



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

TALES BATISTA RIBEIRO

**Avaliação de Sandálias Impregnadas com Repelente Espacial e o Seu Efeito na Biologia e Proteção Contra Picadas do Mosquito *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE).**

Belo Horizonte, MG

2022

Tales Batista Ribeiro

**AVALIAÇÃO DE SANDÁLIAS IMPREGNADAS COM REPELENTE ESPACIAL E O SEU EFEITO NA BIOLOGIA E PROTEÇÃO CONTRA PICADAS DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE).**

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

**Área de concentração:** Entomologia

**Orientador:** Prof. Dr. Álvaro Eduardo Eiras

**Coorientadora:** Dra. Elis Paula de Almeida Batista

Belo Horizonte

2022

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por toda sua estrutura e excelência, fazendo jus ao seu status de um dos melhores (talvez o melhor) programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Brasil.

À Sibeles e Sumara, sempre dispostas a nos ajudar em todos os pepinos que apareceram no percurso.

Aos Funcionários e Professores do Departamento de Parasitologia, e por todos os ensinamentos, paciência e conhecimentos compartilhados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa concedida.

À USAID, que tornou esse projeto possível, através de financiamento.

Ao meu orientador, Dr. Álvaro Eiras, pela mentoria, confiança e apoio ao longo desses tantos anos de parceria. Pelas portas abertas e por todas as oportunidades de crescimento e conhecimento que todos esses anos de Lintec me proporcionaram.

À minha coorientadora, Dra. Elis Paula Batista, por ter aceitado me ajudar nessa caminhada, por todo o tempo dedicado, pelas dicas, ajuda e conselhos, que, sem sobra de dúvidas, foram fundamentais para que esse trabalho tomasse forma.

Ao Dr. Fredros Okumo, líder da pesquisa no Ifakara Health Institute (IHI), pela parceria firmada com o Lintec, possibilitando a execução deste trabalho.

Ao Dr. (perdoem-me o anacronismo) Leonardo Rodrigues (Léo), pelas trocas de ideia, pitacos, sugestões, e por dividir o peso dos desafios e dificuldades do caminho da pós-graduação.

À Dra. Kelly Paixão, Elizângela Melo, Richard Silva, Amanda Lorena, e Marcela Raso, a “Equipe das Sandálias”, pela dedicação e determinação na realização desse projeto. Pelas conversas, discussões, aprendizado, e picadas no gaiolão. Este trabalho só foi possível com a contribuição de vocês

À Juliana Costa (Ju), por sempre nos receber com um sorriso no rosto e por fazer o insetário, o “coração do laboratório”, funcionar perfeitamente e possibilitar que todos os testes fossem realizados.

À Luana Moraes, que apesar de não dividir comida, era fundamental para manter a ordem no laboratório e não poupava esforços para ajudar qualquer um que precisasse.

A todos os amigos que estão ou passaram pelo do Lintec: Agustin, Amanda, Ana, André, Daniel, Hil, Ju, Lucas, Anderson, Marcelo, Hans, Rafael, Sara (as 3), Vítor, Natália, Bruna, Carol (as duas), Jennifer, Ingrid, Stephanie, Vitória e Ludmila, vocês fizeram essa caminhada ser mais leve e prazerosa.

Aos meus Amigos, que tornam a vida tão prazerosa quanto um sábado de sol com uma cervejinha gelada, e que fazem eu enxergar, através de cada conquista dividida com vocês, que o caminho valeu a pena.

À minha namorada Elisa, companheira e amiga de alma, que está sempre ao meu lado, comemorando as conquistas e ajudando nas batalhas e surpresas que a vida nos proporciona.

À minha madrinha, Tia Dete, por todo o apoio e amor doado, e pela melhor farofa de andu com carne de sol de toda história mundial.

Ao meu pai Lerival e meu irmão Dante, as bases e referências da minha vida, em todos os aspectos. Amo vocês.

À minha mãe, Eustáquia, minha estrela de olhos verdes.

Obrigado

## RESUMO

A busca por novas tecnologias para evitar arbovirose transmitidas por *Aedes aegypti* tem recebido atenção nas últimas décadas devido a resultados insatisfatórios dos métodos de controles convencionais. Recentemente, houve um aumento de estudos com o uso de repelentes espaciais, que evitam o contato humano-vetor e criam um espaço livre de mosquitos, resultando em uma proteção contra picadas e reduzindo a transmissão de doenças. O presente trabalho teve o objetivo de desenvolver e avaliar a transflutrina como repelente espacial e o seu efeito na biologia e proteção contra picadas do mosquito *Ae. aegypti* em condições de laboratório e de semicampo. O efeito da transflutrina (2% e 8%) impregnadas em tiras de juta no comportamento e na biologia de fêmeas de *Ae. aegypti* foi avaliado em bioensaios em laboratório e em semicampo. Em laboratório, (i) a exposição dos mosquitos em gaiolas teladas por 30 min. a correntes de ar a 50 e 100cm induziram maior efeito *knock down* em comparação à mortalidade, independente da distância; (ii) o olfatômetro de dupla escolha, ambas as concentrações de transflutrina inibiram a atração em relação ao odor humano e induziram >60% taxa de mortalidade nos mosquitos e (iii) caixas de repelência (BG-Cages) utilizando antebraço de voluntários demonstraram que ambas concentrações reduziram a tentativa de picadas nos voluntários e que a concentração de 8% ofereceu maior proteção (49,05%). Em semicampo, (i) mosquitos foram expostos à um voluntário usando protótipos de sandálias impregnadas com transflutrina (8%) com diferentes áreas de superfície de juta (10, 20, 40, 80 e 160 cm<sup>2</sup>). Observou-se que a maior proteção (45,5%) contra picadas em sandália com maior área de liberação. (ii) Um par de sandália impregnada com área de 327cm<sup>2</sup> foi colocada no solo e potes telados contendo 25 fêmeas de *Ae. aegypti* colocada em diferentes distâncias e alturas por 30 min e posteriormente foi verificada a mortalidade até 24h, *knock down* (1h após o final da exposição) e repasto sanguíneo após a exposição. Observou-se efeito *knock down* e mortalidade em todas as combinações de alturas e distâncias da fonte de transflutrina, porém a inibição da hematofagia foi observada somente em mosquitos posicionados a 1m de altura e a 1,4m e 7,0m de distância das sandálias impregnadas. (iii) Voluntários usando sandálias impregnadas (160 cm<sup>2</sup>) com diferentes concentrações de transflutrina (2, 5, 8, 10 e 15%) tiveram proteção de picadas em todas as concentrações, porém a maior proteção (51,5%) ocorreu na concentração de 2%. A transflutrina impregnadas em juta provocou alterações na biologia do *Ae. aegypti* em bioensaios de

laboratório e de semicampo e foi eficaz na proteção contra picadas, demonstrando o potencial dessa tecnologia em complementar os métodos de controle atuais.

**Palavras-Chave:** *Aedes aegypti*, repelente espacial, transflutrina, piretróide, mosquito.

## ABSTRACT

The search for new technologies to prevent arboviruses transmitted by *Aedes aegypti* has received attention in recent decades due to unsatisfactory results from conventional control methods. Recently, there has been an increase in studies using spatial repellents, which prevent human-vector contact and create a mosquito-free area, resulting in protection against bites and reducing disease transmission. The present work aimed to develop and evaluate transfluthrin as a space repellent and its effect on biology and protection against *Ae. aegypti* under laboratory and semi-field conditions. The effect of transfluthrin (2% and 8%) impregnated in hessian strips on the behavior and biology of *Ae. aegypti* was evaluated in semi-field laboratory bioassays. In the laboratory, (i) exposure of caged mosquitoes screened for 30 min. at 50 and 100 cm of distance to a fan, making a air flow induced a greater *knock down* effect compared to mortality, regardless of distance; (ii) in double-choice olfactometer, both transfluthrin concentrations inhibited attraction towards human odor and induced >60% mortality rate in mosquitoes and (iii) in repellence boxes (BG-Cages) using forearms of volunteers, we demonstrated that both concentrations reduced the attempt to bite the volunteers and that the concentration of 8% offered greater protection (49.05%). In semi-field, (i) mosquitoes were exposed to a volunteer wearing prototype sandals impregnated with transfluthrin (8%) with different hessian surface areas (10, 20, 40, 80 and 160 cm<sup>2</sup>). It was observed that the greatest protection (45.5%) against bites occurs with the sandal with the greatest area of release. (ii) A pair of impregnated sandals with an area of 327cm<sup>2</sup> were placed on the ground and screened pots containing 25 females of *Ae. aegypti* was placed at different distances and heights for 30 min and then mortality up to 24 h, *knock down* (1 h after the end of exposure) and blood meal after exposure were verified. *Knock down* effect and mortality were observed in all combinations of heights and distances from the transfluthrin source, however the inhibition of hematophagy was observed only in mosquitoes positioned at 1 m in height and at 1.4 m and 7.0 m away from the impregnated sandals. (iii) Volunteers wearing sandals impregnated (160 cm<sup>2</sup>) with different concentrations of transfluthrin (2, 5, 8, 10 and 15%) had protection from stings at all concentrations, but the greatest protection (51.5%) occurred at the concentration of 2%. The transfluthrin impregnated in hessian strips caused changes in the biology of *Ae. aegypti* in laboratory and semi-field bioassays and was effective in protecting against bites, demonstrating the potential of this technology to complement current control methods.

**Key-words:** *Aedes aegypti*, spatial repellents, transfluthrin, pyrethroid, mosquito.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição mundial prevista de *Aedes aegypti*, mostrando a probabilidade de ocorrência desta espécie. As áreas em vermelho indicam alta incidência da presença do vetor, enquanto as áreas em azul não apresentam o mosquito. Fonte: Kraemer *et al.* ..... 1

Figura 2. Ciclo Biológico de *Aedes aegypti* com respectivos estágios de desenvolvimento: (1) Ovos, (2) Larvas (L1 à L4), (3) Pupa, (4) Adulto. Fonte: <http://www.casadaciencia.com.br/o-fim-da-picada/> ..... 2

Figura 3. Exemplos de repelentes espaciais dependentes de energia externa para funcionamento. (A) Bobina repelente dependente de combustão e (B) repelente espacial de tomada, dependente de energia elétrica. Fonte: <https://br.freepik.com/fotos-premium/bobina-repe>..... 7

Figura 4. Fórmula estrutural da transflutrina. Fonte: Wikimedia Commons..... 9

Figura 5. Ilustração e imagens das estruturas externa e interna da área de semicampo do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores – Lintec. O semicampo está localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais..... 15

Figura 6. Configuração do olfatômetro horizontal de dupla escolha. 1: Gaiola de liberação; 2: tubo principal; 3: câmara de escolha; 4: tubo de escolha. 5: Compartimento de liberação de estímulo. Representação da interpretação dos testes, de acordo com a localização dos mosquitos ao final dos experimentos: A = Mosquitos inativos; B, C e D; Mosquitos ativos (Mosquitos que voaram para fora da gaiola de soltura); D: mosquitos atraídos. A seta indica a direção do fluxo de ar. Fonte: Adaptado de Leme, 2013. .... 17

Figura 7. Ilustração do desenho experimental para avaliar o efeito da exposição à transflutrina na biologia de *Aedes aegypti* em laboratório. (a) Gaiola contendo 25 fêmeas de *Ae. aegypti*; (b)Tiras de Juta impregnadas com transflutrina ou controle; (c) Ventilador. .... 18

Figura 8. Ilustração do desenho experimental para avaliar o efeito da exposição à transflutrina na biologia do *Aedes aegypti* em semicampo (A) e pote de prolipropileno

adaptado para o experimento (B). (a) Câmara do semicampo com 37m<sup>2</sup>; (b) Potes de propileno, adaptados para permitir a passagem a circulação do ar contendo o repelente espacial, contendo os mosquitos; (c) Estacas de madeira para posicionar os potes em diferentes alturas e distâncias das sandálias (fonte de transflutrina). ..... 19

Figura 9. Ilustração da montagem do sistema de alimentação artificial com membrana de politetrafluoretileno (A) e fêmeas de *Aedes aegypti* sendo alimentadas com sangue de galinha (*Gallus gallus domesticus*) (B). Adaptado de Siria *et al.* (2018). ..... 21

Figura 10. Proporção média de fêmeas de *Aedes aegypti* vivas ou mortas após exposição à tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina 2% ou 8%, em ensaio comportamental utilizando olfatômetro horizontal de dupla escolha. (\*) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 22

Figura 11. Proporção média de resposta de fêmeas de *Aedes aegypti* à tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina a 2% ou 8% em olfatômetro horizontal de dupla escolha. Inativas: mosquitos que não voaram e permaneceram na gaiola de liberação; Ativas: Mosquitos que saíram da gaiola de liberação, atingindo as demais partes do olfatômetro. (\*) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 23

Figura 12. Resposta de fêmeas de *Aedes aegypti* atraídas à diferentes estímulos em olfatômetro horizontal de dupla escolha. Ar: braço do olfatômetro com corrente de ar limpo, sem estímulo; Voluntários: braço do olfatômetro associado a voláteis dos dedos humanos; Transflutrina 2%: tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina a 2%; Transflutrina 8%: tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina a 8%. (\*) indicam diferenças significativas (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ). ..... 24

Figura 13. Número médio ( $\pm EP$ ) de mosquitos em efeito *knock down* ao nível do solo e a 1m de altura e em diferentes distâncias da fonte de transflutrina. Colchetes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos e seus respectivos controles. . 26

Figura 14. . Número médio ( $\pm EP$ ) de mosquitos mortos ao nível do solo e a 1m de altura e em diferentes distâncias da fonte de transflutrina. Colchetes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos e seus respectivos controles. .... 28

Figura 15. Voluntário realizando recaptura de mosquitos com o auxílio de um Capturador de Castro, na câmara de testes do semicampo.....	37
Figura 16. Caixa de repelência BioGents Cage (A) e estrutura do sistema de ventilação (B). .....	38
Figura 17. Experimento de teste de repelência de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> por tiras de juta impregnadas com transflutrina utilizando caixas de repelência BioGents Cage. (A) Caixas de repelência com tira de juta sob o antebraço de um voluntário; (B) Voluntário com o antebraço sob a parte inferior da caixa de repelência, realizando o experimento. ....	39
Figura 18. Diagrama esquemático da posição dos voluntários e local de liberação dos mosquitos, representado na imagem pelo círculo, e voluntários realizando teste de atratividade na câmara de testes do semicampo. ....	41
Figura 19. Diagrama esquemático da posição do voluntário e locais de liberação dos mosquitos (círculo) na câmara de teste do semicampo. ....	42
Figura 20. Diagrama esquemático da posição do voluntário e locais de liberação dos mosquitos (círculo) na câmara de teste do semicampo. ....	42
Figura 21. Número médio de tentativa de picadas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> por voluntários durante teste de repelência utilizando caixas de repelência BioGents Cage. ....	44
Figura 22. Taxa média de proteção contra picadas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> por voluntários durante teste de repelência utilizando caixas de repelência BioGents Cage. ....	46
Figura 23. Proporção de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> recapturadas durante 25 minutos de experimento em semicampo. A linha pontilhada indica o tempo de experimento necessário para a recaptura de aproximadamente 90% dos mosquitos liberados.....	47
Figura 24. Taxa de proteção média contra picadas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> por voluntários usando sandálias com diferentes áreas de liberação para a transflutrina, em semicampo. ....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número médio de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> caídas logo após, 1h (efeito <i>knock down</i> ) e 24 horas (mortos) após o final da exposição à transflutrina em um túnel de vento. ....	25
Tabela 2. Número médio de mosquitos alimentados posicionados em diferentes alturas e distâncias da fonte de transflutrina em semicampo.....	29
Tabela 3. Número médio de tentativa de picadas de <i>Aedes aegypti</i> e taxa de proteção em voluntários com tiras impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina, em testes de repelência utilizando caixas de repelência BioGents Cage. .	45
Tabela 4. Número médio de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> recapturadas por duplas de voluntários e Risco Relativo de Picadas (RRP 95% IC), em semicampo. ....	47
Tabela 5. Número médio de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> recapturadas e taxa de proteção em voluntários utilizando sandálias com diferentes áreas de liberação impregnadas com transflutrina 8%, em semicampo.....	48
Tabela 6. Número médio de fêmeas recapturadas de <i>Aedes aegypti</i> , Risco Relativo de Picadas (RRP 95% IC) e taxa de proteção em voluntários utilizando sandálias impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina, em semicampo. ....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

BG-Cage – BioGents Cage

BHC – Hexaclorobenzeno

Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEP-UFMG – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

DEET – N, Ndiethyl-m-toluamida

EP – Erro padrão

IHI – Ifakara Health Institute

Lintec – Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores.

UR – Umidade relativa do ar

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

P – Fósforo

O – Oxigênio

P.A – Puro para análise

PTFE – politetrafluoretileno

RRP – Risco Relativo de Picadas

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USAID – Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional

## SUMÁRIO

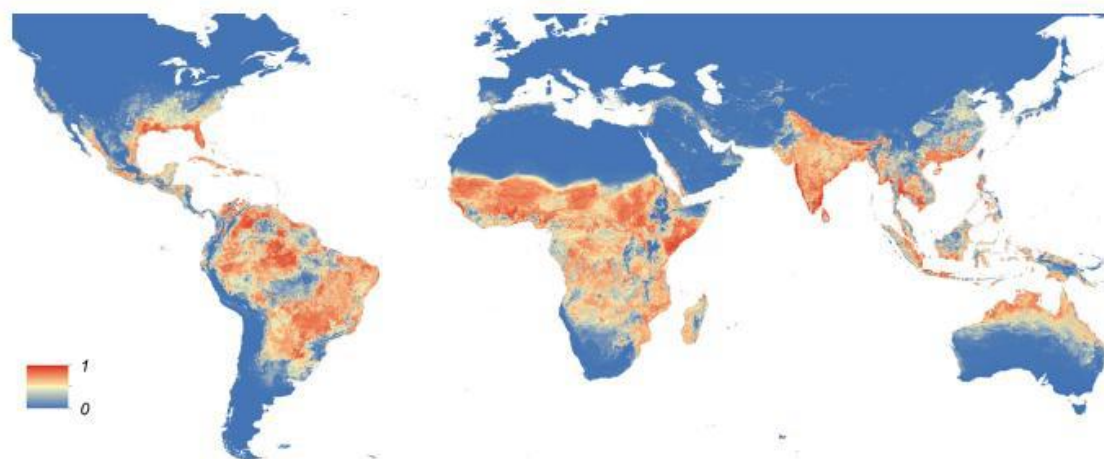
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Distribuição .....	1
1.3 Importância epidemiológica .....	3
1.4 Controle vetorial.....	4
1.5 Repelentes .....	5
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>10</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
3.1 Geral.....	11
3.2 Específicos .....	11
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos .....	14
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>14</b>
3.1 Local do estudo .....	14
3.2 Mosquitos.....	15
3.3 Impregnação das tiras de juta .....	16
3.4 Olfatômetro horizontal de dupla escolha.....	16
3.5 Avaliação do efeito <i>knock down</i> e mortalidade de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> expostas à transflutrina em olfatômetro.....	17
3.6 Avaliação do efeito <i>knock down</i> e mortalidade de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> expostas a corrente de ar contendo transflutrina.....	17
3.7 Avaliação do efeito da exposição à transflutrina na biologia de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .....	18
3.8 Análise de dados.....	21
<b>4. Resultados</b> .....	<b>22</b>
4.1 Avaliação do efeito <i>knock down</i> e mortalidade de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> expostas à transflutrina em olfatômetro .....	22
4.2 Avaliação do efeito <i>knock down</i> e mortalidade de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> expostas à transflutrina em um túnel de vento.....	24
4.3 Avaliação do efeito da exposição à transflutrina na biologia de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .....	25
<b>5. Discussão</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>32</b>

<b><i>CAPITULO II</i></b> .....	<b>34</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>35</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1 Geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>36</b>
3.1 Local do estudo .....	36
3.2 Mosquitos.....	36
3.3 Voluntários.....	37
3.4 Tiras impregnadas com transflutrina e Sandálias repelente .....	37
3.5 Avaliação do efeito repelente de tiras de juta impregnadas com transflutrina utilizando caixas de exposição BG-Cage .....	38
3.6 Procedimentos experimentais em Semicampo .....	40
3.7 Considerações Éticas.....	43
3.8 Análise de dados.....	43
<b>4. Resultados</b> .....	<b>43</b>
4.1 Avaliação do efeito repelente de tiras de juta impregnadas com transflutrina utilizando caixas de exposição BG-Cage .....	43
4.3 Experimento 2: Avaliação do tamanho da área de liberação das sandálias impregnadas com transflutrina .....	48
4.4 Experimento 3: Avaliação da repelência de sandálias impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina .....	49
<b>5. Discussão</b> .....	<b>50</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>53</b>
<b>7. Considerações Gerais</b> .....	<b>53</b>
<b><i>REFERÊNCIAS</i></b> .....	<b>56</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Distribuição

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um inseto da família Culicidae, ordem Diptera, com origem na região afrotropical. É considerado um mosquito cosmopolita, se fazendo presente em grande parte do mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Kraemer *et al.*, 2015, WHO, 2022) (Figura 1). No continente africano, sua distribuição é ampla, concentrando-se principalmente na região subsaariana (Kraemer *et al.*, 2015), enquanto na Ásia, o *Ae. aegypti* é encontrado na região sudeste do continente e na Oceania sua distribuição está concentrada ao norte da Austrália, além de estar presente em outros países do continente. Nas Américas, está presente em todos os países da América Central, enquanto que na América do Norte está presente em estados do sudeste estadunidense, assim como em toda a América do Sul (Kraemer *et al.*, 2015; Gonzáles *et al.*, 2016).



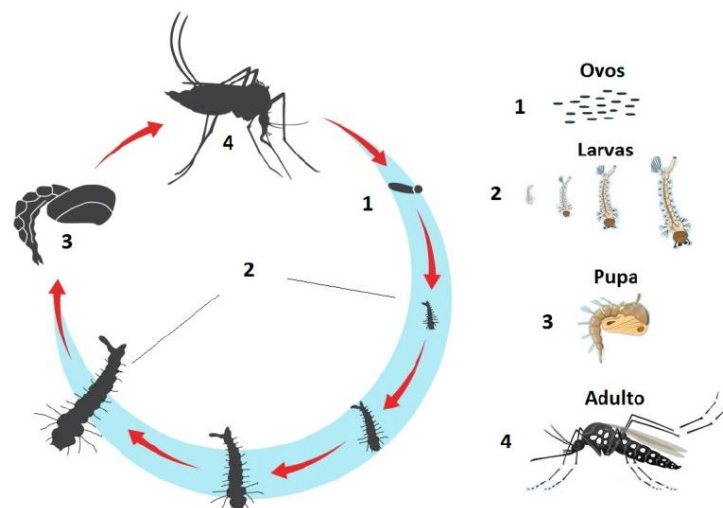
**Figura 1.** Mapa da distribuição mundial prevista de *Aedes aegypti*, mostrando a probabilidade de ocorrência desta espécie. As áreas em vermelho indicam alta incidência da presença do vetor, enquanto as áreas em azul não apresentam o mosquito. Fonte: Kraemer et al, 2015

No Brasil, sua introdução se deu por via marítima, no período das Grandes navegações (Séc. XV - Séc. XVII) (Forattini, 2002). Várias campanhas ocorreram entre os anos de 1958 e 1973 visando controlar o *Ae. aegypti*, que resultaram em sucessivos eventos de erradicações e reintroduções deste vetor. Em 1976, ocorreu a reintrodução da espécie no país de modo definitivo, e hoje é considerada uma espécie endêmica em todo o território brasileiro (Zara *et al.*, 2016, Kotsakiozi *et al.*, 2017)



## 1.2 Biologia

O *Ae. aegypti* possui ciclo de vida holometábolo, apresentando os estágios de ovo, larva com quatro estádios (L1-L4), pupa e adulto (Figura 2). O período de desenvolvimento de ovo a adulto varia entre 7 a 10 dias, em condições ideais de temperatura e umidade (Forattini, 2002; Faull & Williams, 2015). Os ovos são resistentes a dissecação, podendo permanecer viáveis por até 450 dias sem contato com água (Gadelha & Toda, 1985; Faull & Williams, 2015). Os adultos possuem uma expectativa de vida de aproximadamente 30 dias e possuem hábitos diurnos (Cônsoli & Lourenço-de-Oliveira, 1998 Forattini, 2002).



**Figura 2. Ciclo Biológico de *Aedes aegypti* com respectivos estágios de desenvolvimento: (1) Ovos, (2) Larvas (L1 à L4), (3) Pupa, (4) Adulto. Fonte <http://www.casadaciencia.com.br/o-fim-da-picada/>**

Tanto os machos quanto as fêmeas alimentam-se de substâncias açucaradas como frutose, glicose e sacarose, porém, as fêmeas também se alimentam de sangue, pois necessitam dos nutrientes para o desenvolvimento e maturação dos ovos (Harrington *et al.*, 2001), sendo os seres humanos os hospedeiros favoritos (Powell & Tabachnick 2013). O ciclo gonotrófico do mosquito que se inicia com a hematofagia finaliza com a oviposição, porém, em alguns casos, a espécie apresenta discordância gonotrófica, que pode ser definida como a necessidade de realizar repasto sanguíneo mais de uma vez, a fim de concluir o amadurecimento ovariano (Clements, 1999; Barata *et al.* 2001), característica que, conseqüentemente, aumenta o número de hospedeiros picados, favorecendo a dispersão de patógenos. A alimentação sanguínea quase que

exclusivamente em humanos, o alto grau de sinantropia (Terra *et al.*, 2018) e a possibilidade da discordância gonotrófica são algumas das características que fazem do *Ae. aegypti* um dos mais importantes vetores de patógenos, como os vírus causadores da Dengue, Febre Amarela, Chikungunya, Zika (WHO, 2009; Gubler, 2011; Wikan & Smith, 2016).

### **1.3 Importância epidemiológica**

O *Ae. aegypti* pode ser considerado um vetor de importância epidemiológica uma vez que é o principal responsável pela transmissão de arbovírus que apresentam um grande impacto na saúde pública (Terra, 2017; Espinal *et. al.*, 2019), como os vírus da Dengue, Chikungunya, (WHO, 2018) e Zika (Schuler-Faccini, 2016).

Atualmente, estima-se que ocorram anualmente aproximadamente 390 milhões de novos caso de dengue ao redor do mundo e 10.000 mortes, em mais de 125 países (Messina *et al.*, 2019). A Dengue, doença transmitida por um vírus do gênero *Flavivirus*, possui 4 sorotipos virais (DENV-1, 2, 3 e 4) (CDC, 2020) e seus picos de ocorrência são caracterizados por ciclos de anos epidêmicos a cada 3 ou 5 anos (San Martín *et al.*, 2010).

A Chikungunya, doença causada por um vírus do gênero *Alphavirus* e é notificada em surtos isolados em todo o mundo, a partir de 2005. (Burt *et al.*, 2012). Foi notificada pela primeira vez nas Américas em 2013 e no Brasil no ano seguinte, prevalecendo como uma doença de importância para a saúde pública (SVS, 2015; Espinal, 2017).

No Brasil, o primeiro registro do Zika vírus ocorreu em 2015, e é considerado uma doença de evolução clínica branda (WHO, 2016). Porém, a doença é associada a casos de microcefalia, quando ocorre a transmissão vertical do patógeno (Schuler-Faccini *et al.*, 2016). A ocorrência de complicações neurológicas, como neuropatias, mielite e síndrome de Guillain-Barré também parecem ter associação com infecção por esse vírus. (WHO, 2018).

No ano de 2021, foram notificados no Brasil 516.123 casos prováveis de dengue, 94.264 casos prováveis de chikungunya e 6.020 casos prováveis de zika, (Ministério da Saúde, 2021), porém é possível que esses números estejam defasados, devida à pandemia do Coronavírus, que pode ter causado um receio na população em procurar atendimento em uma unidade de saúde, e conseqüentemente diminuindo as notificações (SVS, 2021).

#### 1.4 Controle vetorial

Com exceção da Febre Amarela, para a qual existe vacina, os principais métodos de controle das arboviroses veiculadas pelo *Ae. aegypti*, são baseados no controle do vetor para a prevenção da transmissão dessas doenças (Teixeira *et al.*, 1996; Ministério da Saúde, 2009; OPAS, 2019). Nesse contexto, o controle do *Ae. aegypti* é realizado basicamente através de três tipos de mecanismos: (i) controle mecânico, que consiste na identificação e eliminação de possíveis criadouros, diminuindo assim a oferta de locais propícios para a oviposição, e consequente aumento da população do mosquito (Chavasse *et al.*, 1997; Braga & Vale, 2007; Ministério da Saúde, 2009); (ii) controle biológico que utiliza predadores ou patógenos, como peixes larvóforos, comumente dos gêneros *Poecilia* e *Gambusia* e a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti), que possui ação inibidora de desenvolvimento de larvas de alguns dípteros, e apresenta quase nenhum efeito em outros organismos (Mulla *et al.*, 1982; Hoy, 1985; Martinez-Ibarra *et al.*, 2002; Benjamin *et al.*, 2005; Ministério da Saúde, 2009; Ritchie *et al.*, 2010; Shulze *et al.*, 2013; OPAS, 2019); e o (iii) controle químico, considerado uma medida emergencial, que utiliza produtos químicos e reduz rapidamente a população de insetos alvo. Todos esses métodos possuem lacunas inerentes. O controle mecânico e o biológico, por exemplo, demandam uma identificação correta dos criadouros e seu correto manejo, além do custo e tempo necessário para a criação e desenvolvimento dos organismos que serão utilizados (Dambach, 2020). Já o controle químico é recomendado apenas para o controle em situações de surto ou epidemias e o seu uso indiscriminado, além de diminuir espécies de insetos e animais que não possuem interesse epidemiológico, pode acarretar na seleção de mosquitos resistentes (Ministério da Saúde, 2009).

A alta plasticidade e capacidade de adaptação e a já observada resistência à alguns inseticidas contribuem para que o controle do *Ae. aegypti* seja dificultado (Schleier III & Peterson, 2011), tornando assim, a busca de maneiras complementares para o combate ao mosquito uma importante questão de saúde pública (Ministério da Saúde, 2001; Braga & Vale, 2007, Ranson *et al.*, 2011; Rabinovich *et al.*, 2017; Brady & Hay, 2020). Tendo em vista esse cenário, o controle integrado do vetor tem sido adotado e incentivado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e consiste na utilização de duas ou mais ferramentas de controle, e de metodologias complementares, resultando em uma estratégia que visa o melhor aproveitamento dos recursos disponíveis, com o objetivo de

executar ações que sejam efetivas ecológica e economicamente (WHO, 2009). Dentre as metodologias complementares recomendadas pela OMS (2014) estão os repelentes.

### 1.5 Repelentes

O termo repelência foi originalmente cunhado para se referir ao afastamento de insetos de qualquer superfície tratada quimicamente, em comparação com essa mesma superfície não tratada (Kennedy, 1947). Posteriormente, Barton-Browne (1977) propôs uma nova definição, em que considera como repelente tudo aquilo que provoca no inseto uma reação de afastamento de um local para o qual naturalmente ele seria atraído. Dessa forma, repelentes são substâncias aplicadas diretamente sobre a pele exposta ou aplicadas sobre materiais dispersores, promovendo proteção contra insetos e outros artrópodes (Curtis, 1992; WHO, 2014). Essa proteção pessoal é uma estratégia complementar aos métodos tradicionais de controle vetorial amplamente difundida ao redor do mundo e se propõe a limitar o contato entre humanos e vetores, reduzindo assim o risco de picadas e, conseqüentemente, a contaminação por patógenos (Deparis *et al.*, 2004; WHO, 2014).

Os repelentes são tradicionalmente classificados como de uso tópico ou espaciais. Os repelentes de uso tópico são aplicados diretamente na área exposta do corpo, provocando repulsão dos vetores (Bibbs & Kaufman, 2017), enquanto os repelentes espaciais se caracterizam por provocar o afastamento do vetor quando este entra em contato com partículas suspensas no ar, em forma de vapor, da substância repelente (Grieco *et al.*, 2007). Dentre os produtos químicos mais utilizados como repelente tópico, destaca-se o N,Ndiethyl-m-toluamida (DEET) (Koren *et al.*, 2013). Este composto apresenta elevada atividade repelente contra mosquitos vetores, como *Aedes* spp., *Anopheles* spp e *Mansonia* spp (Sudakin & Trevathan, 2003; Robbins, & Cherniack, 1986). No entanto, estudos demonstraram que mosquitos que já foram expostos ao DEET apresentam capacidade de memória olfativa de reconhecimento do repelente, o que resulta numa menor sensibilidade do inseto em exposições futuras (Pellegrino *et al.*, 2011; Stanczyk *et al.*, 2013; Lutz *et al.*, 2017). Experimentos que avaliam o efeito do DEET na fisiologia de ratos encontraram importantes efeitos neurológicos e locomotores adversos (Abdel Abou-Donia *et al.* 1996, 2001). Além disso, a utilização do DEET já foi relacionada à casos clínicos específicos de desenvolvimento de episódios epiléticos e encefalopatias, sobretudo em crianças (Osimitz, & Murphy, 1997). Também já foi observado um possível efeito sinérgico de intoxicação e efeitos adversos no sistema

locomotor de usuários de repelentes tópicos que contenham DEET, quando o mesmo é utilizado concomitantemente a carbamatos (Corbel *et al.*, 2009).

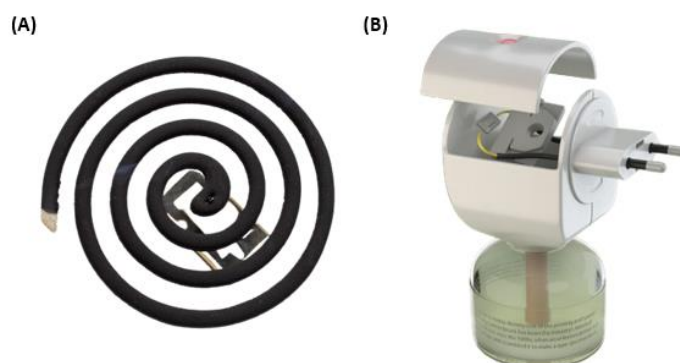
Apesar dos repelentes tópicos serem eficazes, eles apresentam algumas desvantagens em seu uso, tais como a necessidade de reaplicação do produto em poucas horas e cobertura total da pele exposta, o que torna a eficácia do produto totalmente vinculada à responsabilidade e disposição do usuário em fazê-lo e, além disso, a pode gerar reações alérgicas (Maibach & Johnson, 1975; Corazza *et al.*, 2005; McHenry & Lacuesta., 2014). Além disso, por se tratar de uma medida de proteção pessoal, outro problema relatado é o possível deslocamento dos mosquitos de um indivíduo protegido pelo repelente para outro indivíduo que não estiver utilizando repelente, estando, portanto, desprotegido, além da baixa adesão ao uso do repelente tópico, mesmo quando disponível (Maia *et al.*, 2012; Gryseels *et al.*, 2015; Makungu *et al.*, 2017).

#### *1.5.1 Repelentes espaciais*

Ao propor um novo sistema de classificação para caracterizar o modo de ação de alguns produtos químicos usados no controle de vetores de malária, Grieco *et al.* (2007) definiram repelência espacial como produtos que estimulam o movimento do mosquito para longe da fonte química, sem a necessidade do contato físico com a superfície tratada. Os repelentes espaciais são uma alternativa aos repelentes tópicos e podem ser definidos como produtos químicos que são aplicados a um material liberador, que, em sua fase de vapor, previne o contato entre o vetor e o possível hospedeiro (Grieco *et al.*, 2009). O repelente espacial altera o padrão natural de procura por uma fonte de alimento do inseto, impossibilitando que o inseto se alimente em um hospedeiro dentro da área de ação do repelente espacial (Achee *et al.*, 2012). Esse tipo de repelente também possui a capacidade de proteção de pessoas que estejam dentro do raio de ação do inseticida, fornecendo uma proteção em grupo (Ogoma *et al.*, 2014; Mwanga *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, os repelentes espaciais são encontrados na forma de bobinas, vaporizadores e emanadores (WHO, 2009) (Figura 3). As bobinas repelentes para mosquito são os modelos mais utilizados. São baratos e eficazes, porém dependem de fogo e produzem fumaça, característica que impõe limitações, sobretudo em ambientes fechados (Liu *et al.*, 1987). Esteiras vaporizadoras e repelentes de tomada são uma alternativa às bobinas. Esses aparelhos contêm ingredientes ativos repelentes que são volatilizados usando um mecanismo de aquecimento elétrico (Amalraj, *et al.*, 1992; Debboun *et al.*, 2006). Porém, a necessidade de uma fonte de energia elétrica externa para

o funcionamento desses produtos pode aumentar seu custo e dificultar sua utilização em localidades de baixa renda ou sem acesso à energia elétrica (Ogoma *et al.*, 2012).



**Figura 3. Exemplos de repelentes espaciais dependentes de energia externa para funcionamento. (A) Bobina repelente dependente de combustão e (B) repelente espacial de tomada, dependente de energia elétrica.** Fonte: <https://br.freepik.com/fotos-premium/bobina-repe>

Os repelentes espaciais de liberação passiva necessitam de uma matriz liberadora, que garanta a liberação contínua do composto no ambiente. Dentre os materiais utilizados como matrizes liberadoras estão papel (Argueta *et al.*, 2004), plástico (Kawada *et al.*, 2008) e tecidos, como a juta. (Deparis *et al.*, 2004; Ogoma *et al.*, 2017; Sangoro *et al.*, 2020). A juta, material produzido a partir de fibras de origem vegetal de baixo custo e fácil manufatura vem sendo utilizada como matriz liberadora da transflutrina, e essa associação tem se mostrado uma ferramenta promissora para utilização como medida de proteção pessoal contra mosquitos vetores (Ogoma *et al.*, 2012; 2017; Masalu *et al.*, 2017; Mmbando *et al.* 2019; Tambwee *et al.*, 2020).

O fato dessas ferramentas não precisarem de uma fonte de energia externa, o material de liberação ser de baixo custo e apresentar uma alta possibilidade de modelos e tamanhos fizeram os repelentes espaciais passivos ganharem destaque na busca por alternativas no combate à insetos vetores (Ogoma *et al.*, 2017).

### 1.5.2 Os inseticidas piretróides

A segunda geração de inseticidas teve início com a sinterização de produtos químicos em escala industrial, após a Segunda Guerra Mundial (Ware & Whitacre, 2004). Seus representantes são geração são tradicionalmente divididos em quatro classes: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Os organoclorados foram os primeiros a serem produzidos em larga escala, e incluem o diclorodifeniltricloroetano

(DDT) e o hexaclorobenzeno (BHC) (Schleier III & Peterson, 2011). São compostos orgânicos lipossolúveis altamente tóxicos, de grande bioacumulação e de toxicidade crônica, ou seja, seus efeitos se manifestam de forma lenta pelo organismo. No entanto, devido às características nocivas à saúde humana e animal, os organoclorados passaram a ter uso proibido em vários países na década de 1970, sendo substituídos, primeiramente, pelos organofosforados (Coats, 1990).

Os inseticidas organofosforados, os quais incluem o malation, fenitrothion e temefós, são compostos de fósforo trivalentes, e devido à forte reatividade dos pares de elétrons livres e da grande afinidade entre fósforo (P) e oxigênio (O), são bons agentes redutores. Por serem rapidamente oxidados por oxigênio, ozônio e outros agentes oxidantes, possuem uma carga residual menor, se comparado aos organoclorados (Fisher & van Wazer, 1961).

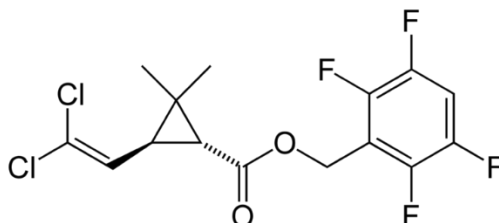
Por sua vez, os carbamatos são compostos orgânicos derivados do ácido carbâmico, que atuam inibindo a ação da enzima Acetilcolinesterase, responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina, resultando na hiperexcitação celular. Mundialmente distribuído, é a classe mais usada de inseticida, possuindo aproximadamente mais de 100 compostos (Worthing, & Walker, 1987).

Os piretróides são análogos sintéticos do piretro, repelente natural que é obtido através da trituração das flores de crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (Corbett *et al.*, 1984). Essa classe de inseticidas tem sido utilizada como alternativa para substituição das outras classes, as quais apresentaram vários problemas ao longo dos anos (Corbett *et al.*, 1984; Tafuri, J. & Roberts, J., 1987; Zwiener, R. J., & Ginsburg, C. M., 1988).

Para utilização em fase de vapor como repelente espacial, a OMS recomenda, majoritariamente, inseticidas pertencentes à classe química dos piretróides (WHO, 2014). Estes apresentam vantagens no manejo de pragas por apresentarem alta letalidade nos insetos (sobretudo em moscas, baratas, formigas, triatomíneos e mosquitos), deixando uma pequena carga residual no ambiente. Além disso, são inodoros, apresentam baixa toxicidade nos vertebrados terrestres e não se acumulam ao longo da cadeia alimentar, ao contrário dos organoclorados, e representam cerca de 23% do mercado mundial de inseticidas (Schleier III & Peterson, 2011).

### 1.5.3 Uso da transflutrina como repelente espacial

A transflutrina (2,3,5,6-tetrafluorobenzyl (1R,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate) é um inseticida volátil da classe dos piretróides de ação rápida, cuja fórmula molecular é  $C_{15}H_{12}Cl_2F_4O_2$  (WHO, 2006) (Figura 4). Este composto vem sendo usado como princípio ativo em formulações de repelentes espaciais devido à sua alta pressão de vapor, que resulta em uma alta volatilidade.



**Figura 4. Fórmula estrutural da transflutrina.** Fonte: Wikimedia Commons.

Devido ao seu perfil volátil, partículas de transflutrina suspensas no ar criam um espaço aéreo livre de mosquitos, resultando em uma proteção a todos os possíveis hospedeiros que estejam dentro do raio de ação do repelente espacial (Masalu *et al*, 2017). A redução do índice de picadas de mosquitos dentro desses espaços pode resultar na diminuição da transmissão de patógenos que possuem mosquitos como principal (Achee *et al*, 2012). Estudos realizados na Tanzânia testaram a combinação da juta e da transflutrina em várias apresentações, visando a proteção contra picadas de insetos vetores. Cesto decorativos e adornos impregnados foram eficazes em reduzir picadas de *Anopheles arabiensis* e *Culex* spp em até 89% (Masalu *et al.*, 2017). Bancos de madeira com uma camada de juta tratada com transflutrina sob o assento, também mostraram efetividade na conferência de proteção de picadas contra estes vetores, tanto na estação seca quanto chuvosa (Masalu *et al.*, 2020). Recentemente, sandálias fabricadas com tiras de juta impregnadas com transflutrina conferiram uma proteção contra pousos de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* s.l em voluntários que utilizavam estes calçados (Sangoro *et al.*, 2020). Além de repelência espacial, já foi observado que a transflutrina possui efeito tóxico em mosquitos, além de diminuição da capacidade alimentar dos mesmos, o que pode contribuir para a proteção em massa, mesmo para pessoas que não estejam utilizando medidas de proteção com esse piretróide (Ogoma *et al.*, 2014; Mwanga *et al.*, 2019).



## 2. JUSTIFICATIVA

A busca por novas tecnologias de controle vetorial é fundamental para preencher as lacunas existentes nos métodos tradicionais, como seleção de organismos resistentes à inseticidas, custo elevado de aquisição e baixa adesão das pessoas vulneráveis a vetores às ferramentas de combate disponíveis. Segundo a OMS, o uso de aparatos de proteção pessoal, como repelentes tópicos e roupas e acessórios impregnados com repelente, configuram uma estratégia complementar aos controles químico, físico e biológico. Visto essa importância, repelentes espaciais que não dependem de fonte de energia externa para funcionamento têm sido desenvolvidos nos últimos anos e se mostrado como uma opção promissora para complementar os métodos de combate à vetores de patógenos. O presente estudo é parte do projeto “*Creating low-cost sandals for round-the-clock protection against mosquito-borne infections*”, realizado em uma parceria da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o Ifakara Health Institute (IHI) da Tanzânia, e financiado pela Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID). O referido projeto se iniciou em 2017 e finalizou em 2020 e teve o objetivo de desenvolver sandálias impregnadas com repelente espacial de baixo custo para proteção contra picadas de mosquitos. O presente projeto, portanto, visa desenvolver sandálias impregnadas com transflutrina e avaliar o seu efeito em condições de laboratório e semicampo em fêmeas de *Ae. aegypti*, através dos seguintes objetivos:

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Desenvolver e avaliar sandálias impregnadas com repelente espacial e o seu efeito na biologia e proteção contra picadas do mosquito *Ae. aegypti*.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar o efeito da exposição à transflutrina na biologia de fêmeas de *Aedes aegypti*, em laboratório e semicampo
- Avaliar o efeito repelente de sandálias impregnadas com transflutrina contra picadas de *Aedes aegypti*

## **CAPITULO I**

**Avaliação de parâmetros biológicos de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à transflutrina**

## 1. Introdução

A busca por métodos complementares para o controle de vetores é algo incentivado pela OMS, uma vez que os métodos tradicionais de controle apresentam lacunas inerente a cada método (WHO, 2014).

Dentre os métodos recomendados, estão o uso de aparatos impregnados com piretróides, classe de inseticidas que apresentam vários efeitos na biologia de insetos expostos (WHO, 2014), como repelência por hiperexcitabilidade, (Meyer, 1989), efeito *knock down* (Page *et al.*, 1949), e morte (Narahashi, 1996). Dentre os recomendados pela OMS para uso como repelente espacial, está a transflutrina. (WHO, 2014).

A transflutrina possui alta pressão de vapor, diferentemente de outros piretróides, o que permite uma evaporação passiva do composto em temperatura ambiente, dispensando a necessidade de uma fonte de energia externa para volatilização (McPhatter *et al.*, 2017; Kline & Urban, 2018). Visto isso, vários modelos de liberadores passivos confeccionados com materiais têxteis de baixo custo e fácil manufatura, como a juta, vem sendo avaliados visando contornar as limitações dos repelentes passíveis dependentes de energia externa (Ogoma *et al.*, 2012; 2017; Masalu *et al.*, 2017; Mmbando *et al.* 2019; Tambwee *et al.*, 2020).

Visto essas características, vários estudos tem investigado o efeito de tecidos de juta impregnada com transflutrina na biologia de insetos vetores. Em condições de campo, tiras de poliéster com 3 semanas de impregnação com transflutrina foram capazes de causar efeito *knock down* e uma pequena taxa de mortalidade em *An arabiensis* (Andrés *et al.*, 2015). Cadeiras que continham tira de juta impregnada com transflutrina embaixo do assento foram capazes de causar mortalidade em *An. arabiensis* (99.4%) e *An. funestus* (100%) em 24h. Experimento realizado por Martin *et al.* (2020), no Vietnã, demonstrou que um tecido de juta impregnado com transflutrina (2%) foi capaz de provocar *knock down* e mortalidade em mosquitos do gênero *Anopheles* que estavam a até 4m da fonte do repelente espacial. Esses estudos mostram que emanadores passivos que utilizam a tecidos de juta como matriz liberadora são capazes de funcionar em temperaturas ambientes através de vaporização de compostos ativos voláteis. Também já foi observado que a transflutrina, quando apresentada em formas de bobinas combustíveis, é capaz de provocar redução hematofágica em *An gambiae s.l.*, o que pode significar uma redução da circulação de patógenos, como vírus e protozoários (Ogoma *et*

al., 2014). Além disso, a transflutrina tem uma toxicidade muito baixa para vertebrados e é classificada como de improvável apresentar risco agudo em uso normal (WHO, 1997)

Portanto, os objetivos deste trabalho foram:

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito da exposição à transflutrina na biologia de fêmeas de *Aedes aegypti*, em laboratório e semicampo.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar o efeito *knock down* e mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas à transflutrina em olfatômetro horizontal de dupla escolha em condições de laboratório;
- Avaliar o efeito *knock down* e mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas à correntes de ar contendo transflutrina em condições de laboratórios;
- Avaliar o efeito *knock down*, mortalidade e alimentação sanguínea de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas à transflutrina em condições de semicampo.

## **3. Material e Métodos**

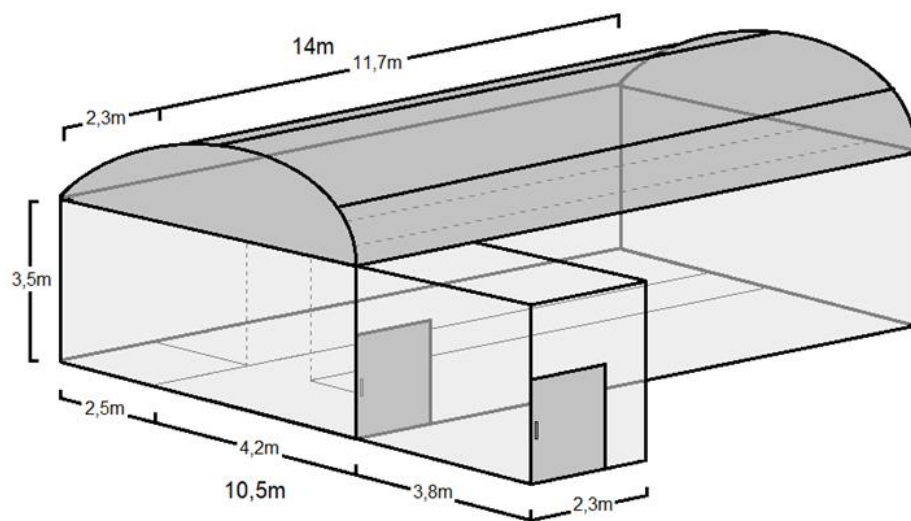
### **3.1 Local do estudo**

Os experimentos foram realizados em salas aclimatizadas e em semicampo do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo no Controle de Vetores (Lintec), localizado no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Parte dos experimentos foram realizados em laboratório.

Os testes de olfatomia foram realizadas em uma sala (2,5x3,0m) com temperatura e umidade relativa do ar (UR) controladas ( $27,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , UR  $60 \pm 5\%$ ) contendo uma antesala de tela de nylon para evitar o escape de mosquitos, enquanto que os testes de corrente de ar foram realizados em uma bancada de laboratório (2,5m x 0,23m).

### 3.1.2 Semicampo

O semicampo consiste em uma estrutura de paredes laterais externas com tela de metal inoxidável, teto de polietileno (malha 72,1 mm) e piso coberto por pedra do tipo brita. Um sistema automático de arrefecimento permite o controle e as condições ambientais (temperatura e UR), que foram medidas por meio de termo-higrômetros. O interior dessa estrutura é composto por duas câmaras de tamanho regulável de aproximadamente 29m<sup>2</sup> cada (2,5m x 11,2m), revestidas com tecido do tipo *voil* (Roque & Eiras, 2008) (Figura 5).



**Figura 5.** Ilustração e imagens das estruturas externa e interna da área de semicampo do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo em Controle de Vetores – Lintec . O semicampo está localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

### 3.2 Mosquitos

Nos experimentos foram utilizados mosquitos da espécie *Ae. aegypti* criados em laboratório no insetário do LINTEC. Os mosquitos foram criados em insetário e mantidos em salas aclimatizadas ( $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR  $80 \pm 5\%$  e fotoperíodo 12:12h). Os ovos foram

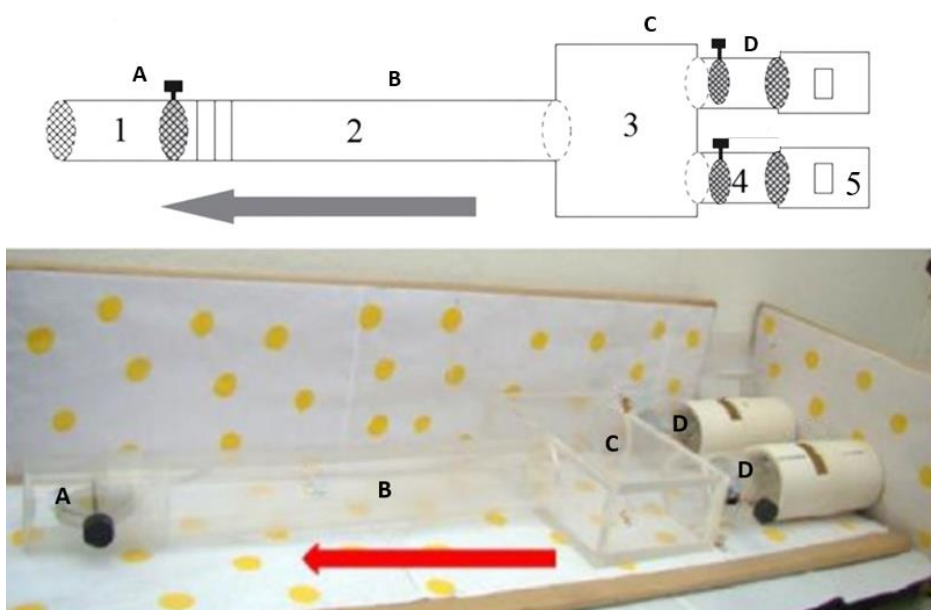
colocados em cubas plásticas (22 x 30x 7cm) contendo 1,5L de água desclorada, para eclosão das larvas. As larvas foram alimentadas com ração para réptil (ReptoLife® Alcon, Brasil). Adultos de *Ae. aegypti* (machos e fêmeas) foram mantidos em gaiolas teladas (30 x 30 x 30cm) (Bugdorm-1, MegaView Science Co., Ltd. Taiwan), contendo solução de sacarose a 10% para alimentação *ad libitum*. As fêmeas F2 e F3, nulíparas e com 5 a 7 dias de idade foram utilizadas nos experimentos e não receberam alimentação sanguínea e estavam em jejum de sacarose por 24h antes de cada teste.

### 3.3 Impregnação das tiras de juta

As tiras de juta que utilizadas nos experimentos foram anexadas às sandálias serão impregnadas com o piretróide transflutrina (TC 99%, Bayer S.A., Alemanha) e secaram em local seco e arejado por 24h antes do início dos testes. A metodologia de impregnação de transflutrina não será descrita aqui para preservar o direito de Proteção Intelectual (Depósito de Patente ou de *know-how*).

### 3.4 Olfatômetro horizontal de dupla escolha

A estrutura do olfatômetro é de acrílico transparente composta por um tubo principal (90 cm de comprimento x 12 cm de diâmetro) e dois tubos de escolha (36,5 cm de comprimento x 12 cm de diâmetro), conectados nas laterais opostas de uma caixa de escolha (Figura 6) (Geier & Boeckh, 1999). O fluxo de ar que trespassa o olfatômetro nos experimentos foi gerado por um exaustor (Qualitas®, CQ1T4 SC - Motor WEG, potência: 0,5 HP) a uma velocidade de 0,32 m/s.



**Figura 6. Configuração do olfatômetro horizontal de dupla escolha. 1: Gaiola de liberação; 2: tubo principal; 3: câmara de escolha; 4: tubo de escolha. 5: Compartimento de liberação de estímulo.** Representação da interpretação dos testes, de acordo com a localização dos mosquitos ao final dos experimentos: A = Mosquitos inativos; B, C e D; Mosquitos ativos (Mosquitos que voaram para fora da gaiola de soltura); D: mosquitos atraídos. A seta indica a direção do fluxo de ar. Fonte: Adaptado de Leme, 2013.

### **3.5 Avaliação do efeito *knock down* e mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas à transflutrina em olfatômetro**

O comportamento de fêmeas de *Ae. aegypti* quando expostas à transflutrina impregnada em tiras de juta foi avaliado em um olfatômetro horizontal. Primeiramente, foram realizados testes de calibração para avaliar a frequência de escolha dos insetos pelos dois braços do olfatômetro. Na calibração, não foi utilizado nenhum estímulo olfativo no aparelho.

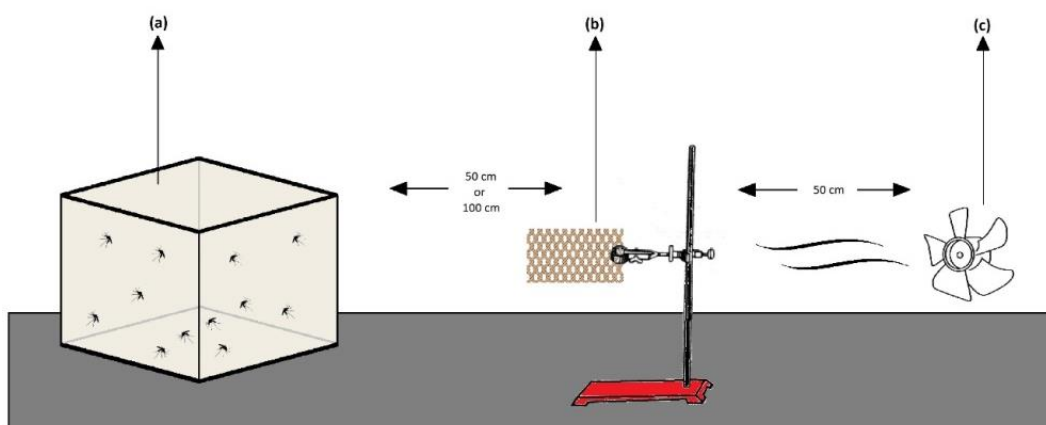
Para avaliar a exposição à transflutrina foram utilizados 10 mosquitos por gaiola de soltura por teste, com 15 repetições por tratamento. Os mosquitos utilizados foram mantidos na gaiola de liberação por 15 min., para aclimatação. Foi considerado como começo do teste a abertura da porta da gaiola de liberação, permitindo, assim, que os mosquitos voassem contra a corrente de ar, dentro do olfatômetro. O estímulo (tratamentos) foi introduzido no olfatômetro cinco segundos antes do início do teste e cada repetição teve a duração de 1 min. A posição do estímulo foi alternada entre os braços do olfatômetro a cada repetição para evitar tendências de respostas. Os tratamentos avaliados foram os seguintes estímulos: (a) tiras de juta impregnadas com uma solução de transflutrina a 2% (2% de transflutrina, 49% detergente e 49% de água); (b) tiras de juta impregnadas com uma solução de transflutrina a 8% (8% de transflutrina, 46% detergente e 46% de água); e (c) controle, odor humano dos dedos de voluntários.

A resposta comportamental foi categorizada pelo número de mosquitos encontrados nos diferentes compartimentos do olfatômetro ao final dos testes e foram: (1) inativos: mosquitos que não voaram e permaneceram na gaiola de liberação; (2) ativos: todos os insetos, voando ou em repouso, fora da gaiola de liberação; e (3) atraídos: insetos que voaram contra o vento e permaneceram dentro de algum tubo de escolha (tratamento ou controle).

### **3.6 Avaliação do efeito *knock down* e mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas a corrente de ar contendo transflutrina.**



Foram avaliadas tiras de juta com 160 cm<sup>2</sup> impregnadas com solução de transflutrina a 8%. Os parâmetros avaliados nesse experimento foram: (a) *Knock down* e (b) mortalidade. Em cada repetição, 25 fêmeas de *Ae. aegypti* foram acondicionadas em gaiolas teladas (30 x 30 x 30cm) (Bugdorm-1, MegaView Science Co., Ltd. Taiwan). As tiras impregnadas com transflutrina foram colocadas a 50 cm ou a 100 cm da caixa contendo os mosquitos, a uma altura de 25cm da bancada, e um ventilador elétrico (12V e 14 cm de diâmetro), que produzia uma corrente de ar constante (0,9 m/s), foi colocado no lado oposto da gaiola contendo os mosquitos, a 50 cm das tiras impregnadas (Figura 7). A temperatura e umidade média do local foram medidas com um termo-higrômetro e o tempo de exposição do experimento foi de 30 min.

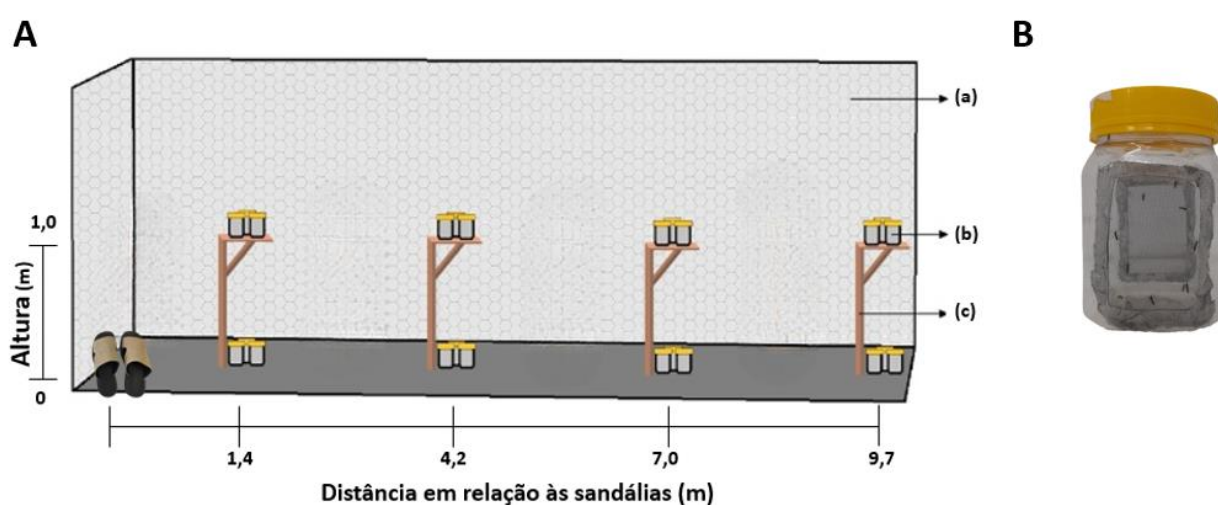


**Figura 7. Ilustração do desenho experimental para avaliar o efeito da exposição à transflutrina na biologia de *Aedes aegypti* em laboratório.** (a) Gaiola contendo 25 fêmeas de *Ae. aegypti*; (b) Tiras de Juta impregnadas com transflutrina ou controle; (c) Ventilador.

Após a exposição foi observada a quantidade de mosquitos caídos em três momentos distintos: (1) logo após o fim da exposição, (2) 1h após o término da exposição e (3) 24h após o término da exposição. Mosquitos que estavam caídos logo após e até 1h após a exposição foram considerados em *knock down*, enquanto mosquitos que continuaram caídos após 24h do final da exposição foram considerados mortos. Foram realizadas 6 repetições para cada tratamento (tira impregnada e controle), totalizando 300 mosquitos. Os mosquitos observados foram mantidos em condições controladas, no insetário do Lintec, descrita em detalhes no item 3.2 do **Capítulo I**.

### **3.7 Avaliação do efeito da exposição à transflutrina na biologia de fêmeas de *Aedes aegypti* em semicampo**

Para avaliar o efeito da exposição à transflutrina, fêmeas de *Ae. aegypti*, confinadas em potes, foram posicionados a 0,5m e a 1,0m acima do solo em suportes de madeira instalados a (i) 1,4m (ii) 4,2m; (iii) 7,0m e (iv) 9,7m de distância de pedaço de 327cm<sup>2</sup> de juta impregnada com transflutrina 8% e anexada a uma sandália de borracha (Figura 8A). Os potes de polipropileno (350 mL) utilizados para o confinamento dos mosquitos foram adaptados com tela de nylon em duas faces paralelas, formando aberturas de 4cm x 5,5cm, para permitir a circulação do ar e garantir que os mosquitos entrassem em contato com a transflutrina liberada no ambiente (Figura 8B).



**Figura 8. Ilustração do desenho experimental para avaliar o efeito da exposição à transflutrina na biologia do *Aedes aegypti* em semicampo (A) e pote de polipropileno adaptado para o experimento (B).** (a) Câmara do semicampo com 37m<sup>2</sup>; (b) Potes de propileno contendo os mosquitos; (c) Estacas de madeira para posicionar os potes em diferentes alturas e distâncias das sandálias (fonte de transflutrina).

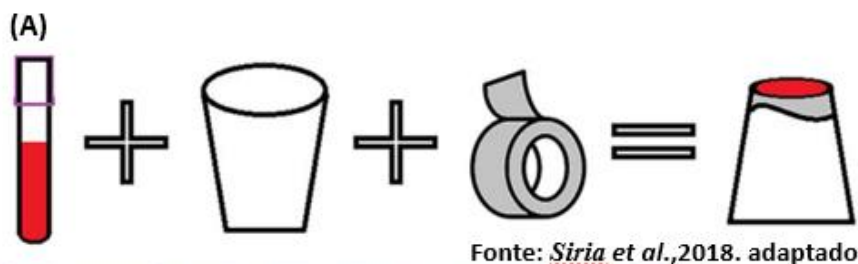
Os mosquitos foram expostos às sandálias com tira de juta impregnadas com transflutrina 8% ou não impregnadas (controle) durante 30 min, separadamente, sendo realizado primeiro o teste controle para evitar contaminação do ambiente com o repelente espacial. Foram realizadas três repetições do experimento e após o término de cada repetição, os mosquitos foram encaminhados ao laboratório, onde foram avaliadas as seguintes respostas: (a) efeito *knock down* (mosquitos que caíram durante o experimento, mas se recuperaram até 1h após o final da exposição); (b) mortalidade (mosquitos que morreram em até 24h após o final da exposição); e (c) comportamento alimentar (mosquitos que realizaram o repasto sanguíneo após a exposição).

### 3.7.1 Avaliação do efeito knock down e mortalidade de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à transflutrina

Após a exposição à transflutrina 8% no semicampo, as fêmeas foram observadas em laboratório em períodos pré-determinados para avaliar o efeito *knock down* e a taxa de mortalidade. Nos períodos logo após o experimento (tempo 0), 1h, 12h e 24h após a exposição, os mosquitos caídos no pote foram contabilizados e as fêmeas caídas no tempo 0 e 1h pós-exposição foram consideradas *knock down*, enquanto as fêmeas caídas no período de 12h e 24h pós-exposição foram consideradas mortas.

### 3.7.2 Avaliação do comportamento alimentar de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à transflutrina

Os mosquitos que permaneceram vivos receberam alimentação sanguínea 1h, 12h e 24h após a exposição à transflutrina 8%, com sangue de galinha (*Gallus gallus domesticus*). O sangue foi adicionado no fundo (externamente) de um copo descartável de 50mL e coberto com uma camada de politetrafluoretileno (PTFE) formando uma membrana (Siria et al., 2018) (Figura 9A). No interior dos copos foram adicionados 50 mL de água a 37 °C, para manter o sangue aquecido. Em seguida, os copos foram posicionados na superfície telada dos potes, de modo que os mosquitos conseguissem ter acesso ao sangue, se alimentando através da membrana de PTFE (Figura 9B). Os mosquitos foram alimentados durante 30 min *ad libitum* e, em seguida, a quantidade de fêmeas ingurgitadas foi contabilizada.



**Figura 9.** Ilustração da montagem do sistema de alimentação artificial com membrana de politetrafluoretileno (A) e fêmeas de *Aedes aegypti* sendo alimentadas com sangue de galinha (*Gallus gallus domesticus*) (B). Adaptado de Siria *et al.* (2018).

### 3.8 Análise de dados

Testes T de Student e Análise de Variância (ANOVA) foram utilizados para estimar as diferenças em cada experimento, respeitando a normalidade da distribuição dos dados. No experimento realizado no olfatômetro, as variáveis dependentes foram: (a) média de mosquitos inativos; (b) média de mosquitos ativados; (c) média de mosquitos vivos; (d) média de mosquitos mortos e (e) média de mosquitos atraídos, enquanto as variáveis independentes foram (a) calibração; (b) voluntário humano e (c) transflutrina a 2% ou 8%. No experimento com correntes de ar contendo transflutrina, as variáveis dependentes foram: (a) média de mosquitos caídos; (b) média de mosquitos em efeito *knock down* e (c) média de mosquitos mortos, enquanto as variáveis independentes foram (a) controle; (b) voluntário humano, (c) tempo após exposição (logo após a exposição, 1h após exposição e 24h após exposição) e (d) distância das tiras de juta (0,5m e 1,0m).

No experimento realizado em semicampo para avaliar o efeito da exposição à transflutrina na biologia dos mosquitos, as variáveis dependentes foram: (a) média de mosquitos em efeito *knock down*; (b) média de mosquitos mortos e (c) média de mosquitos alimentados, enquanto as variáveis independentes foram (a) sandálias controle;

(b) sandálias tratadas com transflutrina, (c) tempo após exposição (logo após a exposição, 1h após exposição e 24h após exposição) e (d) distância das tiras de juta.

Em todas as análises, resultados com p-valor menor ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados utilizando o software Graphpad Prism versão 9.0.0.

## 4. Resultados

### 4.1 Avaliação do efeito *knock down* e mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas à transflutrina em olfatômetro

Nos testes preliminares de calibração (sem estímulo olfativo) não houve diferença significativa na proporção de escolha dos braços do olfatômetro pelos mosquitos ( $p > 0,05$ ). Portanto, considerou-se que o olfatômetro horizontal de dupla escolha não apresentava nenhuma característica que pudesse influenciar a escolha dos mosquitos por um dos tubos de escolha em detrimento do outro.

A transflutrina provocou uma mortalidade nos mosquitos superior a 60% em ambas as concentrações utilizadas. Foi observada uma mortalidade de 61,14% de mosquitos expostos à transflutrina 2% e 69,03% em mosquitos expostos à transflutrina 8%. Nos testes com voluntários não observou-se mortalidade, enquanto no teste de calibração a mortalidade foi inferior a 2% (Figura 10).

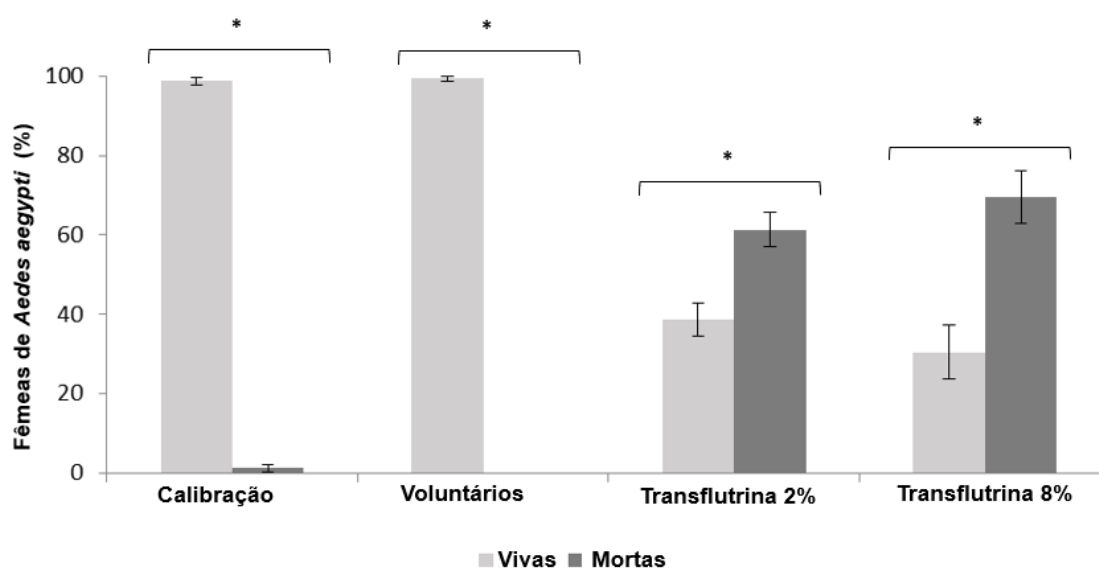
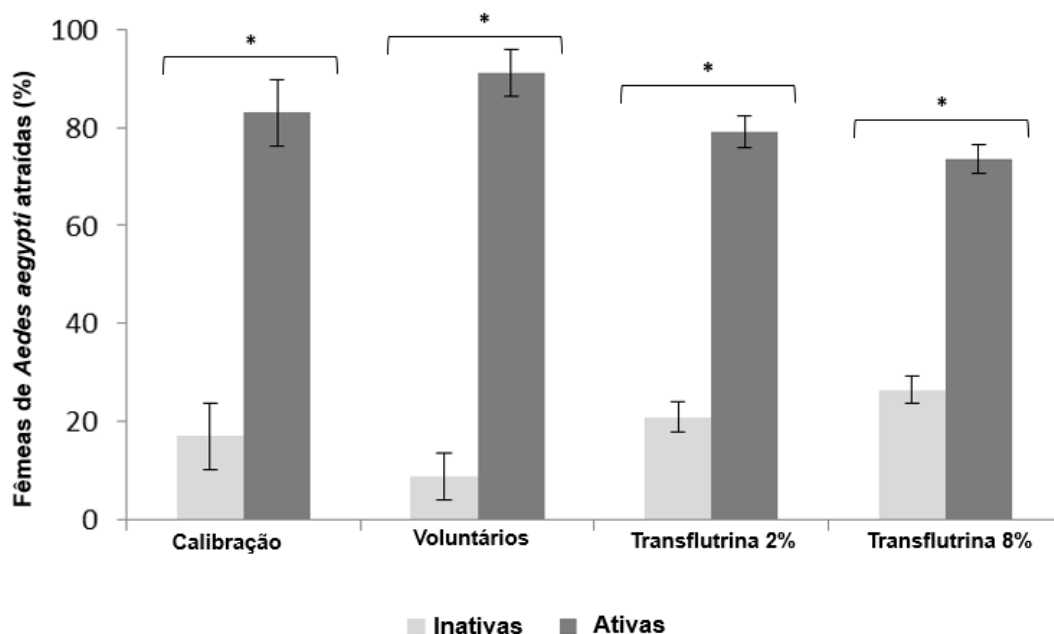
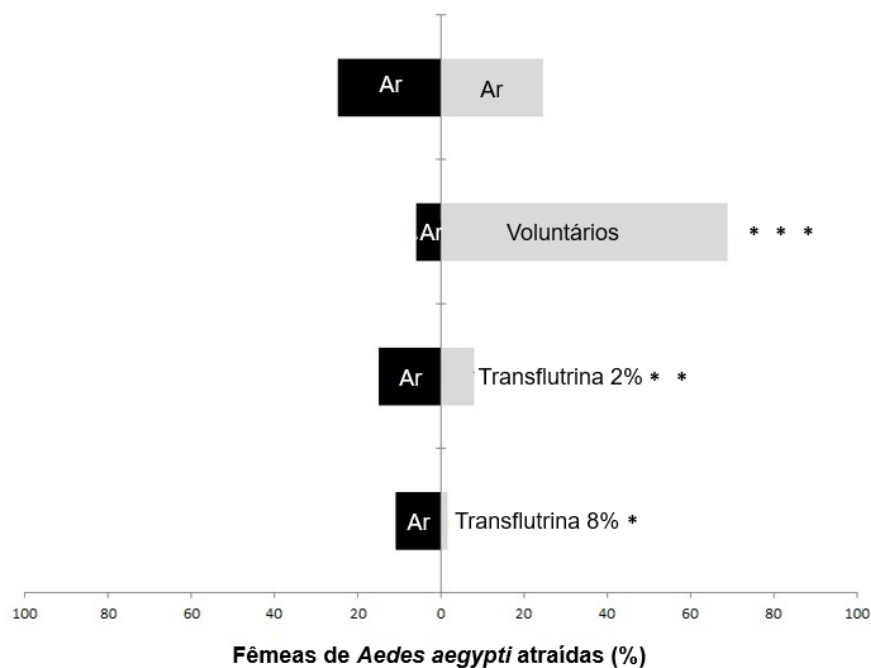


Figura 10. Proporção média de fêmeas de *Aedes aegypti* vivas ou mortas após exposição à tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina 2% ou 8%, em ensaio comportamental utilizando olfatômetro horizontal de dupla escolha. (\*) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Entre os mosquitos que permaneceram vivos ao final do experimento, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os mosquitos que se locomoveram contra o fluxo de vento (ativados) para os tubos de escolha contendo transflutrina 2% e 8% e os mosquitos que permaneceram na gaiola de liberação (inativos) durante o período do experimento (Figura 11). Os mosquitos foram mais atraídos para o tubo de escolha com o estímulo do odor humano em relação ao tubo de escolha vazio ( $p<0,001$ ), demonstrando que as fêmeas utilizadas nos testes estavam em busca de um hospedeiro. Quando os mosquitos foram expostos à transflutrina, os que foram ativados tiveram uma predileção ao tubo de escolha com ar limpo (sem estímulo), em detrimento ao tubo com o repelente (Figura 12).



**Figura 11. Proporção média de resposta de fêmeas de *Aedes aegypti* à tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina a 2% ou 8% em olfatômetro horizontal de dupla escolha.** Inativas: mosquitos que não voaram e permaneceram na gaiola de liberação; Ativas: Mosquitos que saíram da gaiola de liberação, atingindo as demais partes do olfatômetro. (\*) indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ).



**Figura 12. Resposta de fêmeas de *Aedes aegypti* atraídas à diferentes estímulos em olfatômetro horizontal de dupla escolha.** Ar: braço do olfatômetro com corrente de ar limpo, sem estímulo; Voluntários: braço do olfatômetro associado a voláteis dos dedos humanos; Transflutrina 2%: tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina a 2%; Transflutrina 8%: tiras de juta impregnadas com solução de transflutrina a 8%. (\*) indicam diferenças significativas (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.2 Avaliação do efeito *knock down* e mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* expostas à transflutrina em um túnel de vento.

A transflutrina produziu o efeito *knock down* e mortalidade em todas as distâncias avaliadas. Mosquitos que foram expostos à transflutrina, independente da concentração, apresentaram uma maior média de *knock down* em todos os parâmetros analisados, quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Logo após a exposição à transflutrina, o efeito *knock down* foi superior nos mosquitos que estavam a 0,5m das jutas impregnadas em relação aos que estavam expostos a 1m de distância, porém não houve diferença significativa entre ambos os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Número médio de fêmeas de *Aedes aegypti* caídas logo após, 1h (efeito *knock down*) e 24 horas (mortos) após o final da exposição à transflutrina em um túnel de vento.

Evento	Tempo pós Exposição	Distância (m)	Controle (Média ± EP)	Transflutrina (Média ± EP)	<i>p</i> -valor
<i>Knock down</i>	Logo após exposição	0,5	0 ± 0 <sup>a</sup>	32,7 ± 8,6 <sup>b</sup>	0,0001
		1	0 ± 0 <sup>a</sup>	18,7 ± 6,0 <sup>b</sup>	0,02
	1 hora	0,5	0 ± 0 <sup>a</sup>	28,7 ± 8,0 <sup>b</sup>	0,0007
		1	0 ± 0 <sup>a</sup>	20,0 ± 7,4 <sup>b</sup>	0,0159
Mortalidade	24 horas	0,5	0 ± 0 <sup>a</sup>	4,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	0,0049
		1	0 ± 0 <sup>a</sup>	11,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	<0,0001

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em uma mesma linha.

Foi observada uma maior média de mortalidade (11,33%) em mosquitos que estavam a 1m da fonte de transflutrina, quando comparados à mosquitos a 0,5m de distância ( $p < 0,05$ ). A média de mortalidade de mosquitos nas duas distâncias analisadas foram maiores do que seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

### 4.3 Avaliação do efeito da exposição à transflutrina na biologia de fêmeas de *Aedes aegypti*

#### 4.3.1 Avaliação do efeito *knock down* e mortalidade de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à transflutrina

Durante o experimento foram utilizados um total de 5.724 mosquitos, dos quais 187 (3,26%) mosquitos entraram em *knock down* e 864 (15,1%) mosquitos morreram. Em mosquitos que estavam posicionados ao nível do solo e a 1,4m da fonte de transflutrina, a média *knock down* foi de  $33,06 \pm 8,4$ , sendo a maior média entre todos os tratamentos avaliados e com maior diferença com seu respectivo controle ( $p < 0,0001$ ) (Figura 13). Mosquitos que estavam ao nível do solo e a 9,7m de distância da fonte de transflutrina também apresentaram uma maior média de mosquitos caídos logo após a exposição em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Entre os demais tratamentos avaliados e seus controles não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 13).



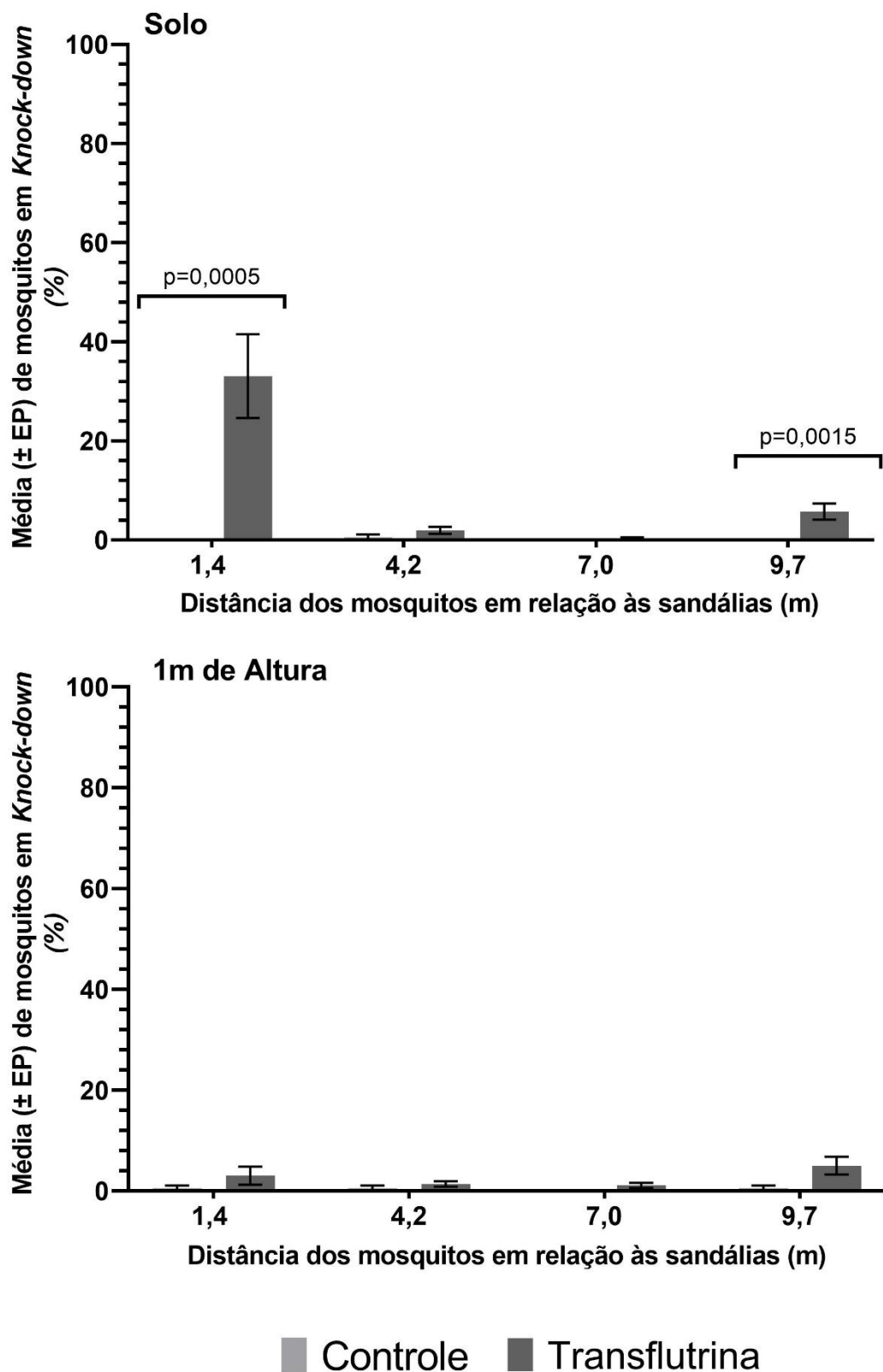
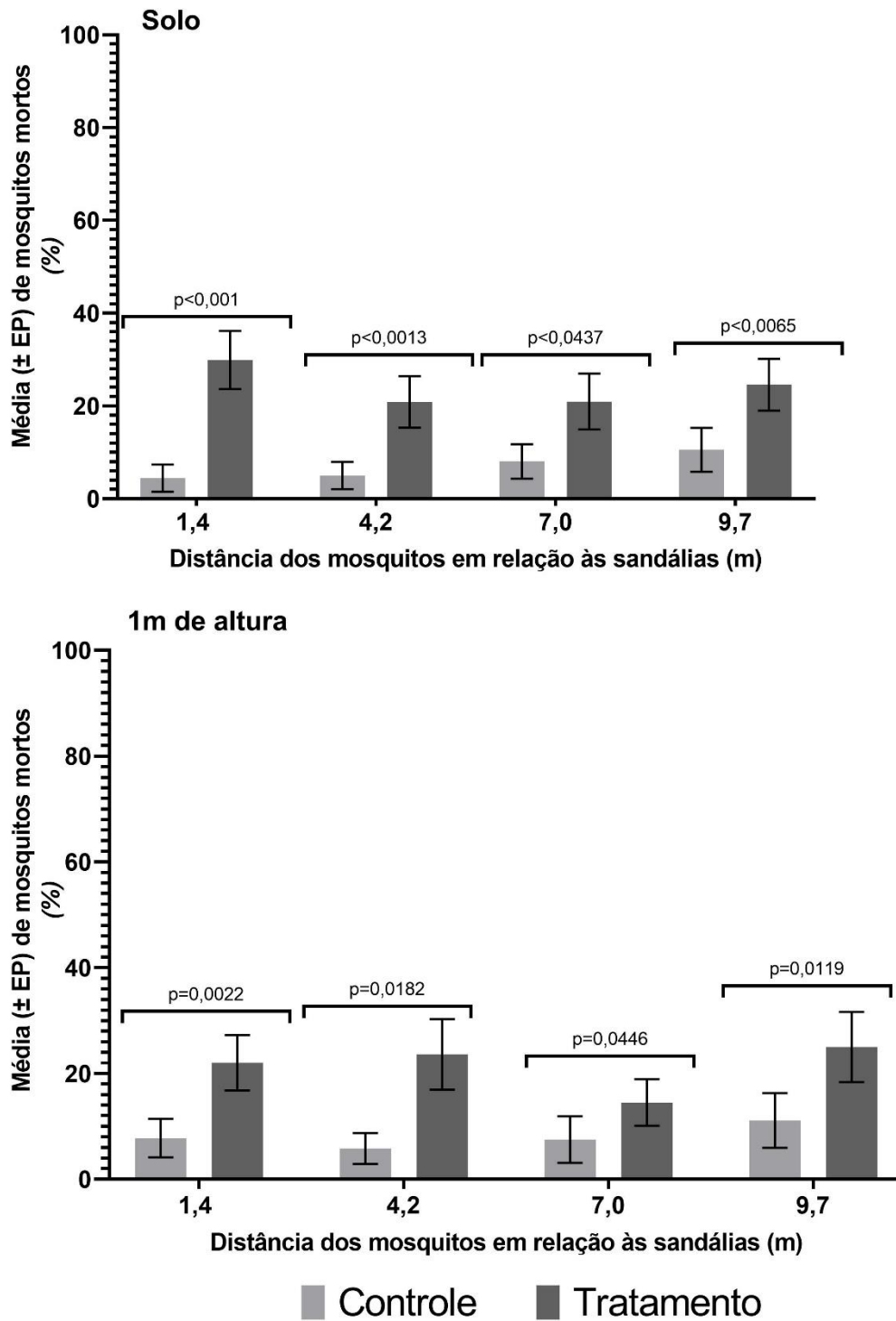


Figura 13. Percentual médio ( $\pm$ EP) de mosquitos em efeito *knock down* ao nível do solo e a 1m de altura e em diferentes distâncias da fonte de transflutrina. Colchetes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos e seus respectivos controles.

Em todas as distâncias e alturas analisadas foi observada maior mortalidade em mosquitos expostos à transflutrina do que mosquitos expostos ao seu respectivo controle ( $P < 0,05$ ), sendo que a maior diferença foi observada em mosquitos que estavam ao nível do solo e a 1,4m da fonte de transflutrina (Figura 14). Comparando apenas mosquitos expostos à transflutrina, não foi observada diferença entre as mortalidades nas diferentes distâncias ( $p > 0,05$ ).



**Figura 14.** Número médio ( $\pm$  EP) de mosquitos mortos ao nível do solo e a 1m de altura e em diferentes distâncias da fonte de transflutrina. Colchetes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos e seus respectivos controles.

4.3.2 Avaliação do comportamento alimentar de fêmeas de *Aedes aegypti* expostas à transflutrina

Dos 4.860 mosquitos sobreviventes, 1.849 (38,04%) foram capazes de efetuar a alimentação sanguínea. Deste total 1.069 (57,81%) foram expostos às sandálias não tratadas (controle). A transflutrina afetou a alimentação dos mosquitos somente 1h após a exposição, no qual observou-se uma redução na média de alimentação nos mosquitos posicionados a 1m de altura e a 1,4m e 7m de distância da fonte de transflutrina, em comparação aos seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 15). Entretanto, não houve diferença nos demais tratamentos avaliados nesse mesmo período. Contudo, nos períodos seguintes em que foi oferecido repasto sanguíneo aos mosquitos, 12 e 24h após a exposição, não houve diferença no número médio de mosquitos alimentados expostos aos diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ), indicando que em algum momento após o primeiro horário de repasto (1h pós-exposição), os mosquitos retomaram a alimentação normal (Tabela 2)

**Tabela 2. Número médio de mosquitos alimentados posicionados em diferentes alturas e distâncias da fonte de transflutrina em semicampo.**

Altura (m)	Distância (m)	Tempo pós exposição					
		1hora		12horas		24horas	
		Controle (Média ± EP)	Transflutrina (Média ± EP)	Controle (Média ± EP)	Transflutrina (Média ± EP)	Controle (Média ± EP)	Transflutrina (Média ± EP)
Solo	1,4	46,5 ± 11,1 <sup>a</sup>	48,5 ± 14,5 <sup>a</sup>	31,1 ± 5,1 <sup>a</sup>	42,8 ± 9,8 <sup>a</sup>	35,4 ± 3,3 <sup>a</sup>	57,8 ± 12,3 <sup>a</sup>
	4,2	37,3 ± 7,37 <sup>a</sup>	40,4 ± 13,8 <sup>a</sup>	38,0 ± 4,4 <sup>a</sup>	36,7 ± 7,6 <sup>a</sup>	36,8 ± 5,3 <sup>a</sup>	59,6 ± 8,5 <sup>a</sup>
	7	44,0 ± 9,76 <sup>a</sup>	46,5 ± 15,5 <sup>a</sup>	40,3 ± 3,5 <sup>a</sup>	27,9 ± 6,7 <sup>a</sup>	37,7 ± 6,5 <sup>a</sup>	57,9 ± 8,7 <sup>a</sup>
	9,7	35,9 ± 11,4 <sup>a</sup>	12,9 ± 4,2 <sup>a</sup>	38,6 ± 4,7 <sup>a</sup>	24,9 ± 6,7 <sup>a</sup>	39,3 ± 7,3 <sup>a</sup>	35,1 ± 4,6 <sup>a</sup>
1m	1,4	57,5 ± 7,6 <sup>a</sup>	19,0 ± 5,5 <sup>b</sup>	39,4 ± 6,0 <sup>a</sup>	34,5 ± 3,3 <sup>a</sup>	38,5 ± 4,9 <sup>a</sup>	58,6 ± 9,8 <sup>a</sup>
	4,2	39,2 ± 8,0 <sup>a</sup>	42,6 ± 12,1 <sup>a</sup>	34,7 ± 64,9 <sup>a</sup>	47,2 ± 77,8 <sup>a</sup>	41,1 ± 6,8 <sup>a</sup>	50,6 ± 7,3 <sup>a</sup>
	7	45,8 ± 3,0 <sup>a</sup>	25,4 ± 7,2 <sup>b</sup>	32,4 ± 4,9 <sup>a</sup>	29,6 ± 8,7 <sup>a</sup>	42,8 ± 7,8 <sup>a</sup>	40,0 ± 7,7 <sup>a</sup>
	9,7	37,8 ± 7,6 <sup>a</sup>	44,4 ± 17,7 <sup>a</sup>	42,1 ± 9,4 <sup>a</sup>	33,2 ± 8,0 <sup>a</sup>	37,5 ± 10,0 <sup>a</sup>	51,1 ± 6,5 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em cada período pós-exposição entre cada grupo de de mosquitos expostos à transflutrina e seu respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

## 5. Discussão

No presente estudo, tiras de juta impregnadas com transflutrina foram testadas como agente causador de *knock down*, mortalidade e inibidor de alimentação, em experimentos realizados em condições de laboratório e de semicampo. Em condições de laboratório, foi utilizado um olfatômetro de dupla escolha e um ventilador que emitia um fluxo de ar constante. Testes realizados em laboratório permitem uma maior quantidade de repetições diárias, devido a facilidade dos procedimentos pré e pós experimentais, fato que não ocorre em experimentos em área de semicampo, que exigem maior quantidade de materiais e um tempo de preparo entre as repetições consideravelmente maiores (Ogoma *et al.*, 2012). Em contrapartida, estes testes reproduzem mais fielmente as condições encontradas no dia a dia, devido aos fatores ambientais variáveis, como temperatura, umidade do ar, velocidade e direção dos ventos (Knols *et al.*, 2004; Fergusson *et al.*, 2008; Roque e Eiras, 2008; Ritchie *et al.*, 2011).

A escolha do dispositivo usado como matriz liberadora de um repelente espacial pode afetar sua eficácia. A utilização de repelentes espaciais dependentes de fonte externa de energia para funcionamento garante uma liberação constante. No presente estudo foi utilizado um liberador passivo, cuja taxa de liberação ainda é desconhecida, sendo esse um fator limitante do estudo. A versatilidade da juta permitiu sua apresentação em diferentes tamanhos, podendo se adequar a metodologia utilizada em cada experimento. Masalu *et al.*, (2017) utilizaram cestos e placas decorativas confeccionados com a juta impregnada com transflutrina em locais de grande circulação de pessoas, na Tanzânia, e observaram que os aparatos foram capazes de reduzir a frequência de picadas de *An arabiensis* em até 89%. No mesmo país, tiras de juta impregnadas com transflutrina foram utilizadas para a confecção de sandálias reduziram o pouso de *An gambiae s.l* em voluntários em cerca de 59% (Sangoro *et al.*, 2020)

Em testes utilizando olfatômetro horizontal de dupla escolha observou-se efeito repelente e mortalidade nos em *Ae. aegypti*, induzido pela transflutrina. A variação na mortalidade dos mosquitos que foram expostos a diferentes concentrações de transflutrina (2 e 8%) sugere que, assim como ocorre com efeitos repelentes, pode existir um limiar de concentração para a letalidade (Fradin & Day, 2002; Ogoma *et al.*, 2014). Em um estudo da repelência da Icaradina utilizando o mesmo tipo de olfatômetro, foi observado que a transflutrina atingiu o mesmo nível de repelência da Icaradina, porém em uma concentração 333 vezes menor (0,03mg) (Netwing *et al.*, 2017).

Ainda em condições de laboratório, em testes utilizando correntes de ar em sistema aberto, a transflutrina 8% provocou maior taxa de *knock down* (paralisação) em comparação à taxa de mortalidade, independente da distância da fonte de transflutrina (50cm ou 100cm). Um experimento realizado no Vietnã demonstrou que um tecido de juta impregnado com transflutrina (2%) provocou *knock down* e mortalidade em mosquitos do gênero *Anopheles* que estavam a até 4m da fonte do repelente espacial. (Martin *et al.*, 2020). Esse resultado sugere que a transflutrina é capaz de causar efeitos na biologia de diferentes espécies de vetores com importância epidemiológica. Experimentos utilizando um emanador comercial à pilha OFF! Clip-on (S.C. Johnson & Son, Inc) cujo princípio ativo era metoflutrina (31,2%) induziram taxas semelhantes de efeito *knock down* e mortalidade em fêmeas de *Ae aegypti* expostas a 30cm e 60cm da fonte do repelente espacial. Porém, a uma distância maior da fonte emanadora (90cm) não foi observado efeito *knock down* nem mortalidade nos insetos (Bibbs & Xue, 2016). Nossos resultados sugerem que a transflutrina, mesmo em uma concentração cerca de 4 vezes menor, é capaz de afetar mosquitos que estão em uma maior distância, quando comparada com a metoflutrina.

Em testes no olfatômetro no presente estudo, observou uma maior taxa de mortalidade do que de efeito *knock down*. Já o contrário foi observado em testes utilizando correntes de ar geradas por um ventilador. Tal diferença no efeito da transflutrina nos dois sistemas pode ter ocorrido pelo fato do olfatômetro, por ser um sistema fechado, direcionar o fluxo de ar totalmente para os mosquitos, evitando a dissipação do composto analisado para o ambiente e induzindo um aumento do efeito letal do piretróide.

O fato de os mosquitos estarem confinados em sistemas fechados durante os testes em laboratório foi um fator limitante do estudo. Uma vez que a utilização de repelentes espaciais se dá normalmente em áreas abertas, os mosquitos, em condições naturais, estão propensos a entrarem em contato com uma menor concentração de repelente do que mosquitos confinados em caixas ou gaiolas (Hougard *et al.*, 2003, Ogoma *et al.*, 2014).

No presente estudo, a transflutrina 8% reduziu a hematofagia de *Ae. aegypti* que estavam somente a 1m de altura do solo e a 1,4m e 7,0m de distância da fonte de transflutrina. Em estudos utilizando cabanas experimentais em semicampo na Tanzânia, bobinas de transflutrina (0,03%) reduziram a alimentação em 98%, metoflutrina (0,00625%) em 93% e DDT impregnado nas paredes em 77% em *Anopheles gambiae* (Ogoma *et al.*, 2014a). Em outro estudo realizado em uma câmara Peet Grady (estrutura

fechada utilizada para testar produtos inseticidas em insetos, feita de aço, alumínio ou vidro de 1,80m x 1,8m x 1,8m), contendo um ventilador no interior que garante um fluxo contínuo de ar) (WHO, 2009), Ogoma e colaboradores (2014b) observaram que mosquitos *An. gambiae* s.s, quando expostos à fase de vapor de transflutrina (0,015, 0,030 e 0,045%) emanadas de bobinas, na presença de um ventilador, apresentaram uma redução de até aproximadamente 30% na alimentação sanguínea. Tais características podem ter potencializado a atuação da transflutrina como agente inibidor de alimentação sanguínea, mesmo em baixas concentrações. O fato de Ogoma e colaboradores terem usado um repelente espacial dependente de combustão tanto nos testes em cabanas experimentais quanto nos testes utilizando a *câmara Peet Grady* pode ter influenciado na quantidade de mosquitos que não conseguiram realizar o repasto sanguíneo. Além disso, a utilização de outra espécie de mosquito pode ter influenciado na resposta alimentar após contato com o inseticida, uma vez que diferentes espécies de mosquitos podem apresentar comportamentos alimentares e respostas a estímulos diferentes entre si.

A inibição da hematofagia é uma forma muito eficiente de evitar a transmissão de arboviroses, uma vez que a diminuição da alimentação sanguínea possivelmente prolongará o ciclo gonotrófico, podendo alterar a capacidade vetorial dos mosquitos. (Debboun *et al.*, 2006). A capacidade da transflutrina em causar *knock down* e mortalidade pode ser vista, de maneira prática, como um efeito similar à repelência, uma vez que impedirá a realização do repasto sanguíneo (Nentwig *et al.*, 2017). Além disso, a inibição da capacidade alimentar não contribui para a seleção de mosquitos resistentes a inseticidas, por não selecionar mosquitos resistentes (Achee *et al.*, 2009).

Visto isso, a transflutrina pode ser utilizada como princípio ativo de repelentes espaciais passivos, uma vez que a indução de morte e efeito *knock down* impede a realização de picadas por *Aedes aegypti*, fornecendo proteção. A inibição da hematofagia também é um efeito importante, uma vez que com a alimentação sanguínea comprometida, a circulação de patógenos veiculados por esse vetor é diminuída, resultando em uma diminuição de doenças.

## 6. Conclusão

- A transflutrina a 2% e 8% foi capaz de provocar efeito *knock down* e mortalidade em fêmeas de *Ae. aegypti*;

- Houve maior taxa de mortalidade do que de efeito *knock down* em fêmeas de *Ae. aegypti* expostas à transflutrina em olfatômetro de dupla escolha;
- Em testes utilizando corrente de ar, a transflutrina foi mais eficaz em provocar efeito *knock down* do que mortalidade em fêmeas de *Ae. aegypti*;
- A transflutrina 8% reduziu a alimentação sanguínea de fêmeas de *Ae. aegypti* somente até 1h após a exposição, quando estavam a 1m de altura e nas distâncias de 1,4m e 7,0m da fonte de transflutrina.



## **CAPITULO II**

**Avaliação do efeito repelente de sandálias impregnadas com n transflutrina contra picadas de *Aedes aegypti***

## 1. Introdução

Devido ao grande impacto sócio-econômico de arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti*, como Dengue, Zika e Chikungunya (Ministério da Saúde, 2002, 2014; Garcia, 2018), existe a necessidade de desenvolver e implantar ferramentas complementares ao controle deste vetor, que possam reduzir as picadas de mosquitos, e conseqüentemente, a circulação dessas arboviroses (Achee *et al.*, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009, 2013), os repelentes espaciais são métodos complementares para a redução da transmissão de arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti*, pois evitam o contato humano-mosquito, interferindo na resposta do vetor aos estímulos químicos que indicam um hospedeiro em potencial (Achee *et al.*, 2012; WHO, 2009, 2013).

Atualmente, os repelentes espaciais mais utilizados pela população em geral são emanados por dispositivos que precisam de fonte de energia externa, como a queima ou eletricidade para funcionamento. Essa característica, em muitos casos, pode dificultar ou impossibilitar seu uso, além da limitação de mobilidade desses dispositivos. Para terem proteção ao ar livre, os modelos de repelente espaciais devem ser desenvolvidos para promover a proteção do usuário dentro do domicílio ou quando este estiver ao ar livre.

Mosquitos vetores de doenças apresentam uma atratividade por determinadas áreas do corpo humano que são mais atrativas, como por exemplo pernas e pés (Smallegange *et al.*, 2011; Braack *et al.*, 2015). A proteção dessas partes do corpo pode resultar em uma significativa redução de picadas, e conseqüentemente um aumento na proteção do usuário. Com isso, aparatos impregnados com repelentes que possam reduzir a aproximação de insetos vetores, sobretudo nessas áreas do corpo, vem sendo desenvolvidos nos últimos anos. Tecidos de juta impregnados com o piretóide transflutrina foram eficazes em fornecer cerca de 90% de proteção contra picadas de *An. Arabiensis* por até 6 meses (Ogoma *et al.* 2012). Objetos de uso diário confeccionados com juta e impregnados com transflutrina também tiveram suas eficácias como repelente espacial avaliados. Bancos de madeira com uma camada de juta tratada com transflutrina sob o assento, colocados no peridomicílio, demonstraram ser efetivos na redução de picadas de *An. arabiensis* e *Culex spp.*, tanto na estação seca quanto chuvosa (Masalu *et al.*, 2020). Recentemente, sandálias fabricadas com tiras de juta impregnadas com transflutrina apresentaram uma redução de 37% de pousos de *Ae. aegypti* e 70% no pouso

de *An. gambiae s.l* em pessoas que utilizavam esses calçados em uma área rural da Tanzânia (Sangoro *et al.*, 2020).

Dessa forma, além do benefício em reduzir picadas de mosquitos em geral no ser humano (Braack *et al.*, 2015; Durrheim & Govere, 2002), a utilização de aparatos impregnados com repelentes espaciais, como calçados, garante ao usuário estar sempre dentro da bolha de proteção fornecida pelo repelente (Ogomoa *et al.*, 2012; Govella *et al.*, 2015; Masalu *et al.*, 2017; Sangoro *et al.*, 2020).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito repelente de tiras de juta impregnadas com transflutrina contra picadas de *Aedes aegypti*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito repelente de tiras de juta impregnadas com transflutrina utilizando caixas de exposição BG-Cage, em condições de laboratório.
- Desenvolver protótipos de sandálias com tiras de juta impregnadas com transflutrina e avaliar o efeito repelente em *Ae. aegypti*
- Avaliar o efeito repelente de sandálias com tiras de juta impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina em *Ae. aegypti*

## **3. Material e Métodos**

### **3.1 Local do estudo**

O estudo foi realizado na área de semicampo do Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo no Controle de Vetores (Lintec), localizado no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. A estrutura da área de semicampo está descrita em detalhes no item **3.1.2** do **Capítulo I**. As duas câmaras (29m<sup>2</sup>) foram utilizadas no estudo, no entanto, para a realização de alguns experimentos foi necessário ajustar o tamanho de uma das câmaras para 12,5m<sup>2</sup>.

### **3.2 Mosquitos**

Os mosquitos utilizados foram obtidos da colônia do insetário do LINTEC. As informações sobre a colônia e sua manutenção, bem como a condição dos mosquitos utilizados no experimento, está descrita em detalhes no item **3.2** do **Capítulo I**.

### **3.3 Voluntários**

Para avaliar a eficácia das sandálias em proteger as pessoas contra picadas de mosquitos, quatro voluntários, dois do sexo masculino (RDS e TBR, ambos com 26 anos) e duas do sexo feminino (EFM, 43 anos, e MCM, 19 anos). Os voluntários receberam treinamento para os testes de recaptura de mosquitos com um aspirador manual de Castro e foram instruídos a não usarem produtos que pudessem alterar o odor natural do corpo durante os testes, bem como a evitar a ingestão de álcool e uso de cigarro por 24h antes dos experimentos. Durante os experimentos, os voluntários permaneceram sentados em cadeiras de plástico e usaram um macacão de polipropileno SMS branco Steelgen Confort (Vicsa<sup>®</sup>, Brasil), deixando expostos apenas o rosto, as pernas e os pés, para evitar picadas dos mosquitos nas outras partes do corpo (Figura 15)



**Figura 15.** Voluntário realizando recaptura de mosquitos com o auxílio de um Capturador de Castro, na câmara de testes do semicampo.

### **3.4 Tiras impregnadas com transflutrina e Sandálias repelente**

Os protótipos das sandálias repelente foram confeccionados a partir de adaptações em sandálias Havaianas Tradicional (Alpargatas S.A), nas quais tiras de juta impregnadas

com o piretróide transflutrina (TC 99%, Bayer S.A., Alemanha) foram anexadas às tiras de borracha das sandálias. O processo de impregnação das tiras de juta não será descrito em detalhes devido a segredo de patente ou de *know-how*.

### 3.5 Avaliação do efeito repelente de tiras de juta impregnadas com transflutrina utilizando caixas de exposição BG-Cage

Foram utilizadas caixas de repelência BioGents Cages (BG-Cage) (Obermayr *et al.*, 2010) para a avaliação de repelência de tiras de juta (9 cm x 4cm) impregnadas com 2% e 8% de transflutrina. A BG-Cage consiste em uma caixa com um volume aproximado de 0,027 m<sup>3</sup> (41 x 41 x 16 cm), com as paredes laterais feitas de alumínio e a parede frontal feita em acrílico transparente. O piso da gaiola é feito de uma chapa metálica e a parte do fundo é coberta por um tecido tipo gaze para permitir a liberação dos mosquitos (Figura 16A). A chapa metálica que compõe o piso possui uma janela de teste de 56 cm<sup>2</sup> (14,8 x 3,8 cm), cortada no centro da borda frontal. O teto da gaiola contém uma abertura conectada à um sistema de ventilação de ar que permite a circulação de ar quente e úmido (26 ± 1°C e 60 ± 5% UR) a uma taxa de fluxo de 40–80 cm/s na gaiola entre os testes (Figura 16B). Antes do teste, uma estrutura de metal, um pouco maior que a abertura da janela de teste, foi montada em um trilho abaixo da mesma, que era aberta no início de cada teste. A armação metálica foi utilizada como espaçador para manter o braço do voluntário a uma distância definida de 150 mm da janela de teste (Obermayr *et al.*, 2010).

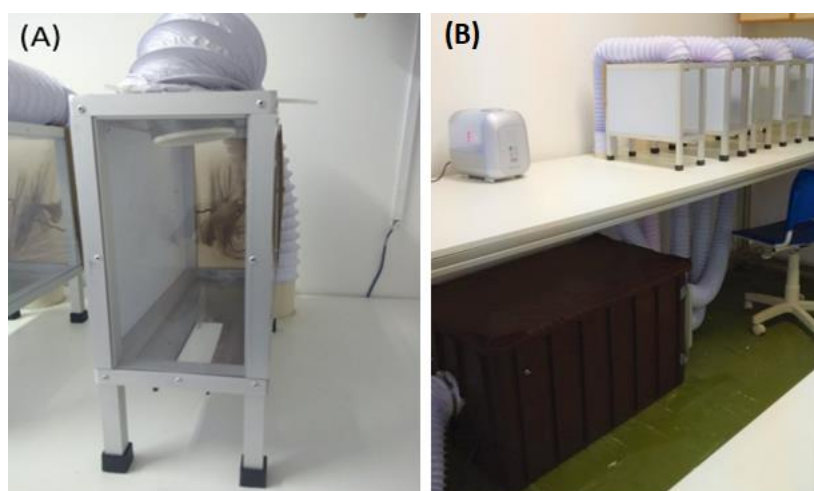
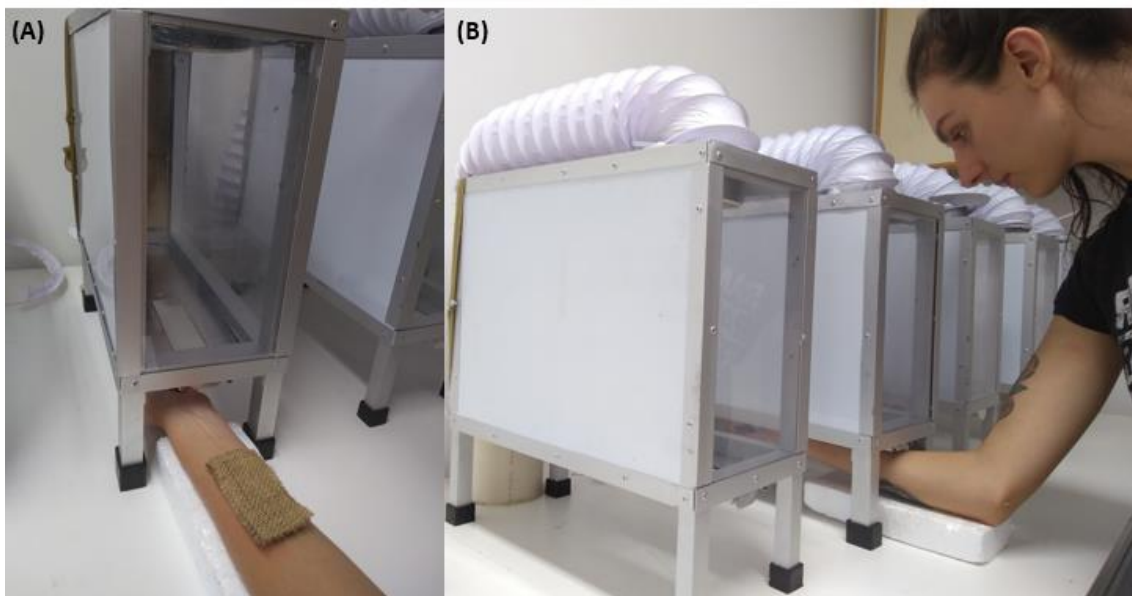


Figura 16. Caixa de repelência BioGents Cage (A) e estrutura do sistema de ventilação (B).

Para a realização do teste, um voluntário posicionou o antebraço abaixo da caixa de repelência, próximo à abertura inferior, onde as fêmeas atraídas pousaram para tentar

realizar o repasto sanguíneo. Os tratamentos avaliados, nessa ordem, foram: (a) controle (antebraço do voluntário sem tira de juta); (b) antebraço do voluntário com uma tira de juta sem impregnação; (c) antebraço do voluntário com uma tira de juta impregnada com solução de transflutrina a 2%; e (d) antebraço do voluntário com uma tira de juta impregnada com solução de transflutrina a 8% (Figura 17).



**Figura 17. Experimento de teste de repelência de mosquitos *Aedes aegypti* por tiras de juta impregnadas com transflutrina utilizando caixas de repelência BioGents Cage. (A) Caixas de repelência com tira de juta sob o antebraço de um voluntário; (B) Voluntário com o antebraço sob a parte inferior da caixa de repelência, realizando o experimento.**

Durante o período de teste, o antebraço dos voluntários foi observado através das paredes translúcidas da BG-Cage e o número de sondagens (comportamento do inseto caracterizado pelo pouso no hospedeiro e início da canulação dos vasos sanguíneos para alimentação) dos mosquitos foi contabilizado. A eficácia de proteção da transflutrina foi calculada em comparação com o número de tentativas picadas no braço associado à tira controle e no braço com tira tratada, de acordo com a fórmula de proteção.

Trinta e cinco fêmeas de *Ae. aegypti* foram utilizadas em cada tratamento, as quais foram colocadas dentro das caixas de repelência por 5 min, para aclimatação. Após esse período, o fluxo de ar foi ligado por mais 3 min, para finalizar a aclimatação dos insetos. Em seguida, os voluntários posicionaram o antebraço com uma tira de juta (impregnada ou não) sob a janela de teste e a contagem de mosquitos que se aproximaram foi realizada por 2 min. Após finalizar o teste, a janela foi fechada e o sistema de ventilação de ar foi

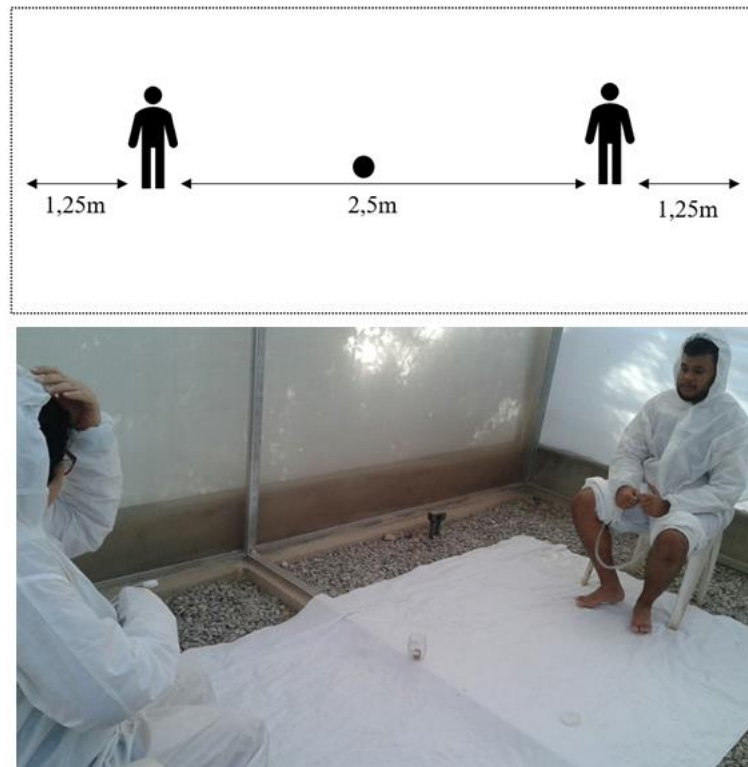
conectado à gaiola por 3 min., para remover quaisquer odores remanescentes dos voluntários. Cada voluntário realizou 6 repetições para cada tratamento.

### **3.6 Procedimentos experimentais em Semicampo**

Em todos os experimentos realizados no semicampo, as fêmeas de *Ae. aegypti* contidas em frascos telados foram posicionadas no piso da câmara de teste para aclimação por 15 min. Após esse período, o voluntário adentrava na câmara e se sentava em uma cadeira, enquanto uma pessoa do lado externo liberava os mosquitos através de uma linha fixada na tampa do frasco. Após os mosquitos serem liberados, o voluntário iniciava a recaptura através do método de captura por atração humana, que consiste em expor os membros inferiores para recapturar os mosquitos que se aproximavam e pousavam (WHO, 1995). Os mosquitos recapturados foram armazenados em potes de plástico devidamente identificados para posterior contagem. O tempo experimental de cada teste foi definido de acordo com os resultados obtidos no experimento 1. Ao final de cada teste, os mosquitos não recapturados foram eliminados com o auxílio de uma raquete elétrica e um ventilador foi ligado dentro das câmaras por 10 min para dissipar possíveis odores residuais da transflutrina no interior da câmara de teste.

#### *3.6.1 Experimento 1: Determinação do tempo experimental e atratividade entre os voluntários*

Para determinar o tempo de duração dos experimentos em semicampo e a atratividade natural dos voluntários, dois indivíduos foram avaliados simultaneamente na câmara de semicampo com 12,5m<sup>2</sup> em um experimento de escolha binária. Os voluntários foram posicionados sentados em cada uma das extremidades da câmara a uma distância de 2,5m entre si e aproximadamente 60 mosquitos/teste foram liberados no centro da câmara, no ponto equidistante entre os voluntários (Figura 18). Durante a recaptura dos mosquitos, os voluntários trocavam os potes em que eles eram armazenados a cada 5 min, visando contabilizar o número de mosquito recapturados nesse período. Todas as duplas possíveis de voluntários foram comparadas. Quatro repetições foram realizadas para cada dupla de voluntários e os mosquitos recapturados foram contabilizados para determinar as diferenças na atratividade dos voluntários. O tempo necessário para a recaptura de aproximadamente 90% dos mosquitos foi considerado como o tempo de duração de cada repetição nos experimentos seguintes.

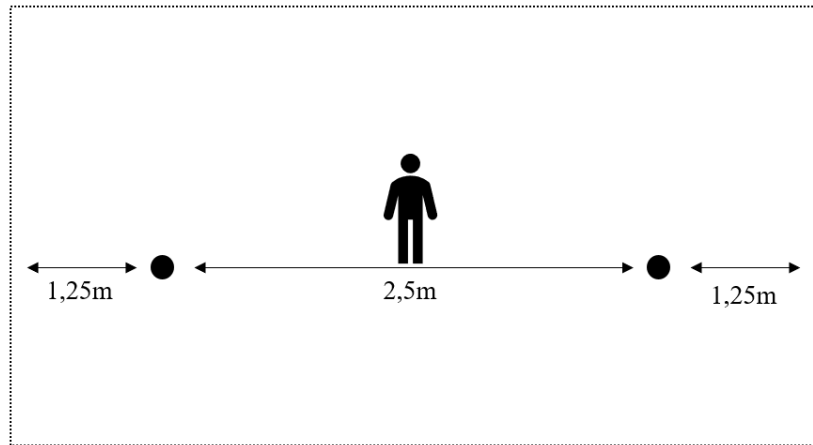


**Figura 18.** Diagrama esquemático da posição dos voluntários e local de liberação dos mosquitos, representado na imagem pelo círculo, e voluntários realizando teste de atratividade na câmara de testes do semicampo.

### *3.6.2 Experimento 2: Avaliação do tamanho da área de liberação das sandálias impregnadas com transflutrina*

Para avaliar a área de liberação para a transflutrina, tiras de juta com diferentes dimensões anexadas às sandálias foram avaliadas neste experimento. As tiras de juta foram impregnadas com solução de transflutrina a 8%, segundo estabelecido por Ogoma *et al* (2012). Os tratamentos avaliados foram as sandálias contendo as tiras de juta com a) 10 cm<sup>2</sup>; b) 20 cm<sup>2</sup>; c) 40 cm<sup>2</sup>; d) 80 cm<sup>2</sup>; e) 160 cm<sup>2</sup>; e f) controle (tiras que não foram impregnadas com o repelente). Aproximadamente 50 fêmeas de *Ae. aegypti* (dois potes contendo 25 mosquitos cada) foram liberadas simultaneamente em dois pontos equidistantes do voluntário, que estava posicionado no centro da câmara (Figura 19). Foram realizadas cinco repetições por voluntário para cada tratamento. O experimento foi realizado na câmara de semicampo de 12,5m<sup>2</sup> e o tempo experimental foi definido de acordo com o experimento 1.

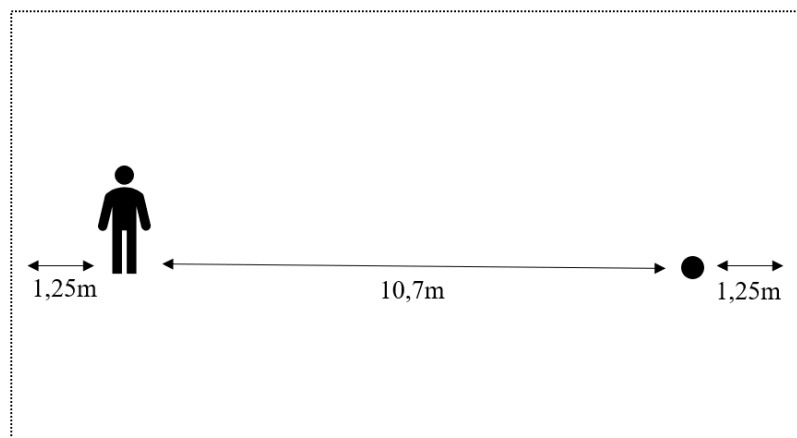




**Figura 19.** Diagrama esquemático da posição do voluntário e locais de liberação dos mosquitos (círculo) na câmara de teste do semicampo.

### 3.6.3 Experimento 3: Avaliação da repelência de sandálias impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina

Sandálias cujas tiras foram impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina foram avaliadas para testar a eficácia em proteger os seus usuários contra picadas de *Ae. aegypti*. Os tratamentos avaliados foram as sandálias com as tiras impregnadas com soluções de transflutrina a 2, 5, 8, 10 e 15% e controle (tira não impregnada). Nesse experimento, aproximadamente 50 mosquitos foram liberados na extremidade oposta ao voluntário (Figura 20) e quatro repetições foram realizadas. O tamanho das tiras utilizadas foi baseado nos resultados obtidos no experimento anterior.



**Figura 20.** Diagrama esquemático da posição do voluntário e locais de liberação dos mosquitos (círculo) na câmara de teste do semicampo.

### 3.7 Considerações Éticas

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – CEP- UFMG (CAAE 63891816.2.1001.5149). Para a realização da captura por atração humana os voluntários selecionados foram devidamente informados dos objetivos, riscos e benefícios da pesquisa. Após o consentimento oral, os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 3.8 Análise de dados

A taxa de repelência (proteção contra picadas de *Ae. aegypti*) oferecida pelas sandálias foi calculada através da equação:

$$\text{Proteção (\%)} = \left( \frac{\text{Controle} - \text{Tratamento}}{\text{Controle}} \right) \times 100$$

no qual, Tratamento e Controle representam a quantidade de mosquitos recapturados pelos voluntários utilizando sandálias com o repelente e sem o repelente (controle), respectivamente.

Análises de Variância (ANOVA) foram utilizados para estimar as diferenças entre os tratamentos em cada experimento, respeitando a normalidade da distribuição dos dados. No experimento com as BG-Cages, as variáveis independentes foram a juta sem impregnação, e impregnadas com as diferentes concentrações de transflutrina, enquanto as variáveis dependentes foram a média de mosquitos recapturados e a taxa de proteção. Para os experimentos em semicampo, no experimento 1 as variáveis independentes foram os voluntários, enquanto as variáveis dependentes foram as médias de captura de cada voluntário. Nos experimentos 2 e 3, as variáveis independentes foram respectivamente área de liberação de transflutrina e concentrações da transflutrina, enquanto as variáveis dependentes foram a média de mosquitos recapturados e a taxa de proteção.

Em todas as análises, resultados com p-valor menor ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados utilizando o software Graphpad Prism versão 9.0.0.

## 4. Resultados

### 4.1 Avaliação do efeito repelente de tiras de juta impregnadas com transflutrina utilizando caixas de exposição BG-Cage

As tiras de juta impregnadas com transflutrina se mostraram eficazes em reduzir a quantidade média de tentativas de picadas de *Ae. aegypti*, quando comparadas com o controle e a tira controle (sem impregnação) (Figura 21). Entre as tiras impregnadas, a com transflutrina 8% apresentou maior taxa de proteção média que as tiras com transflutrina 2% ( $p < 0,05$ ) (Figura 22). Foi observada uma maior taxa de proteção em voluntários do sexo feminino nas duas concentrações de transflutrina analisadas. Não houve diferença na média de picadas entre o controle e a tira de juta sem impregnação ( $p > 0,05$ ).

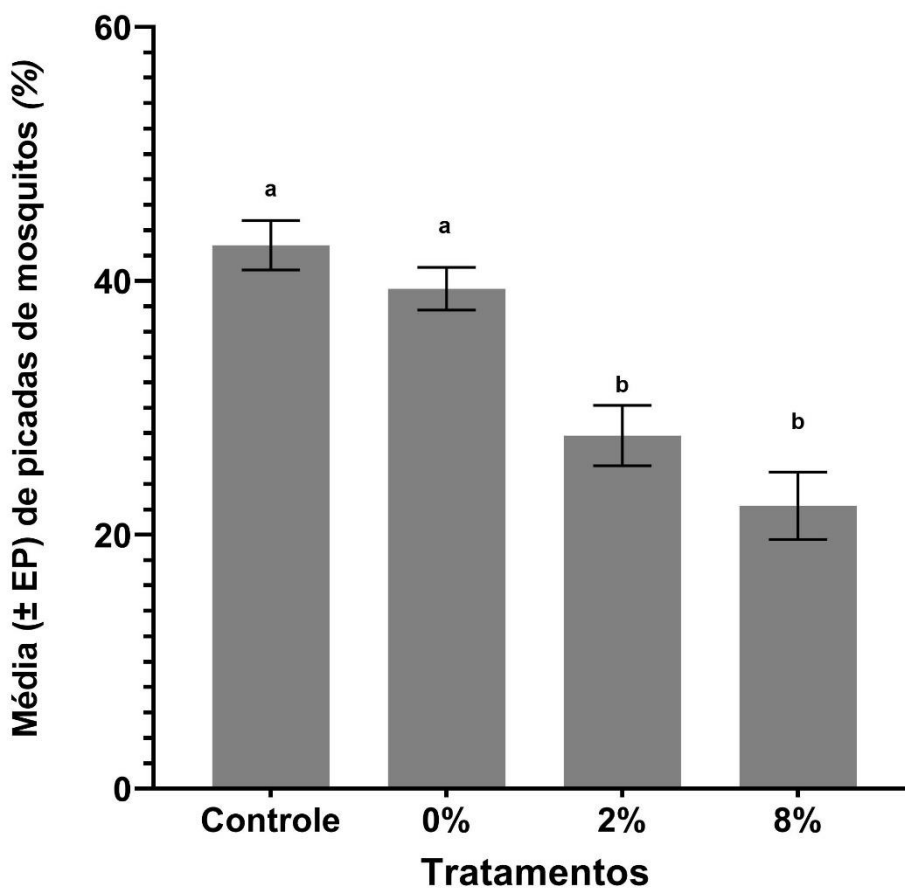


Figura 21. Número médio de tentativa de picadas de fêmeas de *Aedes aegypti* por voluntários durante teste de repelência utilizando caixas de repelência BioGents Cage.

**Tabela 3. Número médio de tentativa de picadas de *Aedes aegypti* e taxa de proteção em voluntários com tiras impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina, em testes de repelência utilizando caixas de repelência BioGents Cage.**

Voluntários	Tratamento	Transflutrina 2%		Transflutrina 8%	
		Média (± EP)	Taxa de proteção	Média (± EP)	Taxa de proteção
Masculinos	Controle	14,27 ± 0,8 <sup>a</sup>	33,64% <sup>A</sup>	15,40 ± 1,6 <sup>a</sup>	45.02% <sup>B</sup>
	Tiras impregnadas	9,47 ± 1,1 <sup>b</sup>		8,47 ± 1,5 <sup>b</sup>	
Femininos	Controle	16,21 ± 1,6 <sup>a</sup>	38,27% <sup>A</sup>	14,07 ± 1,1 <sup>a</sup>	49.29% <sup>B</sup>
	Tiras impregnadas	10,00 ± 1,2 <sup>b</sup>		7,13 ± 1,0 <sup>b</sup>	

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

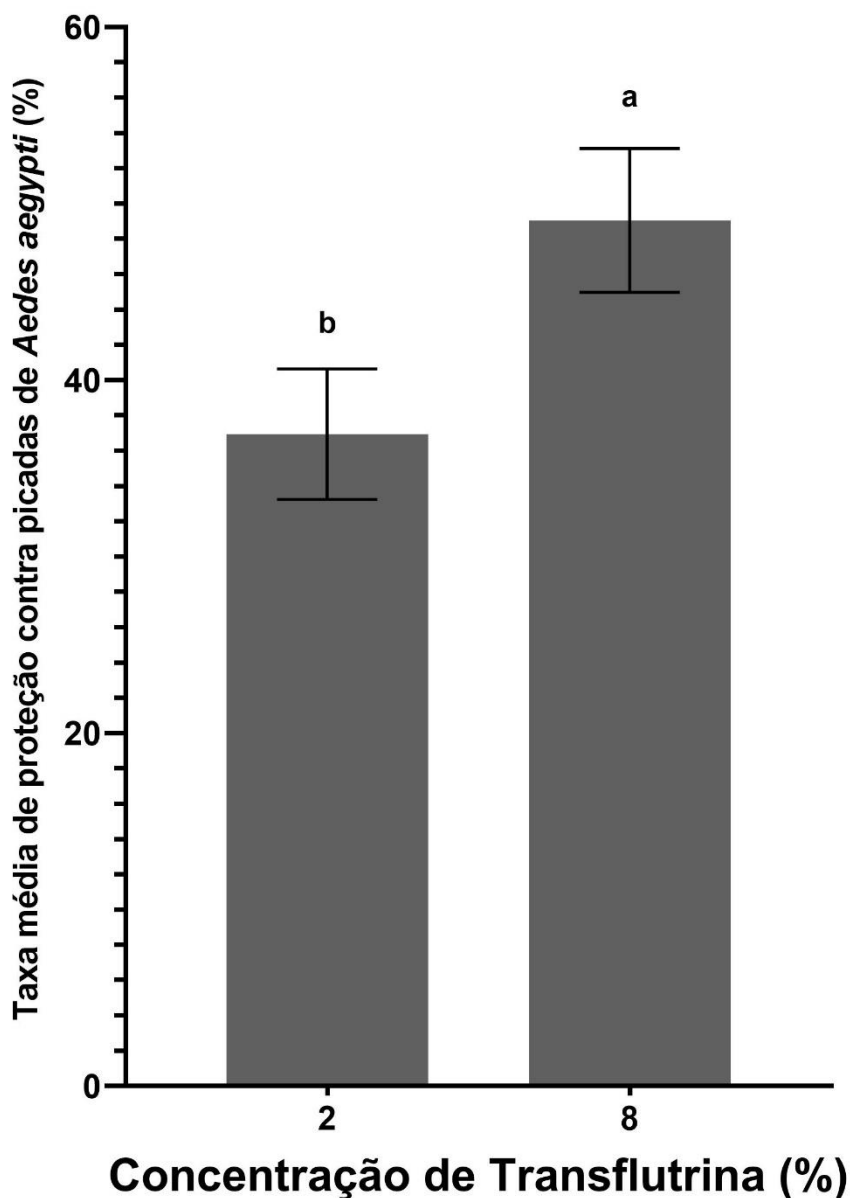
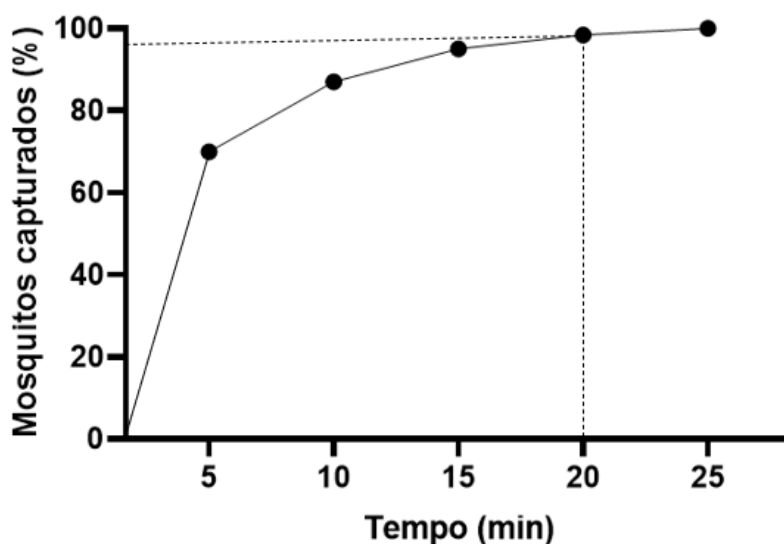


Figura 22. Taxa média de proteção contra picadas de fêmeas de *Aedes aegypti* por voluntários durante teste de repelência utilizando caixas de repelência BioGents Cage.

*4.2 1 Experimento 1: Determinação do tempo experimental e atratividade entre os voluntários*

Dos 1.178 mosquitos liberados no semicampo, o total de 1.068 (90,7%) foram recapturados durante o experimento. Foi observada a recaptura de 63,4% (747) dos mosquitos nos primeiros 5 min, atingindo 78,9% (929) após 10 min e 89,1% (1051) após 20 min (Figura 23). Os resultados demonstraram que a recaptura de aproximadamente 90% dos mosquitos liberados ocorreu com 20 min de experimento e, portanto, este foi o tempo estabelecido para os experimentos posteriores.



**Figura 23. Proporção de fêmeas de *Aedes aegypti* recapturadas durante 25 minutos de experimento em semicampo.** A linha pontilhada indica o tempo de experimento necessário para a recaptura de aproximadamente 90% dos mosquitos liberados.

Nas quatro duplas de voluntários avaliadas foi observada diferença na atratividade entre os indivíduos de sexo diferente ( $p < 0,005$ ), com a média de recaptura sempre maior para os homens ( $46,3 \pm 9,7\%$  a  $60,6 \pm 7,8\%$ ) do que para as mulheres ( $15,0 \pm 3,8\%$  a  $29,2 \pm 2,6$ ) (Tabela 4). Entre as duplas formadas por voluntários do mesmo sexo não houve diferença significativa na média de recaptura dos mosquitos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4. Número médio de fêmeas de *Aedes aegypti* recapturadas por duplas de voluntários e Risco Relativo de Picadas (RRP 95% IC), em semicampo.**

Dupla de Voluntários	Média de recaptura (%) $\pm$ EP	RRP 95% IC
♂ RDS – TBR ♂	$32,5 \pm 5,7^a - 40,8 \pm 4,4^a$	-32,9 a 16,2
♂ TBR – EFM ♀	$60,6 \pm 7,8^a - 25,7 \pm 3,0^b$	12,4 a 57,5
♂ TBR – MCM ♀	$46,3 \pm 9,7^a - 15,0 \pm 3,8^b$	0,9 a 61,5
♂ RDS – EFM ♀	$50,0 \pm 3,4^a - 29,2 \pm 2,6^b$	8,2 a 32,9
♂ RDS – MCM ♀	$49,2 \pm 5,5^a - 18,7 \pm 3,6^b$	7,5 a 53,4
♀ EFM – MCM ♀	$29,5 \pm 4,7^a - 49,1 \pm 5,4^a$	-42,4 a 3,1

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Experimento 2: Avaliação do tamanho da área de liberação das sandálias impregnadas com transflutrina

Foram recapturadas 3.684 (59,11%) fêmeas de *Ae. aegypti* do total de 6.230 liberadas no experimento. Foi observado que, com exceção das sandálias com área de liberação de 10 cm<sup>2</sup>, todos os modelos avaliados tiveram uma média de mosquitos recapturados menor do que a sandália controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5). Não foi observada diferença na média de mosquitos recapturados entre as sandálias com diferentes áreas de liberação ( $P > 0,05$ ). Verificou-se que a taxa de proteção das sandálias aumentava à medida que a área de liberação aumentava, variando de 14,98% (10 cm<sup>2</sup>) à 45,55% (160 cm<sup>2</sup>) (Tabela 5). A sandália com maior área de liberação conferiu a maior taxa de proteção entre os modelos testados ( $p < 0,05$ ), e por isso foi escolhida como padrão para o próximo experimento.

**Tabela 5.** Número médio de fêmeas de *Aedes aegypti* recapturadas e taxa de proteção em voluntários utilizando sandálias com diferentes áreas de liberação impregnadas com transflutrina 8%, em semicampo.

Área de liberação (cm <sup>2</sup> )	Média de recaptura ( $\pm$ EP)	Taxa de proteção (%)
Controle	67,61 $\pm$ 4,244 <sup>a</sup>	-
10	51,60 $\pm$ 4,860 <sup>a</sup>	14.98 <sup>a</sup>
20	47,39 $\pm$ 5,528 <sup>b</sup>	20.62 <sup>a</sup>
40	47,50 $\pm$ 6,797 <sup>b</sup>	24.84 <sup>a</sup>
80	41,66 $\pm$ 5,570 <sup>b</sup>	27.54 <sup>a</sup>
160	36,63 $\pm$ 5,941 <sup>b</sup>	45.55 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

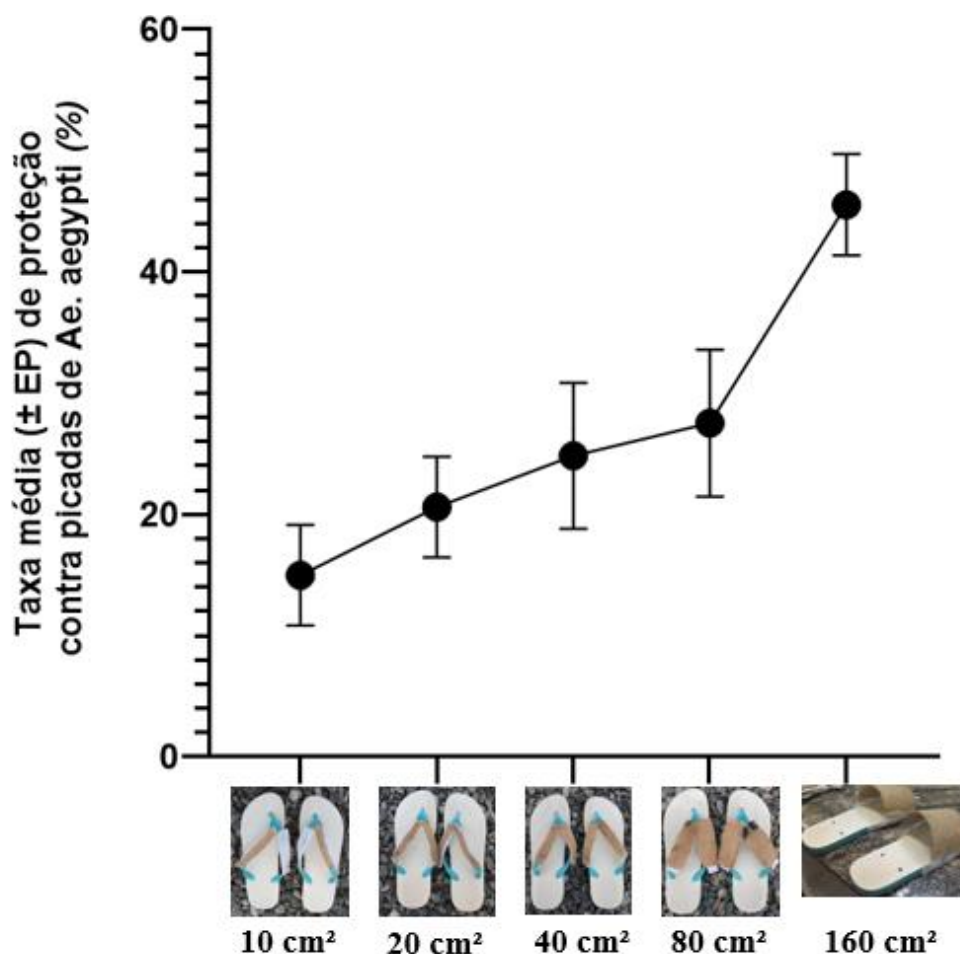


Figura 24. Taxa de proteção média contra picadas de fêmeas de *Aedes aegypti* por voluntários usando sandálias com diferentes áreas de liberação para a transflutrina, em semicampo.

#### 4.4 Experimento 3: Avaliação da repelência de sandálias impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina

Nesse experimento foram liberadas 7.674 fêmeas de *Ae. aegypti*, das quais 4.640 (60,43%) foram recapturadas. As sandálias impregnadas com transflutrina, independente da concentração, foram capazes de repelir os mosquitos quando comparadas ao controle (<0,001) (Tabela 6). Apesar de não apresentar diferença significativa na proteção entre as concentrações de transflutrina avaliadas, a concentração de 2% ofereceu a maior taxa de proteção contra picadas, enquanto a de 10% ofereceu a menor taxa.

Tabela 6. Número médio de fêmeas recapturadas de *Aedes aegypti*, Risco Relativo de Picadas (RRP 95% IC) e taxa de proteção em voluntários utilizando sandálias impregnadas com diferentes concentrações de transflutrina, em semicampo.

Tratamentos	Média de recaptura ± EP	RRP (95%IC)	Taxa de proteção (%)	p-valor
Controle	36,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	1	-	-



2%	17,8 ± 2,3 <sup>b</sup>	0,59 (0,5 – 0,8)	51,1	<0,001
5%	21,8 ± 1,9 <sup>b</sup>	0,55 (0,5 – 0,7)	40,1	<0,001
8%	23,7 ± 2,4 <sup>b</sup>	0,58 (0,5 – 0,7)	34,9	<0,001
10%	25,1 ± 2,5 <sup>b</sup>	0,67 (0,6 – 0,8)	31,0	<0,001
15%	19,8 ± 2,0 <sup>b</sup>	0,53 (0,4 – 0,7)	45,6	<0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

## 5. Discussão

A repelência conferida por tiras de juta impregnadas com transflutrina foram testadas em condição de laboratório e semicampo.

Segundo as *Diretrizes Para Testes de Eficácia de Repelentes Espaciais*, estabelecidos pela OMS (2013), estudos em laboratório devem ser os primeiros a serem realizados em uma bateria de testes visando observar a repelência de princípios ativos. Testes nestas condições necessitam de menos materiais e demandam menor tempo de preparo nos períodos pré e pós teste. Além disso, estudos realizados em laboratório permitem um maior controle e manipulação das condições em que os testes são realizados, como temperatura, umidade e velocidade do vento.

Dentre os testes em laboratório preconizados para avaliação de repelência, está o *Arm-in-Cage*, em que um voluntário introduz um dos braços contendo o repelente que será avaliado em uma caixa (40cm x 40cm x 40cm) com vetores de interesse e realiza a contagem de aproximações (WHO, 2009). No presente trabalho, foi utilizado a BG-Cage em detrimento ao *Arm-in-Cage*. A escolha da BG-Cage se deu ao fato dessa tecnologia requerer menos mosquitos por teste, além de serem mais confortáveis para os voluntários humanos. Ademais, existe a minimização de contaminação residual das superfícies da gaiola com repelente, uma vez que o composto ativo não é introduzido no aparato. A presença de um sistema de ventilação de ar fornece ar condicionado às gaiolas após cada teste individual, para expulsar e evitar qualquer acúmulo de substâncias de teste (Obermayr *et al.*, 2010).

O presente estudo na BG-Cage demonstrou que tiras impregnadas com 2% ou 8% de transflutrina foram capazes em provocar repelência contra fêmeas de *Ae. aegypti*. A transflutrina foi avaliada em diferentes estudos em vários tipos de aparelhos em laboratórios. Em testes utilizando gaiola dupla (duas gaiolas de plástico transparente, conectadas por um tubo plástico com 33,5 cm de comprimento e 18 cm de diâmetro, com duas comportas rotativas, que interligam ou obstruem a conexão entre as gaiolas) os autores observaram que foi necessária uma dose menor de transflutrina (0,03g), quando

comparada a Icaradina (1mg) e óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* (L.)) (60mg) para provocar o mesmo efeito de repelência em fêmeas de *Ae. aegypti* (Nentwig *et al*, 2017). Em testes do tipo *hand-in-cage*, concentrações de transflutrina de até 1ppm (1 ng/cm<sup>2</sup>) foram capazes de causar repelência em fêmeas de *Ae. aegypti*. Quando a concentração foi aumentada cerca de 10x, também foi observada dificuldade de locomoção dos insetos (Andreazza *et al*, 2021). Bernier *et al* (2016), também usando a metodologia *hand-in-cage* (modificação da metodologia *Arm-in-cage*, em que apenas a mão é introduzida na caixa de teste), observaram um efeito repelente contra fêmeas de *Ae. aegypti*, quando o voluntário estava utilizando um microdissipador de repelente espacial contendo 4 µL de transflutrina para análise (P.A).

Durante os testes utilizando a BG-Cage, foi observada uma dificuldade de vôo das fêmeas, caracterizados por vôos errante e quedas sucessivas. Segundo Narahashi *et al.*, (2007), o modo de ação dos piretróides se dá no axônio do neurônio dos insetos, onde ocorre a sua ligação nos canais de sódio, deixando-os sempre excitados e não permitindo seu repouso. O comportamento observado dos mosquitos pode ter relação com a maneira de atuação deste composto.

Estudos de comportamento de mosquito em semicampo permite observar as alterações comportamentais e biológicas se desenvolvam em um ambiente com condições semelhantes aos naturais. Tal característica pode revelar aspectos que poderiam passar despercebidos em experimentos menores, normalmente conduzidos em laboratório ou em experimentos em larga escala, geralmente realizados em campo (Knols *et al*, 2004). Estudos realizados em áreas experimentais de semicampo apresentam algumas vantagens quando comparados com experimentos realizados em condições de laboratório, como a influência de fatores ambientais, como vento, luz natural, temperatura e umidade. O fato desses fatores não serem totalmente manipuláveis em condições de semicampo permite uma reprodução mais fiel das variações ambientais encontradas no mundo natural, potencializando a verossimilhança dos dados obtidos em testes em semicampo com os que seriam obtidos em um ambiente natural (Knols *et al.*, 2004; Fergusson *et al.*, 2008; Roque e Eiras, 2008; Ritchie *et al*, 2011).

No presente estudo, o estabelecimento do tempo de duração dos experimentos possibilitou um maior controle sobre os experimentos, além de conhecer o tempo de resposta dos insetos na busca de um hospedeiro. Com a definição de 20 min por teste foi

possível o planejamento do número de testes diários para os experimentos seguintes, resultando na otimização dos recursos disponíveis.

No experimento para a determinação da atratividade entre os voluntários demonstrou-se que existe diferença na atratividade entre voluntários de sexo oposto, corroborando com dados obtidos por Rahm (1958) e Gilbert, Gouck, & Smith (1966), em que voluntários do sexo masculino atraíram uma maior porcentagem de *Ae. aegypti* do que voluntárias do sexo feminino. As diferenças entre o metabolismo masculino e feminino podem ter influência na liberação de cairormônios do homem e mulheres, fator que pode influenciar a atratividade para insetos vetores (Giacomoni *et al.*, 2009).

O presente trabalho demonstrou um aumento na taxa de proteção em voluntários que utilizavam sandálias com maior área de liberação de transflutrina. Diferentemente, Sangoro *et al.* (2020) não encontraram uma relação entre tamanho do substrato impregnado com transflutrina e aumento de proteção contra picadas de mosquitos. No entanto, foi encontrada evidências que o tamanho das tiras impregnadas com transflutrina proporciona uma maior proteção contra picadas de outros mosquitos, como *Anopheles* spp. e *Culex* spp. (Govella *et al.*, 2015 Masalu *et al.*, 2017; Ogoma *et al.*, 2017). Essas observações indicam que a área de superfície do substrato passivo pode ser um fator de importância a se considerar no desenvolvimento de dispositivos com repelentes espaciais, uma vez que o tamanho da área de liberação pode influenciar na taxa final de liberação de um repelente espacial no ambiente.

Todas as concentrações utilizadas nos experimentos do presente trabalho demonstraram proteção contra picadas de *Ae. aegypti* entre 31,0 a 51,1%. Estudos prévios também não encontraram diferença na redução de picadas de mosquitos em voluntários próximos à tiras de sisal impregnadas com 0,4 e 2% (Ogoma *et al.*, 2017) e com 2 e 5% de transflutrina (Sangoro *et al.* 2020). O fato de não ter diferença na média de mosquitos recapturados entre as diferentes concentrações analisadas sugere que, assim como ocorre em repelentes tópicos, pode existir um limite na proteção proporcionada por maiores concentrações de transflutrina. (Fradin & Day, 2002; Ogoma *et al.*, 2014).

Interessante que, no presente estudo de semicampo, quando comparada a recaptura de mosquitos por voluntários no teste de atratividade (sem repelente) e que não utilizavam sandálias impregnadas com transflutrina, houve a recaptura de 90,7% dos mosquitos liberados, enquanto testes com dois voluntários e somente um usando sandália usando transflutrina, houve a recaptura somente de 59,1%. Portanto, ocorreu uma redução de aproximadamente 30% na recaptura de mosquitos, sugerindo que o uso de repelente

espacial (sandálias impregnadas com transflutrina) pode reduzir atividade de procura do hospedeiro para a hematofagia e, conseqüentemente proteção contra o *Ae. aegypti*, corroborando com outros estudos (Ogoma *et al*, 2012; Masalu *et al*, 2017, 2020; Sangoro *et al.*, 2020).

Futuros estudos visando determinar a taxa de liberação, avaliação da duração do efeito repelente das sandálias impregnadas e testes dos protótipos em condições de campo devem ser conduzidos, para aprimoramento e validação de sandálias impregnadas com transflutrina como repelente espacial para proteção contra picadas de *Ae. aegypti*.

## 6. Conclusão

- Tiras impregnadas com soluções de transflutrina a 2% e a 8% se mostraram eficazes em reduzir tentativas de picadas de *Aedes aegypti* em voluntários em testes utilizando as BG-Cages em laboratório;

- A duração dos testes de semicampo foi padronizada em 20 min, devido a recaptura de 90% dos mosquito liberados;

- Todas as concentrações de transflutrina utilizadas na impregnação das sandálias (2, 5, 8, 10 e 15%) foram capazes de oferecer proteção contra picadas de *Aedes aegypti* aos voluntários.

- Sandálias com tiras de juta com 160 cm<sup>2</sup> impregnadas com transflutrina a 8% apresentaram uma maior ação repelente do que sandálias com tiras menores, demonstrando que quanto maior a área de liberação, maior é a proteção oferecida pelas sandálias.

## 7. Considerações Gerais

O presente estudo desenvolveu e avaliou protótipos de sandálias produzidas com juta e impregnadas com o piretróide transflutrina. A propriedade repelente da associação entre a juta e a transflutrina contra mosquitos já é bem estabelecida e demonstramos que, além da indução de repelência que confere proteção ao usuário, este repelente espacial pode atuar como um inibidor da hematofagia em *Ae. aegypti*.

Nos testes em laboratório, a transflutrina apresentou uma maior mortalidade do que efeito *knock down* quando ministrada em um sistema fechado, e o perfil oposto foi observado quando analisada em um sistema aberto.

Em condições de semicampo, a sandália impregnada com transflutrina também afetou a capacidade hematofágica em *Ae. aegypti* que estavam a 1m de altura e a distâncias de 1,4 a 7,0m. A capacidade reduzir a hematofagia de mosquitos que estavam distantes da fonte de transflutrina é uma característica importante para um repelente espacial, já que afeta mosquitos que estão dentro do raio de ação do repelente e não apenas próximos ao usuário do repelente espacial.

O presente trabalho também desenvolveu protótipos de calçados impregnados com transflutrina e avaliou-se sua aplicabilidade como repelente espacial. Foi demonstrado que o tamanho da área de liberação de um repelente espacial passivo é uma característica importante no desenvolvimento deste tipo de aparato, uma vez que há uma associação positiva entre tamanho da área de liberação e capacidade de repelência. Também foi avaliada a concentração de transflutrina utilizada nos protótipos e os resultados sugerem existir um limiar máximo de concentração do princípio ativo utilizado para a conferência de proteção de usuários.

Uma limitação comumente relacionada a usos de repelentes tópicos é a não reaplicação dos mesmos, uma vez que, mesmo em formulações com maiores concentrações, é recomendado que se façam várias reaplicações ao longo do dia, visando a proteção diurna (Sangoro *et al.*, 2014C; Lalani *et al.*, 2016). Essa limitação pode ser ocasionada por diversos fatores, desde a condição sócio-econômica de uma região, até o incômodo com aumento de transpiração e alergias que aplicações contínuas de produtos tópicos podem ocasionar (Barnard, 2005). A utilização de um calçado como matriz liberadora de repelente espacial consegue contornar essas limitações. Sendo uma sandália um objeto de uso rotineiro e de grande aceitação, seu uso contínuo é facilitado e o fato da evaporação da transflutrina ocorrer naturalmente em temperaturas que favorecem a atividade de mosquitos vetores faz com que não haja uma necessidade constante de reaplicação de um composto repelente.

Contudo, outros estudos utilizando sandálias impregnadas com transflutrina devem ser realizados em condições naturais de campo. Experimentos em condições de campo são necessários para a validação das sandálias também nesse ambiente. Testes de durabilidade do repelente, resistência a lavagem e taxa de liberação do princípio ativo são

necessários, visando a viabilidade da utilização de sandálias impregnadas como uma medida de proteção eficaz contra picadas de *Ae aegypti*. A utilização de modelos de calçados disponíveis no mercado como matrizes liberadoras de repelentes espaciais pode ser avaliada, uma vez que esses modelos já possuem aceitação popular. Por fim, experimentos visando o desenvolvimento de novas matrizes liberadoras para a transflutrina podem ser conduzidos, aumentando as possibilidades de apresentação do repelente espacial, e assim poder ser adaptado às necessidades ou limitações dos usuários.

## REFERÊNCIAS

Abou-Donia, M. B., Goldstein, L. B., Jones, K. H., Abdel-Rahman, A. A., Damodaran, T. V., Dechkovskaia, A. M., ... & Khan, W. A. (2001). Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. *Toxicological Sciences*, *60*(2), 305-314.

Abou-Donia, M. B., Wilmarth, K. R., Abdel-Rahman, A. A., Jensen, K. F., Oehme, F. W., & Kurt, T. L. (1996). Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundamental and Applied Toxicology*, *34*(2), 201-222.

Achee, N. L., Bangs, M. J., Farlow, R., Killeen, G. F., Lindsay, S., Logan, J. G., ... & Grieco, J. P. (2012). Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. *Malaria Journal*, *11*(1), 1-9.

Achee, N. L., Grieco, J. P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., ... & Vontas, J. (2019). Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS neglected tropical diseases*, *13*(1), e0006822.

Achee, N. L., Sardelis, M. R., Dusfour, I., Chauhan, K. R., & Grieco, J. P. (2009). Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical Actions of Standard Vector Control Compounds1. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *25*(2), 156-167

Acree Jr, F., Turner, R. B., Gouck, H. K., Beroza, M., & Smith, N. (1968). L-Lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. *Science*, *161*(3848), 1346-1347.

Amalraj, D. D., Kalyanasundaram, M., & Das, P. K. (1992). Evaluation of EMD vaporizers and bioallethrin vaporizing mats against mosquito vectors. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, *23*, 474-474.

Andrés, M., Lorenz, L. M., Mbeleya, E., & Moore, S. J. (2015). Modified mosquito landing boxes dispensing transfluthrin provide effective protection against *Anopheles arabiensis* mosquitoes under simulated outdoor conditions in a semi-field system. *Malaria journal*, *14*(1), 1-13.

Argueta, T. B. O., Kawada, H., & Takagi, M. (2004). Spatial repellency of metofluthrinimpregnated multilayer paper strip against *Aedes albopictus* under outdoor conditions, Nagasaki, Japan. *Medical entomology and zoology*, *55*(3), 211-216.

Barata, E. A., da Costa, A. I. P., Chiaravalloti Neto, F., Glasser, C. M., Barata, J. M. S., & Natal, D. (2001). População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Revista de saúde pública*, 35, 237-242.

Barnard, D. R. (2005). Biological assay methods for mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(sp1), 12-16.

Barton-Browne, L. Host-related responses and their suppression: some behavioral considerations. In: *Chemical Control of Insect Behavior: Theory and applications*. John Wiley & Sons; 1977. (Ch.8): 117-127

Benjamin, S., Rath, A., Fook, C. Y., & Lim, L. H. (2005). Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation, VectoBac DT®, for control of dengue mosquito vectors in potable water containers. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 36(4),879.

Bibbs, C. S., & Kaufman, P. E. (2017). Volatile pyrethroids as a potential mosquito abatement tool: a review of pyrethroid-containing spatial repellents. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1).

Bibbs, C. S., & Xue, R. D. (2016). OFF! Clip-on repellent device with metofluthrin tested on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for mortality at different time intervals and distances. *Journal of medical entomology*, 53(2), 480-483.

Bibbs, C.S., *et al.*, Vapor toxicity of five volatile pyrethroids against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci*, 2018. 74(12): p. 2699-2706.

Braack, L., Hunt, R., Koekemoer, L. L., Gericke, A., Munhenga, G., Haddow, A. D., ... & Coetzee, M. (2015). Biting behaviour of African malaria vectors: 1. where do the main vector species bite on the human body?. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-10.

Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.

CDC. Center For Disease Control And Prevention. Atlanta. Dengue. 2020. Disponível em:<https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>

Chavasse, D. C., Yap, H. H., & World Health Organization. (1997). *Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance* (No. WHO/CTD/WHOPES/97.2). World Health Organization.

Chin, A.C., *et al.*, Comparative Efficacy of Commercial Mosquito Coils Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Malaysia: A Nationwide Report. *J Econ Entomol*, 2017. 110(5): p. 2247-2251



Clements, A. N. (1999). *The biology of mosquitoes. Volume 2: sensory reception and behaviour*. CABI publishing.

Coats, J. R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87,255-262.

Consoli, R. A., & Oliveira, R. L. D. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz.

Corazza, M., Borghi, A., Zampino, M. R., & Virgili, A. (2005). Allergic contact dermatitis due to an insect repellent: double sensitization to picaridin and methyl glucose dioleate. *Acta dermato-venereologica*, 1(1), 1-1

Corbel, V., Stankiewicz, M., Pennetier, C., Fournier, D., Stojan, J., Girard, E., ... & Lapied, B. (2009). Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC biology*, 7(1), 1-11.

Corbett, J. R., Wright, K., & Baillie, A. C. (1984). *The biochemical mode of action of pesticides*. Academic press.

Curtis, C. F. (1992). Personal protection methods against vectors of disease. *Rev Med Vet Entomol*, 80(10), 543-553

Dambach, P. (2020). The use of aquatic predators for larval control of mosquito disease vectors: Opportunities and limitations. *Biological control*, 150, 104357.

Debboun, M., Frances, S. P., & Strickman, D. (Eds.). (2006). *Insect repellents: principles, methods, and uses*. CRC press.

DeParis, X., Frere, B., Lamizana, M., N' Guessan, R., Leroux, F., Lefevre, P., ... & Baudon, D. (2004). Efficacy of permethrin-treated uniforms in combination with DEET topical repelente for protection of French military troops in Cote d'Ivoire. *Journal of medical entomology*, 41(5), 914-921

Dicke, M., & Sabelis, M. W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional ecology*, 131-139.

Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker, Steve Walker (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.

Durrheim, D. N., & Govere, J. M. (2002). Malaria outbreak control in an African village by community application of 'deet' mosquito repellent to ankles and feet. *Medical and Veterinary Entomology*, 16(1), 112-115.

Espinal, M. (2017). Chikungunya: first emergent arbovirolosis in the XXI century in the Americas. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 41(3).

Faull, K. J., & Williams, C. R. (2015). Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 292-300.

Ferguson, H. M., Ng'habi, K. R., Walder, T., Kadungula, D., Moore, S. J., Lyimo, I., ... & Knols, B. G. (2008). Establishment of a large semi-field system for experimental study of African malaria vector ecology and control in Tanzania. *Malaria Journal*, 7(1), 1-15.

Fisher, E. B., & van Wazer, R. (1897). JR; Use of Organic in phosphorus compounds and its compounds.

Forattini, O. P. (2002). Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: v. 2. In *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: v. 2* (pp. 860-860).

Gadelha, D. P., & Toda, A. T. (1985). Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. bras. malariol. doenças trop*, 29-36.

Garcia, L. P. (2018). Epidemia do vírus Zika e microcefalia no Brasil: emergência, evolução e enfrentamento (No. 2368). Texto para Discussão.

Geier, M., & Boeckh, J. (1999). A new Y-tube olfactometer for mosquitoes to measure the attractiveness of host odours. *Entomologia experimentalis et applicata*, 92(1), 9-19.

Geier, M., Bosch, O. J., & Boeckh, J. (1999). Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chemical senses*, 24(6), 647-653.

Giacomoni, P. U., Mammone, T., & Teri, M. (2009). Gender-linked differences in human skin. *Journal of dermatological science*, 55(3), 144-149.

González, C. R., Henry, A., Reyes, C., Aylwin, M. P., Escobar, D., Fernández, J., & Saldarriaga-Córdoba, M. (2016). Reintroducción del invasivo mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Diptera: Culicidae) en el norte de Chile. *Idesia (Arica)*, 34(4), 49-53.

Govella, N. J., Ogoma, S. B., Paliga, J., Chaki, P. P., & Killeen, G. (2015). Impregnating hessian strips with the volatile pyrethroid transfluthrin prevents outdoor exposure to vectors of malaria and lymphatic filariasis in urban Dar es Salaam, Tanzania. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-9.

Grieco, J.P., *et al.*, A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malária control. *PLoS One*, 2007. 2(8): p. e716

Gryseels, C., Uk, S., Sluydts, V., Durnez, L., Phoeuk, P., Suon, S., ... & Grietens, K. P. (2015). Factors influencing the use of topical repellents: implications for the effectiveness of malaria elimination strategies. *Scientific reports*, 5(1), 1-14.

Gubler, D. J. (2011). Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. *Tropical medicine and health*, 39(4SUPPLEMENT), S3-S11

Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood?. *Journal of medical entomology*, 38(3), 411-422.

Hoy, J. B. (1985). Experimental mass-rearing of the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *J Am Mosq Control Assoc*, 1(3), 295-8.

Kawada, H., Temu, E. A., Minjas, J. N., Matsumoto, O., Iwasaki, T., & Takagi, M. (2008). Field evaluation of spatial repellency of metofluthrin-impregnated plastic strips against *Anopheles gambiae* complex in Bagamoyo, coastal Tanzania. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(3), 404-409

Kennedy, J. S. (1947). The excitant and repellent effects on mosquitos of sub-lethal contacts with DDT. *Bulletin of entomological research*, 37(4), 593-607.

Knols, B. G., Njiru, B. N., Mukabana, R. W., Mathenge, E. M., & Killeen, G. F. (2004). Contained semi-field environments for ecological studies on transgenic African malaria vectors: benefits and constraints. *Frontis*, 91-106.

Koren, G., Matsui, D., & Bailey, B. (2003). DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *Cmaj*, 169(3), 209-212

Kotsakiozi P, Gloria-Soria A, Caccone A, Evans B, Schama R, Martins AJ, Powell JR. 2017 Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11 (e0005653).

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... & Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *elife*, 4, e08347.

Lalani, T., Yun, H., Tribble, D., Ganesan, A., Kunz, A., Fairchok, M., ... & Johnson, M. D. (2016). A comparison of compliance rates with anti-vectorial protective measures during travel to regions with dengue or chikungunya activity, and regions endemic for *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Travel Medicine*, 23(5).

Liu, W. K., Wong, M. H., & Mui, Y. L. (1987). Toxic effects of mosquito coil (a mosquito repellent) smoke on rats: I. Properties of the mosquito coil and its smoke. *Toxicology letters*, 39(2-3), 223-230

Lutz, E. K., Lahondere, C., Vinauger, C., & Riffell, J. A. (2017). Olfactory learning and chemical ecology of olfaction in disease vector mosquitoes: a life history perspective. *Current opinion in insect science*, 20, 75-83

Maia, M., Sangoro, P., Thele, M., Turner, E., & Moore, S. (2012). Do topical repellents divert mosquitoes within a community?. *Malaria Journal*, 11(1), 1-2

Maibach, H. I., & Johnson, H. L. (1975). Contact urticaria syndrome: Contact urticaria to diethyltoluamide (immediate-type hypersensitivity). *Archives of dermatology*, 111(6), 726-730

Makungu, C., Stephen, S., Kumburu, S., Govella, N. J., Dongus, S., Hildon, Z. J. L., ... & Jones, C. (2017). Informing new or improved vector control tools for reducing the malaria burden in Tanzania: a qualitative exploration of perceptions of mosquitoes and methods for their control among the residents of Dar es Salaam. *Malaria journal*, 16(1), 1-18.

Martin, N. J., Nam, V. S., Lover, A. A., Phong, T. V., Tu, T. C., & Mendenhall, I. H. (2020). The impact of transfluthrin on the spatial repellency of the primary malaria mosquito vectors in Vietnam: *Anopheles dirus* and *Anopheles minimus*. *Malaria journal*, 19(1), 1-11.

Martinez-Ibarra, J. A., Guillén, Y. G., Arredondo-Jimenez, J. I., & Rodriguez-Lopez, M. H. (2002). Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tanks in Southern Mexico. *BioControl*, 47(4), 481-486

Masalu, J. P., Finda, M., Killeen, G. F., Ngowo, H. S., Pinda, P. G., & Okumu, F. O. (2020). Creating mosquito-free outdoor spaces using transfluthrin-treated chairs and ribbons. *Malaria journal*, 19(1), 1-13.

Masalu, J. P., Finda, M., Okumu, F. O., Minja, E. G., Mmbando, A. S., Sikulu-Lord, M. T., & Ogoma, S. B. (2017). Efficacy and user acceptability of transfluthrin-treated sisal and hessian decorations for protecting against mosquito bites in outdoor bars. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-8.

McBride, M. F., Lambert, K. F., Huff, E. S., Theoharides, K. A., Field, P., & Thompson, J. R. (2017). Increasing the effectiveness of participatory scenario development through codesign. *Ecology and Society*, 22(3).

McHenry, M., & Lacuesta, G. (2014, December). Severe allergic reaction to diethyltoluamide (DEET) containing insect repellent. In *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* (Vol. 10, No. 18 2, pp. 1-1). BioMed Central.

McPhatter, L. P., Mischler, P. D., Webb, M. Z., Chauhan, K., Lindroth, E. J., Richardson, A. G., & Debboun, M. (2017). Laboratory and Semi-field Evaluations of Two (Transfluthrin) Spatial Repellent Devices Against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). US Army Medical Department Journal.

Messina, J. P., Brady, O. J., Golding, N., Kraemer, M. U., Wint, G. R., Ray, S. E., ... & Hay, S. I. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature microbiology*, 4(9), 1508-1515

Meyer, F. B. (1989). Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Research Reviews*, 14(3), 227-243.

Ministério da Saúde. (2002). Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. *Dengue*.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2014). Plano de Contingência Nacional para a Febre de Chikungunya.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue*. Brasília: Ministério da Saúde, 2009

Mulla, M. S., Federici, B. A., Darwazeh, H. A., & Ede, L. (1982). Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against floodwater mosquitoes. *Applied and environmental microbiology*, 43(6), 1288-1293.

Mwanga, E. P., Mmbando, A. S., Mrosso, P. C., Stica, C., Mapua, S. A., Finda, M. F., ... & Okumu, F. O. (2019). Eave ribbons treated with transfluthrin can protect both users and non-users against malaria vectors. *Malaria journal*, 18(1), 1-14.

Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology & toxicology*, 79(1), 1-14.

Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., & Yeh, J. Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & experimental toxicology*, 26(4), 361-366.

Ogoma, S. B., Lorenz, L. M., Ngonyani, H., Sangusangu, R., Kitumbukile, M., Kilalangongono, M., ... & Moore, S. J. (2014a). An experimental hut study to quantify

the effect of DDT and airborne pyrethroids on entomological parameters of malaria transmission. *Malaria journal*, 13(1), 1-17.

Ogoma, S. B., Mmando, A. S., Swai, J. K., Horstmann, S., Malone, D., & Killeen, G. F. (2017). A low technology emanator treated with the volatile pyrethroid transfluthrin confers long term protection against outdoor biting vectors of lymphatic filariasis, arboviruses and malaria. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(4), e0005455.

Ogoma, S. B., Ngonyani, H., Simfukwe, E. T., Mseka, A., Moore, J., & Killeen, G. F. (2012). Spatial repellency of transfluthrin-treated hessian strips against laboratory-reared *Anopheles arabiensis* mosquitoes in a semi-field tunnel cage. *Parasites & vectors*, 5(1), 1-5

Organização Pan-Americana da Saúde. Avaliação das estratégias inovadoras para o controle de *Aedes aegypti*: desafios para a introdução e avaliação do impacto dessas. Washington, D.C.: OPAS; 2019.

Osimitz, T. G., & Murphy, J. V. (1997). Neurological effects associated with use of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 35(5), 435-441.

Page, A. B. P., Stringer, A., & Blackith, R. E. (1949). BIOASSAY SYSTEMS FOR THE PYRETHRINS I. WATER-BASE SPRAYS AGAINST AXDÈS AEGYPTI L. AND OTHER FLYING INSECTS. *Annals of Applied Biology*, 36(2), 225-243.

Pellegrino, M., Steinbach, N., Stensmyr, M. C., Hansson, B. S., & Vosshall, L. B. (2011). A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor. *Nature*, 478(7370), 511-514

Ponlawat, A., *et al.*, Semi-Field Evaluation of Metofluthrin Impregnated Nets on Host Seeking *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus*. *J Am Mosq Control Assoc*, 2016. 32(2): p. 130-8.

POSEY, K.H. & C.E. SCHRECK. An airflow apparatus for selecting female mosquitoes for use in repellent and attraction studies. *Mosq. News*. 41: 566-568. 1981.

POWELL, J.R. TABACHNICK, W.J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013.

Rabinovich, R. N., Drakeley, C., Djimde, A. A., Hall, B. F., Hay, S. I., Hemingway, J., ... & Alonso, P. L. (2017). malERA: an updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLoS medicine*, 14(11), e1002456.

Ranson, H. N' Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. 2011. *Pyrethroid*

*resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control*, 91-98.

Reeves, W. C. (1951). Field studies on carbon dioxide as a possible host simulant to mosquitoes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 77(1), 64-66

Ritchie, S. A., Rapley, L. P., & Benjamin, S. (2010). *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(6), 1053-1059.

Robbins, P. J., & Cherniack, M. G. (1986). Review of the biodistribution and toxicity of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 18(4), 503-525.

Roque, R. A., & Eiras, Á. E. (2008). Calibration and evaluation of field cage for oviposition study with *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* female (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotropical entomology*, 37(4), 478-485.

San Martín, J. L., Brathwaite, O., Zambrano, B., Solórzano, J. O., Bouckennooghe, A., Dayan, G. H., & Guzmán, M. G. (2010). The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(1), 128.

Sangoro, O. P., Gavana, T., Finda, M., Mponzi, W., Hape, E., Limwagu, A., ... & Okumu, F. O. (2020). Evaluation of personal protection afforded by repellent-treated sandals against mosquito bites in south-eastern Tanzania. *Malaria journal*, 19(1), 1-12.

Sangoro, O., Kelly, A. H., Mtali, S., & Moore, S. J. (2014). Feasibility of repellent use in a context of increasing outdoor transmission: a qualitative study in rural Tanzania. *Malaria journal*, 13(1), 1-16.

Sangoro, O., Turner, E., Simfukwe, E., Miller, J. E., & Moore, S. J. (2014) c. A cluster-randomized controlled trial to assess the effectiveness of using 15% DEET topical repellent with long-lasting insecticidal nets (LLINs) compared to a placebo lotion on malaria transmission. *Malaria journal*, 13(1), 1-15.

Schleier III, J. J., & Peterson, R. K. (2011). *Pyrethrins and pyrethroid insecticides* (Vol. 11, pp. 94-131). London: Royal Society of Chemistry.

Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M., Horovitz, D. D., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., ... & Brazilian Medical Genetics Society–Zika Embryopathy Task Force. (2016). Possible association between Zika virus infection and microcephaly—Brazil, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), 59-62.

Shulse, C. D., Semlitsch, R. D., & Trauth, K. M. (2013). Mosquitofish dominate amphibian and invertebrate community development in experimental wetlands. *Journal of Applied Ecology*, 50(5), 1244-125

Siria, D. J., Batista, E. P., Opiyo, M. A., Melo, E. F., Sumaye, R. D., Ngowo, H. S., ... & Okumu, F. O. (2018). Evaluation of a simple polytetrafluoroethylene (PTFE)-based membrane for blood-feeding of malaria and dengue fever vectors in the laboratory. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-10.

Smallegange, R. C., Verhulst, N. O., & Takken, W. (2011). Sweaty skin: an invitation to bite?. *Trends in parasitology*, 27(4), 143-148.

Stanczyk, N. M., Brookfield, J. F., Field, L. M., & Logan, J. G. (2013). *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. *PloSone*, 8(2), e54438.

Steib, B. M., Geier, M., & Boeckh, J. (2001). The effect of lactic acid on odour-related host preference of yellow fever mosquitoes. *Chemical Senses*, 26(5), 523-528.

Sudakin, D. L., & Trevathan, W. R. (2003). DEET: a review and update of safety and risk in the general population. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 41(6), 831-839

SVS. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Ministério da saúde. Monitoramento dos casos de arboviruses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. Boletim Epidemiológico, v. 51, n. 3, p. 1-31, 2021.

Tafari, J., & Roberts, J. (1987). Organophosphate poisoning. *Annals of emergency medicine*, 16(2), 193-202

Takken, W. (1991). The role of olfaction in host-seeking of mosquitoes: a review. *International Journal of Tropical Insect Science*, 12(1-2-3), 287-295.

Tambwe, M. M., Moore, S., Chilumba, H., Swai, J. K., Moore, J., Stica, C., & Saddler, A. (2020). Semi Field Evaluation of Freestanding Transfluthrin Passive Emanators and the BG Sentinel Trap as a “Push-Pull control Strategy” Against *Aedes aegypti* Mosquitoes.

TEIXEIRA, Maria da Glória; BARRETO, Maurício Lima. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 1, p. 122-136, 1996. DOI: 10.1590/1413-812319961101582014



TERRA, M. R., DA SILVA, R. S., PEREIRA, M. G. N., & LIMA, A. F. (2017). *Aedes aegypti* e as arbovíroses emergentes no Brasil. *Revista Uningá Review*, 30(3).

Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.

Ware, G. W., & Whitacre, D. M. (2004). An introduction to insecticides. *The pesticide book*, 6.

WHO 2022. World Health Organization Dengue and severe dengue. (2022) Last update 10/01/2022. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/111008> WHO, 1995 World Health Organization. Division of Malaria and other Parasitic Diseases. (1995). *Manual on practical entomology in malaria / prepared by the WHO Division of Malaria and Other Parasitic Diseases*. World Health Organization.

WHO, 1997 World Health Organization. (1997). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 1996-1997. *International Programme on Chemical Safety*.

WHO, 2006 World Health Organization. (2006). WHO SPECIFICATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES (WHO specification 741/TC). World Health Organization.

WHO, 2009. World Health Organization. (2009). Vector management and delivery of vector control services. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. 3rd ed. Geneva: The Organization. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871\\_i](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871_i)

WHO, 2013 World Health Organization. (2013). WHO pesticide evaluation scheme. *Guidelines for Efficacy Testing of Spatial Repellents*. Geneva: World Health Organization. Disponível em [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78142/1/9789241505024\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78142/1/9789241505024_eng.pdf).

WHO, 2014 World Health Organization. (2014). A global brief on vector-borne diseases. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/111008>

Wikan, N., & Smith, D. R. (2016). Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e119-e126

Wilson, A. L., Chen-Hussey, V., Logan, J. G., & Lindsay, S. W. (2014). Are topical insect repellents effective against malaria in endemic populations? A systematic review and meta-analysis. *Malaria journal*, 13(1), 1-9.

World Health Organization. (2009). *Guidelines for efficacy testing of household insecticide products: mosquito coils, vaporizer mats, liquid vaporizers, ambient*

emanators and aerosols (No. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.3). World Health Organization.

Worthing, C., & Walker, S. (1987). *The Pesticide Manual*, 8th edn (Croydon, UK: The British Crop Protection Council)

Zara, A. L. D. S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 391-404.

Zwiener, R. J., & Ginsburg, C. M. (1988). Organophosphate and carbamate poisoning in infants and children. *Pediatrics*, 81(1), 121-126