores do que essa. Assim, a concentração mediana, teoricamente, deve levar a mortalidade de cerca de 50% dos indivíduos e as outras devem resultar em mortalidades entre 10% e 99%. Os resultados aqui obtidos (Tabela 21) demonstraram que a concentração mediana (0,15 ppb) proporcionou uma mortalidade próxima do esperado tanto para fêmeas quanto para machos. As outras concentrações também proporcionaram mortalidade adequadamente correlacionada, exceto para a maior concentração (0,62 ppb) cujo resultado de mortalidade não ultrapassou 91%.

A resposta de ambos os sexos quanto a mortalidade pela deltametrina foi semelhante, não havendo diferença significativa ($t = 1,008$, $p>0,05$). No entanto, quanto ao efeito KD os machos responderam numa porcentagem maior, sendo que na comparação estatística entre os sexos houve diferença significativa ($t = -3,164$, $p<0,05$).

Tabela 21. Porcentagens médias (desvio padrão) de mortalidade e porcentagens médias (desvio padrão) de mosquitos em KD, após 24 h, para três bioensaios com deltametrina aplicada em ♀ e ♂ de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller.

	Concentrações (ppb)					
	0,035	0,075	0,15	0,31	0,62	Testemunha
	Mortalidade					
♀	2,94 (2,94)	12,32 (9,13)	47,77 (13,79)	79,92 (12,93)	90,86 (9,28)	0 (0)
	KD					
	0	0,08 (0,17)	1,33 (0,86)	2,67 (1,17)	4,92 (1,98)	0
	Mortalidade					
♂	9,19 (10,59)	11,95 (7,17)	47,63 (14,90)	66,55 (14,84)	80,27 (14,63)	0,61 (0,99)
	KD					
	0	0	3,67 (2,05)	9,40 (5,52)	6,77 (4,85)	0

Os resultados para os valores de concentração-mortalidade encontrados (Tabela 22) demonstram uma CL_{50} 4 vezes maior para fêmeas, no entanto, não há diferença significativa uma vez que os intervalos de confiança estão sobrepostos. Já, para a CL_{99}, houve uma maior semelhança entre os valores encontrados e também uma sobreposição dos intervalos de confiança.

A concentração diagnóstico (CD) assim estabelecida para a deltametrina, na forma de duas vezes a CL_{99} (WHO, 2006a) será assim a mesma para fêmeas e machos adultos de *Ae. aegypti*, e igual a 6,52 ppb.

Tabela 22 - Resultados de concentração-mortalidade dos bioensaios de aplicação de deltametrina em ♀ e ♂ de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. CL_{50} e CL_{99} médios em ppb.

	CL_{50} ($IC_{0,05}$)	CL_{99} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
Fêmeas	0,256 (0,187 – 0,356)	3,418 (1,534 – 22,600)	0,075±0,060	477,72	71
Machos	0,202 (0,162 – 0,260)	3,177 (1,703 – 9,090)	0,070±0,057	280,01	71

As curvas de concentração-mortalidade (Gráfico 10) demonstram que para ambos os sexos alguns pontos estão localizados distantes da reta e que as retas se cruzam em determinado ponto onde a mortalidade é semelhante. Porém, na concentração mais alta a mortalidade de fêmeas é maior quando as retas se separam.

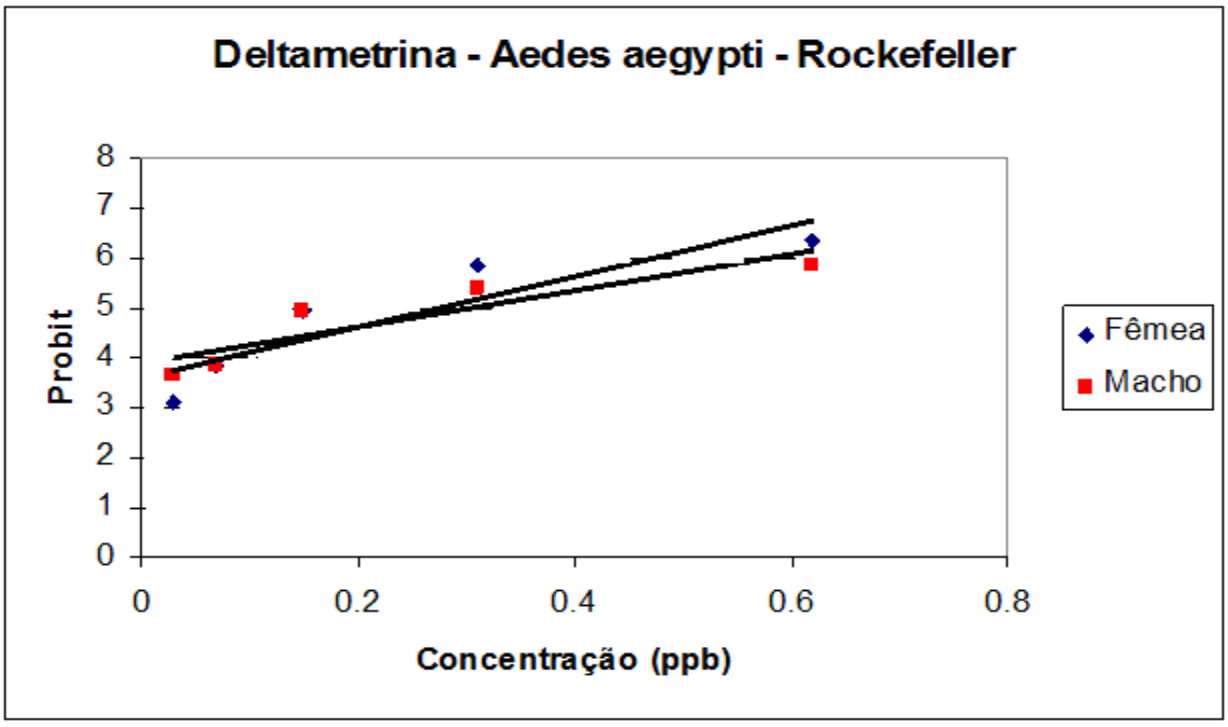


Gráfico 10 – Curva de concentração-mortalidade de ♀ e ♂ de *Aedes aegypti* a deltametrina para todos os períodos de leitura.

Os Tempos Letais Medianos calculados (Tabela 23) demonstram que para a concentração mais baixa, de 0,31 ppb, o intervalo de confiança mais alto está um tanto

deslocado e a TL_{50} está mais próxima do limite inferior. Já, para a concentração mais alta, de 0,62 ppb, observa-se que os limites estão bem distribuídos, sendo que a TL_{50} está exatamente no centro entre o limite inferior e superior. Além disso, as TLs demonstram a potência das concentrações sendo que a maior (0,62 ppb) matou 50% das fêmeas de *Ae. aegypti* 2,7 vezes mais rápido do que a anterior (0,31 ppb).

Tabela 23 – Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de deltametrina em ♀ de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios.

Concentração (ppb)	TL_{50} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
0,31	166,1 (117,7 – 238,4)	1,080±0,045	297,80	96
0,62	60,6 (39,4 – 86,4)	1,306±0,049	509,26	96

As curvas de tempo-mortalidade (Gráfico 11) demonstram que a resposta de fêmeas foi semelhante para as duas concentrações. No entanto, nos testes de Igualdade e Paralelismo entre os três bioensaios para cada concentração ocorreu que em 0,62 ppb houve Igualdade e Paralelismo e para 0,31 ppb houve somente Igualdade.

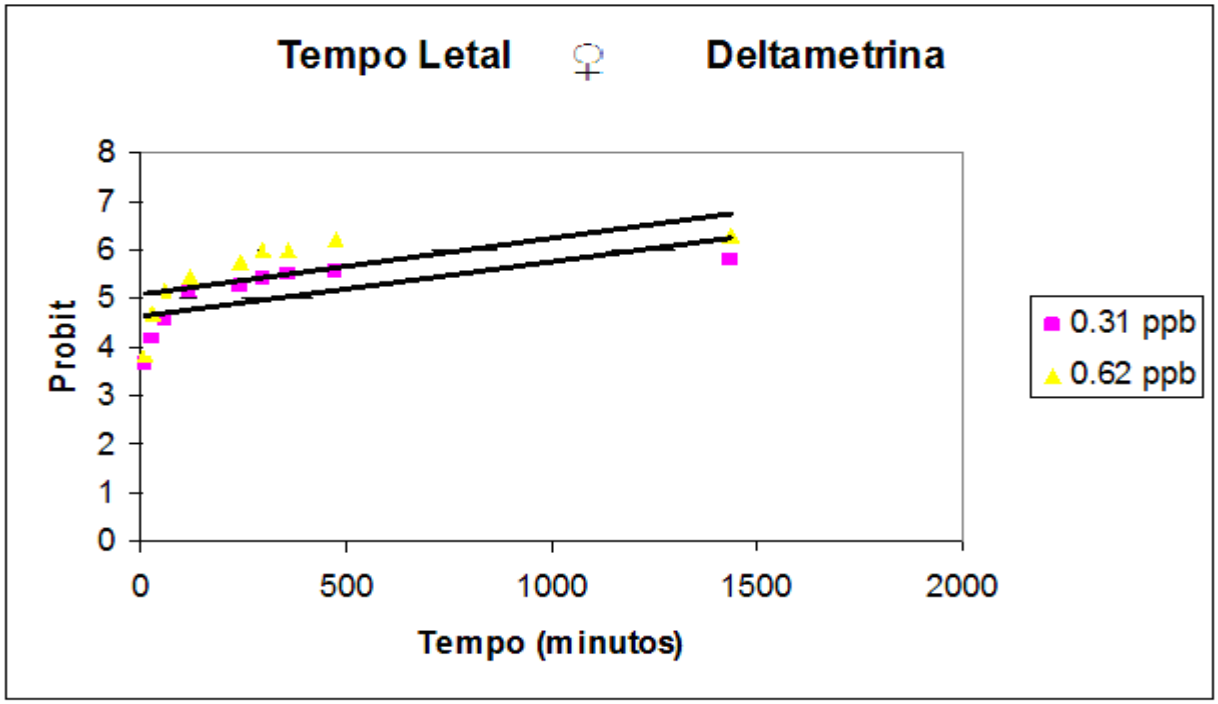


Gráfico 11 – Curva tempo-mortalidade de fêmeas de *Aedes aegypti* para duas concentrações (0,31 ppb e 0,62 ppb) de deltametrina.

O Tempo Letal de machos para a deltametrina demonstrou valores bastante baixos para as duas concentrações (Tabela 24). No entanto, diferente das fêmeas, na concentração menor (0,31 ppb) os mosquitos morreram 7,3 vezes mais rápido do que na concentração maior (0,62 ppb). Além disso, na concentração maior, os intervalos de confiança foram mais amplos demonstrando que os mosquitos respondem de forma divergente para essa concentração.

Tabela 24 – Tempo Letal Mediano (minutos) para os bioensaios de aplicação de deltametrina em ♂ de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller, para todos os bioensaios. TLs médios.

Concentração (ppb)	TL_{50} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
0,31	2,6 (0,6 – 6,9)	0,603±0,041	271,21	81
0,62	19,0 (0,001 – 1,73)	0,415±0,046	353,27	91

No Gráfico 12 estão demonstradas as curvas de tempo-mortalidade sendo que para as duas concentrações a distribuição de mortalidade é semelhante. No entanto, quando da comparação entre os três bioensaios para cada concentração não houve nem Igualdade e nem Paralelismo.

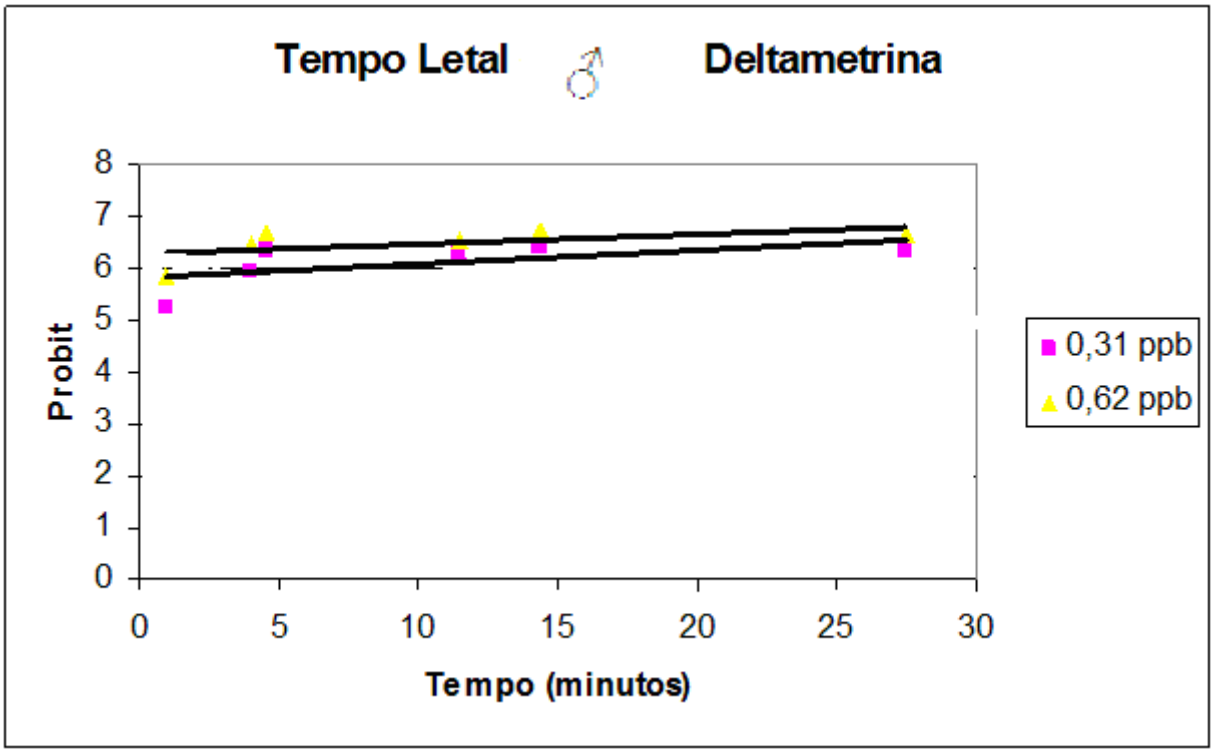


Gráfico 12 – Curva tempo-mortalidade de ♂ de *Aedes aegypti* para duas concentrações (0,31 ppb e 0,62 ppb) de deltametrina.

9.11. AVALIAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* LINHAGEM SANTARÉM A CL_{50} DE DELTAMETRINA.

A CL_{50} para fêmea (0,746 ppb) e para macho (0,202 ppb) foi avaliada sobre *Ae. aegyti* linhagem Santarém, sendo que a resposta de mortalidade média após 24 h da aplicação foi: Fêmeas = 1,4 % (d.p. 2,9) e Machos = 15,3% (d.p. 7,8), não havendo diferença significativa (t = -1,431, t>0,05). Para ambos os sexos, as testemunhas não demonstraram mortalidade.

9.12. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE CLOROPÍDEOS

Foram coletados um total de 9.780 indivíduos, sendo 83,5% de *Li. nigrifons* e 16,5% *Liohippelates flavipes*. A sexagem demonstrou uma proporção geral para as duas espécies de 1 macho/3 fêmeas para ambas as espécies. Na proporção geral para as duas espécies, ocorreram 25% machos e 75% fêmeas. Devido a maior quantidade de *Li. nigrifons* optou-se por utilizar essa espécie nos experimentos posteriores.

9.13. IMOBILIZAÇÃO DE MOSCAS POR MEIO DE SUCÇÃO

Todas as moscas permaneceram parcialmente imobilizadas e, às vezes, algumas podiam andar sobre a tela. No entanto, não podiam voar e assim não conseguiam sair da imobilização. Nesse caso, a superfície de exposição a um jato de um líquido consistiu principalmente na face dorsal do inseto (Figura 33).

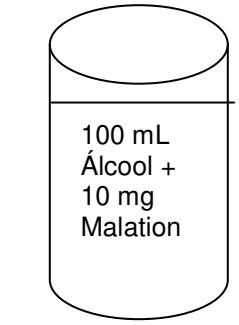
Figura 33 – Moscas cloropídeos sob sucção no imobilizador.

9.14. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE MOSCAS *Liohippelates nigrifons* AO MALATION.

Andrade e Castelo Branco Jr. (1990) deliberaram os seguintes dados: DL_{50} de *Si. perflavum* = 314,8 ng/adulto; Área corporal do borrachudo (comprimento = cabeça ao último segmento abdominal / largura torácica) = 0,03 cm^2 e Volume da gota aplicada sobre cada indivíduo (borrachudo) = 0,5 µL

Desses dados calculou-se que em cada gota de temefós aplicada sobre *Si. perflavum* havia 630 ng/L e em 0,12 mL, que consiste no volume médio do jato de cada

dispersor utilizado no presente trabalho e 20 mL de solução, calculou-se uma CL_{50} de 0,75 ppb. A partir dessa, foram calculadas as concentrações preliminares aqui utilizadas (Figura 34).



Malation 10 ppm

Solução Estoque (mL)	Álcool (mL)	Concentração (ppb)
4,5	1495,5	3,02
2,25	747,7	1,51
1,12	373,8	0,75
0,56	186,9	0,37
0,28	93,5	0,18

Figura 34 – Cálculos das diluições de malation em álcool etílico p.a. para obtenção das concentrações preliminares.

Para adequação ao programa POLO-PC, foi necessário passar as concentrações de ppm para ppb sendo essas: 0,18 ppb, 0,37 ppb, 0,75 ppb, 1,51 ppb e 3,02 ppb. Foram realizadas 5 repetições para cada concentração e como testemunha, as moscas receberam um jato de álcool absoluto p.a.

Devido a utilização de moscas coletadas diretamente do campo (geração parental), aumentou-se a quantidade de 30 para 60 indivíduos para cada repetição dos bioensaios, considerando a heterogeneidade de alelos predisponentes para a susceptibilidade e resistência. Além disso, devido a maior quantidade de fêmeas quando das coletas em campo, optou-se por utilizar esse sexo nos bioensaios.

A porcentagem média de mortalidade para as concentrações preliminares está exposta na Tabela 25.

TABELA 25. Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade, para as concentrações preliminares, de *Liohippelates nigrifons* ao malation em diferentes concentrações (0,18 ppb, 0,37 ppb, 0,75 ppb, 1,51 ppb e 3,02 ppb) por meio de um jato de 0,12 mL de solução inseticida.

	Concentrações (ppb)				
Horas após	0,18	0,37	0,75	1,51	3,02
1	23,18 (4,35)	29,82 (4,12)	55,28 (7,53)	67,82 (6,49)	70,24 (15,00)
4	47,70 (11,74)	57,42 (8,30)	84,12 (9,99)	99,08 (2,05)	97,32 (5,99)
8	54,30 (12,40)	66,82 (13,86)	94,04 (5,81)	99,38 (1,38)	98,00 (4,47)
24	56,28 (13,08)	70,48 (14,18)	95,68 (4,31)	99,68 (0,71)	98,66 (2,99)

As concentrações aqui avaliadas demonstraram alta mortalidade e curto intervalo, iniciando-se com mortalidade por volta de 23,2% até aproximadamente 98,6%.

Na Tabela 26 estão dispostos os resultados de mortalidade às concentrações definitivas aqui propostas para estabelecimento da linha base de susceptibilidade de *Li. nigrifons* ao malation. A distribuição de mortalidade ainda não ficou adequada, pois entre 0,04 ppb e 0,37 ppb ocorreram mortalidades entre 2% e 37% e quando da aplicação da concentração de 0,75 ppb a mortalidade passou para 65% até 79%. No entanto, esses resultados foram considerados para o cálculo das CL_{50} e CL_{99} por não haver quantidade suficiente de moscas e nem possibilidade de efetuar coletas adicionais para continuidade das avaliações.

TABELA 26. Porcentagem média (desvio padrão) de mortalidade, para as concentrações definitivas, de *Liohippelates nigrifons* ao malation em diferentes concentrações (0,04 ppb, 0,09 ppb, 0,18 ppb, 0,37 ppb e 0,75 ppb) por meio de um jato de 0,12 mL de solução inseticida.

	Concentrações (ppb)					
Horas após	0,04	0,09	0,18	0,37	0,75	Testemunha
1	2,25 (2,24)	5,64 (3,56)	16,72 (8,48)	24,60 (11,04)	65,01 (24,33)	0 (0)
4	7,02 (3,69)	10,95 (3,17)	25,43 (5,81)	27,02 (12,21)	77,51 (16,91)	0 (0)
8	10,99 (5,91)	18,87 (6,36)	29,01 (9,22)	34,27 (12,70)	77,85 (19,40)	0 (0)
24	12,51 (6,42)	18,87 (6,36)	31,97 (8,54)	37,08 (12,52)	79,69 (18,96)	0,10 (0,17)

Na Tabela 27 estão expostos a CL_{50} e CL_{99} calculada a partir dos resultados de mortalidade das moscas as concentrações definitivas de malation aqui calculadas. Observa-se que as CL_{50} estão muito próximas entre si variando entre 0,37 ppb e 0,55 ppb, demonstrando que entre os tempos de avaliação há pouca variação no efeito de mortalidade do malation sobre as fêmeas de *Li. nigrifons*. Já, para as CL_{99} há uma variação um pouco maior, entre 7,43 ppb e 11,56 ppb, o que está dentro do esperado, uma vez que as CL_{99} possuem uma amplitude maior quanto aos intervalos de confiança.

Tabela 27 - Resultados de concentração/resposta dos bioensaios de aplicação de malation em *Liohippelates nigrifons* para todos os bioensaios. CL_{50} e CL_{99} médios.

Horas após	CL_{50} ($IC_{0,05}$)	CL_{99} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
1	0,55 (0,42 – 0,81)	7,43 (3,44 – 33,33)	0,072±0,045	329,34	61
4	0,45 (0,34 – 0,69)	9,98 (3,95 – 64,53)	0,061±0,043	335,07	59
8	0,41 (0,30 – 0,66)	13,05 (4,41 – 127,66)	0,056±0,042	413,24	61
24	0,37 (0,27 – 0,59)	11,56 (4,57 – 152,30)	0,055±0,042	397,44	61

No Gráfico 13 ocorrem as curvas de concentração para os quatro períodos de avaliação, sendo que está nítida a resposta homogênea das moscas.

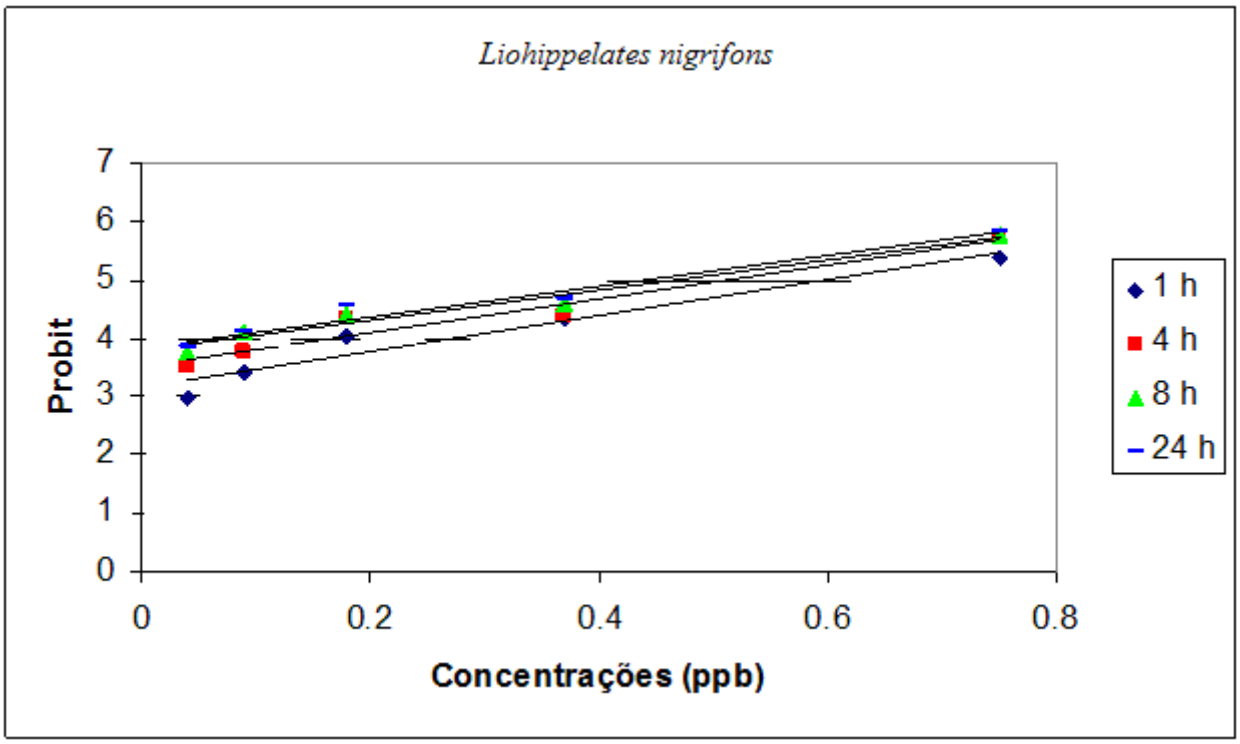


Gráfico 13 – Curvas de concentração-mortalidade de *Liohippelates nigrifons* ao malation após diversos períodos de leituras (1 h, 4 h, 8 h e 24 h).

Na Tabela 28 estão dispostos os Tempos Letais Medianos para três concentrações, sendo que há uma variação grande na resposta quanto ao tempo para a maior concentração (0,75 ppb), pois essa causou mortalidade de forma mais rápida do que as outras avaliadas. Entre 0,18 ppb e 0,37 ppb há certa semelhança com o tempo próximo de 50 min.

Tabela 28 – Tempo Letal Mediano (minutos) de aplicação de malation de *Liohippelates nigrifons* para todos os bioensaios. TLs médios.

Concentração (ppb)	TL_{50} ($IC_{0,05}$)	b±EP	χ_2	gl
0,18	54,98 (26,64 – 203,90)	0,518±0,032	154,57	131
0,37	50,36 (36,72 – 78,15)	0,617±0,030	348,77	131
0,75	0,41 (0,25 – 0,58)	1,820±0,046	1873,8	131

No Gráfico 14 estão demonstradas as curvas de tempo-mortalidade. Observa-se que as retas são semelhantes entre si e demonstram a homogeneidade de resposta da população de *Li. nigrifons* obtida no município de Cosmópolis, SP. Para os testes de Igualdade e Paralelismo entre os bioensaios para cada concentração ocorreu que para nenhuma das concentrações houve igualdade e para 0,18 ppb e 0,37 ppb houve paralelismo. Já, para 0,75 ppb não houve nenhuma das situações.

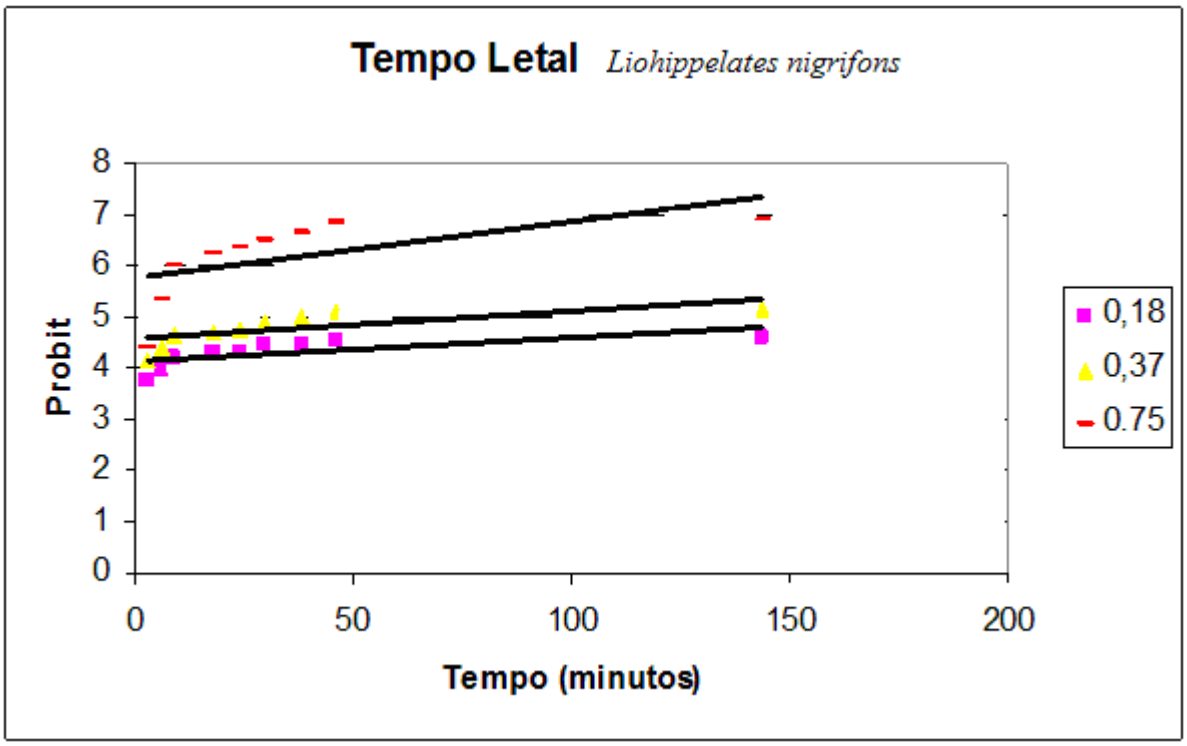


Gráfico 14. Curva tempo-mortalidade de choropídeos ao malation para três concentrações (0,18 ppb, 0,37 ppb e 0,75 ppb).

9.15. ANÁLISES DE CORRELAÇÃO

Análises estatísticas utilizando a correlação linear de Pearson (p = 0,05) foram feitas para analisar o grau de associação entre as médias de duas variáveis.

As variáveis analisadas foram: Tamanho de Gotas e Volume liberado pelos dispersores sendo que as análises consistiram em determinar se essas variáveis influenciavam na Mortalidade de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller. Os resultados de mortalidade analisados estão expostos como segue:

1) Mortalidade em relação aos períodos de avaliação (1h, 4h, 8h e 24h) para malation, fêmea, 2,75 ppm e macho, 2,0 ppm.
2) Mortalidade em relação aos três bioensaios com malation, fêmea, 2,75 ppm e macho, 2,0 ppm.

3) Mortalidade em relação a linha base de malation, fêmea, 2,75 ppm e 4 h e macho, 2,0 ppm e 4 h.

Os resultados estão expostos na Tabela 29.

TABELA 29 – Análises de correlação entre tamanho e volume em relação às mortalidades de ♀ e ♂ de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller demonstrando o r (Pearson) e a probabilidade em 0,05. MP = Mortalidade em relação aos períodos (horas); MB = Mortalidade em relação aos bioensaios; MLB = Mortalidade em relação à linha base.

	♀		
	Tamanho de Gota		
	MP	MB	MLB
r	0,917	0,967	0,883
p	0,028	0,001	0,001
	Volume		
	MP	MB	MLB
r	0,914	0,831	0,871
p	0,001	0,001	0,001
	♂		
	Tamanho de Gota		
	MP	MB	MLB
r	0,977	0,970	0,949
p	0,004	0,001	0,001
	Volume		
	MP	MB	MLB
r	0,914	0,937	0,885
p	0,001	0,001	0,001

Todas as análises foram correlacionadas positivamente com $p<0,05$, demonstrando que com o aumento tanto do tamanho de gotas quanto do volume há,

consequentemente, o aumento na mortalidade de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller ao malation.

10. DISCUSSÃO

10.1. ANESTESIA DE MOSQUITOS COM CO_2 E BAIXA TEMPERATURA

ESTUDOS COM CO_2

Variações nas concentrações de CO_2 resultam em modificações fisiológicas nas abelhas, princípio este que é utilizado na utilização desse gás como agente anestésico para insetos. É comum a prática de anestesia de insetos com a exposição a elevadas concentrações de CO_2 ou baixas temperaturas. Os insetos respondem de forma rápida a essa exposição e ficam paralisados e não responsivos à estímulos sensoriais (BADRE et al, 2005).

Os efeitos fisiológicos da elevação de CO_2, segundo a revisão de Nicolas e Sillans (1989) resultam na diminuição da taxa metabólica e elevação do ácido lático na hemolinfa de coleópteros e modificação dos níveis hormonais em abelhas. Porém, não há registro na literatura sobre a utilização exclusiva de CO_2 para anestesiar ou mesmo como método de controle de mosquitos a não ser aqueles publicados pela OMS que propõe esse método de anestesia para a realização de testes e avaliações de susceptibilidade a inseticidas químicos de contato. Diversos estudos enfatizam, entretanto a função do uso de CO_2 e a sua influência, incluindo abelhas, formigas e mosquitos vetores de doenças. Existem evidências que sugerem a influência do CO_2 ambiental no comportamento de insetos (STANGE, 1996; GUERENSTEIN et al, 2004; GUERENSTEIN e HILDEBRAND, 2008) e diferentes pesquisas sugerem que o CO_2 é de fato um importante fator exógeno que participa da modulação de variados aspectos da vida social dos insetos.

O gás carbônico tem sido utilizado no controle de insetos, principalmente em armazéns de grãos armazenados onde se propõe a formação de atmosfera controlada. Guedes et al. (1996) utilizaram CO_2 e O_2 para controlar *Si. zeamais* em diferentes

tempos de exposição e concentrações. No presente trabalho não foi calculado a concentração de CO_2, pois o objetivo era que os mosquitos fossem anestesiados em ambiente não fechado, que permitisse a aplicação de produto inseticida de contato. Devido ao tamanho do ambiente, no caso, por exemplo, de armazéns de grãos armazenados, há a necessidade de liberação dos gases durante dias o que não confere com o presente trabalho onde se utilizou um pequeno recipiente de 300 mL e liberação de CO_2 durante apenas alguns segundos. Para produzir mortalidade e se obter um controle total de *Si. zeamais,* por exemplo, foi necessário cinco dias de exposição dos insetos a uma concentração de 20% de CO_2 e 16% de O_2.

Na mosca–das-frutas *D. melanogaster* a sensibilidade ao CO_2 acarretando viroses latentes é conhecida desde 1937 (L'HERITIER e TEISSIER, 1937). Outros trabalhos mais recentes têm ainda demonstrado os efeitos deletérios provocados pela exposição ao CO_2. Barron (2000), por exemplo, anestesiou *D. melanogaster* com CO_2 para analisar o efeito desse gás no comportamento de cópula. Os resultados demonstraram que houve um aumento de 76,4 min. no tempo para que o macho copulasse com a fêmea. Não houve relato de mortalidade.

Larvas de *D. melanogaster* foram expostas a 100% de CO_2 durante cinco minutos e a resposta comportamental foi observada. Em menos de um minuto as larvas foram anestesiadas e não responderam aos estímulos mecânicos e quando a injeção do gás foi retirada, as larvas permaneceram num estado de contração por um curto período e logo após iniciaram a movimentação. Não foi relatado mortalidade (BADRE et al., 2005).

BRANSCOME et al. (2005) analisaram o efeito da anestesia por CO_2 sobre *Blatella germanica* (Blattaria) observando o tempo de KD, recuperação, movimentação e alimentação. O tempo de exposição foi de cinco minutos. O tempo de KD foi menor do que 45 seg., e o tempo de recuperação variou entre 3,4 min. e 46,3 min. não ocorrendo influência na taxa de alimentação. Após a alimentação as baratas que foram submetidas a exposição ao CO_2 sobreviveram mais tempo do que aquelas não expostas.

Ao que se conhece, CO_2 é liberado pelas abelhas pela respiração e o aumento de sua concentração no interior da colméia (resultante do aumento do metabolismo)

desencadeia como resposta a ventilação, ou abanamento (FREE, 1980). Esse comportamento, entre os insetos sociais, está envolvido com o controle na variação ambiental no interior da colméia, pois valores elevados de temperatura ou níveis de CO_2 dentro da colméia podem ter efeitos deletérios. Assim, a regulação depende da ventilação coletiva entre as operárias próximas à entrada da colméia (SEELEY, 1974; GUERENSTEIN e HILDEBRAND, 2008).

Nilson et al. (2006) anestesiaram machos de *D. melanogaster* com CO_2 expondo-os ao gás durante períodos de 5 a 120 min., com intervalos de 5 min. e observaram a recuperação em intervalos de 60 seg. Os resultados demonstraram que o tempo de recuperação foi maior conforme o aumento no tempo de exposição, porém não houve relato de mortes. No presente trabalho ocorreu a mesma situação, pois aumentando o tempo de exposição, para ambos os sexos de *Ae. aegypti* houve aumento no tempo de recuperação. Além disso, adicionam-se os resultados de mortalidade que chegou a 4,00% para fêmeas e 0,52% para machos após 30 min. de exposição ao CO_2.

ESTUDOS COM BAIXA TEMPERATURA

Temperaturas abaixo de um determinado limite podem causar a inativação e destruição de enzimas ou de nutrientes com maior rapidez com que são sintetizados, afetando os processos metabólicos dos insetos. A exposição de insetos em determinadas fases da vida a baixas temperaturas, pode consequentemente fazer com que danos acumulados se manifestem na fase seguinte do ciclo biológico (HOWE, 1966). A morte do inseto, nessas condições, pode ser causada por acúmulo de produtos tóxicos, ausência de absorção de nutrientes, desidratação e injúria mecânica por cristais de gelo nos fluídos corporais (MULLEN e ARBOGAST, 1983). Insetos que vivem em zonas temperadas e quentes são intolerantes ao congelamento e morrem pela formação de gelo na hemolinfa (JENSEN et al., 2007). No entanto, insetos tolerantes ao congelamento são bem adaptados a temperaturas abaixo de zero por períodos eventualmente longos, pois possuem capacidade de evitar a formação de gelo na hemolinfa. Outros podem morrer ou serem danificados em temperaturas muito acima do que os tolerantes suportam (KNIGHT et al., 1986; CHEN et al., 1987; LEE et al., 1987; CZAJKA e LEE, 1990).

Barron (2000) anestesiou *D. melanogaster* por meio de refrigeração (não informou a temperatura) e analisou o efeito sobre o comportamento de cópula. Os resultados demonstraram que houve um aumento de 44,5 min. no tempo para que o macho copulasse com a fêmea. Não houve relato de mortalidade.

Jensen et al. (2007) submeteu todos os estágios de desenvolvimento de *D. melanogaster* à exposição à temperaturas negativas até chegar a 0 ºC. A porcentagem de sobrevivência foi de 0-100%, sendo que a sobrevivência foi menor com a diminuição da temperatura.

Baixas temperaturas têm sido utilizadas como estratégia de controle de pragas, no tratamento de frutas e hortaliças e combate à *Anastrepha suspensa* (Diptera), *Ceratitis captata* (Diptera), *Cydia polmonella* (Lepidoptera), entre outras, as quais são submetidas a temperaturas de cerca de 1 ºC a 2 ºC por mais de 15 dias para uma total mortalidade (BRACKMANN e GUEDES, 1995). Mosquitos parecem ser mais sensíveis ao tratamento com baixa temperatura, pois no presente trabalho a exposição à 5 ºC foi capaz de causar baixa mortalidade (entre 2 e 4%) para a exposição tanto de fêmeas como para machos, após meia hora de exposição. No entanto, para exposições menores, e já suficientes para garantir uma imobilização e testes com inseticidas, essa mortalidade pode ser considerada desprezível.

Essa mortalidade pode ser explicada pelo fato da baixa temperatura mudar a conformação protéica do inseto por retirada de água da estrutura e assim alterar a funcionalidade de uma proteína. Além disso, o congelamento rápido aumenta os danos nos órgãos do inseto devido ao tamanho dos cristais de gelo ser maior.

ESTUDOS UTILIZANDO CO_2 E BAIXA TEMPERATURA CONCOMINTANTEMENTE

Crespigny e Wedell (2008) analisaram o impacto da anestesia por CO_2 e transferência para baixa temperatura, com uma seguida transferência para temperatura ambiente (20 ºC) na sobrevivência e fertilidade de *Drosophila simulans* (Diptera). Os resultados demonstraram que quando da transferência para baixa temperatura houve uma mortalidade de 96% e quando para temperatura ambiente não houve mortalidade. Os resultados aqui obtidos demonstram que fêmeas e machos de *Ae. aegypti* não são tão sensíveis quanto *D. simulans* pois quando são anestesiados com CO_2 e depois são

transferidos para baixa temperatura ocorreu uma mortalidade ao redor de 4,0% após meia hora. Apesar da mortalidade iniciar-se logo após 60 seg. de exposição, ela permanece tanto para machos como fêmeas, bastante baixa para períodos de até 5 min. de exposição, sempre menor do que 1%, o que viabiliza, ou de outra forma referenda, o uso dessa estratégia para a imobilização de *Ae. aegypti* e uso em bioensaios.

Discute-se que em bioensaios de avaliação de susceptibilidade de insetos à inseticidas químicos, classicamente descarta-se o experimento quando na testemunha ocorrem mortalidades acima de 20% (ABBOTT, 1925; DAVIDSON e ZAHAR, 1973; WHO, 1998). Os resultados do presente trabalho demonstram que o método de anestesia proposto por WHO (2006a) não resulta em níveis de mortalidade críticos, que demandariam descartar experimentos. No entanto, porcentagens médias de 4,0% ou 5% de mortalidade de fêmeas após 30 min. de exposição, teriam que ser submetidos a fórmulas de correção. E principalmente, indicam que de qualquer forma existe um estresse que pode sinergicamente resultar em uma maior expressão da mortalidade quando essas de fêmeas de *Ae. aegypti* são expostas a inseticidas químicos de contato. Essa preocupação estimula no presente trabalho a busca por alternativas à imobilização de mosquitos para bioensaios desse tipo, que se traduzam em menor ou nenhuma mortalidade entre os insetos.

10.2. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE COLETA E IMOBILIZAÇÃO DE PEQUENOS DÍPTEROS

O método de imobilização aqui proposto para *Ae. aegypti* não foi até o presente descrito na literatura sendo esse o primeiro trabalho a propor a sucção como modo de imobilização física para bioensaios. A possibilidade de imobilização por sucção não se restringe somente a possibilidade de testes com a aplicação de inseticida mas a qualquer outro tipo de experimento que necessite manter os insetos imobilizados. Dessa forma, a imobilização total dos mosquitos é vantajosa pois mantém o mosquito sem nenhuma movimentação. Ao adaptarem para condições de campo uma metodologia proposta pela WHO para detecção de resistência de adultos de borrachudos (Simuliidae) na África, Andrade e Castelo-Branco Jr (1990) utilizaram um

aspirador de pó portátil 12 V para imobilizar *S. pertinax*. Esses pesquisadores adaptaram uma pequena tela na entrada de ar do aspirador onde as fêmeas de borrachudos ficavam imobilizadas e em seguida aplicaram uma micro gota de solução em acetona do inseticida temefós sobre o dorso ou ventre dos insetos, dependendo da posição em que esses estavam imobilizados. A eficácia da imobilização e a resposta dos borrachudos adultos a esse inseticida organofosforado, que foi usado como larvicida por duas décadas no litoral da região sudeste do Brasil, permitiu determinar de forma prática e rápida a resistência dessa espécie alvo de campanha de controle.

A WHO (2006a) propõe o método de atividade intrínsica descrito para avaliações em mosquitos do gênero *Anopheles*, no entanto, não amplia a utilização desse método para outros gêneros de mosquito e nem para insetos de outros grupos taxonômicos. A metodologia de imobilização aqui proposta foi avaliada em *Ae. aegypti* e moscas da família Chloropidae demonstrando que a mesma pode ser utilizada para insetos com diferentes características morfológicas. Além disso, a possibilidade de recuperar os insetos vivos após a imobilização garante a disponibilidade de exemplares para utilizar posteriormente quando necessário. Outro fator de questionamento quanto à metodologia da WHO (2006a) é a utilização exclusivamente de fêmeas, possivelmente pelo papel de vetor da fêmea, uma vez que apenas essas picam um hospedeiro para obtenção de sangue e dessa forma transmitem doenças. A metodologia de imobilização aqui proposta demonstrou que é possível a utilização também de machos de mosquitos sendo que isso facilita a realização de um experimento quando se tem poucos exemplares advindo de uma coleta de campo ou mesmo de criação onde não foi possível obter grande quantidade de indivíduos em gerações posteriores a parental.

10.3. AVALIAÇÃO DE MORTALIDADE EM DIFERENTES PERÍODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Os mosquitos foram mantidos sob imobilização durante todo o tempo proposto. Dessa forma, o método de imobilização por sucção aqui discutido é seguro e vantajoso para a realização dos experimentos sendo possível manter os mosquitos imobilizados até 60 min. com mortalidade dentro dos padrões que prescindem da correção de

mortalidade em bioensaios, pelas fórmulas de ABBOTT (1925), DAVIDSON e ZAHAR (1973) e WHO (1998).

O método de imobilização aqui proposto visou eliminar as fases de anestesia tanto com CO_2 quanto pelas baixas temperaturas proposto em WHO (2006a), pois se considera que nessas fases haveria estresse e mortalidade de mosquitos conforme foi demonstrado no item 9.1. Fato que reforça essa proposta é que a publicação da WHO (2006a) indica a exposição dos mosquitos ao CO_2 durante um período máximo de 30 seg. Considera-se que tal objetivo foi alcançado, pois no presente estudo os mosquitos foram imobilizados adequadamente e não houve mortalidade significativa mesmo após 60 min. de imobilização constante. Esses resultados demonstram uma vantagem do método aqui proposto, pois dessa forma o experimento não fica restrito ao tempo de manuseio dos insetos.

10.4. AJUSTES PARA UTILIZAÇÃO DO ASPIRADOR DE COLETA

Aspiradores foram originalmente desenvolvidos como equipamentos para sucção, e posteriormente foram adaptados para outras finalidades em trabalhos com insetos, com a utilização de bulbos ou foles (WISHART, 1930; BROPHY et al., 1982), ventiladores elétricos ou a gás (NELSON e CHAMBERLAIN, 1955; DIETRICK, 1961; MURPHEY e DARSIE, 1962; CLARK et al., 1994), para limpar bancadas de laboratório (SCHWARTZ, 1964) e ajudar a proteger pesquisadores da inalação de poeiras tóxicas, partes de insetos ou patógenos (HURD, 1954; DOUGLAS, 1984; KIM e HONG, 2007). Aspiradores também podem ser utilizados para reduzir o cansaço e os erros de pesquisadores, aumentar a velocidade e a eficiência e minimizar danos em amostras de insetos vivos.

Os primeiros aspiradores foram desenvolvidos no início do século passado utilizando-se tubos em linha com a sucção (ex. KUNKEL, 1926), porém necessitavam que o equipamento fosse levado separadamente para a coleta das amostras, sendo ineficaz para coletar insetos que voam. Também, como os insetos são sugados para dentro de um tubo de coleta, podem se chocar e ser forçados contra a tela de proteção na extremidade oposta, causando danos e estresse aos insetos coletados. Essas deficiências foram, no entanto, resolvidas com o desenvolvimento de um recipiente de

coleta em ângulo reto, para contrabalencear e alterar o fluxo de ar, de forma que os insetos coletados pudessem ser depositados diretamente em álcool (SINGER, 1964) ou dentro de pequenas gaiolas ou pequenos frascos que poderiam ser removidos e rapidamente tampados. Essa última característica é interessante para utilização em bioensaios, se o frasco removível for a própria câmara de bioensaio. Utilizando um tubo dobrado, Chao e Peterson (1952) desenvolveram um aspirador em forma de "T" que com eficiência depositam insetos em frascos de bioensaios. Ristich e Lockard (1953) utilizaram um adaptador de troca rápida para permitir o uso de um aspirador em forma de "T" para diferentes tamanhos de frascos coletores.

O aspirador adaptado por Nasci (1981) para coleta de mosquitos em campo tem sido amplamente utilizado para amostragem de culicídeos (FORATTINI et al., 1987; TAIPE-LAGOS e NATAL, 2003; CUPP et al., 2004; RICHARDS et al., 2006; CARDOSO et al., 2010). Esse aspirador consiste em um tubo de alumínio de 121 cm de comprimento x 37,5 cm de diâmetro com um cone transparente em um das extremidades e um bolsa, feita de tela, no centro do cone. No tubo foi colocado um motor movido a bateria (Figura 35).

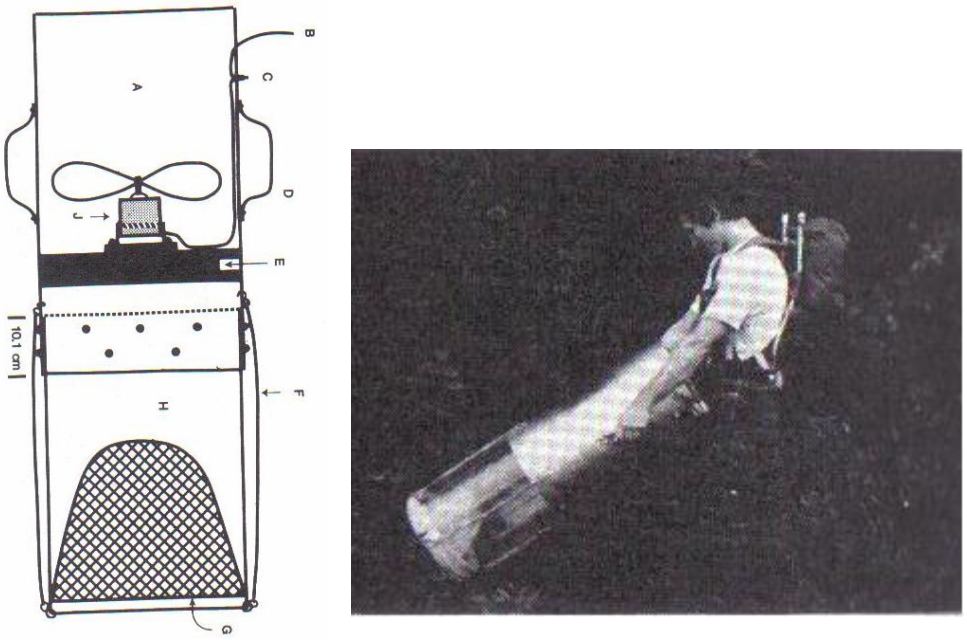


Figura 35 – Aspirador para amostragem de culicídeos adaptado por Nasci (1981).

A maioria das adaptações de aspiradores tem sido para utilização principalmente em amostragens de insetos e artrópodes em campo (BOITEAU et al., 1992; HARPER e GUYNN, 1998; SMITH, 1999; BERGTHALER e RELYS, 2002, EVANS et al., 2009). Um exemplo é o trabalho de Natal e Marucci (1984) que descreve um método para captura de mosquitos (Figura 36) onde o corpo do aparelho (ca) foi construído a partir de uma luva de PVC de três polegadas. O motor (m) - micro-motor de uso geral de 6.000 rpm - é preso ao corpo do aparelho através de duas alças de suporte (as). Estas são feitas de tiras de alumínio, preparadas para encaixar o motor na parte central. Suas extremidades são dobradas lateralmente e presas por parafusos ao corpo do aparelho. O motor é alimentado por uma bateria de 6 V, através dos fios de alimentação (al). Nas extremidades destes fios, existem garras tipo "jacaré" que permitem sua fixação aos terminais da bateria. A câmara de captura (c), é construída de tubo PVC de três polegadas; na sua parte inferior, existe uma tela fina (tc), que tem por finalidade reter o material aspirado. Sua parte superior, quando em operação, é aberta, permitindo assim que os mosquitos sejam aspirados para o interior da câmara, os quais são mantidos neste compartimento, pelo fluxo de ar provocado pela hélice (h). Antes de desligar o aparelho, fecha-se a câmara de captura com a tampa (t), construída a partir de luva de PVC de três polegadas e provida de tela fina. O cabo (cb) foi construído a partir de cano de alumínio com diâmetro de uma polegada, que teve uma das extremidades achatada para permitir sua fixação ao corpo do aparelho. O comprimento do cabo pode variar de acordo com o local de captura. Assim, cabos longos são próprios para coletas no teto de residências, enquanto cabos mais curtos são ideais para trabalho no interior de florestas densas. Também aparelhos sem cabo podem ser utilizados em capturas de mosquitos com isca humana, ou para remover insetos da armadilha tipo Shannon. Segundo os autores esse tipo de aspirador tem ainda a vantagem de possuir a câmara de captura em posição anterior à hélice, o que evita a danificação do material coletado.

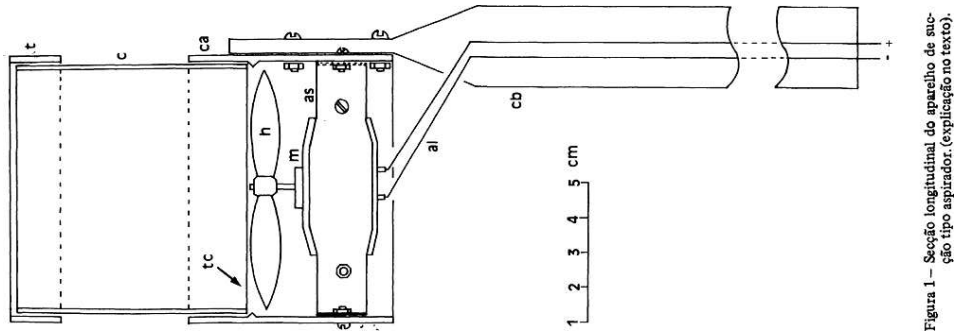


Figura 1 – Secção longitudinal do aparelho de sucção tipo aspirador. (explicação no texto).

Figura 36 – Aspirador de coleta proposto por Natal e Marucci (1984).

Aspiradores elétricos têm sido adaptados para aspiração de mosquitos e podem servir para facilitar a captura dos insetos de forma rápida e com manutenção dos exemplares vivos. No entanto, os danos causados aos insetos após a transferência em determinados aspiradores levaram Aldridge et al. (2012) a desenvolverem um aspirador em forma de revólver (denominado *Wynn Gun*) (Figura 37) com materiais modernos e fáceis de serem encontrados e com inovações em relação ao mosquito.

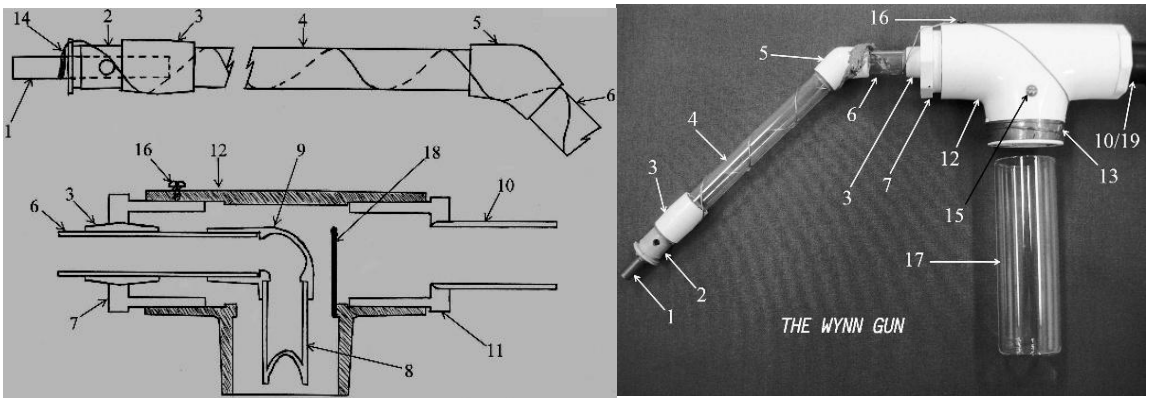


Figura 37 – Aspirador em forma de revólver desenvolvido por Aldridge et al. (2012).

A parte principal do *Wynn Gun,* feito de PVC, é resistente a impactos e pode ser facilmente modificado com acopladores para proporcionar uma grande amplitude de tubos de coleta. De forma semelhante, o tubo coletor pode ser substituído por variados

bicos de diferentes diâmetros para facilitar a coleta de insetos de diferentes tamanhos. O ventilador pode ser modificado para produzir diferentes forças de sucção e a exaustão do ar pode ser filtrada para garantir a qualidade do ar no ambiente. O *Wynn Gun* foi utilizado para aspirar *Cx. quinquefasciatus* (Diptera) sendo possível coletar aproximadamente 60 indivíduos/min. com uma média de mortalidade de 1% (ALDRIDGE et al., 2012).

A adaptação do aspirador de pó para teclados de computador proposta no presente trabalho favorece a realização de experimentos com mosquitos pois agiliza o processo de coleta além do fato de estar vinculado ao método de imobilização. Tal aspirador é facilmente encontrado no mercado brasileiro e é de baixo custo, sendo esse um dos objetivos para o desenvolvimento do método de avaliação aqui proposto. Além disso, considerando que o modelo de aspirador proposto por Aldridge et al. (2012) é o mais próximo daquele desenvolvido no presente trabalho, nota-se que a eficiência de coleta aqui obtida é maior, pois foi necessário aproxidamente 20 seg. para coletar 30 indivíduos, havendo uma mortalidade de, respectivamente, 0,33% e 0,66% para fêmeas e machos de *Ae. aegypti*. Além disso, deve-se considerar que *Cx. quinquefasciatus* é um mosquito mais robusto do que *Ae. aegypti.* Quanto à distância de voo, por exemplo, enquanto o primeiro pode alcançar 22.400 m, *Ae. aegypti* tem um máximo indicado como de 2.500 m (FORATTINI, 1962). Assim, a mortalidade de 1% demonstrada por Aldridge et al. (2012) com seu equipamento para a coleta de *Cx. quinquefasciatus*, quase que certamente se traduziria em um valor bem mais alto para adultos de *Ae. aegypti*, mais delicados.

10.5. PROPOSTA DE UM MÉTODO DE APLICAÇÃO DE AMOSTRAS EM LÍQUIDO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO TÓPICO EM MOSQUITOS

10.5.1 ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DOS DISPERSORES

10.5.1.1. PARÂMETROS DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS GOTAS PRODUZIDAS PELOS DISPERSORES

O tamanho das gotas é um importante fator para a definição de um dispersor ou um bico de pulverização e até mesmo válvulas que produzem aerossóis. Considera-se que o tamanho de gota ideal para controle de mosquitos no campo, por meio de aplicação em ULV, seria: 1) aquele com alta eficiência na mortalidade dos mosquitos, 2) gotas que permaneçam no ar por tempo suficiente de forma a aumentar a probabilidade de encontro com o mosquito e, 3) não contenha alta dose de um único inseticida (LOFGREN, 1972).

Os trabalhos que descrevem as aplicações para controle de mosquitos e moscas demonstram que a amplitude de tamanho de gotas em campo é grande, sendo que vários autores tem determinado tal amplitude. Latta et al. (1947) analisou a combinação do tamanho de gotas (1 a 20 µm) e velocidade do vento sobre a mortalidade de mosquitos em um túnel de vento, utilizando DDT em óleo e concluiu que gotas de 10 µm na velocidade de 480 km/h foram eficientes, mas em 1,6 km/h, gotas de 10 µm não foram eficientes para controlar mosquitos.

Himel e Moore (1967) descrevem que 93% das gotas que se fixam em insetos, quando aplicadas no ambiente, têm menos de 50 µm de diâmetro. Já, Mount (1970) estimou o diâmetro ótimo de gotas para controle de mosquitos entre 11 e 20 µm.

Lofgren (1972) determinou que para matar 100% de *Ae. taeniorhynchus* com o inseticida malation técnico foi necessário uma quantidade média de 10 ng de inseticida por mosquito. Essa quantidade de inseticida estaria contida em gotas de 25 µm de diâmetro e que a aplicação de gotas maiores levaria ao desperdício de produto. O autor ainda salienta que esse tamanho de gota é adequado para o malation e que o tamanho letal para outros inseticidas pode variar conforme a toxicidade e formulação. Ainda, o autor descreve que esse tamanho de gota atinge todo o corpo do mosquito, porém em

maior abundância as asas e antenas, sendo que das 467 gotas que atingiram 12 mosquitos, 87% tiveram 3 a 8 µm e nenhuma foi maior do que 16 µm ou menor do que 1 µm.

Weidhass et al. (1970) determinou que o tamanho de gota letal de fention é de 17,5 µm e de malation 25 µm. Em 1982, Haile usou um túnel de vento para demonstrar as respostas concentração/mortalidade ao malation em mosquitos para diferentes aplicações de gotas de tamanho único, sendo que a CL_{50} foi obtida para gotas entre 7 e 22 µm.

Uribe et al. (1984) analisaram a aplicação aérea de malation na forma de VUB na Colômbia e o tamanho de gotas dentro e fora das casas variou entre 14 µm e 48 µm, respectivamente.

Focks et al. (1987) aplicando malation em VUB, com tamanho de gotas entre 10 e 15 µm para controle de adultos de *Ae. aegypti* diariamente durante cinco dias, conseguiram uma porcentagem de mortalidade de machos de 88% e fêmeas de 30%, fator esse relacionado a emergência de fêmeas das pupas que não são atingidas por esse método de controle. Ainda, Aragão et al. (1988) consideram importante, no jato pulverizado, a porcentagem de gotas capazes de aderir ao mosquito sendo as mais eficazes as que têm menos de 20 µm de diâmetro.

Matthews (2000) estimou a maior eficácia para mortalidade contra moscas e mosquitos entre 30 e 55 µm. Outros autores consideram que, ao selecionar equipamentos de aplicação de inseticidas para controle de vetores, o DVM deve ser inferior a 30 µm (LEDSON e MATTHEWS, 1992; WHO 2006b, 2006c). A WHO (2003) considera que equipamentos atomizadores são eficazes para aplicação espacial porque produzem gotas com um DVM de 15 ± 2 µm.

Barber et al. (2004) citam que as gotas produzidas para controlar mosquitos estão numa amplitude de 1 a 150 µm, sendo difícil de capturá-las no campo. Esses autores avaliaram, em laboratório, dois bicos: um bico rotativo, representando a extremidade superior do tamanho de gotas utilizados no controle de mosquitos, e um bico de impacto, representando a extremidade inferior. O DVM variou entre 11 µm e 24 µm sendo que os bicos podem ser recomendados para aplicação de campo no controle de mosquitos. E ainda Silva et al. (2009) caracterizaram o tamanho de gotas de

aerossóis em inseticidas domissanitários com objetivo de determinar se os aerossóis comerciais atendiam as exigências oficiais para o mercado brasileiro. O DVM variou entre 30 µm e, aproximadamente, 80 µm. Conforme já mencionado no presente trabalho, o tamanho ideal de gotas para controle de mosquitos é de 30 µm e, portanto, a maioria dos aerossóis testados por Silva et al. (2009) não atendem a esse requisito. No entanto, analisando outros fatores como, por exemplo, a amplitude relativa, os autores concluíram que tais aerossóis comerciais atendem as exigências oficiais.

As aplicações aéreas que utilizam bicos do tipo jato plano, operando em 30 a 50 psi (3,65 kgf/cm^2), produzem gotas com um DVM entre 60 µm e 100 µm, sendo ineficientes em produzir gotas no tamanho ideal, ou seja, abaixo de 30 µm. Já, os atomizadores rotativos produzem gotas com um DVM entre 20 µm e 40 µm, mas não são amplamente utilizados no campo. Equipamentos que utilizam válvulas de alta pressão (1000 - 3000 psi) ou sistemas de duplo fluído produzem gotas com DVM entre 10 µm e 30 µm (LATHAM, 2012).

Entre os trabalhos aqui descritos, observa-se que não há um consenso na definição de um tamanho único ou uma pequena amplitude de tamanho de gotas para controle de mosquitos, pois os tamanhos de gotas descritos variam entre 10 µm e 80 µm. No entanto, a maioria dos autores considera o tamanho ideal de gota entre 14 µm e 15 µm. No presente trabalho, observa-se que o DVM para as gotas produzidas pelos dispersores aqui avaliados tem uma amplitude média de 30,16 µm a 65,68 µm, sendo que o menor tamanho de gota aqui obtido está entre 2 a 4 vezes maior do que a maioria dos autores consideram como ideal. No entanto, considerando a amplitude entre 10 µm e 80 µm, considera-se que os dispersores utilizados no presente trabalho produzem tamanhos de gotas que atingem os mosquitos e levarão a obtenção de dados reais sobre a mortalidade, mesmo que não havendo homogeneidade no tamanho das gotas, característica de bicos hidráulicos como os utilizados no presente trabalho. Nesse, caso haveria a opção de utilizar bicos pneumáticos, que produzem gotas menores e com maior uniformidade.

Além disso, os trabalhos acima descritos descrevem aplicações em VUB, que necessitam de equipamentos de alta tecnologia e motorização. Os bicos de pulverização para VUB são específicos e altamente qualificados, o que leva a maior

precisão no tamanho de gotas. Os dispersores aqui utilizados são de baixo custo e obtidos no mercado popular, sendo mais simples e com funcionamento por meio de acionamento de válvulas e saída do líquido em orifícios não padronizados. Isso demonstra que se viáveis, tais dispersores seriam extremamente práticos para aplicação de líquidos sobre insetos e obtenção de resultados factíveis de serem analisados.

Outro fator importante é que nas aplicações em campo não é utilizado álcool etílico como solvente de inseticidas, mas sim acetona e óleo. Os resultados do presente trabalho quanto ao tamanho das gotas de álcool não são diferentes daqueles para aplicação em VUB demonstrando que esse solvente não leva a modificação no tamanho de gotas quando comparado aos outros solventes citados pelos autores acima. No entanto, o DVM aqui demonstrado é a média do tamanho de gotas e dessa forma foi possível demonstrar que essas estão dentro da amplitude proposta por outros autores. Já, a AR não demonstrou boa indicação de homogeneidade e isso faz com que, quando da aplicação utilizando os dispersores aqui propostos, os mosquitos recebam uma gama maior de gotas de diâmetros variados. Silva et al. (2009) também encontraram grande AR entre os aplicadores de inseticidas na forma de aerossóis comerciais sendo os valores aproximados de 1,25 a 2,25. Os autores enfatizam a importância desse parâmetro na confiabilidade do dispersor, pois quanto maior o valor da amplitude relativa, maior será a faixa de diâmetro das gotas pulverizadas e, consequentemente, menor o número de gotas com diâmetro semelhante ao DVM. Assim, os dispersores aqui estudados deixaram uma lacuna quanto a homogeneidade no tamanho das gotas o que pode levar a impossibilidade de utilização de diferentes marcas comerciais.

No ambiente agrícola o tamanho de gotas de inseticida aplicadas pode ser bem maior devido, principalmente, a opção de aplicações do produto sobre os insetos adultos e larvas e sobre a lavoura, para que as formas imaturas do inseto (ou mesmo adultos) encontrem o alimento tratado e sejam dessa forma atingidos. Assim, Reed e Smith (2001) avaliaram o efeito do tamanho de gotas e o volume de aplicação na mortalidade de larvas de *Heliothine* (Lepidoptera) utilizando diferentes bicos de pulverização. O DVM variou entre 121 µm e 302 µm sendo que o DVM de 220 µm foi

suficiente para 100% de controle. E ainda Fernandes et al. (2007) caracterizaram o perfil de deposição e do diâmetro de gotas de três bicos de jato plano *Teejet* em dois níveis de pressão. O nível de pressão menor produziu um DVM maior de aproximadamente 150 µm.

Ainda para o ambiente agrícola, Vásquez-Castro et al. (2007) estudaram a influência da formulação CE sobre as propriedades físicas do espectro de gotas. O espectro de gotas entre água e solução inseticida de fenitrotion e esfenvalerate, teve um DVM de 353,96 µm e 372,43 µm, respectivamente. Ainda Camara et al. (2008) analisaram a distribuição volumétrica e espectro de gotas de bicos hidráulicos de jato plano de faixa expandida sendo que o DVM variou conforme o tipo de líquido, bico e pressão utilizados numa amplitude de 143,19 µm e 170,99 µm.

Di Oliveira et al. (2010) avaliaram o espectro e a uniformidade de gotas em função de equipamentos de pulverização, volumes de calda e dosagem de inseticida na mortalidade de *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera) em laboratório. Realizaram uma aplicação sobre lagartas utilizando-se equipamentos com bico rotativo e bico hidráulico e diferentes volumes de calda do inseticida endosulfan. O DVM do bico hidráulico foi de 156,4 µm e do bico rotativo foi de 194,1 µm sendo que o bico rotativo produziu gotas de maior uniformidade e menor porcentagem de gotas susceptíveis à deriva.

Viana et al. (2010) analisaram a distribuição volumétrica e espectro de gotas de três pontas de pulverização de baixa deriva sendo que o DVM variou entre, aproximadamente, 4^{-3} e 9^{-3} µm.

Discute-se adicionalmente que o método de aplicação líquida aqui proposto não é conveniente para uso em bioensaios com a aplicação sobre substratos (como folhas ou dieta artificial), para se avaliar em bioensaios a susceptibilidade a produtos por ingestão, uma vez que os dispersores utilizados apresentaram AR não demonstrando boa indicação de homogeneidade. As folhas ou a superfície da dieta estaria, portanto tratada de forma não homogênea.

10.6. UTILIZAÇÃO DE ACETONA OU ÁLCOOL ABSOLUTO COMO DILUENTE PARA APLICAÇÃO DE INSETICIDAS DE AÇÃO TÓPICA EM MOSQUITOS.

ANÁLISES UTILIZANDO ACETONA

Considerando que em um bioensaio de avaliação de susceptibilidade descarta-se o experimento quando nas testemunhas ocorrem mortalidades acima de 20% (ABBOTT, 1925; DAVIDSON e ZAHAR, 1973; WHO, 1998), os resultados aqui obtidos demonstram que acetona não pode ser utilizada como diluente ou mesmo como testemunha em um bioensaio de aplicação de inseticida sobre adultos de mosquitos, pois a elevada mortalidade causada por esse solvente levaria a falsos resultados ou mesma descarte do bioensaio, considerando-se também, que o protocolo indicado em WHO (2006a) estabelece as avaliações de mortalidade 24 h após a aplicação.

Em experimentos conhecidos como bioensaio em garrafas, Souza et al. (1987), analisaram a susceptibilidade de *Trichogramma demoraesi* (Hymenoptera) à ivermectina e ao malation. Trataram os recipientes de vidro com os produtos diluídos em acetona e usaram apenas a acetona nos recipientes usados como testemunha para que adultos caminhassem sobre as superfícies tratadas. Os resultados demonstraram que a acetona proporcionou um efeito adverso sobre os insetos, acarretando uma mortalidade crescente, chegando a 43,3%, até às 72 h após o tratamento, sendo evidentemente superior àquela constatada nas garrafas testemunhas tratadas com água.

Cruz et al. (1997) utilizaram acetona e álcool nas testemunhas, pela aplicação tópica, para avaliar a susceptibilidade de *Anastrepha fraterculus* (Diptera) ao fention. Tais diluentes causaram mortalidade acima de 10%.

ANÁLISES UTILIZANDO ÁLCOOL

Barbosa et al. (2009) analisaram a mortalidade de *Diabotrica speciosa* (Coleoptera) após tratamento com extratos vegetais extraídos com os solventes óleo, água e álcool etílico. Os extratos que utilizaram água ou álcool como solventes, não diferiram das testemunhas (solventes), nas diferentes concentrações, quanto às mortalidades de *D. speciosa* após 24 horas de exposição. Entretanto, após 48 horas, as

maiores mortalidades foram observadas nas concentrações 5 e 10% utilizando água como solvente. As diferentes concentrações não diferiram, entre si, após 48 horas, mas apresentaram maiores mortalidades de *D. speciosa* comparado à testemunha solvente - álcool etílico, demonstrando que álcool não proporciona mortalidade quando associado a um inseticida ou mesmo como testemunha.

Relatos têm sido feitos descrevendo que o tipo de solvente utilizado em soluções pode influenciar no efeito do inseticida (TSUDA e OKUMO, 1985). E isso é certamente algo a se esperar, uma vez que a eficácia de um inseticida depende da permeabilidade dos solventes sobre a cutícula dos insetos. Consequentemente há dois fatores que determinam a eficácia das formulações: 1) eficiência das gotas em chegar no organismo alvo e 2) eficiência do ingrediente ativo em penetrar e se ligar ao sítio de ação, no caso o sistema nervoso do inseto.

Os resultados de baixa mortalidade com álcool demonstram que esse pode ser utilizado como diluente não acarretando resultados falsos em um bioensaio de mortalidade.

10.7. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA NA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DA APLICAÇÃO DE INSETICIDA NOS RECIPIENTES DE CONTENÇÃO

A hipótese de que poderia haver resquícios da solução inseticida na tela da tampa do recipiente de contenção foi confirmada pela mortalidade de fêmea e macho na testemunha, uma vez que esses recipientes não foram lavados e a concentração mais forte de malation foi utilizada (2,75 ppm). Dessa forma confirma-se a necessidade da lavagem do material após a realização de bioensaios de mortalidade com inseticida ou qualquer outro procedimento que possa expor os insetos a risco de mortalidade quando imobilizados.

O trabalho aqui proposto é novo e não há correspondentes para obterem-se detalhes necessários para uma discussão mais detalhada. Por isso, o procedimento para a lavagem dos recipientes baseou-se na proposta da SUCEN (2012) para lavagem de recipientes utilizados no armazenamento de praguicidas (inseticidas e outros, conforme a SUCEN) que está descrito na Instrução Normativa nº 4 – Destinação final de inseticidas vencidos, de suas embalagens e outros inservíveis. A normativa descreve

que o procedimento para lavagem de tambores com menos de 20 L consistirá na utilização da tríplice lavagem onde o recipiente é cheio com água e essa é agitada durante 30 seg., repetindo-se esse procedimento por três vezes. Na última lavagem acrescenta-se o hidróxido de sódio a 5% para neutralização dos resíduos. No entanto, o recipiente de contenção, aqui utilizado, possui uma tela no fundo, assim como a tampa desse recipiente. Dessa forma, a tríplice lavagem não seria a opção correta para lavá-los e por isso optou-se pela neutralização com o hidróxido de sódio.

Considera-se que a adaptação da Instrução Normativa nº 4 da SUCEN pode ser proposta para a adequada neutralização do inseticida nas tampas dos recipientes de contenção utilizados nos bioensaios do presente trabalho. Conclui-se que foi procedimento conveniente, de modo a limpar as telas dos resíduos de inseticida e assim impedir que mosquitos sejam mortos por resíduos de outras avaliações quando imobilizados.

10.8. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* ROCKEFELLER AO MALATION GRAU-TÉCNICO

Os períodos para cálculo da porcentagem entre 1 h e 24 h foram destacados com o objetivo de limitar a última leitura antes de 24 h e dessa forma obter os resultados do bioensaio mais rapidamente sem ter que aguardar as 24 h. USAEHA (1992) descreve que as avaliações de bioensaios podem ser feitos em 6 h após e 24 h após a aplicação. No entanto, ressalta que é importante fazer avaliações em vários intervalos após a aplicação. Os resultados aqui demontraram que para a obtenção da CD de fêmeas não é necessário avaliações após 4 h da aplicação. No entanto, para machos não foi possível estabeler um intervalo de tempo antes de 24 h.

A CD de um inseticida é usada para detectar a presença de resistência em uma população de inseto. WHO (2006a) determina que a CD deva ser calculada como sendo duas vezes a concentração que mata 100% dos indivíduos. Gaona e Andrade (2005) consideram que uma CD é aquela concentração mais baixa que têm mostrado capacidade de matar 100% das larvas de uma população susceptível testada em campo ou em laboratório. USAEHA (1992) determinam que a concentração diagnóstica seja determinada pela exposição de insetos susceptíveis a uma série de concentrações inseticidas e a concentração que matar 99,9% da população deverá ser multiplicada 2

vezes a partir da que que matou 99,9%. As concentrações mais altas aqui utilizadas causaram uma mortalidade média de 94,75% em fêmea e 94,84% em macho em 24 h. No entanto, entre os três bioensaios com cinco repetições para fêmeas houve três repetições que causaram 100% de mortalidade. Já, para machos, sete repetições causaram total mortalidade, significando que para ambos os sexos a CD calculada no presente trabalho é confiável.

Em relação à inclinação da reta, Ambrós e Prado (2010) consideraram que dentre dez populações de *Musca domestica* (Diptera) estudadas o coeficiente angular foi baixo (1,94), mas para uma população resistente (Campinas, SP) o coeficiente angular foi alto (4,20), o que pode indicar uma maior homogeneidade da população. O coeficiente angular poderia ser um indicativo da variabilidade genética dentro da população: quanto menor seu valor, maior heterogeneidade (BROWN e PAL, 1971).

Analisando os resultados obtidos para <u>fêmea</u> (Tabela 13) temos que o Qui-quadrado tabelado (graus de liberdade em p = 0,05) é de 34,764 e os Qui-quadrado calculados são maiores demonstrando que os dados não se ajustam ao modelo Probit (χ_2 não significativo, p > 0,05). O não ajuste ao modelo Probit deve estar relacionado a dados discrepantes inerentes ao desenvolvimento da nova medologia aqui proposta. Já, os valores de t para o coeficiente angular devem exceder 1,96 (nível de probabilidade de 5% ou p = 0,05) para que os dados se ajustem a uma função linear de dose ou log (dose). Assim, os resultados para todos os períodos de leitura de mortalidade de fêmea foram maiores, havendo então ajuste para as análises de forma log (dose). Analisando os coeficientes lineares (b), observa-se que os valores são baixos, sendo o maior 0,227, indicando que a população utilizada no presente trabalho se demonstrou heterogênea. Isso é um fato a ser analisado porque a linhagem Rockefeller é padrão de laboratório sendo mantida nessas condições há muitos anos e, portanto era de se esperar que essa fosse homogênea. Os intervalos de confiança para a CL_{50} em todos os tempos de leitura estão sobrepostos, exceto para 60 min., sendo que as curvas de mortalidade (Gráfico 7) comprovam esse fato demonstrando disparidade da curva para 1h. Os resultados para a CL_{99} são semelhantes, não havendo sobreposição apenas para 1h.

Analisando os resultados para machos (Tabela 16), o Qui-quadrado tabelado (p = 0,05) é de 73,311. Isso demonstra que apenas o valor de Qui-quadrado para 60 min. se ajusta ao modelo Probit. Já, para os outros períodos de leitura, os valores de Qui-quadrado são altos, o que demonstra que há ocorrência de dados discrepantes na mortalidade de machos. Porém, isso foi considerado como resultado inerente ao desenvolvimento da metodologia aqui proposta. No entanto, os valores de t aqui obtidos para todos os períodos de leitura (60 min. – 15,288; 240 min. – 22,462; 480 min. – 24,269 e 1440 min. – 25,150) foram maiores do que o valor exigido e por isso há ajuste para regressão. Conforme ocorreu para fêmeas, os coeficientes angulares (b) são baixos indicando que a população utilizada no presente trabalho é heterogênea. Nos resultados aqui obtidos, observamos que apenas a CL_{50} para 60 min. não ocorre sobreposição dos intervalos de confiança e por isso para os outros tempos de leitura as CL_{50} são semelhantes. As curvas de mortalidade comprovam esses resultados, havendo paralelismo entre todos os períodos de leitura, exceto para 60 min (Gráfico 8). Os resultados para a CL_{99} são semelhantes, onde apenas em 60 min não houve sobreposição dos intervalos de confiança.

Os Tempos Letais semelhantes entre fêmea e macho evidenciam que malation possui efeito letal de modo semelhante para ambos os sexos. No entanto, observa-se a ausência de igualdade e paralelismo nos bioensaios com fêmeas o que significa que a resposta das fêmeas ao malation é quantitativa e qualitativamente diferente entre os bioensaios o que pode estar relacionado ao método de aplicação e também a heterogeneidade enzimática da população de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller mantida na Unicamp, uma vez que essa característica foi demonstrada pelo baixo coeficiente angular nos ensaios de mortalidade. Já, a concentração mais baixa (1,50 ppm) de machos não demonstrou igualdade, mas demonstrou paralelismo o que nos leva a entender que os bioensaios não foram quantitativamente suficientes para a ocorrência de resultados semelhantes e que, para a utilização do método de aplicação aqui proposto, é necessário maior número de repetições ou bioensaios. E, para a concentração de 2,00 ppm não houve nem igualdade e nem paralelismo, demonstrando que os bioensaios são qualitativamente diferentes e incorrendo mais uma vez as diferenças enzimáticas ou mesmo no método de aplicação.

Kohn (1991a) avaliou a susceptibilidade de *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* ao DDT por meio da exposição de adultos, fêmeas e machos, a papéis impregnados. Os resultados demonstraram que, quanto a *Ae. aegypti*, fêmeas ingurgitadas foram altamente resistentes sendo que após 90 min. de exposição a mortalidade foi menor do que 80%. Fêmeas sem alimentação foram mais susceptíveis, sendo que a mortalidade chegou a 70% após exposição de 30 min. Já, machos foram susceptíveis chegando a 87% de mortalidade em 30 min. de exposição. Quanto a *Cx. quinquefasciatus* os resultados demonstraram que fêmeas ingurgitadas foram altamente resistentes com mortalidade na casa de 30% após 90 min. de exposição. Fêmeas sem alimentação e machos foram susceptíveis. Os autores discorrem com hipóteses não conclusivas sobre a diferença na susceptibilidade de fêmeas e machos discutindo que, como DDT é um inseticida de contato, a diferença pode estar relacionada a permeabilidade cuticular ou mesmo no metabolismo do DDT após a penetração no corpo do mosquito.

Kohn (1991b) avaliaram os níveis de resistência de nove espécies de mosquitos silvestres ao DDT por meio de exposição a papéis impregnados. A maioria das espécies fêmeas foi encontrada ser resistente, exceto duas espécies e, no entanto, machos foram sempre susceptíveis. Uma das explicações para essa diferença na susceptibilidade está no tipo de aplicação do inseticida em questão, uma vez que as aplicações são feitas dentro das moradias e os machos, geralmente, estão fora das moradias e por isso não são atingidos pelo inseticida.

A diferença na susceptibilidade entre fêmeas e machos está evidente nos trabalhos de Kohn o qual utilizou o método do papel impregnado. Por meio da metodologia aqui proposta também foi possível encontrar que machos foram ligeiramente mais susceptíveis ao malation.

10.9. BIOENSAIOS DE MORTALIDADE DE MOSQUITOS COM APLICAÇÃO DA CL_{50} DE MALATION POR DIFERENTES VOLUNTÁRIOS

Uma das muitas salvaguardas utilizadas pelo Método Científico para evitar que o erro humano ou uma eventual tendenciosidade dos pesquisadores contaminem os resultados de uma pesquisa é a exigência da validação desses resultados pela prova da “Repetibilidade e Reprodutibilidade” (R & R). Repetibilidade é confirmação de um

resultado a partir da repetição do experimento, pelo mesmo pesquisador ou por outros, mas necessariamente com amostras diferentes das originais, de modo a garantir que os resultados sempre se repetem. Reprodutibilidade é a repetição do experimento por outros pesquisadores, preferencialmente isentos em relação aos primeiros, utilizando-se não apenas de diferentes amostragens, mas também de diferentes equipamentos. Esse método simples e eficaz evita que resultados falseados por erro instrumental, erro humano, erro médico ou mesmo má intenção sigam a frente na teorização de um princípio científico (TOLEDO et al., 2009).

Observa-se que a mortalidade de mosquitos entre os três voluntários esteve na casa dos 70%. No entanto, a metodologia pode ser considerada repetitiva e reprodutiva, uma vez que as análises estatísticas não demonstraram diferença significativa entre os voluntários o que significa que diferentes pessoas podem utilizar esse método para avaliação de susceptibilidade de mosquitos à inseticidas com a obtenção de resultados passíveis de serem analisados à luz científica.

A porcentagem de mortalidade acima dos 50% está relacionada principalmente ao intervalo de confiança de 95%, o que permite uma elevação ou diminuição nos valores da CL. Também, mesmo que em menor importância, pode haver influência da condição fisiológica da população de mosquitos obtida das gaiolas no momento do experimento, sendo que os mosquitos podiam estar sem alimentação açucarada adequada ou mesmo as larvas não se alimentaram suficientemente para se desenvolverem em adultos sadios ou alguma condição ambiental, como temperatura e umidade relativa, durante os dias que antecederam o experimento podem ter influenciado na vitalidade dos mosquitos.

10.10. REUTILIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE MALATION ARMAZENADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Desmanchelier e Bengston (1979) e Snelson (1987) consideram que os fatores que podem acelerar o processo de degradação dos inseticidas são o aumento da temperatura e do teor de umidade em grãos tratados com clorpirifós metílico.

Pimentel et al. (2005) avaliaram a eficácia de bifentrina aplicada em grãos de milho quanto a mortalidade de algumas espécies de coleópteros. Os resultados

demonstraram que houve redução na mortalidade de *S. zeamais* de 45% para valores próximos a 5% após 24 h de exposição à temperatura de 25 °C. Resultados semelhantes foram observados por Hamacher et al. (2002) para o pirimifós metílico sobre a mortalidade de insetos dessa mesma espécie. A redução da eficácia biológica de inseticidas protetores durante o período de armazenamento de grãos, na mortalidade de espécies de *Sitophilus*, tem sido relatada por vários pesquisadores.

O comprometimento da eficiência dos inseticidas está relacionado à degradação do ingrediente ativo, sendo que os fatores que levam ao aceleramento desse processo são: o aumento da temperatura e do teor de umidade de grãos armazenados. Isso é fato conhecido para clorpirifós metílico (DESMANCHELIER e BENGSTON, 1979; SNELSON, 1987).

Bitran et al. (1991) utilizando o inseticida deltametrina na dose de 0,5 ppm, observaram que após o período de seis meses de armazenamento dos grãos, em temperaturas do ar ambiente variando entre 19 e 26 ºC, a eficácia desse inseticida sobre o controle de *S. zeamais* foi reduzida consideravelmente. Daglish (1998), associando deltametrina com clorpirifós-metílico e metacrifós, observou 64% de mortalidade da progênie de *Sitophilus oryzae* após 84 dias de ser pulverizado sobre trigo, nas condições de temperatura e umidade relativa do ar de 30 ºC e 55%, respectivamente. Já Fleurat-Lessard et al. (1998) observaram, em experimentos com clorpirifós-metílico pulverizado a 30 ºC que, a partir de 60 dias de armazenamento, a eficácia do inseticida sobre *S. oryzae* começou a cair consideravelmente, passando de 100% de eficácia aos 60 dias, para menos de 20% aos 126 dias de armazenamento.

Muitos inseticidas sofrem alterações na estrutura química durante o período que permanecem nos vegetais em que foram aplicados, ou mesmo na água para a qual foram carreados ou no solo em que foram absorvidos. Estes metabólitos ou produtos de degradação são ingeridos junto com os alimentos ou com a água. Alguns destes podem, por vezes, ser mais tóxicos do que o composto original como, por exemplo, o paration que alterando sua estrutura molecular passa a paraoxon. Esta transformação ocorre em nível de tecidos vegetais e também nos animais. Alterações semelhantes ocorrem com outros inseticidas organofosforados orgânicos que têm suas ligações tiofosfato (P=S) oxidadas a ortofosfato (P=O), sendo que sob esta última forma são

inibidores diretos das colinesterases (EPA, 1989; HASSAL, 1990).

Em solos aeróbios, o tempo de meia-vida do metamidofós é de 1,9 dias em siltes e 6,1 em areia. Em ambientes aquáticos, o tempo de meia-vida do metamidofós varia basicamente conforme o pH do meio. Em pH 5,0, este tempo é de 309 dias; em pH neutro, de 27 dias, e em pH levemente alcalino (pH~9,0) de 3 dias. A luz solar apresenta influência significativa na degradação deste composto, visto que mesmo em pH ácido, na presença da luz do sol, seu tempo de meia-vida diminui para 90 dias (LIMA et al., 2001). Conforme Yen et al. (2000) a degradação do ingrediente ativo é variável e o tempo de meia-vida oscila entre 1,11 a 1,61 dias em água superficial, em temperatura entre 20-30 ºC e umidade em torno de 50 a 100%.

Malato et al. (1999) verificaram que sob efeito da luz solar e em presença de partículas dispersas de óxido de titânio, o metamidofós (Tamaron 50% em relação ao ingrediente ativo) teve sua velocidade de degradação aumentada em 18 vezes. Doong e Chang (1998) estudaram a degradação de inseticidas organofosforados, entre os quais o metamidofós, pela ação de luz ultravioleta (UV) em combinação com peróxido de hidrogênio. Verificaram a influência de combinações férreas, incluindo o ferro com valência zero, no aumento da eficiência de degradação do organofosforado. A degradação quase completa foi observada quando o sistema com combinações de ferro foi irradiado com luz UV, de tal forma que a eficiência da degradação no sistema UV/Fe/H_2O_2 foi mais efetiva que no sistema UV/ H_2O_2.

Em outro estudo de estabilidade de compostos organofosforados, Koukurec et al. (1998) verificaram que durante a extração do composto em diferentes matrizes vegetais (trigo, laranja e repolho branco), utilizando o mesmo solvente (acetato de etila e sulfato de sódio), ocorreu degradação significativa do inseticida na temperatura de 40 ºC, sobretudo nas amostras de laranja e repolho. Nas amostras de trigo, a estabilidade mostrou-se pouco maior que nos demais extratos, sendo também observada leve degradação do metamidofós e de outros organofosforados em solução de acetato de etila após 60 dias a 40 ºC. Em trabalhos realizados com culturas de tomates, o tempo de meia-vida no legume e nas folhas foi de 4,8 a 5,1 e 5,5 a 5,9 dias, respectivamente (ANTONIOUS e SNYDER, 1994).

No presente estudo, conclui-se que a temperatura ambiente influenciou no efeito inseticida da solução armazenada e que é necessária a manutenção das soluções inseticidas em baixa temperatura.

10.11. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* ROCKEFELLER A DELTAMETRINA

Analisando-se os resultados obtidos para fêmeas e machos (Tabela 22) temos que o Qui-quadrado tabelado (graus de liberdade em p = 0,05) é de 51,739 e os Qui-quadrado calculados são maiores demonstrando que os dados não se ajustam ao modelo Probit (χ_2 não significativo, p > 0,05). O não ajuste ao modelo Probit deve estar relacionado a dados discrepantes inerentes ao desenvolvimento da nova metodologia aqui proposta. Já, os valores de t para o coeficiente angular devem exceder 1,96 (nível de probabilidade de 5% ou p = 0,05) para que os dados se ajustem a uma função linear de dose/concentração ou log (dose/concentração). Assim, os resultados para todas as concentrações tanto para fêmeas quanto para machos foram maiores, havendo então ajuste para as análises de forma log (dose). Analisando-se os coeficientes lineares (b), observa-se que os valores são baixos indicando que a população utilizada no presente trabalho é heterogênea. A sobreposição dos intervalos de confiança das CLs_{50} e CLs_{99} demonstra que fêmeas e machos de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller respondem semelhantemente ao inseticida deltametrina.

A semelhança na resposta de ambos os sexos fica evidente na curvas de concentração-mortalidade (Gráfico 11) uma vez que em determinado ponto há sobreposição entre as retas. Isso reporta ao fato de que a população Rockefeller é geneticamente homogênea e que no momento dos experimentos as condições fisiológicas de ambos os sexos eram semelhantes.

Em relação ao Tempo Letal Mediano, os resultados para fêmeas demonstram que o Qui-quadrado tabelado para 96 graus de liberdade e p = 0,05 é de 77,929 e os Qui-quadrado calculados (Tabela 23) para todas as concentrações são maiores e que assim os dados não se ajustam ao modelo Probit. Já, os valores de t para todas as concentrações são maiores do que 1,96 demonstrando que os dados se ajustam a função log (dose). Os coeficientes angulares foram baixos e demonstram que foi

adotado um amplo espectro de concentrações e tempos de leitura. Já, o maior coeficiente angular (1,306 para 0,62 ppb) confirma que a maior concentração possui maior efeito, causando mortalidade de forma mais rápida. Os intervalos de confiança para as concentrações 0,31 ppb e 0,62 ppb demonstram uma resposta homogênea com intervalos de confiança justos e com sobreposição. Isso demonstra que essas concentrações são efetivas quanto a mostrar a homogeneidade das fêmeas. O resultado de Paralelismo demonstra que cada concentração exerceu o mesmo efeito de mortalidade para os três bioensaios sendo isso um fator positivo quanto a viabilidade da metodologia aqui proposta uma vez que não há variação entre os bioensaios. Já, para o teste de Igualdade apenas para 0,62 ppb houve uma resposta qualitativa e quantitativa semelhante o que não ocorreu para 0,31 ppb. Esses resultados diferem dos de malation, pois a igualdade e paralelismo demonstram que os bioensaios foram semelhantes quantitativa e qualitativamente, significando que o piretroide deltametrina exerce efeito diferenciado dos organofosforados sobre fêmeas de *Ae. aegypti*, possivelmente devido ao modo de ação de piretroides, uma vez que os organofosforados atuam inibindo a acetilcolinesterase (AChE). Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição de AChE resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses neuronais, o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Consequentemente, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto. Os piretroides atuam, aparentemente, mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios. Há dois tipos de piretroides: aqueles que, entre outras respostas fisiológicas, têm um coeficiente de temperatura negativo, assemelhando-se ao DDT (tipo 1); e os que apresentam coeficiente de temperatura positivo (tipo 2), ou seja, a mortalidade dos insetos a eles expostos varia diretamente com o aumento da temperatura. Os piretroides afetam o sistema nervoso periférico e central do inseto: estimulam as células nervosas a produzir descargas repetitivas e, assim causam paralisia ou KD (WARE, 2000).

Já, quanto ao Tempo Letal Mediano calculado para machos (Tabela 24) ocorre que o Qui-Quadrado tabelado é menor do que Qui-Quadrado calculado e mais uma vez os dados não se ajustam ao modelo Probit. Já, os valores de t foram maiores do que

1,96 demonstrando o ajuste dos dados como uma função linear de log (dose). O coeficiente angular foi maior para 0,31 ppb demonstrando que, mesmo que essa seja a concentração mediana, a mesma possui maior efeito de mortalidade. Os baixos valores desse coeficiente evidenciam um espectro de concentrações amplo. As TL_{50} para todas as concentrações se monstraram próximas, não havendo resultados discrepantes. A ocorrência de sobreposição dos intervalos demonstra a semelhança na resposta dos machos para as duas concentrações de deltametrina aqui avaliadas. No entanto, a ausência de igualdade e paralelismo demonstra que machos de *Ae. aegypti* sofrem algum efeito fisiológico diferenciado quando comparado a resposta de fêmeas significando que machos podem levar a resultados discrepantes se utilizados em conjunto com fêmeas em um bioensaio de mortalidade.

A diferença na susceptibilidade entre fêmeas e machos está evidente nos trabalhos de Kohn (1991a e 1991b) o qual utilizou o método do papel impregnado. Por meio da metodologia aqui proposta também foi possível encontrar que machos foram ligeiramente mais susceptíveis a deltametrina uma vez que a mortalidade foi maior e o tempo letal menor tanto para a linhagem Rockefeller quanto para Santarém.

10.12. AVALIAÇÃO DE MORTALIDADE DE *Aedes aegypti* LINHAGEM SANTARÉM A CL_{50} DE DELTAMETRINA.

DAVIDSON e ZAHAR (1973) e WHO (1998) estabelecem que os resultados para determinação de susceptibilidade e resistência sejam determinados de acordo a essas porcentagens:

S - SUSCEPTIBILIDADE - Mortalidades acima de 98%
SR - SUSPEITA DE RESISTÊNCIA - Mortalidades entre 80% e 97%
R - RESISTÊNCIA - Mortalidades abaixo de 80%

A linhagem Santarém, obtida da Fiocruz – RJ foi disponibilizada como sendo resistente a deltametrina. Os resultados de mortalidade para fêmea (1,4%) e para machos (15,3%) obtidos confirmaram a resistência e demonstraram que a metodologia aqui proposta é viável para identificação de populações resistentes de campo.

10.13. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE CLOROPÍDEOS

Arias (2004) inventariou a dipterofauna de uma região da Colômbia por meio de coletas com armadilhas e aspirador durante 16 meses. Foram coletadas 250 espécies sendo 38 delas da família Chloropidae que ocorreu com uma abundância de aproximadamente 2.000 indivíduos.

Francisco (2005) utilizou armadilha com isca animal e suas coletas foram feitas no período de Maio/1998 a Abril/1999 durante duas horas diárias em diferentes horários. Coletaram-se 11 espécies e a quantidade de indivíduos coletados foi de 25.991, sendo que a proporção de machos e fêmeas foi de 1:3. No presente trabalho coletou-se 37% menos indivíduos e apenas duas espécies, mas com a mesma proporção entre machos e fêmeas.

Reilly et al. (2007) coletaram cloropídeos na Ilha do Marajó, Pará. As coletas foram feitas com armadilha pega-mosca em 78 casas durante 12 dias. No total foram coletados 5.579 indivíduos sendo que os gêneros dominantes foram *Hippelates* e *Liohippelates*.

Oliveira et al. (2008), utilizando armadilha do tipo Malaise, coletaram 40.436 indivíduos de 41 famílias em uma área de Cerrado em Minas Gerais. Dentre essas, Chloropidae ocorreu com 259 indivíduos.

Mediante esses resultados, considera-se que a amostragem de cloropídeos obtida no presente trabalho é significativa e que o método de coleta aqui utilizado é conveniente para amostrar essas moscas em um trabalho onde necessite de coletas sistematizadas.

10.14. IMOBILIZAÇÃO DE MOSCAS POR MEIO DE SUCÇÃO

A imobilização parcial de cloropídeos pelo método de sucção aqui proposto demonstrou que há necessidade de aumentar a voltagem do aspirador utilizado como imobilizador para que cloropídeos sejam imobilizados da mesma forma que os mosquitos, não havendo movimentação e com a superfície de exposição mais abrangente. No entanto, para a aplicação de um *spray* conforme proposto no presente trabalho, o fato das moscas não conseguirem voar já é suficiente para que, ao aplicar o

jato, as mesmas recebam o produto a ser avaliado. Já, a manipulação individual dos insetos seria mais dificultosa.

10.15. LINHA BASE DE SUSCEPTIBILIDADE DE MOSCAS *Liohippelates nigrifons* AO MALATION.

Bioensaios de mortalidade para estabelecimento de linha base de susceptibidade a inseticidas, utilizando populações de campo, ou geração parental, possuem alguns problemas que levam à discrepâncias entre as concentrações no quesito mortalidade. Isso se deve, principalmente pela heterogeneidade genética ocorrente em uma população de campo. Os resultados dos bioensaios com população parental de *Li. nigrifons* aqui realizados, demonstram que, mesmo com o aumento do número de indivíduos em cada repetição dos bioensaios (de 30 para 60 indivíduos), não foi possível delinear um espectro de concentrações de modo a atingir o objetivo quanto a mortalidade entre 10% e 99%. Nesse caso, o procedimento mais adequado seria a criação dessas moscas para obtenção de gerações posteriores e assim, consequentemente a obtenção de uma população geneticamente mais homogênea. No entanto, as dificuldades inerentes a criação não permitiram que *Li. nigrifons* fosse mantida no laboratório, sendo que alguns aspectos quanto a alimentação de adultos e larvas propostos por FRANCISCO (2005) não foram passíveis de reprodutibilidade.

Analisando os resultados (Tabela 25) temos que o Qui-quadrado tabelado (61 graus de liberdade em p = 0,05) é de 43,188 e os Qui-quadrado calculados são maiores demonstrando que os dados não se ajustam ao modelo Probit (χ_2 não significativa, p > 0,05). O não ajuste ao modelo Probit pode estar relacionado a dados discrepantes inerentes à população parental ou mesmo ao desenvolvimento da nova metodologia aqui proposta.

Já, os valores de t para o coeficiente angular excederam 1,96 (nível de probabilidade de 5% ou p = 0,05) demonstrando que os resultados se ajustam a função linear de dose ou log (dose).

Analisando os coeficientes lineares (b), observa-se que os valores são muito baixos, sendo o maior 0,027, porém ainda menor do que aqueles obtidos para a linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti*. Esses valores baixos demonstram uma população

acentuadamente heterogênea, correspondendo a uma população de campo.

Os intervalos de confiança para a CL_{50} em todos os tempos de leitura estão sobrepostos demonstrando que o tempo de avaliação de um bioensaio de mortalidade de *Li. nigrifons* ao malation pode ser finalizado em qualquer período de leitura aqui proposto. Já, apesar dos intervalos de confiança para a CL_{99} estarem também sobrepostos observa-se que para os períodos de avaliação 8 h e 24 h a CL_{99} é maior e com maior intervalo de confiança. Isso demonstra que *Li. nigrifons* responde de forma diferenciada a resposta de *Ae. aegypti*, uma vez que para esses a CL_{99} diminui com o aumento do período de avaliação após a exposição ao inseticida. No entanto, para os chloropídeos ocorreu o inverso e por isso propõe-se que em bioensaios de mortalidade ao malation utilizando chloropídeos a avaliação de mortalidade seja até um período máximo de 4 h.

As retas paralelas para todos os períodos de leitura demonstradas no Gráfico 15 demonstram que as concentrações aqui utilizadas são qualitativamente idênticas, porém quantitativamente diferentes. Já, quanto as retas obtidas pelas TLs, observa-se que para as concentrações 0,18 ppb e 0,37 ppb (Gráfico 16) ambas são paralelas entre si e a reta para 0,75 ppb se distancia em relação as outras retas. No entanto, apesar desse distanciamento, considerou-se que a reta para 0,75 ppb é igual as outras retas indicando semelhança qualitativa e quantitativa.

11. PROTOCOLO PARA UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE DE PEQUENOS DÍPTEROS ADULTOS A INSETICIDA

Aqui se resume os passos para um Protocolo de utilização da metodologia proposta no presente trabalho, quanto à utilização para avaliação de susceptibilidade de insetos a inseticida em aplicações por contato, no sentido de facilitar a compreensão.

Os passos gerais de um Protocolo são:

1º - Colocar os cotonetes ou hastes de plástico com o algodão embebido em solução de mel a 10% no recipiente de contenção (não encharcar o algodão para que não escorra nas paredes do recipiente de contenção evitando que os adultos dos mosquitos acabem grudando);
2º - Preparar as soluções dos inseticidas e colocá-las nos recipientes dos dispersores;
3º - Preparar solução de hidróxido de sódio a 5%;
5º - Coletar os mosquitos com o aspirador elétrico e recipiente coletor,
6º - Colocar o recipiente coletor com o fundo para baixo no imobilizador ligado;
7º - Retirar a tampa do recipiente coletor e colocar a tampa do recipiente de contenção;
8º - Retirar o recipiente com os mosquitos da sucção e colocar em um local para descanso durante 1 h, sendo que o recipiente de contenção deve ser mantido em posição horizontal e coberto;
9º - Colocar o recipiente de contenção com a tampa para baixo no imobilizador ligado;
10º - Aplicar um jato de solução inseticida nos mosquitos imobilizados na tampa do recipiente de contenção;
11º - Colocar a tampa no recipiente de contenção, retirá-lo da sucção e colocar em local para descanso dos mosquitos;
10º - Registrar a mortalidade após 4 h, ou mais se necessário, da aplicação do inseticida;

12º - Ao final do experimento os mosquitos devem ser direcionados conforme o objetivo do trabalho e a tampa do recipiente de contenção deve ser submergida em solução de hidróxido de sódio a 5% durante 1 h;

13º - Retirar as tampas da solução de hidróxido de sódio a 5%, enxaguar em água de torneira rapidamente e colocar para secar em estufa a 30^0C;

14º - Os dispersores devem ser lavados com álcool etílico absoluto, acionando-os durante pelo menos 5 vezes após o jato completo;

15º - As soluções inseticidas podem ser armazenadas em recipientes de vidro devidamente fechados e envoltos por papel alumínio em temperatura de geladeira comum (10^0C).

12. CUSTOS APROXIMADOS PARA MONTAGEM DE UM *KIT* DA METODOLOGIA PROPOSTA

O trabalho aqui desenvolvido visou o desenvolvimento de uma metodologia que pudesse ser utilizada para diversas finalidades experimentais desde que associada principalmente a imobilização de insetos. Já, se o objetivo for utilizar a imobilização associada a aplicação de inseticida, os dispersores fazem parte da metodologia.

Assim, quanto a utilização para avaliação de susceptibilidade de insetos a inseticidas, é aqui proposto um *kit* com os equipamentos necessários para realização de bioensaios (Tabela 30).

Tabela 30 – Equipamentos para elaboração de um *kit* para realização de bioensaios de mortalidade.

Equipamentos	Quantidade	Medidas	Valor (R$)
Aspirador de pó para automóvel	1		60,00
Barra roscada de aço (hastes)	1	1 m x 3 mm	1,50
Adaptador PVC		35mm x ½ polegada	1,50
Cap PVC	1	50 pol	3,00
Fonte de Alimentação	1		50,00
Dispersores	1		2,00
Cotonete	75		3,00
Tela (malha 15)		1 m	10,00
Ponte plástico acrílico	1	40 mL	0,50
Cola	1	15 g	3,00
Mangueira plástica		1 m	1,00
Balde	1	1000 mL	4,00
Soda Cáustica		1 Kg	7,00
		Total	**147,00**

13. CONCLUSÕES

a) Anestesia utlizando-se CO_2 e Temperatura abaixo de 10ºC aumenta a mortalidade de *Ae. aegypti*;
b) Imobilização de *Ae. aegypti* e *Li. nigrifons* por meio de sucção pode ser recomendado por não causar mortalidade significativa;
c) Aplicação de solução inseticida em álcool etílico por meio de dispersores com válvula pump proporciona resultados de baixa mortalidade de modo inequívocos;
d) Aplicação de acetona produto analítico em machos de *Ae. aegypti* causa alta mortalidade;
e) Diluições de inseticidas para aplicação na forma de *spray* não deve ser feita utilizando-se acetona produto analítico como solvente;
f) Álcool etílico produto analítico é um solvente adequado para diluições de inseticidas;
g) Os recipientes utilizados nos bioensaios de aplicação de inseticida devem ser lavados em hidróxio de sódio a 5%;
h) Os dispersores podem ser reutilizados por longo período;
i) Soluções inseticidas podem ser armazenadas a temperatura ambiente durante 30 dias;
j) A metodologia aqui proposta é viável para estabelecimento de linha base de susceptibilidade a inseticidas de *Ae. aegypti* e *Li. nigrifons*, assim como para identificação de populações resistentes a inseticidas;
k) A montagem e utilização da metodologia é de baixo custo.
l) A metodologia pode ser utilizada, com confiabilidade nos resultados, por diferentes pessoas, mesmo que não sejam treinadas.

Segundo a WHO (1992) para que um método seja padronizado os seguintes requisitos são necessários: ser simples, replicável, confiável e acessível. Mediante os resultados obtidos no presente trabalho, a metodologia aqui desenvolvida se insere nesses requisitos e, portanto, é recomendável para ampla utilização. No presente trabalho foi possível demonstrar a viabilidade de utilização da metodologia para realização de bioensaios, mesmo que alguns ajustes ainda sejam necessários. Dessa

forma, pretende-se trabalhar os detalhes que ainda necessitam ser melhorados e dessa forma gerar um produto final para a comercialização.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, Walter Sidney A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology***,* v.18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ALDRIDGE, Robert L.; WYNN, W.Wayne.; BRITCH, Seth C.; KENNETH, J.Linthicum. Aspirator Gun for High-Throughput Mosquito Bioassays. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 1, p. 65-68, 2012.

ALVAREZ, Leslie; OVIEDO, Milagros; GUSTAVO, Ponce; FLORES, Adriana E. Resistance to deltamethrin and enzymes associated with *Aedes aegypti* from western Venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 3, p. 308, 2010.

AMBRÓS, Carmen M.G.; PRADO, Ângelo Pires. Resistência a ivermectina em populações de *Musca domestica* (Díptera: Muscidae) provenientes de granjas de galinhas poedeiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 239-244, 2010.

AN, Shuwen; YANG, Ding. Species of the genus *Mepachymerus* Speiser, 1910 from China (Diptera, Chloropidae). **Deutsche Entomologhische Zeitschrift**, v. 54, n. 2, p. 271-279, 2007.

AN, Shuwen; YANG, Ding. The genus *Platycephala* from Guangdong, South China (Diptera, Chloropidae) with descriptions of four new species. **Deutsche Entomologhische Zeitschrift**, v. 55, n. 1, p. 137-144, 2008.

AN, Shuwen; YANG, Ding. Four new species of *Platycephala* with a key to the Chinese species (Diptera, Chloropidae). **Journal of Natural History**, v. 43, n. 7-8, p. 399-409, 2009a.

AN, Shuwen; YANG, Ding. New species of *Meromyza* from Palaeartic and Oriental China (Diptera: Chloropidae). **Entomologica Fennica**, v. 20, n. 2, p. 94-99, 2009b.

ANDRADE, Carlos F.S.; CASTELLO BRANCO JR., Armando. A methods for field detection of resistance to Temephos in simuliids. Larval esterase level and topical application of the insecticide adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 3, p. 291-297, 1990.

ANTONIOUS, George F.; SNYDER, John C. Residues and half-lives of acephate, methamidophos, and pirimiphos-methyl in leaves and fruit of greenhouse-grown tomatoes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 141-148, 1994.

ARAGÃO, Mario B.; AMARAL, Ronaldo S.; LIMA, Milton M. Aplicação especial de inseticidas em saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v.4, n.2, p.147-166, 1988.

ARIAS, Larry N. Características de las comunidades de Diptera (Arthropoda: Insecta) y su relación com el paisaje en la altillanura de la orinoquia (Meta, Colombia). Trabajo de Grado Biologia. Universidad Nacional de Colômbia. 2004. Disponível em: <http://es.scribd.com/doc/16529765/Nino-L>. Accesso em: 10 Nov. 2012.

ASHBURNER, Michael; THOMPSON, James N. The laboratory culture of *Drosophila*. IN: ASHBURNER, Michael; WRIGHT, T.R.F. (eds.). **The Genetics and Biology of *Drosophila***, Academic Press, London, vol. 2, pp. 1-109, 1978.

ASHBURNER, Michael; GOLIC, Kent G.; HAWLEY, R. Scott. ***Drosophila*. A laboratory handbook**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

ASHBURNER, Michael, GOLIC, Kent G.; HAWLEY, R. Scott. **Drosophila: a laboratory handbook**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Second edition, 1408 pp, 2005.

BADRE, Nicolas H.; MARTIN, M. Elisabeth; COOPER, Robin L. The physiological and behavioral effects of carbon dioxide on *Drosophila melanogaster* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.140, p. 363-376, 2005.
BALL, H.J. Insecticide resistance: a practical assessment. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 27, p. 261, 1981.
BARATA, Edgar F.; COSTA, Antonio I.P.; CHIARAVALLOTI NETO, Francisco.; BARATA, José Maria S.; NATAL, Delsio. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 237-42, 2001.
BARBER, Jane; GREER, Mike; HEWITT, Andrew. **A field measurement device for the aerosols used in mosquito control**. Technical presentation, ASAE Paper No. AA04-0010, 2004.
BARBOSA, Flavia S.; LEITE, Germano L.D.; MARTINS, Ernane R.; GUANABENS, R.E.M.; SILVA, Farley W.S. Métodos de extração e concentrações no efeito inseticida de *Ruta graveolens* L., *Artemisia verlotorum* Lamotte e *Petiveria alliacea* L. a *Diabrotica speciosa* Germar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 221-229, 2009.
BARRON, Andrew B. Anaesthetising *Drosophila* for behavioural studies. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 439-442, 2000.
BARROZO, Romina B.; LAZZARI, Claudio R. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. **Chemical Senses**, v. 29, n. 4, p. 319-329, 2004.
BASSET, D.C.J. *Hippelates* flies and streptococcal skin infection in Trinidad. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 64, n. 1, p. 138-147, 1970.
BERGÉ, Jean-Baptiste; FEYERENSEN, Ren; AMICHOT, Marcel. Cytochrome P450 monoxygenases and insecticide resistance in insects. **Philosophical Transactions Royal Society London Series B: Biological Sciences**, v. 353, n. 1376, p. 1701-1705, 1998.
BENGTSON, I. A. Seasonal acute conjunctivitis occurring in the southern states. **Public Health Reports**, v. 48, p. 917–926, 1933.
BERGTHALER, Gernot J.; RELYS, Vygandas. Suction sampling in alpine habitats: experiences and suggestions. **European Arachnology**, v. 2000, p. 291-297, 2002.
BISSET, Juan A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, n. 3, p. 202-19, 2002.
BISSET, Juan.A.; RODRIGUEZ, Maria M.; CÁCERES, Lorenzo. Niveles de resistência a insecticidas y sus mecanismos em 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, n. 3, p. 191-195, 2003.
BITRAN, Edgard A.; CAMPOS, Tiago B.; SUPLICY Filho, Nelson; CHIBA, Soyako. Avaliação da ação residual de alguns inseticidas na proteção de grãos de milho, trigo e arroz contra pragas de armazenamento. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 58,n. 1-2, p. 43-50, 1991.
BOITEAU, Gilles; MISENER, G.C.; SINGH, Ratan P.; BERNARD, George. Evaluation of a vacuum collector for insect pest-control in potato. **American Potato Journal**, v. 69, n. 3, p. 157-166, 1992.
BONNET, Jullien; CORBEL, Vicent; DARRIET, Frederic; CHANDRE, Fabrice; HOUGARD, Jean-Marc. Topical applications of pyrethroid and organophosphate

mixtures revealed positive interaction against pyrethroid-resistant Anopheles gambiae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 20, n. 4, p. 438–43, 2004.
BLOOMQUIST, Jeflrey R. Inseticides chemistries and characteristics. Disponível em: <http: www.ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm> 1996>. Acesso em: 10 Jan. 2010.
BRACKMANN, Auri: GUEDES, Jerson V.C. Controle de insetos em frutas, hortaliças e grãos armazenados com o uso de temperaturas extremas e gases. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 317-322, 1995.
BRAGA Ima A.; GALARDO, Allan K.R.; MACHADO FILHO, Manuel R.; ZIMMERMAN, Robert; BRAGA I.L. **Controle Seletivo de Vetores da Malária - Guia para o Nível Municipal**. Brasília: Ministério da Saúde. 1º ed., 56p., 1999.
BRAGA, Ima A.; LIMA, José Bento P.; SOARES, Sidnei.S. & VALLE, Denise. *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**, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.
BRANSCOME, D.D.; KOEHLER, P.G.; OI, F.M. Influence of carbon dioxide gas on German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) knockdown, recovery, movement and feeding. **Physiological Entomology**, v. 30, p. 144–150, 2005.
BRASSOLATTI, Rejane C.; ANDRADE, Carlos F.S. Avaliação de uma intervenção educativa na prevenção da dengue. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 243-251, 2002.
BRESCIA, F. Salt marsh and anopheline mosquito control by ground dispersal of DDT aerosol. **Journal of Economic Entomology**, v. 39, p. 698-715, 1946.
BROGDON, Willian G.: MCALLISTER, Janet C. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. **Journal of the American Mosquito Control Association** v. 14, n. 2, p. 159-64.1998a.
BROGDON, Willian G.: MCALLISTER, Janet C.. Insecticide resistence and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605-613, 1998b.
BROPHY, J.J.; NELSON, D.; PAILLE, R.R. A vacuum aspiration apparatus for the efficient collection of ants. **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 21, p. 303–305, 1982.
BROWN, A.W.A.; PAL, R. **Insecticide Resistance in Arthropods**. 2nd ed., World Health Organization, 1971.
BROWN, Anthony W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. J**ournal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n.2, p. 123-140, 1986.
CABRINI, Isaías; ANDRADE, Carlos F.S. Resposta de fêmeas de mosquitos ao hospedeiro – busca por alimentação sanguínea – uma revisão. Ecologia Aplicada – Instituto de Biologia – Unicamp. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm>. Acesso em: 30 Jul. 2010.
CAMARA, Felipe T.; SANTOS, José L.; SILVA, Elias A.; FERREIRA, Marcelo C. Distribuição volumétrica e espectro de gotas de bicos hidráulicos de jato plano de faixa expandida XR11003. **Engenharia Agrícola**, v. 28, n. 4, p. 740-749, 2008.
CAMPOS, Jairo; ANDRADE, Carlos F.S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n.3, p. 232-236, 2001.
CANYON, D.V.; HII, J.L.K. Insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Townsville. **Australian Journal of Entomology**, v. 38, p. 40-43, 1999.

CARDOSO, Jader C.; PAULA, Márcia B.; FERNANDES, Aristides; SANTOS, Edmilson; ALMEIDA, Marco Antonio B.; FONSECA, Daltron F.; SALLUM, Maria Anice M. Novos registros e potencial epidemiológico de algumas espécies de mosquitos (Diptera, Culicidae), no estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 552-556, 2010.

CARVALHO FILHO, Fernando S.; ESPOSITO, Maria C. A new species of *Bricelochlorops* Paganeli and the first recordo of *Urubambina rufa* (Duda) (Diptera: Chloropidae) from Brazil. **Neotropica Entomology**, v. 39, n. 5, p. 742-745, 2010.

CHANSANG, Uruyakorn; MULLA, Mir. S. Field evaluation of repellents and insecticidal aerosol compositions for repelling and control of *Siphunculina funicola* (Diptera: Chloropidae) on aggregation sites in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 2, p. 299–307, 2008.

CHANSANG, Uruyakorn; MULLA, Mir. S.; CHANTAROI, Siripom; SAWANAPANYALERT, Pathom. The eye fly *Siphunculina funicola* (Diptera: Chloropidae) as a carrier of pathogenic bacteria in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public**, v. 41, n. 1, p. 61-71, 2010.

CHAO, Y.C.; PETERSON, A. A new type of aspirator. **Journal of Economic Entomology**, v. 45, p. 751, 1952.

CHAVERRA-RODRIGUEZ, Duverney; JARAMILO-OCAMPO, Nicolas; FONSECA-GONZALEZ, Idalyd. Artificial selection of insecticide resistance to Lambda-cialotrina in *Aedes aegypti* and cross resistance to other insecticides. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 38, n. 1, p. 100-107, 2012.

CHEN, Cheng-P.; DENLINGER, David L.; LEE, Richard.E. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. **Physiological Zoology**, v. 60, n. 3, p. 297–304, 1987.

CHRISTOPHERS, Samuel C. ***Aedes aegypti (L.)*** **The yellow fever mosquito**. Cambridge, At the University Press, 1960.

CHUAYCHAROENSUK, Thipwara; JUNTARAJUMNONG, Waraporn; BOONYUAN, Wasana; BANGS, Michael J.; AKRATANAKUL; Pongthep; THAMMAPALO, Suwit; JIRAKANJANAKIT, Nuananong; TANASINCHAYAKUL, Somchai; CHAREONVIRIYAPHAP, Theeraphap. Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, n. 1, p. 204-212, 2011.

CLARK, A.G.; SHAMAAN, N.A.; DAUTERMAN, W.C.; HAYAOKA, T. Characterization of multiple glutathione transferases from the house fly, *Musca domestica* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 22, n.1, p.51-59, 1984.

CLARK, A.G.; DICK, G.L.; MARTINDALE, S.M.; SMITH, J.N. Glutathione S-transferases from the New Zealand gras grub, *Costelytra zealandica*. **Insect Biochemistry**, v. 15, p. 35-44, 1985.

CLARK, G.G.; SEDA, H.; GUBLER, D.J. Use of the CDC backpack aspirator for surveillance of Aedes aegypti in San Juan, Puerto Rico. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 10, n. 1, p. 119–124, 1994.

CLAYTON, J.S.; SANDER, T.P.Y. Aerial application for control of public health pests. **Aspects of Applied Biology**, v. 66, p. 1–8, 2002.

COTO, M.M.R.; LAZCANO, A.B.; FERNÁNDEZ, D.M.; SOCA, A. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control

program. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 16, n. 4, p. 324-330, 2000.
COX, Caroline. Pyrethrins and pyrethrum. **Journal of Pesticide Reform**, v. 22, n. 1, p. 14-20, 2002.
CRESPIGNY, Frederick C.; WEDELL, Nina. The impact of anaesthetic technique on suvirval and fertility in *Drosophila*. **Physiological Entomology**, v. 33, n. 4, p. 310-315, 2008.
CRUZ, I.B.M; HUMERES, E.; OLIVEIRIA, A.K. Toxicity of fenthion to *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera:Tephritidae): dose response analysis. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 471-479, 1997.
CUI, Feng; RAYMOND, Michel; QIAO, Chuan -L. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. **Pest Management Science**, v. 62, n.11, p. 1013-1022, 2006.
CUI, Yusi; YANG, Ding. Species of *Epichlorops* Becker from China (Diptera: Chloropidae). **Zootaxa**, n. 2017, p. 41-46, 2009.
CUI, Yusi; YANG, Ding. Species of *Chlorops* Meigen from Palaeartic China (Diptera, Chloropidae). **Zootaxa**, n. 2987, p. 18-30, 2011a.
CUI, Yusi; YANG, Ding. Species of *Chlorops* Meigen from Yunnan (Diptera: Chloropidae). **Transactions of the American Entomological Society**, v. 137, n. 3-4, p. 329-353, 2011b.
CUPP, E.W.; TENNESSEN, K.J.; OLDLAND, W.K.; HASSAN, H.K.; HILL, G.E.; KATHOLI, C.R.; UNNASCH, T.R. Mosquito and Arbovirus Activity During 1997–2002 in a Wetland in Northeastern Mississippi. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 495–501, 2004.
CZAJKA, Maureen C.; LEE Jr., Richard E. A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Experimental Biology**, v. 148, p. 245–254, 1990.
DA COSTA, Miguel A. F. **Avaliação de desempenho operacional de um pulverizador pneumático costal motorizado utilizado no controle de mosquitos vetores de doenças**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), 99 pp. – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo. Piracicaba: 2002.
DA-CUNHA, Marcella P.; LIMA, Joseé B.P.; BROGDON, Willian G.; MOYA, Gonzalo E.; VALLE, Denise. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 441-444, 2005.
DAGLISH, G.J. Efficacy of six grain protectants applied alone or in combination against three species of coleoptera. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 263-268, 1998.
DAVIDSON, G.; ZAHAR, A.R. The practical implications of resistance in malaria vectors to insecticides. **Bulletim of the World Health Organization**, v. 49, n. 5, p. 475-483, 1973.
DAVIS, D. J.; PITTMAN, M. Acute conjunctivitis caused by *Haemophilus*. **American Journal of Diseases of Children**, v. 79, n. 2, p. 211-219. 1950.
DAWSON, C. R. Epidemic Koch-Weeks conjunctivitis and trachoma: in the Coachela Valley of California. Amercan Journal of Ophthalmology, v. 49, p. 801-808. 1960.
DESMANCHELIER, J.M.; BENGSTON, M. **The residual behavior of chemicals on stored grain**. In: International Working Conference on Stored-Product Entomology, Ibadan, Nigeria. Proceeding Ibadan, v. 2, p.138-151, 1979.

DEUS, K.M.; SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; BUTTERS, M.P.; BLACK, W.C.; FOY, B.D. The effect of Ivermectin in seven strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) including a genetically diverse laboratory strain and three Permethrin resistant strains. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 2, p. 356-363, 2012.

DIETRICK, E.J. An improved backpack motor fan for suction sampling of insect populations. **Journal of Economic Entomology**, v. 54, n. 2, p. 394–395, 1961.

DI OLIVEIRA, José R.G.; FERREIRA, Marcelo C.; ROMAN, Rodrigo A.A. Diferentes diâmetros de gotas e equipamentos para a aplicação de inseticida no controle de *Pseudoplusia includens*. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 1, p. 92-99, 2010.

DONALÍSIO, Maria Rita D. **O Dengue no Espaço Habitado**. São Paulo: Hucitec; 1999.

DONALÍSIO, Maria Rita D.; GLASSER, Carmen M. Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-272. 2002.

DOONG, Ruey. A.; CHANG, Wen H. Photoassisted iron compound catalytic degradation of organophosphorus pesticides with hydrogen peroxide. **Chemosphere**, v. 37, n. 13, p. 2563-2572, 1998.

DORTA, Domingo M.; VASUKI, V.; RAJAVEL, A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquitoes species. **Revista de Saúde Pública**, v, 27, n. 6, p. 391-397, 1993.

DORTA, Domingo M.; RODRÍGUEZ, M. Castex; DELGADO, S.Suárez; SÁNCHEZ, D.Figueiredo; SILVA, M.Leyva. Estado de la resistencia a insecticidas em adultos del mosquito *Aedes aegypti* del municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, n. 2, p. 137-142, 2005.

DOUGLAS, R.B. The hazard of pooting insects. **Antenna**, v. 8, p. 193–194, 1984.

EICHINER, Florian B.; HOEBEKE, E. Richard; NARTSHUK, Emilia P. A new species of *Calamoncosis* Enderlein (Diptera: Chloropidae) associated with common reed, *Phragmites australis* (Poaceae), in Eastern North America. **Proceedings of the Encomological Society of Washington**, v. 113, n. 2, p. 109-118, 2011.

EIRAS, Alvaro E.; JEPSON, Paul C. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. **Bulletin of Entomological Research**, v. 81, n. 2, p. 151-160, 1991.

[EPA]. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticide environmental fate one line summary: methamidophos**. Washington, DC: Environmental Fate and Effects Division, 1989.

ESTENIK, J.F.; FEDERLE, P.F. The susceptibility of an adult damselfly, *Ischnura verticalis*, to selected insecticides **Ohio Talaromyces**, v. 75, n. 2, p. 81-82, 1975.

EVANS, D.M; MCLEOD, J.J.; PASCOE, L. & MEMMOTT, J. The efficiency of a vacuum device for estimating soil-surface seed abundance on lowland farms. **Research**, v. 49, n. 3, p. 337-340, 2009.

FARNHAM, A.W.; MURRAY, A.W.A.; SAWICKI, R.M.; DENHOLM, I.; WHITE, J.C. Characterization of the structure activity relationship of kdr and two variants of super-kdr to pyrethroids in the housely (Musca domestica). **Pesticide Science**, v. 19, n. 3, p. 209–220, 1987.

FERNANDES, Ana P.; PARREIRA, Renata S.; FERREIRA, Marcelo C.; ROMANI, Gustavo N. Caracterização do perfil de deposição e do diâmetro de gotas e otimização

do espaçamento entre bicos na barra de pulverização. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n.3, p. 728-733, 2007.
FERRARI, James A. **Insecticide resistance**. In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado, 1996.
FFRENCH-CONSTANT, Richard H.; ROUSH, R.T. **Resistance detection and documentation**. In: Roush, R.T.; Tabashnik, B.E., eds., Pesticide Resistance in Arthropods, Chapman & Hall, NY, 1990.
FFRENCH-CONSTANT, Richard H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, N. Why there so few resistance-associated mutation target genes? **Philosophical Transactions of the Royal Society London**, v. 353, n. 1376, p. 1685-1693, 1998.
FIELD, W.N.; HITCHEN, J.M.; REES, A.T. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide Malathion. **Journal of Medical Entomology**, v. 21, n. 4, p. 412-418, 1984.
FISK, F.W. Studies on proteolytic digestion in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 43, p. 555-557, 1950.
FLEURAT-LESSARD, Francis.; VIDAL, M.L.; BUDZINSKI, H. Modeling biological efficacy decrease and rate of degradation of chlorpyrifos-methyl on wheat stored under controlled conditions. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 341-354, 1998.
FLORES, Adriana E.; SILVA, Brenda G.; BOBADILLA, Cristina; AERCADO, Roberto; PONCE, Gustavo. Resistance profile to pyrethroids in *Aedes aegypti* from the east coast of México. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 3, p. 318, 2010.
FOCKS, D.A.; KLOTER, K.O. & CARMICHAEL, G.T. The impact of sequential ultra-low volume ground aerosol applications of malathion on the populations dynamics of *Aedes aegypti* (L.). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 3, p. 639-647, 1987.
FONSECA-GONZALEZ, Idalyd; QUINONES, Martha L.; LENHART, Audrey; BROGDON, Willian G. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. **Pest Management Science**, v. 67, n. 4, p. 430-437, 2011.
FORATTINI, Oswaldo P. **Entomologia Médica**. Parte Geral, Diptera, Anophelini, vol. 1, pág. 279. Editora Universidade de São Paulo, 1962.
FORATTINI, Oswaldo P.; GOMES, Amério C.; NATAL, Delsio; KAKITANI, Iná; MARUCCI, Daniel. Preferências alimentares de mosquitos culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, **Brasil. Revista de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 171-187, 1987.
FRANCISCO, Odair. **Moscas dos gêneros *Hippelates* Loew, 1863 e *Liohippelates* Duda, 1929 (Diptera: Chloropidae): levantamento, sazonalidade e parâmetros biológicos**. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
FREE, J.B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 79 p., 1980.
[FUNASA] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Relatório da reunião de avaliação do monitoramento da resistência das populações de *Aedes aegypti* do país**. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
[FUNASA] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue - Instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de Normas Técnicas**. 3º ed. Brasília. 84 p., 2001a.

[FUNASA] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Controle de vetores – Procedimentos de segurança**. Brasília, 2001b.
[FUNASA] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília. 34p, 2002.
GALVÃO, D M. **Catálogo dos defensivos agrícolas**, 1º suplemento, Brasília, Divisão de Produtos Fitossanitários, 1978.
GAONA, Jairo C.; ANDRADE, Carlos Fernando S. Protocolo para avaliação de susceptibilidade e monitoramento da resistência a inseticidas químicos usados no controle de mosquitos. 4º ed., Documento Interno. Disponível em: <http://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/Protocol_Suscep_Jairo2005.pdf>, 2005. Acesso em: 07 Nov. 2012.
GARCIA, G.P.; FLORES, A.E.; FERNANDEZ-SALAS, I.; SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; REYES-SOLIS, G.; LOZANO-FUENTES, S.; BOND, J.G.; CASAS-MARTINEZ, M; RAMSEY, J.M.; GARCIA-REJO, J.; DOMINGUES-GALERAS, M; RANSON, H.; HEMINGWAY,J.; EISEN, L; BLACK, W.C. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 531, 2009.
GEBARA, Amir B.; ALMEIDA, Maria C. Avaliação de termonebulizações de propoxur contra mosquitos através de testes biológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 1, p. 1-7. 1988.
GEORGHIOU, G.P.; METCALF, R.L. A bioassay method and results of laboratory evaluation of insecticides agains adult mosquitoes. **Mosquito News**, v. 24, p. 328-337, 1961.
GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Pesticide resistance as an evolutionary phenomenon. **Proceedings of XV International Congress Entomology**, p. 759-85, 1976.
GILLET, J.D. Natural selection and feeding speed in a blood-sucking insect. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 167, n. 1008, p. 316-329, 1967.
GILOTRA, S., SCHULTE, W., ANDERSON. C., CARMICHAEL, G., STOKES, G.; RICHE, S. Determination of susceptibility of mosquitoes to non-persistent inseticides by micro injections. **Mosquito News**, v. 32, n. 3, p. 358-363, 1972.
GOLDMAN, I.F.; ARNOLD, J.; CARLTON, B.C. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, n. 3, p. 317-324, 1986.
GONZALEZ, Gabriela; PONCE, Gustavo; QUIROZ-MARTINEZ, Humberto; GARCIA, Julian E.; FLORES, Adriana E. Insecticide resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Mérida, Yucatan, Mexico, related with two dengue transmission seasons. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 2, p. 103, 2012.
GUBLER, D.J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. **American Journal of the Troical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 6, p. 571-8. 1989a.
GUBLER, D.J. **Dengue**. In: MONATH, T.P. The arboviruses epidemiology and ecology, vol.2, Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 223-260, 1989b.
GUEDES, Jerson V.C.; BORTOLUZZI, Glaucia; BRACKMANN, Auri; COSTA, Ervandil C. Controle de *Sitophilus zeamais* Mots. através de diferentes concentrações de CO_2 e O_2. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 177-180, 1996.

GUERENSTEIN, Pablo G.; CHRISTENSEN, Thomas A.; HILDEBRAND, John G. Sensory processing of ambient CO_2 information in the brain of the moth *Manduca sexta*. **Journal Comparative Physiology**, v. 190, n. 9, p. 707-725, 2004.
GUERENSTEIN, Pablo G.; HILDEBRAND, John G. Roles and effects of environmental carbon dioxide in insect life. **Annual Reviews Entomology**, v. 53, p. 161-178, 2008.
HAILE, D.G.; MOUNT, G.A.; PIERCE, N.W. Effect of droplet size of malathion aerosols on kill of caged adult mosquitoes. **Mosquito News**, v. 42, n. 4, p. 576-583, 1982.
HALSTEAD, S. B. *Aedes aegypti*: why can t we control it? **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v. 1113, n. 2, p. 304-11, 1988.
HAMACHER, L.S.; FARONI, L.R.D'A.; GUEDES, R.N.C.; QUEIRÓZ, M.E.L.R. Persistence and activity towards *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) of pirimiphos-methyl sprayed at different temperatures on maize. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 167-175, 2002.
HARPER, Craig A.; GUYNN, David C. A terrestrial vacuum sampler for macroinvertebrates. **Wildlife Society Bulletin**, v. 26, n. 2, p. 302-306, 1998.
HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. *Entomology in human and animal health*. Macmillan Publishing Co. New York. 548 p. 1979.
HASSAL, A. K. **The biochemistry and uses of pesticides: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection**. 2 nd ed. Weiheim: VCH, 1990.
HEMINGWAY, Janet; KARUNARATNE, Sarah H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 1998.
HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hilary. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 371-391, 2000.
HIDAYATI, H.; NAZNI, W.A.; LEE, H.L.; SOFIAN-AZIRUN, M. Insecticide resistance development in *Aedes aegypti* upon selection pressure with Malathion. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 2, p. 425-437, 2011.
HIMEL, Cheseter M.; MOORE, Arthur D. Spruce budworm mortality as a function of serial spray droplet size. **Science**, v. 156, n. 3779, p. 1250-1251, 1967.
HOFFMANN, W.Clint; FRITZ, Badley K.; FAROOQ, Muhammad; COPERBAND, Mirian F. Effects of wind speed on aerosol spray penetration in adult mosquito bioassay cages. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 3, p 419-426, 2008.
HOLWAY, R. T., MORRIL, A. W.; SANTANA, F. Y. Mosquito control activities of the U. S. armed forces in the republic of Vietnam. **Mosquito News**, v. 27, n. 3, p. 297-307, 1967.
HOWE, R.W. Temperature effects on embryonic development in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 12, p. 16-41, 1966.
HURD, Paul D. Myiasis resulting from the use of the aspirator method in the collection of insects. **Science**, v. 119, n. 3101, p. 814–815, 1954.
[IBGE]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná: Safra 1998/1999**. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/default.shtm>. Acesso em: 17 Jun. 2010.
IRINO, K., LEE, I.M.L., KAKU, M., BRANDILEONE, M.C.C., MELLES, C.E.A., LEVY, C.E., BERKLEY, S.E., FLEMING, D.W., SILVA, G.A.; HARRISON, L. Febre purpúrica brasileira: Resultados preliminaries da investigação etiológica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 174-177. 1987.

JAY, E. **Recent advances in the use of modified atmospheres for the control of stored product insects**. In: BAUR, F.J. Insect management for storage and processing, Saint Paul : A.A.C.C., 453 p., 1983.

JAYAS, D.S.; KHANGURA, B.; WHITE, D.G. Controlled atmosphere in storage grains. **Posth News and Information**, v. 2, n. 6, p 422-427, 1991.

JEFFEERY, Geoffrey M. Blood meal volume in *Anopheles quadrimaculatus*, *A. albimanus* and *Aedes aegypti.* **Experimental Parasitology**, v. 5, n. 4, p. 371-375, 1956.

JENSEN, Dorthe; OVERGAARD, Johannes; SORENSEN, Jesper G. The influence of developmental stage on cold shock resistance and ability to cold-harden in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 2, p. 179–186, 2007.

JIANG, Yongxing; MULLA, Mir S. Susceptibility of the eye gnat *Liohippelates collusor* (Diptera: Chloropidae) to neonicotinoids and spinosad insecticides. **Journal of Vector Ecology**, v. 31, n. 1, p. 65-70, 2006.

JUNTARAJUMNONG, Waraporn; PIMNON, Sunthorn; BANGS, Michael J.; THANISPONG, Kanutcharee; CHAREONVIRIYAPHAP, Theeraphap. Discriminating lethal concentrations and efficacy of six pyrethroids for control of *Aedes aegypti* in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 1, p. 30-37, 2012.

KAMGANG, Basile; MARCOMBE, Sébastien; CHANDRE; Fabrice; NCHOUTPOUEN, Elysée; NWANE, Philippe; ETANG, Josiane; CORBEL; Vincent; PAUPY, Christophe. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 79, 2011.

KARUNARATNE, Sarah H.P.P.; HEMINGWAY, Janet. Malation resistance and prevalence of the Malation carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 11, p. 1060-1064, 2001.

KILIC, Tulin; YOLDAS, Zeynep. Insect pests determined in fresh onion fields in Ismir province. **Turkiye Entomoloji Dergisi-Turkish Journal of Entomology**, v. 36, n. 2, p. 287-298, 2012.

KIM, C.W.; HONG, C.S. Allergy to miscellaneous household arthropods. **Protein & Peptide Letters**, v. 14, n. 10, p. 982–991, 2007.

KNIGHT, J.D.; BALE, J.S.; FRANKS, F.; MATHIAS, S.F.; BAUST, J.G. Insect cold hardiness: supercooling points and pre-freeze mortality. **Cryo-Letters**, v. 7, p.194–203, 1986.

Knight, A.L; G.W. Norton. 1989. Economics of agricultural pesticide resistance in arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 297- 313.

KNODELL, Janet J.; BEAUZAY, Patrick B; ERICSMOEN, Eric D.; PEDERSON, Jeremy D. Pest management of wheat stem maggot (Diptera: Chloropidae) and wheat stem sawfly (Hymenoptera: Cephidae) using insecticides in spring wheat. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 26, n. 4, p. 183-197, 2009.

KOHN, M. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) to DDT in Kampuchea. **Folia Parasitologica**, v. 39, p. 269-274, 1991a.

KOHN, M. Resistance levels of nine mosquito species to 4% DDT in Fhnon Penh, Kampchea. **Folia Parasitologica**, v. 38, p. 261-268, 1991b.
KOMALAMISRA, Naruman; SRISAWAT, Raweewan; PHANBHUWONG, Theerawit; OATWAREE, Sompis. Insecticide susceptibility of the dengue vector, *Aedes aegypti* (L.) in Metropolitan Bangkok. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine an Public**, v. 42, n. 4, p. 814-826, 2011.
KONAN, Lucien Yao; COULIBALY, Ibrahima Z.; KONE, Blaise A.; ZIOGBA, Jean-Claude T.; DIALLO, Adama; EKRA, Danie O.K. *Aedes aegypti* susceptibility to insecticide from Abidjan city, Cote D´ivoire. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 4, p. 325-329, 2012.
KOUKUREC, V. Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in gas chromatographic analysis of residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2, p. 297-304, 1998.
KUBIK, Stepan. Two new species of *Pselaphia* (Diptera, Chloropidae) from Zambia. **Biologia**, v. 61, n. 2, p. 159-160, 2006.
KUMM, H. W.; TURNER, T. B.; PEAT, A. A. The duration of the mobility of spirochaetes of yaws in a small west Indian fly – *Hippelates pallipes* Loew. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 15, p. 209 – 223. 1935.
KUNKEL, L.O. Studies on aster yellows. **American Journal of Botany**, v. 13, p. 646–705, 1926.
LATTA, R., ANDERSON, L. D.; ROGERS, E. E. The effect of particle size and velocity of movement of DDT aerosols in a wind tunnel on the mortality of mosquitoes. **Journal of the Washington Academy of Science**, v.15, p. 397-407, 1947.
LATHAM, Mark. Aspects to consider for vector control. Disponível em: <http://pep.wsu.edu/drift04/pdf/proceedings/pg97-101_Latham.pdf>. Acesso em: 05 Nov. 2012.
LEDSON, M.; MATTHEWS, G.A. Droplet spectra with thermal foggers. **Aspects of Applied Biology** v. 33, p.125–130, 1992.
LEE Jr., Robert E.; CHEN, Chien P.; DENLINGER, David L. A rapid cold-hardening process in insects. **Science**, v. 238, n. 4832, p. 1415–1417, 1987.
LEHANE, Mike J. **Biology of blood-sucking insects**. Harper Collins Academic, London, 1991.
LEORA Software. **POLO-PC: a user´s guide to Probit or Logit analysis**. LeOra Software, Berkeley, CA, 1987.
L'HERITIER, P.H.; TEISSIER, G. Une anomalie physiologique he´re´ditaire chez la Drosophile. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**. Paris, v. 231, p. 192 –194, 1937.
LIMA, Francisco J.C.; MARQUES, Paulo R.B.O.; NUNES, G.S.; TANAKA, Sônia M.C.N. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 11, 2001.
LIMA José B.P., PEREIRA-DA-CUNHA Maurício; SILVA Jr, Regina C.S.; GALARDO Alan K.R.; SOARES, Sidney S.; BRAGA Ima A., RAMOS, R.P.; VALLE, Denise. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329-333. 2003.
LIMA, Estelita P.; OLIVEIRA FILHO, Alfedro M.O.; LIMA, José W.O.; RAMOS Jr., Alberto N.; CAVALCANTI, Luciano P.G.; PONTES, Ricardo J.S. Resistência do *Aedes*

aegypti ao Temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.
LIMA, Estelita P.; PAIVA, Marcelo H.S.; ARAÚJO, Ana Paula; DA SILVA, Élyda V.G.; DA SILVA, Ulisses M.; OLIVEIRA, Lúcia N.; SANTANA, Antonio E.G.; BARBOSA, Clarisse N.; PAIVA NETO, Clovis C.; GOULART, Marilia O.F.; WILDING, Craig S.; AYRES, Constância F.J.; SANTOS, Maria Alice V. M. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 5, 2011.
LINDSAY, Dale R.; STEWART, Willian H.; WATT, James.Effect of fly control on diarrheal in an area of moderate morbidity. **Public Health Reports**, v. 68, n. 4, p. 361-367, 1953.
LIU, Xiao-Yan; YANG, Ding; NARTSHUK, Emilia P. Species of the genus *Thressa* Walker, 1860 from China (Diptera, Chloropidae). **Zookeys**, n. 129, p. 29-48, 2011.
LIU, Xiao-Yan; YANG, Ding. Species of the genus *Ensiferella* Andersson from China, with a key to world species (Diptera, Chloropidae). **Zootaxa**, n. 30207, p. 54-62, 2012a.
LIU, Xiao-Yan; YANG, Ding. The genus *Centorisoma* Becker in China, with a key to world species (Diptera, Chloropidae). **Zootaxa**, n. 3361, p. 18-32, 2012b.
LOFGREN, C. S. Ultra low volume applications of concentrated insecticides in medical and veterinary entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 15, p. 321-342, 1970.
LOFGREN, C.S. Ultralow volume (ULV) application of insecticides. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 5, p. 819-824, 1972.
LOFGREN, C. S., ANTHONY, D. W.; MOUNT, G. A. Size of aerosol droplets impinging on mosquitoes as determined with a Scaning eletron microscope. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 5, p. 1085-1088, 1973.
LOTHROP, H.D.; HAUNG, H.Z.; LOTHROP, B.B.; GEE, S.; GOMSI, D.E.; REISEN, W.K. Deposition of pyrethrins and piperonyl butoxide following aerial ultra-low-volume applications in the Coachella Valley, California. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2, p. 213-219, 2007.
LUDVIK, G.F. Topical application of insecticide solutions to *Anopheles quadrimaculatus*. **Journal of Economic Entomology**, v. 46, p. 364-365, 1953.
LUZ, P.M.; CODEC, C.T.; MEDLOCK, J.O.; STRUCHINER, C.J.; VALLE. D & GALVANI, A.P. Impact of insecticide interventions on the abundance and resistance profile of *Aedes aegypti*. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 8, p. 1203–1215, 2009.
MACORIS, Maria de Lourdes G.; ANDRIGHETTI, Maria Teresa M.; TAKAKU, Luis; GLASSER, Carmen M.; GARBELOTO, Vanessa C; CIRINO, Vanusa C.B. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 4, p. 521-522, 1999.
MACORIS, Maria de Lourdes G.; ANDRIGHETTI, Maria Teresa M.; TAKAKU, Luis; GLASSER, Carmen M.; GARBELOTO, Vanessa .C.; BRACCO, José E. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.
MACORIS, Maria de Lourdes G.; ANDRIGHETTI, Maria Teresa M.; OTRERA, Vanessa C.G.; CARVALHO, Lídia R.; CALDAS Jr., Antonio L.; BROGDON, Willian G. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 895-900, 2007.

MAESTRE, Ronald S.; REY, Gabriela V.; DE LAS SALAS, Jorge A.; VERGARA, Consuelo S.; SANTACOLOMA, Liliana V.; GOENAGA, Sergio O.; CARRASQUILLA, Maria Cristina F. Susceptibility status of *Aedes aegypti* to insecticides in Atlântico (Colombia). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 36, n. 2, p. 242-248, 2010.
MALATO, S.; BLANEO, J.; RICHTER, C.; MIIOW, B.; MALDONADO, M.I. Solar photocatalytic mineralization of commercial pesticides: methamidophos. **Chemosphere**, v. 38, n. 5, p. 1145-1156, 1999.
MARCOMBE, Sébastien; MATHIEU, Romain B.; POCQUET, Nicolas; RIAZ, Muhammad A.; POUPARDIN, Rodolphe; SÉLIOR, Frédéric; REYNAUD, Stéphane; YÉBAKIM, André; CORBEL; Vincent; DAVID, Jean P.; CHANDRE, F. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, e30989. doi:10.1371/journal.pone.0030989, 2012.
MARQUES FILHO, Carlos A.M. Controle de mosquitos em área urbana do município de São Paulo, mediante aplicação aérea de larvicidas biológicos. Relatório versão 1.0 (Minuta), 2010. Disponível em: <http://www.crbiodigital.com.br/portal?txt=30773539>. Acesso em: 30 Nov. 2012.
MARTINEZ, Antonio; CICHERO, Julio A.; REAÑO, Ismael; GONZALEZ, FREDERICO E. Control of *Triatoma infestans* (Klug) with Malation concentrate. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 6, p. 653-657, 1975.
MARTINS, Ademir J.; RIBEIRO, Camila D.M.; BELLINATO, Diogo F.; PEIXOTO, Alexandre A.; VALLE, Denise; LIMA, José B.P. Effect of insecticide resistance on development longevity and reproduction of fiel or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, e31889. doi:10.1371/journal.pone.0031889, 2012.
MATTHEWS, GA. **Pesticide Application Methods**. London: Blackwell Science, 2000. 432p.
MATUO, T. **Tecnologia de aplicação de defensivos**. In: Graziano Neto coord. **Uso de agrotóxicos e receituário agronômico***,* São Paulo, Agroceres, 1982.
MELO, Adriano S.; WHEELER, Terry A. A new species of *Pseudogaurax* Malloch (Diptera: Chloropidae) reared from dobsonfly egg-masses (Megaloptera: Corydalidae) in Brazil. **Zootaxa**, n. 1972, p. 53-58, 2009.
MEISCH, M.V.; DAME, D.A.; GROOVES, R.L.; NUNEZ, R. Assessment of *Anopheles quadrimaculatus* response to permethrin and resmethrin by topical applications. **Journal of American Mosquito Control Association**, v. 10, n.3, p. 437–439, 1994.
MERZ, Bernhard. Two new species of Chloropidae (Diptera) from Switzerland. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 115, n. 4, p. 661-676, 2008.
MLYNAREK, Julia J.; WHEELER, Terry A. *Camptopeltes*, a new Neotropical genus of oscinelline Chloropidae (Diptera). **Canadian Entomologist**, v. 142, n. 3, p. 193-199, 2010.
MONTELLA, Isabela R.; MARTINS, Ademir J.; VIANA-MEDEIROS, Priscila F.; LIMA, José B.P.; BRAGA, Ima A.; VALLE, Denise. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.
MONTELLA, Isabela R.; SCHAMA, Renata; VALLE, Denise. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437-449, 2012.

MOUNT, G. A. Optimum droplets size for adult mosquito control with space sprays or aerosols of insecticides. **Mosquito News**, v. 30, n 1, p. 70-75, 1970.
MOUNT, G.A.; BIERY, T.L.; HAILE, D.G. A review of ultra low volume aerial sprays of insecticide for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Controle Association**, v. 12, p. 601 -618, 1996.
MULLEN, M.A.; ARBOGAST, R.T. **Low-temperatures to control stored product insetcs.** In: BAUR, F.J. Insect management for food storage and processing. Saint Paul, A.A.C.C., 453 p., 1983.
MULYATNO, Kris C.; YAMANAKA, Atsushi; NGADINO, Ngadino; KONISHI, Eiji. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) larvae to temephos in Surabaya, Indonesia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public**, v. 43, n. 1, p. 29-33, 2012.
MURPHEY, F.J.; DARSIE, R.F. Jr. A mechanical aspirator for collecting adult mosquitoes. **Proceedings of the New Jersey Mosquito Extermination Association**, v. 49, p. 115–117, 1962.
NARTSHUK, Emilia P.; PRZHIBORO, Andrey A. A new species of *Incertella* Sabrosky (Diptera: Chloropidae) from the Wite Sea coast, Russian Karelia. **Entomologica Fennica**, v. 20, n. 1, p. 4-8, 2009.
NARTSHUK, Emilia P. Three new species of Chloropidae (Diptera) from southern Sardinia. **Zootaxa**, n. 2318, p. 545-551, 2009.
NARTSHUK, Emilia P. Grassflies of the Tribe Elachpterini (Diptera: Chloropidae) from Vietnam and Thailand, with description of a new species. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 56, n. 3, p. 265-272, 2010a.
NARTSHUK, Emilia P. To the knowledge of the grassflies (Diptera: Chloropidae) of Greece with description of two new species. **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 62, n. 1, 61-70, 2010b.
NARTSHUK, Emilia P. A check list of the world genera of the family Chloropidae (Diptera, Cyclorrhapha, Muscomorpha). **Zootaxa**, n. 3267, p. 1-43, 2012.
NASCI, R.S. A light weight battery powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. **Mosquito News**, v. 41, n. 4, p. 808-811, 1981.
NATAL, Delsio; MARUCCI, Daniel. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 418-420, 1984.
NAUEN, Ralf. Insecticide mode of action: Return of the ryanodine receptor. **Pest Management Science**, v. 62, n. 8, p. 690-692, 2006.
NAUEM, Ralf. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. **Pest Management Science**, v. 63, n. 7, p. 628-633, 2007.
NAUEN, Ralf; McCAFFERY, Alan. **Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). Prevetion and Management of Insecticides Resistance in Vectors and Pests of Public Health Importance**. Disponível em: <http://www.irac-online.org>. Acesso em: 14 Jun 2010.
NELSON, D.B.; CHAMBERLAIN, R.W. A light trap and mechanical aspirator operating on dry cell batteries. **Mosquito News**, v. 15, n. 1, p. 28–32, 1955
NICHOLLS, Lucius. The transmission of pathogenic microorganisms by flies in St. Lucia. **Bulletin of Entomological Research**, v. 3, n. 1, p. 81– 88. 1912.
NICOLAS, G.; SILLANS, D. Immediate and latent effects of carbon dioxide on insetcs. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 97-116. 1989.

NILSON, Theresa L.; SINCLAIR, Brent J.; ROBERTS, Stephen P. The effects of carbon dioxide anesthesia and anoxia on rapid cold-hardening and chill coma recovery in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 1027-1033, 2006.
NUÑEZ, Josué A. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus*. **Bulletin of Insect Entomological Research**, v. 72, n. 2, p. 253-262, 1982.
OLIVEIRA, Roberto C.; FONSECA, Alysson R.; SILVA, Cláudio G.; SIDNEY, Lívia A.; FERREIRA, Cleyton P.S. Fauna de dípteros em uma área de cerrado no município de Divinópolis, estado de Minas Gerais. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas, v. 2, n. 2, p. 3-7, 2008.
[OMS] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Serie de Informes Técnicos, Nº 585. **Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas** (22º Informe del Comité de Expertos de la OMS em Insecticidas), 1976.
[OMS] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. WHO/VBC/81.807. 1981.
[OMS] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Métodos químicos de lucha contra artrópodos vectores y plagas de importancia para la salud pública**. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1984.
[OMS] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Serie de Informes Técnicos, Nº 737. **Resistencia de los vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas** (10º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biologia de los Vectores y Lucha Antivetctorial), 1986.
[OMS] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Serie de Informes Técnicos, Nº 818. **Resistencia de vectores de enfermedades a los plaguicidas** (15º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biologia de los Vectores y Lucha Antivetctorial), 1992.
[OPAS] ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**. Washington. Publicação Científica nº 548. 109 p. 1995.
OPPENOORTH, F.J. **Biochemical and genetic in insecticide resistance**. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology, v. 12, p. 731-773,1985.
OZEROV, A.L. To knowledge of European species of the genus *Meromyza* (Diptera: Chloropidae). **Zoologichesky Zhurnal**, v. 88, n. 1, p. 127-128, 2009.
PAEPORN, Pungasen; SUPAPHATHOM, Kasin; SATHANTRIPHOP, Sunayana; MUKKHUN, Pongsakorn; SANGKITPORN, Somchai. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* in tsunami-affected areas in Thailand. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 210-213, 2005.
PANT, C. P.; MOUNT, G. A.; JATANASEN, S.; MATHIS, H. L. Ultra-low-volume ground aerosols of technical Malation for the control of *Aedes aegypti* L. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 45, n. 6, p. 805-817, 1971.
PANT, C.P.; MATHIS, H.L.; NELSON, M.J.; PHANTHUMACHINDA, B. A large-scale field trial of ultra-low-volume fenitrothion applied by a portable mist blower for the control of *Aedes aegypti*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 4, p. 409-415, 1974.
PALCHICK, S. **Chemical Control of Vectors** In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado; 1996.
PAYNE, N.; RETNAKARAN, B.; CADOGAN, B. Development and evaluation of a method for the design of spray applications: aerial tebufenozide applications to control

the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). **Crop Protection**, v. 16, n. 3, p. 285-290, 1997.
PENNER, Rolf. Mosquito Control with Malathion: Are There Public Health Consequences? Frontier Centre for Public Policy, 2005. Disponível em: <http://www.fcpp.org/pdf/FB037Malathionpdf.pdf>. Acesso em: 30 Nov 2012.
PEREIRA DA-CUNHA Maurício, LIMA, José B.P., BROGDON, Willian G., MOYA, Gonzalo E.; VALLE, Densise. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 441-4. 2005.
PERRON, J.M.; HUOT, L.; CORRIVAULT, G.W.; CHAWLA, S.S. Effects of carbon dioxide anaesthesia on *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 18, p. 1869-1874, 1972.
PIMENTEL, Marco A.G.; FARONI, Leda R.D.; GUEDES, Raul N.C.; GONÇALVES, José R.; OLIVEIRA, Carlos R.F. Eficácia biológica de bifentrina aplicado em milho armazenado sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 263-267, 2005.
POLSON, Karen A.; RAWLINS, Samuel C.; BROGDON, Willian G.; CHADEE, Dave D. Organophosphate resistance in Trinidad and Tobago strains of *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 4, p. 403-410, 2010.
POLSON, Karen; RAWLINS, Samuel C.; BROGDON, Willian G.; CHADEE, Dave D. Characterisation of DDT and Pyrethroid resistance in Trinidad an Tobago populations of *Aedes aegypti*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, n. 4, p. 435-441, 2011.
PONTES, Ricardo J.S.; DAL FABBRO, Amaury L.; ROCHA, Gutemberg M.; SANTIAGO, Roseli C.; FIGUEIREDO, Luis T.M.; CASTRO e SILVA, Ana Aalice M.C.; GAROTTI, Vilma D.O.; PYNTIÁ, Josely M.P. Epidemia de dengue em Ribeirão Preto, SP, Brasil: Nota prévia. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 315-317, 1991.
PORTARIA GR nº 084 de 23/10/2001. Disponível em: <http://www.cecom.unicamp.br/dengue/index.php?option=com_content&view=article&id=59>. Acesso em: 30 Nov 2012.
QUINN, W.G.; DUDAI, Y. Memory phases in *Drosophila*. **Nature**, 262: 576-577, 1976.
RATHBURN Jr., C. B. Insecticides for the control of mosquitoes and other dipteras. **Mosquito News**, v. 39, n. 1, p. 58-61, 1979.
REED, J.T.; SMITH, D.B. Droplet size and spray volume effects on insecticide deposit and mortality of *Heliothine* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 3, p. 640-647, 2001.
REILLY, Lucy A.; FAVACHO, Joana; GARCEZ, Lourdes M.; COURTENAY, Orin. Preliminary evidence that synanthropic flies contribute to the transmission of trachomacausing *Chlamydia trachomatis* in Latin América. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 7, p. 1682-1688, 2007.
REITER, Paul; GUBLER, D.J. **Surveillance and control of urban dengue vectors. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. D.J. Gubler and G. Kuno. CAB International, p. 425-462. 1997.
REITER, Paul; NATHAN M.B. **Guidelines for assessing the efficacy of insecticide space sprays for the control of the Dengue vector *Aedes aegypti***. WHO/CDS/CPE/PVC/2001.1. 34, p. 2001.
RICHARDS, Stephanie L.; PONNUSAMY, Loganathan.; UNNASCH, Thomas R.; HASSAN, Hassan K.; APPERSON, Charles S. Host-Feeding Patterns of *Aedes*

albopictus (Diptera: Culicidae) in Relation to Availability of Human and Domestic Animals in Suburban Landscapes of Central North Carolina. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 3, p. 543–551, 2006.
RISTICH, S.S.; LOCKARD D. An aspirator modified for sampling large populations. **Journal of Economic Entomology**, v. 46, p. 711–712, 1953.
RIVERO, Ana; VÉZILIER, Julien; WEILL, Myléne; READ, Andrew F.; GANDON, Sylvain. Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? **PloS Pathogens**, v. 6, n. 8, e1001000. doi:10.1371/journal.ppat.1001000, 2010.
ROBERTS, D.B. (ed.). ***Drosophila*. A practical approach**. IRL Press, U.K., 1986.
ROBINSON, J.W. **Operational Program requirements – Moves to the Future, Proc. Spray efficacy**. Research Group (SERG), Mosquito Control session, Wheeling WV, USA, 2001.
ROBERTSON, J.L.; RUSSEL, R.M.; PREISLER, H.K.; SAVIN, N.E. **Bioassays with Arthropods**. 2nd ed., CRC Press, FL, 2007.
RODRIGUEZ, Maria M.; BISSET, Juan A.; DÍAZ, Cristina; SOCA, Lázaro A. Resistência cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con e insecticida organofosforado malation. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, n 3, p.105-111, 2003.
RODRIGUEZ, Maria M.; BISSET, Juan A.; FERNÁNDEZ, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n 4, p. 420-429, 2007.
ROLDAN, Susanne C.A.; BROCHERO, Helena L. Status of insecticide resistance in natural populations from *Aedes aegypti* and KAP surveys of dengue vector in Casanare, Colombia. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 3, p. 314, 2010.
RONG, Loke S.; ANN, Andy T.W.; AHMAD, Nazni W.; LIM, Lee H.; AZIRUM, Mohd S. Insecticide susceptibility status of field-collected *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) at a dengue endemic site in Shah Alam, Selangor, Malaysia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public**, v. 43, n. 1, p. 34-47, 2012.
SABROSKY, C.W. Chloropidae. *In* McALPINE, J. F.; PETERSON, B. V.; SHEWELL, .E.; TESKEY, H. J.; WOOD, VOCKEROTH, J. R.; WOOD, D. M. (eds.) *Manual of Neartic Diptera*. Biosystematics research Centre, Agric. Canada, Monograph 28. v. 2, p. 1049 – 1067. 1987.
SAELIM, V.; BROGDON, W.G.; ROJANAPREMSUK, J.; SUVANNADABBA, S.; PANDIL, W.; JONE, J.W.; SITHIPRASASNA, R. Bottle and biochemical assays on Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 2, p. 417-425, 2005.
SÁNCHEZ, A. M., TONN, R., URIBE, L. J.; CARNEIROS, L. B. Comparación de la eficacia de varios métodos de aplicación de inseticidas para el control o la erradicación del *Aedes aegypti* em Colombia. **Boletím de la Oficina Sanitaria Panamericana,** v. 84, p. 24-37, 1978.
SANDERS, D. A. Hippelates flies as vector of bovine mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 97, n. 763, p. 306–308, 1940.
SANTAMARÍA, Erika, MUNSTERMANN, Leonard E.; FERRO, Cristina. Aproximación al método CDC para determinar susceptibilidad a insecticidas en vectores de leishmaniasis. Biomédica, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2003.

SAWICKI, R.M. **Definition, detection and documentation of insecticide resistance**. In: Combating resistance to xenobiotics: Biological and chemical approaches. Chichester, England: Ellis Horwood, 1987, p. 105.

SAYER, H. J. An ultra-low-volume spraying technique for the control of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk). **Bulletin of Entomological Research,** v. 50, n. 2, p. 371-386, 1959.

SCHWARTZ, P.H. Aspirator for rapid sexing and transfer of eye gnats *Hippelates pusio*. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, p. 784–786, 1964.

SCOTT, Jeffrey G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 9, p. 757-777, 1999.

SECRETARIA de Vigilância em Saúde/MS. Febre do Nilo Ocidental. Cardeno 9. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_febre_do_nilo_ocidental.pdf>. Acesso em: 05 Dez. 2012.

SEELEY, Thomas D.. Atmospheric carbon dioxide regulation in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. **Journal Insect Physiology**, v. 20, n. 11, p. 2301-2305, 1974.

SERRANO, Ronald Y.M.; GOENAGA-OLAYA, Sergio J. Susceptibility status of *Aedes aegypti* to cyfluthrin and permethrin in Atlantico, Colombia. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 3, p. 308, 2010.

SHERLOCK, Ítalo A.; MUNIZ, T. M. Combate ao *Panstrongylus megistus* com Malation concentrado. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 9, p. 289-296, 1975.

SILVA, Marcos; Nascimento, Lílian C.N; CUNHA, Arnaldo C. **Destinação final de inseticidas vencidos, de suas embalagens e outros inservíveis**. Instrução Normativa nº 4. Secretaria de Estado da Saúde – Superintendência de Controle de Endemias – Diretoria de Combate a Vetores, 2008.

SILVA, A.R.; LEITE, M.T.; FERREIRA, M.C.; TAMBELLINI, M.V. Caracterização do diâmetro de gotas de aerossóis em inseticidas domissanitários. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 6, p. 437-442, 2009.

SILVA, Brenda G.; GUTIERREZ, Selene M.; BOBADILLA, Cristina; PONCE, Gustavo; FLORES, Adriana E. Enzymes associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* (L.) from Veracruz, Mexico. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 3, p. 309, 2010.

SINGER, George. A simple aspirator for collecting small arthropods directly into alcohol. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 57, n. 6, p. 796–798, 1964.

SMITH, Joshua Wc. A new method for handling invertebrates collected using standard vacuum-sampling apparatuses. **Australian Journal of Entomology,** v. 38, n. 3, p. 227–228, 1999.

SNELSON, J.T. **Grain protectants.** Camberra, Australian Center for International Research, 448p. Monograph, 3, 1987.

SOUZA, B.; MATIOLI, J.C.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C. Seletividade de avermectin-B1 ao *Trichograma demoraesi* Nagaraja, 1983 (Hym., Trichogrammatidae), em condições de laboratório. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz"**, v. 44, n. 1, p. 825-847, 1987.

[SUCEN] SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. **Vigilância e controle de Aedes aegypti: Normas, orientações e recomendações técnicas**. Plano

de intensificação das ações de controle de dengue no Estado de São Paulo. Secretaria da Saúde. Governo do Estado de São Paulo, 2001.
[SUCEN] SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. Instrução Normativa nº 4 – **Destinação final de inseticidas vencidos, de suas embalagens e outros inservíveis**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/search.action?method=newSearch&searchInAllField=true&searchType=2&search=true&searchFields=all%2C+htmL%2C+fileContent%2C+fileName%2C+mimeTy>. Acesso em: 06 Nov. 2012.
SPRATT, Elaine C. Some effects of a mixture of oxigen,carbon dioxide and nitrogen in ratio 1:1:8 on the oviposition and development of *Sitophilus zeamais* Mots (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Product Reserach**, v. 15, n. 3-4, p. 73-80, 1979.
SRINIVASAN, R.; KALYANASUNDARAM M. Ultra low volume aerosol application of deltacide (deltamethrin 0,5% w/v, S-bioallethrin 0,71% w/v & piperonyl butoxide 8,9% w/v) against mosquitoes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 1, p. 55-60, 2006.
STANGE, G. Sensory and behaviour responses of terrestrial invertebrates to biogenic carbon dioxide gradients. **In Advances Bioclimatology**, v. 4, p. 223-253, 1996.
SUH, Greg S.; WONG, Allan M.; HERGARDEN, Anne C.; WANG, Jing W.; SIMON, Anne F.; BENZER, Seymour; AXEL, Richard; ANDERSON, David J. A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. **Nature**, v. 431, n. 7010, p. 854-859, 2004.
TAILLEFER, Ameli Gregoire; WHEELER, Terry A. The genus *Calamoncosis* in the Neartic region (Diptera: Chloropidae). **Canadian Entomologist**, v. 143, n. 6, p. 652-661, 2011.
TAIPE-LAGOS, Carmen B.; NATAL, Delsio. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 275-279, 2003.
TANAKA, Akira. Effects of carbon dioxide anaesthesia on the number of instar, larval duration and adult body size of the german cockroach, *Blattela germanica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 28, n. 10, p. 813-821, 1982.
TAPLIN, D., ZAIAS, N.; REBELL, G. Infection by *Hippelates* flies. **Lancet**, v. 2, p. 472, 1967.
TOLEDO, Franciani; REGINALDO, Francisco.; ALECRIM, Sheldo; MACIEL, Tatiana. **Repetibilidade e Reprodutibilidade. Relatório – Química Analítica I**, 2009. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABWzEAE/repetibilidade-reprodutibilidade>. Acesso em: 08 Nov. 2012.
TONDELLA, M.L.C.; PAGANELLI, C.H.; BORTOLOTTO, I.M.; TAKANO, O.A.; IRINO, K.; BRANDILEONE, M.C.C.; MEZZACAPA NETO, B.; VIEIRA, V.S.D.; PERKINS, B.A. Isolamento de *Haemophilus aegyptius* associado à febre purpúrica braliseira, de cloropídeos (Diptera) dos gêneros *Hippelates* e *Liohippelates*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 105-109, 1994.
TOUNG, Y.P.; HSIEH, T.S.; TU, C.P. *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 87, n. 1, p. 31-35, 1990.
TSUDA, Shigenori; OKUNO, Yoshitoshi. Factors which affect the insecticidal efficacy of aerosol formulation. 1. Solvents and insecticidal efficacy of the aerosol containing

tetramethrin and d-phenothrin. **Journal of Pesticide Science**, v. 10, n. 4, p. 621-628, 1985.

URIBE, Luis J.; GARRIDO, Germán C.; NELSON, Michael; TINKER, Milton E.; MOQUILAZZA, José. Experimental aerial spraying with ultra-low-volume (ULV) Malathion to control *Aedes aegypti* in Buga, Colômbia. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 18, n. 1, p. 43-57, 1984.

USAEHA. **Procedures for the diagnostic dose resistance test kits for mosquitoes, body lice, and beetle pests of stored products**. Technical Guide nº 189, August 1992.

VAIS, Horia; WILLIAMSON, Martin S.; GOODSON, Susannah J.; DEVONSHIRE, Alan L.; WARMKE, Jeffrey W.; USHERWOOD, Peter N.; COHEN, Charles J. Activation of Drosophila sodium channels promotes modiication by deltamethrin. Reductions in afinity caused by knock-down resistance mutations. **Journal of General Physiology**, v. 115, n. 3, p. 305-318, 2000.

VAN BAAREN, Joan; OUTREMAN, Yannik; BOIVIN, Guy. Effect of low temperature exposure on oviposition behaviour and patch exploitation strategy in parasitic wasps. **Animal Behaviour**, v. 70, n. 1, p. 153-163, 2005.

VARON, Liliana S.; CORDOBA, Bernardo C.; BROCHERO, Helena L. Susceptibility of *Aedes aegypti* to DDT, Deltamethrin, and Lamdacyalothrin in Colombia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 27, n. 1, p. 66-73, 2010.

VÁSQUEZ-CASTRO, Javier A.; BAPTISTA, Gilberto C.; GADANHA Jr., Casimiro D.; TREVIZAN, Luiz R.P. Influence of emulsifiable concentratre formulation on the physical properties of the fluid, spray characteristics, and insecticide deposits on stored grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3529-3534, 2007.

VIANA, A.R.; LEITE, M.T.; FERREIRA, M.C.; TAMBELLINI, M.V. Distribuição volumétrica e espectro de gotas de pontas de pulverização de baixa deriva. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 2, p. 439-446, 2010.

WAN-NORAFIKAH, Othman; NAZNI, Wasi Ahmad; LEE, Han Lim; ZAINOL-ARIFFIN, Pawanchee; SOFIAN-AZIRUN, Mohd. Permethrin resistance in *Aedes aegypti* (Linnaeus) collected from Kuala Lumpur, Malaysia. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, n. 3, p. 175-182, 2010.

WARE, GW. **An introduction to insecticides** [monografia na Internet]. 3rd ed. University of Minnesota; 2000. Disponível em: <http://ipmworld>. umn.edu/chapters/ware.htm. Acesso em: 13 Nov. 2012.

WARE, G.W.; WHITACRE, D.M. **The pesticide book**, 6th ed, Willoughby, OH: MeisterPro Information Resources, 2004.

WARNES, M.L.; FINLAYSON, L.H. Responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae), to carbon dioxide and host odours: II. Orientation. **Bulletin of Entomological Research**, v. 75, n. 4, p. 717-727, 1985.

WEIDHASS, D.E.; BOWMAN, M.C.; MOUNT, G.A.; LOFGREN, C.S.; FORD, H.R. Relationship of Minimum Lethal Dose to the Optimum Size of Droplets of Insecticides for Mosquito Control. **Mosquito News**, v. 30, n. 2, p. 195-200, 1970.

YEN, Juy-Hung; LIN, Kuo-Hsiung; WANG, Yey-Shung. Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n.1, p. 79-86, 2000.

WHEELER, Terry A. Two new genera of oscinelline Chloropidae (Diptera) from Costa Rica. **Zootaxa**, n. 1413, p. 47-53, 2007.

WHEELER, Terry A.; MLYNAREK, Julia J. Systematics of *Agrophaspidium*, a new genus of Neotropical Chloropidae (Diptera). **Zootaxa**, n. 1926, p. 41-52, 2008.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of insecticides for vector control**. WHO/VBC/68. 66: 124-28, 1968.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Equipment for vector control. Geneva, World Health Organization, 1974.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Instructions for determining the susceptibility of adult mosquito to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides establishment of base line**. Geneva. WHO/ VBC/81.806. 1981.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Especification for equipament for vector control: Specification**, WHO/VBC/89.970, Genebra, p. 101-218, 1989.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Equipment for Vector Control, 3rd edition, WHO, Geneva, 1990

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector resistance to pesticides**. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In: WHO Technical Report Series, v. 818, p. 1-55, 1992.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control: Space spray applications In: **Guidelines for dengue surveillance and mosquito control**, n.º 8, 1995.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Control of Tropical Diseases, WHO Pesticide Evaluation Scheme, Informal Consultation, 1996.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. Genebra, WHO/ CTD/WHOPES/97.2, 1997.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bioefficacy and persistence of insecticides on treated surfaces**. Report of an informal consultation, WHO/CDS/CPC/MAL/98.12, 1998

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Space spray application of insecticides for vector and public health pest control. A practitioner's guide.** WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Space spray aplication of inseticide for vector and public health pest control: A practioner's guide**, Genebra, p. 7-35, 2003

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Strategic Framework for Integrated Vector Management**, Genebra, WHO/CDS/CPE/PVC/2004.10, 2004.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets**. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006a.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Equipment for vector control: specification guidelines**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2006b.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pesticides and their application**. 6th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2006c.

WIRTH, M.C.; GEORGHIOU, G.P. Selection and characterization of Temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 3, p. 315-320, 1999.
WISHART, G. Some devices for collecting insects. **Journal of Economic Entomology**, v. 23, p. 234–237, 1930.
WONDJI, Charles S.; DE SILVA, W.A.P.Pryanka.; HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hillary; KARUNARATNE, Sarah H.P.P. Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. **Tropical Medicine and International Health**, v. 13, n. 4, p. 548–555, 2008.