

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

LUIZ FERNANDO DE FREITAS PESSOA

USO DO PYRIPROXYFEN EM NOVAS ABORDAGENS PARA CONTROLE DE
FORMAS JOVENS E ADULTAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

RECIFE
2018

Luiz Fernando de Freitas Pessoa

Uso do pyriproxyfen em novas abordagens para controle de formas jovens e adultas
de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos.

RECIFE

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- P475u Pessoa, Luiz Fernando de Freitas
 Uso do pyriproxyfen em novas abordagens para controle de formas jovens e adultas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Luiz Fernando de Freitas Pessoa. - Recife: [s.n.], 2018.
 72 p. : il., graf., tab.; 30 cm
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.
 Orientadora: Maria Alice Varjal de Melo Santos.
1. Controle vetorial. 2. Reguladores de crescimento de insetos. 3. Mosquitos. 4. *Aedes* - crescimento & desenvolvimento. 5. *Aedes* - efeitos de drogas. 6. Controle de Mosquitos - métodos. 7. Piretrinas - administração & dosagem. 8. Piretrinas - toxicidade. I. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. II. Título.

CDU 614.449

Luiz Fernando de Freitas Pessoa

Uso do pyriproxyfen em novas abordagens para controle de formas jovens e adultas
de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado
acadêmico em Biociências e Biotecnologia em
Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Eco-biologia de patógenos,
vetores e hospedeiros.

Aprovado em: 26/06/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cláudia Maria Fontes e Oliveira
Depto. de Entomologia/IAM-FIOCRUZ

Dr. Danilo de Carvalho Leandro
Centro de Educação/Colégio Aplicação-UFPE

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos
Depto. de Entomologia/IAM-FIOCRUZ

À minha família, amigos e colegas de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a minha gratidão vai para o universo. A imensidão e complexidade existente no infinito me fascinam e me fazem buscar cada dia mais conhecimento. Eu me refiro ao universo, sobretudo, como algo misterioso e grandioso, que exerce uma força incrível sobre todos nós. Mas você pode considerar isso como Deus. Por que não?

À minha família, pois são minha base. Especialmente minha mãe, irmãos e avó (Mana). Vocês são meus heróis.

Agradeço à Renan, por ter estado ao meu lado durante os momentos mais sombrios e confusos de toda minha vida (que “coincidiram” com o período do mestrado, a propósito).

Aos meus amigos de dentro e de fora do IAM que, felizmente, são muitos para listar. Não há um dia sequer que eu não agradeça aos céus por ter vocês.

Um agradecimento bem especial para Dra. Alice, minha orientadora, por ser tão paciente comigo (tarefa difícil). Não fui o melhor aluno, mas você pode ter certeza que dei o meu melhor dentro das minhas limitações.

Bom, no fim de tudo eu espero ter realizado uma contribuição, mesmo que mínima, para a ciência. Agradeço novamente ao universo por me permitir conhecê-lo (mesmo que em uma minúscula fração).

É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê.

Marcelo Camelo

PESSOA, Luiz Fernando de Freitas. **Uso do pyriproxyfen em novas abordagens para controle de formas jovens e adultas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

As fêmeas de *Aedes aegypti* são capazes de colonizar os mais variados locais que possam acumular água no ambiente. A permanência de áreas infestadas pelo mosquito no Brasil aponta para a baixa efetividade das estratégias de controle voltadas a eliminação de criadouros do mosquito. Inseticidas químicos como o análogo do hormônio juvenil dos Insetos, pyriproxyfen (Pyr), são utilizados no tratamento de reservatórios de água potável, um dos principais tipos de criadouros no Brasil. O uso do composto associado à ovitrampa tem revelado que o mesmo pode ser levado mecanicamente para outros criadouros pelos próprios mosquitos. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar efeitos primários e secundários do Pyr sobre o potencial reprodutivo de *Ae. aegypti*, com ênfase aplicada ao desenvolvimento de iscas tóxicas. A exposição direta de ovos a superdosagens e de larvas a subdosagens do Pyr, revelou a inexistência de efeito ovicida e de custo biológico associado a sobrevivência dos indivíduos. Quanto à ingestão do Pyr, os mosquitos, machos e fêmeas, alimentados com 50 mg/L do composto em sangue, solução de mel (50%) ou de sacarose (20%), observou-se uma redução significativa sobre a fecundidade e a fertilidade dos indivíduos, principalmente quando alimentados com mel ou sangue tratados. Os testes em condições simuladas de campo revelaram que as fêmeas foram capazes de carrear o Pyr das unidades disseminadoras (UD) para criadouros crípticos ou não, em quantidades suficientes para eliminar mais de 90% dos indivíduos expostos. Ao combinar iscas tóxicas de carboidratos e UD tratadas com Pyr, os resultados encontrados revelaram um efeito de potencialização desta última ferramenta. O nosso estudo, de modo geral, revela que o uso conjunto das duas técnicas pode ser uma estratégia integrada e inovadora no controle de *Aedes aegypti*.

Palavras chave: Controle vetorial. Reguladores de crescimento de insetos. Mosquitos.

PESSOA, Luiz Fernando de Freitas. **Use of pyriproxyfen in new approaches to control young and adult's forms of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2018. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology for Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

ABSTRACT

The females of *Aedes aegypti* are able to colonize the most varied places that can accumulate water in the environment. The permanence of mosquito-infested areas in Brazil points to the low effectiveness of control strategies aimed at eliminating mosquito breeding sites. Chemical insecticides such as the insect juvenile hormone analog, pyriproxyfen (Pyr), are used in the treatment of drinking water reservoirs, one of the main types of breeding grounds in Brazil. The use of the compound associated with trap has revealed that it can be taken mechanically to other breeding sites by the mosquitoes themselves. Thus, the objective of this study was to investigate the primary and secondary effects of Pyr on the reproductive potential of *Ae. aegypti*, with emphasis applied to the development of toxic baits. The direct exposure of eggs to overdoses and of larvae to sub-doses of Pyr revealed the absence of ovicidal effect and biological cost associated with the survival of individuals. As for the intake of Pyr, male and female mosquitoes fed 50 mg / L of the compound in blood, honey (50%) or sucrose (20%) solution, there was a significant reduction in fecundity and fertility of individuals, especially when fed with honey or blood treated. Tests in simulated field conditions revealed that females were able to carry the Pyr from the disseminator units (UD) to cryptic breeding sites or not, in amounts sufficient to eliminate more than 90% of the exposed individuals. By combining toxic baits of carbohydrates and UD treated with Pyr, the results found revealed a potentiating effect of this latter tool. Our study, in general, reveals that the joint use of the two techniques can be an integrated and innovative strategy in the control of *Aedes aegypti*.

Key-words: Vector control. Insect growth regulators. Mosquitoes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 2 – Estrutura química do hormônio juvenil natural mais comum entre os insetos.....	29
Figura 3 – Títulos do Hormônio Juvenil (HJ) e Ecdisona (20E) em estágios diferentes de um inseto.....	30
Figura 4 – Principais representantes de compostos químicos análogos de hormônio juvenil.....	32
Figura 5 – Cruzamentos realizados nos testes de exposição ao pyriproxyfen.	43
Figura 6 – Gaiolas utilizadas nos testes de dispersão de pyriproxyfen por fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	45
Figura 7 – Ovos postos por fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> alimentadas com mel tratado com pyriproxyfen (A) e não tratado (B).....	59
Gráfico 1 – Oviposição resultante do cruzamento entre indivíduos sobreviventes à exposição de duas concentrações (0,04 e 0,12mg/L) do Sumilarv® 0,5G e controle.....	49
Gráfico 2 – Longevidade média de machos e fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> sobreviventes a subdosagens (0,04 e 0,12 mg/L) do Sumilarv® 0,5G.....	50
Gráfico 3 – Efeitos da ingestão do repasto de sangue tratado com 50 mg/L de pyriproxyfen sobre a fecundidade e fertilidade de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , em dois ciclos sucessivos de oviposição.....	52
Gráfico 4 – Fecundidade de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> resultante do cruzamento entre indivíduos alimentados com iscas de sacarose a 20% tratadas e não tratadas com pyriproxyfen (P.A.). Valores observados em dois ciclos sequenciais de oviposição.....	54
Gráfico 5 – Fertilidade de <i>Aedes aegypti</i> resultante do cruzamento entre indivíduos alimentados com iscas de sacarose a 20% tratadas e não tratadas com pyriproxyfen (P.A.). Valores observados em dois ciclos sequenciais de oviposição.....	56
Gráfico 6 – Fecundidade e fertilidade de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> resultante do cruzamento entre indivíduos alimentados com iscas de mel/Manuka a 50%, tratadas e não tratadas com Sumilarv® 0,5G. Valores observados em	57

dois ciclos sequenciais de oviposição.....	
Gráfico 7 – Inibição da emergência de <i>Aedes aegypti</i> promovida pelo pyriproxyfen em ovitrampas-sentinelas (OVT-S) da dispersão do produto por fêmeas, em gaiolas sob condições simuladas de campo.....	58
Gráfico 8 – Teste de dispersão utilizando iscas tóxicas de mel tratadas com pyriproxyfen. Dados apenas dos efeitos das iscas tóxicas comparadas ao grupo controle.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Viabilidade de ovos de <i>Aedes aegypti</i> com diferentes tempos de embriogênese, expostos à água tratada com 2 mg/L do Sumilarv® 0,5G (dosagem de rotulo), correspondendo a 0,01 mg/L do pyriproxyfen. Ovos e larvas apresentados como média ± desvio padrão.....	47
Tabela 2 – Viabilidade de ovos de <i>Aedes aegypti</i> recém postos, expostos à água tratada com superdosagens do Pyriproxyfen P.A. e do Sumilarv® 0,5G, inferida pela eclosão das larvas. Ovos e larvas apresentados como média ± desvio padrão (DP).....	48
Tabela 3 – Efeito da alimentação de sangue tratado com o pyriproxyfen (50 mg/L) sobre a fecundidade e fertilidade de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , em dois ciclos sequenciais de oviposição. Número de ovos e larvas apresentados como média ± desvio padrão.....	51
Tabela 4 – Comparação dos efeitos da ingestão de iscas de sacarose e mel tratados com P.A. do pyriproxyfen na reprodução de <i>Aedes aegypti</i> em dois ciclos de oviposição. Ovos e larvas apresentados como média ± desvio padrão.....	53
Tabela 5 – Comparação dos efeitos da ingestão de iscas de sacarose e mel tratados com P.A. do pyriproxyfen e Sumilarv® 0,5G na reprodução de <i>Aedes aegypti</i> em dois ciclos de oviposição. Ovos e larvas apresentados como média ± desvio padrão.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE – acetilcolina

Ache – acetilcolinesterase

Bti – *Bacillus thuringiensis* soroveriedade *israelensis*

CA – Corpora allata

CL – Concentração letal

CS – Quitina sintase

CSI – *Chitin synthesis inhibitor* (Inibidor de síntese de quitina)

DDT – diclorodifeniltricloroetano

DENV – Vírus da dengue

DP – Desvio Padrão

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

HJ – Hormônio juvenil

IGR – *Insect growth regulator* (Regulador de crescimento de inseto)

JHA – *Juvenile hormone analogue* (análogo do hormônio juvenil)

MS – Ministério da saúde

N_{av} – Canais de sódio regulados por voltagem

OMS – Organização Mundial de Saúde

OC – Organoclorados

OP – Organofosforados

OVT – Ovitrapa

PA - Princípio ativo

PEAa – Plano de Erradicação do *Aedes aegypti*

PFS – Programa de Saúde da Família

PIACD – Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue

PI – Piretróides

PNCD – Programa Nacional de Controle da Dengue

PYR - Pyriproxyfen

SNC – Sistema nervoso central

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

UVB – Ultra Baixo Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Histórico do controle de mosquitos vetores no Brasil.....	18
2.2 Bioecologia e controle do <i>Aedes aegypti</i>	20
2.3 Inseticidas químicos.....	24
2.3.1 <u>Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos e Piretróides</u>	25
2.3.2 <u>Reguladores de crescimento de insetos (IGRs)</u>	26
2.3.2.1 <i>Inibidores de síntese de quitina</i>	28
2.3.2.2 <i>Análogos do hormônio juvenil</i>	29
2.3.2.2.1 <i>Methoprene</i>	32
2.3.2.2.2 <i>Fenoxycarb</i>	33
2.3.2.2.3 <i>Pyriproxyfen</i>	34
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	37
5 HIPÓTESE.....	38
6 OBJETIVO GERAL.....	39
6.1 Objetivos específicos.....	39
7 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
7.1 Colônia de <i>Aedes aegypti</i>	40
7.2 Inseticida análogo do hormônio juvenil.....	40
7.3 Avaliação do Efeito ovicida.....	40
7.4 Efeitos de concentrações subletais de pyriproxyfen sobre a longevidade e reprodução de <i>Aedes aegypti</i>	41
7.5 Efeito da ingestão do Pyriproxyfen sobre a reprodução de <i>Aedes aegypti</i>	42
7.6 Avaliação do potencial de dispersão do pyriproxyfen fêmeas do mosquito.....	44
8 RESULTADOS.....	47
8.1 Efeito ovicida.....	47
8.2 Efeitos de doses subletais sobre longevidade e reprodução de <i>Aedes aegypti</i>	48

8.3 Efeito da ingestão do Pyriproxyfen sobre a reprodução de <i>Aedes aegypti</i>	50
8.4 Dispersão de pyriproxyfen por fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	57
9 DISCUSSÃO.....	60
10 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Dengue, Chikungunya, febre amarela e Zika são consideradas importantes arboviroses que atingem o homem. No Brasil, surtos epidêmicos destas doenças têm ocorrido em associação a diversos fatores, entre eles a circulação simultânea de alguns dos vírus em áreas endêmicas para o vírus DENV e a intensa mobilidade de pessoas infectadas em áreas densamente infestadas por seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (BRASIL, 2015, 2017).

Os mosquitos, de um modo geral, são insetos que apresentam elevada taxa de reprodução e dispersão, cujas fêmeas ao realizarem a hematofagia, essencial para produção e maturação dos ovos, podem atuar como vetores de patógenos e/ou parasitas. *Ae. aegypti* é uma espécie invasora, bem adaptada aos ambientes urbano e suburbano, cujo desenvolvimento é favorecido pelas condições ambientais encontradas nos países tropicais, onde seu ciclo de vida pode se completar em aproximadamente 10 dias. As fêmeas são capazes de utilizar os mais variados locais que possam acumular água (desde cisternas abertas a pequenos objetos/resíduos sólidos localizados no ambiente) para realizar a deposição de seus ovos e o crescimento de suas formas imaturas (larvas e pupas) (FORATTINI, 2002).

As estratégias empregadas no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) estão concentradas na eliminação mecânica de potenciais criadouros do mosquito, na aplicação de inseticidas de ação larvicida em grandes reservatórios de água (caixa d'água, cisterna, tonel e outros) e na utilização de inseticidas larvicidas e adulticidas em pontos estratégicos, áreas que podem concentrar uma grande quantidade de criadouros do mosquito (cemitérios, ferros-velhos etc.).

Sabe-se que a baixa cobertura de eliminação dos criadouros representa o principal problema para o controle destes mosquitos e pelo menos três aspectos podem interferir neste processo: 1) a maioria dos criadouros estão no peri e/ou intradomicílio dos imóveis; 2) a dificuldade para detecção e eliminação dos criadouros nestes locais e 3) a presença de criadouros crípticos ou de difícil acesso que permanecem produtivos e não tratados no ambiente (ABAD-FRANCH et al., 2015; WILDER-SMITH et al., 2012).

No PNCD, além das dificuldades associadas à cobertura de tratamento dos criadouros, outros fatores como a resistência a inseticidas químicos, organofosforado e piretróides, disseminada nas populações naturais de *Ae. aegypti* tem comprometido ainda mais a efetividade de controle do mosquito (ARAÚJO, 2013; BRAGA; VALLE, 2007b; LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 2003;).

Para o manejo da resistência, detectada desde 2000, inseticidas biológicos ou mesmo químicos, com mecanismo de ação diferentes dos já referidos passaram a ser utilizados no controle vetorial, sobretudo para o tratamento de criadouros do mosquito. O biolarvicida *Bacillus thuringiensis* soroveriedade *israelensis* (*Bti*) foi utilizado, de forma pontual, em substituição aos organofosforados até 2009, seguido dos inibidores de síntese de quitina (diflubenzuron e novaluron) até 2013/2014 e mais recentemente, 2014/2015, do análogo do hormônio juvenil (Pyriproxyfen) (ARAÚJO et al., 2013; BRAGA; VALLE 2007).

A exceção do *Bti*, aqueles outros inseticidas fazem parte do grupo dos Reguladores de Crescimento de Insetos, *Insect Growth Regulatos* (IGR), e atuam interferindo no desenvolvimento e reprodução dos indivíduos expostos aos compostos (BECKER, 2003). Dentre os IGRs mais utilizados, o grupo dos análogos do hormônio juvenil (AHJ) dos insetos ganha destaque. Estes compostos atuam a nível endócrino, atrasando o processo de metamorfose, interferindo no desenvolvimento ovariano, reduzindo a capacidade reprodutiva, promovendo esterilidade e até mesmo bloqueando o desenvolvimento embrionário, podendo, portanto, atuar no controle de diferentes fases do ciclo de vida dos insetos (BECKER, 2003).

O Sumilarv® 0,5G, à base de pyriproxyfen, é um dos poucos produtos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para uso em água potável (BRASIL, 2014). Este produto, formulado em grânulos de areia, possui potencial de ação em baixíssimas concentrações. Estudos revelam que o produto pode ser levado a outros criadouros até mesmo pelos próprios mosquitos, quando impregnados com o inseticida (ABAD-FRANCH et al., 2015; SIHUINCHA et al., 2005). No entanto, pouco se sabe sobre sua efetividade via ingestão em iscas tóxicas de carboidratos para o controle de *Ae. aegypti*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico do controle de *Aedes aegypti* no Brasil

Doenças transmitidas por insetos vetores causam grandes problemas em saúde pública no mundo inteiro, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. Embora haja um esforço para realizar o controle de tais doenças como as arboviroses, helmintoses e protozooses, a OMS ainda enfrenta dificuldades em definir e implantar estratégias que de fato funcionem nas condições de cada localidade. Estimativas apontam que as doenças transmitidas por mosquitos estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade nos países que ainda estão em desenvolvimento (CONDINOI, 2006; CONSOLI, 1994).

No Brasil, até a semana epidemiológica 49, em 2016, mais de 1.400.000 casos de dengue foram notificados com 621 óbitos ainda em investigação, sendo o Sudeste e o Nordeste as regiões mais afetadas pela enfermidade. O cenário epidemiológico ficou ainda mais complexo com a tríplice epidemia em 2015/2016 quando circularam simultaneamente os vírus Chikungunya e o Zika (BRASIL, 2016).

Campanhas para controle do mosquito vetor de arboviroses como a febre amarela urbana, o mosquito *Ae. aegypti*, são executadas desde os anos 30, cujas ações visavam a erradicação do mosquito até meados dos anos 1950. Depois de considerado erradicado em boa parte das Américas na década de 50, inclusive do Brasil em dois momentos, 1956 e 1973, sua presença foi novamente detectada em território nacional no final dos anos 70 (FORATTINI, 1996). A partir daí o Ministério da Saúde iniciou a implementação de campanhas de combate ao mosquito *Ae. aegypti* (BRASIL, 2003; BRAGA; VALLE, 2007; FRANCO, 1969; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996, 2002).

Após a ocorrência endêmica dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 no país, em meados da década de 1990, teve início o Plano de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa), coordenado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), o qual concentrava esforços na utilização de inseticidas químicos, na compra de veículos e equipamentos para sua aplicação em campo e na contratação de pessoal qualificado para a execução das atividades de controle ao mosquito vetor. Embora muito tenha se investido no controle químico do mosquito, pouco foi feito no que diz

respeito ao saneamento básico, ao abastecimento hídrico nas comunidades mais carentes, na conscientização da população quanto à necessidade de recolhimento de resíduos sólidos, dentre outros fatores que juntos culminaram com a expansão territorial do mosquito e o aumento dos casos de dengue no país, revelando o insucesso do PEAa (BRAGA; VALLE, 2007; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

Em 2000, uma nova tentativa, desta vez não de erradicação do mosquito, mas de redução do número de casos da dengue foi proposta com o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), que recebeu investimento de quase meio milhão de reais destinados aos estados e municípios para ações de epidemiologia e controle. Além da redução do número de casos, o PIACD tinha como alvo reduzir as mortes por febre hemorrágica a menos de 1% até o final de 2002 e diminuir a infestação predial pelo mosquito. Mesmo com abordagens reformuladas do PEAa, o PIACD continuou investindo no uso de inseticidas químicos, sobretudo o larvicida temephos (organofosforado) e adulticidas da classe dos piretróides, já em resposta aos indícios de resistência ao malathion, em uso desde o surgimento do PEAa, também da classe dos organofosforados (BRASIL, 2002a,2002b).

Em 2002, com a introdução do sorotipo DENV-3, houve uma nova reformulação do PIACD, para um programa permanente, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), agora com ações para o controle do mosquito e não mais para sua erradicação, enfatizando alguns aspectos essenciais como:

- a) Criação de programas de controle permanentes, haja vista a dificuldade eminente de eliminação do mosquito vetor;
- b) Fortalecimento da vigilância entomológica e epidemiológica para uma maior eficácia na detecção e previsão de possíveis surtos da doença;
- c) Mobilização e conscientização da população, criando uma atmosfera de responsabilidade e cuidado familiar no ambiente doméstico;
- d) Melhoria da qualidade do trabalho de campo dos agentes;
- e) Melhoramento das condições sanitárias (coleta de lixo, saneamento básico, armazenamento de água);
- f) Utilização de instrumentos legalizados para vistoria e eliminação de criadouros em pontos comerciais, imóveis abandonados, etc.;

- g) Integração das ações de controle da dengue na atenção básica, com a mobilização do Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e Programa de Saúde da Família (PFS);
- h) Acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios através de instrumentos mais eficazes.

O PNCD atualmente amplia suas ações de controle do mosquito vetor visando também impactar a prevenção de Zika e Chikungunya (BRASIL, 2002a; FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2002).

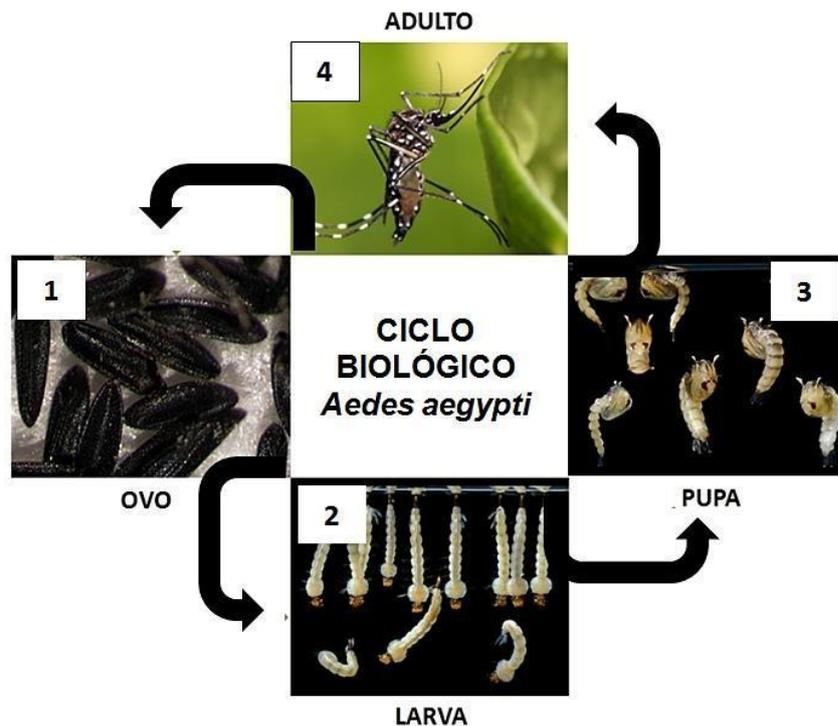
2.2 Bioecologia e controle de *Aedes aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* é uma espécie de culicídeo com características peculiares que o categoriza como um vetor de agentes patogênicos de grande importância epidemiológica em muitas regiões do mundo. Ocorre, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais, tendo uma frequência menor em regiões de clima temperado (FORATTINI, 1996), com recentes descrições de sua presença pela primeira vez no Canadá (BAJER, 2016). Acredita-se que sua dispersão foi iniciada a partir da África, chegando a diversas partes do globo a partir do transporte passivo de seus ovos em embarcações, possivelmente com o transporte marítimo de escravos. Atualmente, é considerada uma espécie cosmopolita que acompanhou a trajetória de urbanização humana, se adaptando aos mais diversos ambientes e criadouros, inclusive os destinados ao armazenamento de água potável como tanques, caixas d'água, cisternas e tonéis, além de outros como pneus em desuso descartados a céu aberto, vasos de plantas, e muitos outros objetos que possuam capacidade de armazenar água, preferencialmente com baixo teor de matéria orgânica, considerada limpa. Tais locais são utilizados como sítios para a oviposição e desenvolvimento das formas imaturas da espécie (CLEMENTS, 1992; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1996;).

O ciclo biológico de *Ae. aegypti* (Figura 1) compreende quatro diferentes estágios: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto. Tais estágios são mediados e regulados por substâncias produzidas pelo inseto, como os hormônios, e participam desde o seu desenvolvimento, até sua reprodução e comportamento

(GILBERT, 2010). O acasalamento desta espécie se dá, normalmente, dentro ou ao redor dos domicílios, sendo necessário apenas uma ou duas cópulas para que os espermatozoides sejam transferidos para o corpo da fêmea e estocados nas espermateca. Ambos os sexos se alimentam, naturalmente, de carboidratos para sobrevivência, cujas fontes são néctar e outros exsudatos das flores e dos frutos. Apenas as fêmeas necessitam se alimentar de sangue para que haja a maturação dos seus ovos, e, no caso de *Ae. aegypti*, há preferência por sangue humano, o que caracteriza esta espécie como fortemente antropofílica (CONSOLI, 1994; FORATTINI, 2002).

Figura 1 – Ciclo biológico do *Aedes aegypti*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: 1) Ovos. 2) Larvas. 3) Pupas. 4) Adulto.

Após o repasto sanguíneo, que ocorre preferencialmente durante o dia, as fêmeas repousam, realizam a digestão e maturação dos ovos, e, por fim, buscam locais para a oviposição. A deposição dos ovos é realizada nas paredes dos criadouros, e cada fêmea procura ovipositar no maior número possível de

criadouros, comportamento denominado *skip-oviposition*, ou oviposição aos saltos, cuja estratégia está associada à dispersão e a preservação da espécie no ambiente (COLTON, 2003).

O controle dos locais onde os mosquitos se reproduzem é a principal abordagem utilizada, visando uma diminuição populacional da espécie, minimizando assim o contato entre o ser humano e o mosquito. As abordagens de controle vetorial para *Ae. aegypti* no Brasil englobam desde ações físicas/mecânicas até intervenções químicas ou biológicas (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; DONNALISIO; GLASSER, 2002).

No controle físico/mecânico estão incluídas ações de reorganização ambiental onde o ser humano está inserido. Basicamente, consiste em transformações permanentes ou temporárias relacionadas a recursos hídricos, à vegetação ou ao solo visando prevenção, eliminação ou diminuição de habitats de vetores. No Brasil existem graves problemas associados ao saneamento, abastecimento de água, coleta e encaminhamento de resíduos sólidos, que somados aos hábitos da própria população, aumentam a quantidade de criadouros artificiais do vetor no ambiente (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Algumas destas ações, como o próprio saneamento, envolvem um alto investimento inicial, pois estão associadas às políticas públicas de caráter permanente. Métodos relacionados à manipulação da habitação humana também estão inseridos neste tipo de controle, como a telagem de portas e janelas, utilização de mosquiteiros impregnados com inseticida, dentre outros que auxiliam no bloqueio do contato entre o humano e o mosquito (FERRARI, 1996; FORATTINI, 2002; MACORIS, 1999).

O controle pelo uso de inseticidas químicos é o mais frequente no mundo, tanto para insetos vetores de diversos patógenos ao homem, quanto para pragas agropecuárias. O modo de aplicação destes compostos pode abranger modalidades distintas que são determinadas pela fase de vida, pelo hábito e habitat do inseto alvo. No caso dos mosquitos, produtos com efeito larvicida são aplicados diretamente na água dos criadouros (aplicação focal) e agem por ingestão e/ou contato, matando larvas e, eventualmente, pupas. Já os adulticidas atingem as formas aladas dos mosquitos que agem por contato e são aplicados por borrifação, geralmente nas superfícies externas dos criadouros ou nos locais de repouso dos mosquitos, presentes nas áreas peridomiciliares (aplicação perifocal). Tais produtos

também podem ser aplicados em ultrabaixo volume (UBV), em veículos motorizados, como parte da estratégia para interrupção de transmissão viral, exemplo (FORATTINI, 2002; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Existem diversos tipos de inseticidas com modos de ação distintos. Os larvicidas, já citados acima, podem ser classificados segundo sua atuação como asfixiantes (impossibilitando a respiração normal do inseto através da obstrução dos seus espiráculos respiratórios), gástricos (que possui ação apenas ao ser ingerido pelo inseto) ou de contato (quando conseguem atravessar a superfície corporal do inseto ou através da respiração). Já os adulticidas, possuem diversos sítios de atuação dependendo de sua classe, agindo principalmente por contato (FORATTINI, 2002; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 1995).

Embora se mostrassem úteis no controle de diversos tipos de pragas urbanas, algumas classes de inseticidas químicos (como os organofosforados e carbamatos) apresentavam certa toxicidade a mamíferos (KING, AARON, 2015). Em outros casos, a utilização em larga escala de classes de inseticidas como a dos organofosforados e piretróides causava seleção de populações de mosquitos contendo características de resistência a estes compostos, demonstrando a necessidade de métodos alternativos para o manejo do uso dos agentes de controle (MACORIS, 2011).

O controle utilizando agentes biológicos surgiu com a premissa de se utilizar de agentes sustentáveis para um controle mais seletivo, agindo como uma ferramenta eficiente na redução populacional de insetos vetores. Dentre os agentes utilizados, estão inclusos predadores naturais, parasitas, espécies competidoras, patógenos e seus subprodutos (MITTAL, 2003).

Atualmente, a utilização de bactérias entomopatógenas está sendo amplamente empregada, pela sua eficiência e seletividade. Trata-se de espécies de bactérias que produzem toxinas com ação larvicida em mosquitos de importância médica. Espécies como *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (*Bti*) produz cristais protéicos que são ingeridos pelas formas larvais mosquitos *Culex*, onde agem em células epiteliais intestinais por meio de interação com receptores específicos para a toxina, causando efeitos citopatológicos, matando a larva (BRAVO, 2011; DARBOUX, 2001; LACEY, 2007).

Estratégias de controle genético também estão se mostrando eficientes no controle de *Ae. aegypti*, e mais estudos estão sendo realizados para o aprimoramento destas técnicas. Dentre os métodos conhecidos, podemos citar a técnica do gene letal, que inclui a utilização de mosquitos modificados geneticamente contendo genes que são transferidos para a prole, os quais são letais na ausência de um inibidor de ativação não presente no ambiente. Apenas os machos transgênicos produzidos em massa nas biofábricas são liberados em campo (BOYER, 2012; MASSONNET-BRUNEEL, 2013). Outra técnica que tem se mostrado promissora é a técnica de esterilização de insetos por irradiação, onde apenas pupas machos de *Ae. aegypti* passam por um tratamento com doses de raios gama ou X, sofrendo rearranjos cromossômicos aleatórios, levando à esterilização destes insetos, os quais, por fim, são liberados na natureza para controle da população local (ARAÚJO, 2015). Ambas as técnicas citadas necessitam de um bom processo de sexagem, pois apenas indivíduos machos podem ser liberados no ambiente (ALPHEY, 2010).

2.3 Inseticidas químicos

Os inseticidas utilizados no controle de insetos são classificados em cinco grupos químicos principais: os organoclorados (OC), os organofosforados (OP), carbamatos, piretróides (PI) e uma classe especial chamada de reguladores de crescimento de insetos (IGR) (BRASIL, 2005; GILBERT, 2010).

A primeira geração de inseticidas cujo modo de ação inclui, principalmente, ação tóxica estomacal por ingestão, tem como um dos principais componentes o arsênio. A segunda geração de inseticidas inclui os compostos que agem por contato, representados pelos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. A terceira geração envolve compostos que atuam desregulando o metabolismo do inseto de forma não tóxica, mas levando-o à morte por comprometer o seu desenvolvimento. Os reguladores de crescimento têm como principais representantes os inibidores de síntese de quitina (CSI) e os análogos do hormônio juvenil (JHA). A quarta geração abrange apenas os inseticidas biológicos, representados especialmente por microorganismos patogênicos ou seus subprodutos, a exemplo do biolarvicida *Bti* (BECKER, 2003).

2.3.1 Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos e Piretróides

Na classe dos Organoclorados se encontram os compostos que possuem carbono, hidrogênio e cloro em sua composição química. Um dos organoclorados mais famosos, o diclorodifeniltricloroetano (DDT), pertence ao grupo dos difenil-alifáticos, muito utilizado durante o século XX contra pragas agrícolas e vetores de patógenos, auxiliando no combate a diversas arboviroses como febre amarela e malária. Com isso, concedeu o Prêmio Nobel de Medicina ao entomologista suíço Paul Muller pela sua descoberta (WARE, 2004). Seu modo de ação ainda não foi claramente descrito, mas sabe-se que ele atua no sistema nervoso central do inseto, interferindo no equilíbrio dos íons de sódio e potássio nos axônios, descoordenando a passagem dos impulsos nervosos e levando o inseto à morte (ROBERTS et al., 1999).

A utilização de organoclorados como o DDT trouxe resultados satisfatórios por um longo período nos programas de controle de insetos, porém o seu uso foi suspenso e até mesmo proibido em muitos países devido a sua longa persistência no ambiente, toxicidade e seu acúmulo em tecidos de vertebrados (CHEN; ROGAN, 2003; PALCHICK, 1996). O uso do DDT, todavia, ainda é permitido e até mesmo indicado pela OMS em alguns países para utilização no controle de insetos vetores, como ferramenta de manejo juntamente com inseticidas de outras classes (ROBERTS et al., 1999).

A classe dos organofosforados (OPs) inclui todos os inseticidas que possuem fósforo em sua composição. Surgiram logo após os organoclorados, e seus principais representantes são o malation (adulticida utilizado em ultra-baixo volume – UVB) e o temephos (larvicida de aplicação direta em criadouros de mosquitos). São todos compostos biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos, porém, são quimicamente instáveis, necessitando de uma renovação periódica constante na sua aplicação (PALCHICK, 1996).

Os OPs atuam no sistema nervoso central, inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pelo controle dos níveis de acetilcolina (ACE), importante neurotransmissor de impulsos elétricos. O inseticida atua através da ingestão e/ou contato, inibindo a ação da AChE através da fosforilação da mesma, deixando-a irreversivelmente inativada. Este efeito causa um

acúmulo da acetilcolina nas sinapses, interrompendo a propagação do impulso elétrico, levando a um processo de paralisia que pode resultar na morte do inseto (BECKER, 2003).

Os carbamatos possuem o ácido carbâmico como composto derivado, e sua comercialização iniciou-se por volta dos anos 60. Seus principais representantes são o bendiocarb, propoxur e o carbaril. Seu modo de ação é similar ao dos organofosforados na inibição da AChE, levando a uma carbamilação da enzima, fazendo dos carbamatos compostos mais rápidos e letais sobre os insetos do que os organofosforados. A ação dos carbamatos, diferentemente dos organofosforados, pode ser reversível ao longo do tempo sobre o inseto tratado (WARE, 2004).

Os piretróides fazem parte de uma geração de inseticidas sintéticos derivados do ácido crisantêmico e do ácido pirétrico de alta atividade (DAVIES et al., 2007). Surgiram em resposta à necessidade de criação de um composto químico estável e eficiente contra diversos tipos de insetos considerados pragas urbanas. São biodegradáveis, foto e termoestáveis e possuem baixa toxicidade aos mamíferos (BECKER, 2003).

Esta classe de inseticidas possui rápida ação neurotóxica no SNC, em proteínas chamadas canais de sódio regulados por voltagem (Na_v), as quais são responsáveis pela passagem dos íons de sódio nos axônios, permitindo, assim, a passagem dos impulsos nervosos de forma correta. Os piretróides atuam na membrana do axônio modificando as proteínas Na_v e levando a uma descoordenação da resposta nervosa do inseto através de uma propagação contínua do impulso nervoso. Os níveis de danos dependerão da dosagem, podendo levar o inseto à morte (BECKER, 2003; HEMINGWAY; RANSON, 2000).

No Brasil, os piretróides substituíram os Organofosforados no controle das fases adultas de *Ae. aegypti* no ano 2000, e alguns dos seus representantes mais conhecidos são a deltametrina, a permetrina, a cipermetrina e a lambda-cialotrina (BRITO et al., 2013; SANTOS, 2008).

2.3.2 Reguladores de crescimento de insetos (IGRs)

Com o surgimento da resistência aos inseticidas químicos utilizados na rotina de controle de pragas dos anos 70, houve a necessidade de se desenvolver

compostos que apresentassem uma ação alternativa e eficiente para manejo da resistência a compostos como os organofosforados, por exemplo, amplamente utilizados na época (MULLA, 1979).

O grupo dos inseticidas reguladores de crescimento de insetos, também conhecidos como IGRs, são compostos que atuam causando modificações fisiológicas e morfológicas que comprometem o desenvolvimento do inseto. Tais compostos surgiram no início dos anos setenta com o primeiro inibidor de síntese de quitina, a benzoilfenilureia, descoberta pelos cientistas da Philips-Duphar BV (atual Crompton Corporation), e comercializado como “Dimilin” pela Uniroyal Chemical Company, nos Estados Unidos (GILBERT, 2010).

Desde então, diversos compostos da classe têm sido sintetizados e comercializados para controle de pragas com a promessa de ação em sistemas fisiológicos e bioquímicos presentes apenas em artrópodes, da classe Insecta, apresentando toxicidade apenas nesta classe de animais, tendo alvos moleculares bem definidos além de serem biodegradáveis e seguros para o ambiente. Compostos desta classe podem apresentar ação na regulação endócrina do crescimento, desenvolvimento, reprodução e metamorfose do indivíduo alvo. O desenvolvimento de resistência a estes compostos, até então não-detectada, apresenta baixa probabilidade de ocorrer, tendo em vista que essas substâncias químicas possuem receptores hormonais naturais específicos, sendo assim, o risco de populações expostas ao IGRs desenvolverem algum tipo de resistência seria mínimo (BEADLES et al., 1975; GILBERT, 2010).

Todo o processo de desenvolvimento e crescimento de um estágio para outro num inseto é regulado por dois hormônios principais, o hormônio esteroide do inseto (ou ecdisona) e o hormônio juvenil (JH), pertencente à classe dos sesquiterpenoides. As mudas que ocorrem de um estágio para o outro são reguladas pela ecdisona desde a fase larval até a fase adulta. Já o hormônio juvenil atua regulando o tempo e os processos de desenvolvimento desde o ovo. Na fase adulta, ambos os hormônios possuem seus papéis modificados para regular os processos reprodutivos do inseto (MENN, 2012).

Atualmente existem dois grupos principais de reguladores de crescimento de insetos, os quais são caracterizados pelo seu modo de ação:

- a) Os inibidores de síntese de quitina, como o diflubenzuron, que atuam interferindo na formação da nova cutícula, resultando no insucesso da muda do inseto.
- b) Os análogos do hormônio juvenil dos insetos, como o pyriproxyfen, que interferem no processo de metamorfose afetando o progresso até o estágio adulto do indivíduo.

2.3.2.1 Inibidores de síntese de quitina

A cutícula dos insetos faz parte de um conjunto de estruturas muito importantes para a formação do seu exoesqueleto. Ela necessita ser impermeável para protegê-lo e ao mesmo tempo macia e flexível para permitir seu movimento. Ao longo do tempo, com a alimentação e o crescimento, a cutícula precisa ser extensível entre cada um de seus segmentos, mas rígida para fornecer pontos firmes para que possa haver a ligação muscular ou para possibilitar a formação de estruturas como mandíbulas e garras. Tendo sua formação realizada por células epidérmicas e composta principalmente por quitina (30-60%, dependendo do inseto), problemas relacionados com a formação da cutícula podem ser letais para o inseto (GILBERT, 2010).

Constituída por uma longa cadeia de N-acetil-D-glicosamina, um composto derivativo da glicose, a quitina está principalmente presente nos exoesqueletos de artrópodes, sendo um dos compostos biológicos mais abundantes na Terra. O metabolismo da quitina pode ser classificado de acordo com o seu processo de síntese e degradação, os quais contam com enzimas específicas como a quitina sintase (CS), que catalisam sua formação através da transferência de N-acetil-D-glicosamina. Basicamente, polímeros individuais deste açúcar são translocados através da membrana plasmática e se unem para formar cristais rígidos. Os cristais formados são partes que integram as estruturas quitinosas de septos e paredes celulares de fungos, e de cutículas de invertebrados como os insetos (COHEN, 2001). As enzimas responsáveis pela degradação da quitina são as quitinases, e atuam regulando a sua produção, sendo cruciais em processos relacionados ao desenvolvimento pós-embrionário, durante a muda larval e pupação (PALLI, 1998).

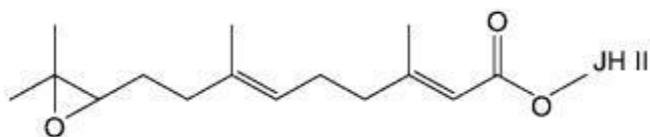
A atividade inseticida do primeiro composto inibidor de síntese de quitina foi descoberta por volta de 1970 por cientistas da Crompton Corporation (Holanda), e o primeiro produto comercial foi o diflubenzuron (Dimilin®). Atuando como um regulador de crescimento não sistêmico, por ingestão ou contato, o diflubenzuron age principalmente no momento da muda do inseto ou na eclosão dos ovos (DAALEN, 1972).

2.3.2.2 Análogos do hormônio juvenil

Estudos conduzidos na Polônia e publicados em 1922 demonstraram que, ao se extirpar o cérebro de uma lagarta, havia um impedimento da mesma alcançar o estágio de pupa, interrompendo ali o seu desenvolvimento. Com isso, o pesquisador responsável pelo estudo, Stefan Kopec, atribuiu este fenômeno a um fator humoral que seria responsável pelo desenvolvimento do inseto e que era produzido no cérebro. Outro estudo realizado pelo pesquisador Vincent Wigglesworth, em 1936, demonstrou que glândulas localizadas na base do cérebro, denominadas corpora allata (CA), secretam substâncias hormonais que seriam responsáveis pelo atraso ou impedimento da metamorfose no inseto. A tal substância foi dado o nome de hormônio juvenil (JH) (KOPEC, 1922; WIGGLESWORTH, 1936).

A estrutura do hormônio juvenil o caracteriza como um composto terpenoide, mais especificamente um sesquiterpeno. Os sesquiterpenos são hidrocarbonetos de fórmula química $C_{15}H_{24}$, formados por três unidades isopreno. Tais compostos são muito encontrados em plantas e insetos cumprindo os mais diversos papéis, mas principalmente como agentes de defesa ou hormônios. A forma mais comum dos sesquiterpenos encontrados nos insetos é mostrada na figura 2.

Figura 2 – Estrutura química do hormônio juvenil natural mais comum entre os insetos

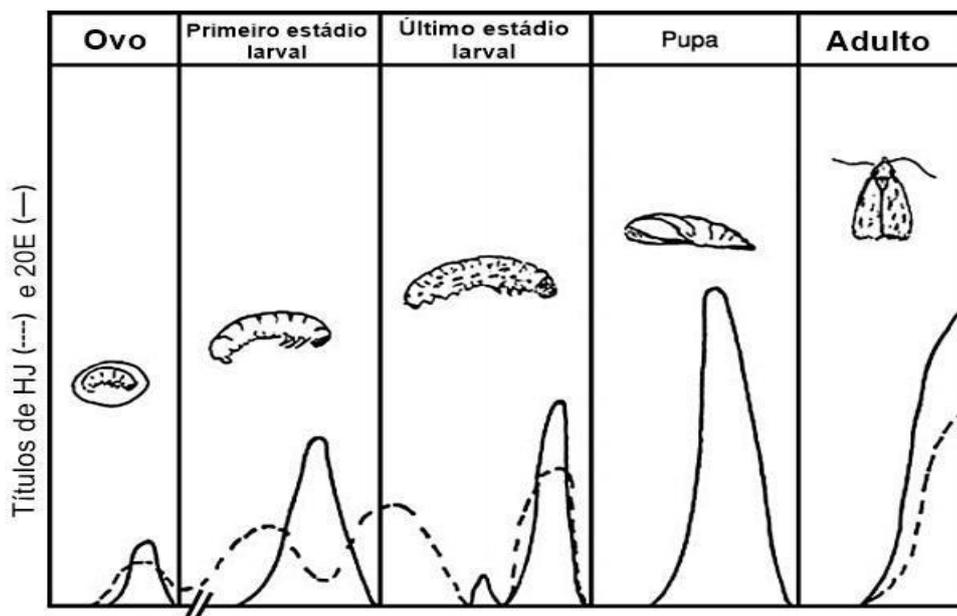


Fonte: Becker (2003).

A produção e a inibição do HJ pela corpora allata são regulados por dois neuro-hormônios que agem determinando os níveis do mesmo no sistema circulatório do inseto. Os hormônios neurosecretórios que estimulam a corpora allata a produzir o HJ são chamados de alatotropinas, e os que inibem sua produção, por sua vez, são as alatostatinas. Já na circulação de hemolinfa, o HJ é eliminado pela HJ esterase, a qual cliva o éster metílico, inativando o hormônio circulante (RANKIN, 1986).

O hormônio juvenil é conhecido por sua ação sobre diversos aspectos funcionais da metamorfose, na reprodução e no comportamento dos insetos. Sua principal função é realizar a manutenção do estado larval, ou, em outras palavras, proporcionar o chamado “efeito juvenil”, o qual proporciona ao inseto condições de se desenvolver de forma correta. Os títulos de HJ durante os estádios larvais iniciais na hemolinfa são altos. Durante os últimos estádios larvais, ocorre uma suspensão na produção do HJ, ao passo de um aumento na produção da ecdisona (Figura 3), o que resulta numa sinalização e direcionamento à pupação. Na fase adulta, o HJ volta a estar presente em titulações variadas (GILBERT, 2010; MENN, 2012; RIDDIFORD, 2003).

Figura 3 – Títulos do Hormônio Juvenil (HJ) e Ecdisona (20E) em estágios diferentes de um inseto homometabólico



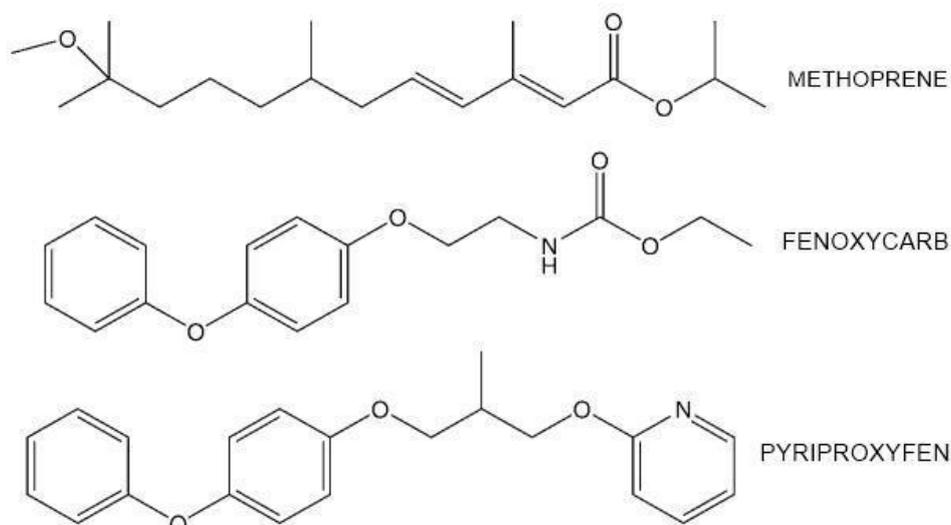
Fonte: Riddiford (2003)

Na fase adulta, o HJ é responsável pela diapausa, onde os ovários acabam não se desenvolvendo por conta da ausência do hormônio, em resposta a situações adversas do ambiente. Porém, este efeito pode ser reversível através de nova produção de HJ. O hormônio juvenil atua em outros papéis importantes, como na determinação de castas (em insetos sociais), produção de feromônios, migração, produção de proteínas anticongelantes, secreção de glândulas acessórias masculinas, comportamento sexual, etc. (BECKER, 2003; WYATT; DAVEY, 1996). É importante salientar que perturbações nos títulos hormonais em determinados períodos do ciclo de vida do inseto irá afetar negativamente sua metamorfose. Além disso, a indução de uma determinada titulação pode ter um “efeito dominó”, perturbando outras funções controladas por hormônios (BECKER, 2003).

O modo de ação do HJ no processo de muda ainda não foi completamente entendido a nível molecular. Algumas teorias citam sua ação de forma direta, onde ele induz a secreção de produtos relacionados ao desenvolvimento do inseto, outras citam sua ação de forma indireta, onde o HJ modula a ação da ecdisona no organismo (DUBROVSKY, 2005).

Desde a descoberta de sua existência e função, o hormônio juvenil dos insetos foi sendo cada vez mais estudado e caracterizado, até ter sua estrutura química sintetizada em laboratório, e seu uso incorporado como “pesticida de terceira geração”. Segundo Riddiford (1967), esta nova classe de inseticidas atuaria como agente de controle de pragas ecologicamente seguro, ao qual o inseto não seria capaz de desenvolver resistência, como ocorreu com os compostos de primeira e segunda geração.

Embora algumas dificuldades tenham sido enfrentadas, conseguiu-se, então, sintetizar moléculas até mesmo mais ativas que o próprio hormônio nativo, e que, desta forma, poderiam ser utilizadas no controle de pragas. Até o momento, existem diversos compostos análogos do hormônio juvenil disponíveis, com diversas estruturas químicas diferentes, tornando-os, conseqüentemente, diferentes entre si em seus modos de ação (RANKIN, 1986; RIDDIFORD, 1967). Alguns exemplos mais representativos destes compostos são apresentados na figura 4.

Figura 4 – Principais representantes de compostos químicos análogos de hormônio juvenil

Fonte: Becker (2003).

2.3.2.2.1 Methoprene

Registrado pela primeira vez pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) como um pesticida químico convencional em 1975 e passou a ser classificado como um pesticida bioquímico por seu modo de ação no controle dos insetos-alvo em 1982. Ao invés de atuar com toxicidade direta, o methoprene ($C_{19}H_{34}O_3$) atua interferindo no ciclo de vida do inseto, impedindo-o de atingir maturidade ou se reproduzir.

Dentre os IGRs análogos de hormônio juvenil mais utilizados para controle de insetos, o methoprene ganha destaque sendo aplicado em diversas áreas, desde indústrias alimentícias (utilizado como aditivo alimentar para animais) até saúde pública para controle de insetos vetores de doenças, sendo eficaz no controle seletivo de uma vasta gama de espécies de “pragas”, e seguro para os seres humanos (BECKER, 2003; HENRICK, 2007).

Em geral, o methoprene se mostra muito ativo no controle de dípteros, sendo utilizado, por exemplo, na indústria agropecuária contra espécies de moscas que se desenvolvem em estrume de bovinos. Nestes casos, o methoprene é incorporado nos suplementos alimentares ou minerais que são oferecidos aos bovinos, os quais o ingerem, processam e através das fezes controlam espécies como a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), impedindo sua reprodução. A pequena percentagem de methoprene que está contida nas fezes, mesmo após o

seu processamento, é suficiente para controlar de forma eficaz esta espécie (HARRIS, 1974).

O methoprene é muito eficaz também no controle de ovos e na prevenção do desenvolvimento de larvas de pulgas, assim como na emergência de adultos. Como exemplo, o CL50 (concentração letal para mortalidade de 50%) de methoprene para prevenir a emergência de pulgas da espécie *Xenopsylla cheopis* que parasitam ratos é de 0.00011ppm quando incorporado numa ninhada de larvas desta pulga, mostrando sua eficiência mesmo em doses baixíssimas (KAWADA, 1996).

2.3.2.2.2 Fenoxycarb

Os fenoxi-etil-carbamatos são compostos reguladores de crescimento de insetos pertencentes à classe dos carbamatos ($C_{17}H_{19}NO_4$). São compostos não-terpênicos e não tóxicos a mamíferos, mas com alta atividade como análogo de hormônio juvenil. Existem diversas formulações de fenoxycarb disponíveis no mercado para uso no controle de *Solenopsis invicta* (formiga-de-fogo) (Logic®), pulgas e baratas (Torus™) e larvas de mosquitos (Varikill™), dentre outros insetos considerados pragas urbanas ou rurais (HAENNI, 1988).

Os efeitos do fenoxycarb como análogo do hormônio juvenil são, principalmente, implicados na morfogênese, bloqueando a metamorfose até o final do último estágio larval. Além destes efeitos nas larvas e pupas, podem ocorrer também complicações na embriogênese, reprodução, produção de feromônios, diapausa, dentre outros. Os efeitos do fenoxycarb, embora sejam principalmente por contato, também são notados através de processos digestivos. Trabalhos demonstram que os mesmos resultados inibitórios foram observados numa dieta com doses diferentes do composto em insetos do gênero *Oncopeltus*, o qual apresentou dificuldades em realizar a muda e suas larvas apresentaram deformações ao chegarem ao quarto estágio (GRENIER et al., 1993).

A alta eficiência e a persistência do fenoxycarb estão diretamente ligadas à sua composição química, que o faz ser uma molécula estável com ação em baixas doses, chegando a ser até 100 vezes mais eficiente que o methoprene, embora o seu modo de ação ainda não seja totalmente conhecido (BECKER, 2003).

2.3.2.2.3 Pyriproxyfen

Em busca de novos compostos juvenóides desde 1975, pesquisadores e químicos japoneses vêm, desde então, obtendo sucesso na utilização de compostos isoprenóides na formulação de substâncias mais eficazes e seguras. Um dos juvenóides japoneses mais bem-sucedido para uso prático, desenvolvido pela Sumitomo Corporation, foi um composto de fórmula [[2-[1-methyl-2(4-phenoxyphenoxy) ethoxy] pyridine]] chamado Pyriproxyfen (C₂₀H₁₉NO₃), o qual cumpriu todos os critérios e exigências para ser um análogo de hormônio juvenil altamente eficaz. Semelhantemente ao fenoxycarb, o pyriproxyfen possui uma taxa de atividade elevada para diversas espécies de insetos, podendo ser maior ou menor que o seu antecessor, dependendo da espécie alvo. Foi comercializado, desde então, sob os nomes Knack®, Admiral® ou Sumilarv® (MIYAMOTO, 1993; TUNAZ, 2004).

O pyriproxyfen é um regulador de crescimento de insetos considerado como um dos mais potentes análogos do hormônio juvenil disponíveis no mercado. São utilizados como pesticidas contra pragas da saúde pública como moscas domésticas, mosquitos, baratas, pulgas, etc. assim também como na agricultura e na horticultura (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2001). Através do desequilíbrio hormonal, o pyriproxyfen atua suprimindo a embriogênese dos insetos, interferindo diretamente na metamorfose e na emergência dos adultos. Seus efeitos também podem incluir ação sobre os ovos e esterilidade em alguns insetos (MENN, 2012; RIDDIFORD, 2008)

Sua formulação comercial pode ser encontrada na forma líquida ou sólida (granulada), e é utilizado principalmente no tratamento de criadouros de insetos de importância epidemiológica como mosquitos, que possuem parte do seu desenvolvimento em ambientes aquáticos. Estudos mais atuais apontam a utilização dos próprios mosquitos, especificamente os da espécie *Ae. aegypti*, como agentes disseminadores do inseticida em sua forma granular, através do hábito de oviposição dispersiva desta espécie. Outros estudos mostram o uso do pyriproxyfen como instrumento no manejo da resistência a outros inseticidas químicos, como os piretróides, utilizando de redes impregnadas com ambos os compostos, levando a

uma redução da propagação de mosquitos resistentes (ABAD-FRANCH, 2015; TIONO, 2015).

Os efeitos deste análogo do hormônio juvenil já foram avaliados em uma infinidade de espécies de insetos, de diversas formas, surtindo diversos efeitos. Estudos em colônias de formigas *Monomorium pharaonis* em laboratório utilizando iscas de pyriproxyfen juntamente com óleo de manteiga de amendoim provocou uma redução drástica na produção de ovos pela rainha, reduzindo drasticamente os indivíduos da colônia (VAIL; WILLIAMS, 1995).

Estudos também foram realizados com pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, onde indivíduos adultos foram submetidos a uma dieta de sangue contendo pyriproxyfen em concentrações variadas. Como resultado, foi verificado que os ovos produzidos pelas pulgas alimentadas não resultaram em larvas, indicando, com isto, uma atividade de esterilização nestes ovos (MEOLA, 2000). Outros estudos com pulgas submetidas ao contato com o pyriproxyfen demonstraram que ovos postos pelos indivíduos tratados continham quantidades anormais de gema, levando ao insucesso no desenvolvimento e eclosão dos mesmos (PALMA, 1993).

Em outro estudo liderado pelo pesquisador japonês Hatakoshi (1992), foi aplicado o mesmo IGR em pupas recém-formadas da espécie de mariposa *Spodoptera litura*, provocando inibição na oviposição no ciclo seguinte. Os autores comentam que este efeito esteja relacionado à suspensão da produção de uma substância responsável pelo estímulo de oviposição, substância esta, presente apenas na hemolinfa das fêmeas não tratadas. Através deste estudo, foi demonstrado que doses subletais desde HJ podem atuar prejudicando diversos processos no desenvolvimento do inseto alvo (HATAKOSHI, 1992).

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o cenário epidemiológico brasileiro de 2018, caracterizado pela circulação simultânea de Chikungunya e Zika vírus em áreas já endêmicas para a dengue, a efetividade do controle do mosquito *Ae. aegypti*, vetor primário de todos estes arbovírus se apresenta como um grande desafio para o sistema de saúde brasileiro.

O PNCD tem alcançado resultados pouco expressivos no controle de *Ae. aegypti*, seja por dificuldades ligadas à baixa cobertura de tratamento e eliminação de criadouros do mosquito, a operacionalização das ações em campo ou por problemas associados à disseminação da resistência aos inseticidas químicos orgafoforados e piretróides, detectada nas populações do mosquito nos últimos 10 anos.

Em 2014, o Ministério da Saúde/SVS/PNCD, em sua estratégia de manejo da resistência e controle vetorial, passou a utilizar pyriproxyfen para controle de formas imaturas do mosquito. Trata-se de um composto análogo do hormônio juvenil dos insetos, que apresenta baixos níveis de toxicidade para seres humanos e para a fauna não-alvo de vertebrados e invertebrados aquáticos.

Formulações em grânulos de areia, como o Sumilarv® 0,5G, são utilizadas em baixíssimas concentrações e apresentam longa persistência de controle em grandes reservatórios de água potável. Estudos recentes sugerem que o pyriproxyfen pode ser disseminado para outros criadouros mecanicamente pelas fêmeas do mosquito, no momento de oviposição, através das partículas aderidas ao seu corpo. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos secundários associados a doses subletais do pyriproxyfen, bem como da sua ingestão, sobre a sobrevivência, potencial reprodutivo e embriogênese de *Ae. aegypti*, objetivos do presente estudo. As informações obtidas poderão ser utilizadas pelas Secretarias de Saúde e o PNCD para o uso do produto em estratégias inovadoras e mais efetivas de controle vetorial.

4 PERGUNTA CONDUTORA

O inseticida Pyriproxyfen pode comprometer o potencial reprodutivo de *Aedes aegypti* e atuar para seu controle em iscas tóxicas de carboidratos?

5 HIPÓTESE

Efeitos diretos e indiretos do inseticida pyriproxyfen podem reduzir a capacidade reprodutiva de *Aedes aegypti*, sobretudo quando utilizado em iscas tóxicas de carboidrato.

6 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do inseticida pyriproxyfen sobre o potencial reprodutivo de *Aedes aegypti*, com ênfase aplicada ao desenvolvimento de iscas tóxicas para controle.

6.1 Objetivos específicos

- a) Investigar o potencial ovicida do pyriproxyfen para *Ae. aegypti*;
- b) Avaliar a longevidade e o potencial reprodutivo de machos e fêmeas de *Ae. aegypti* sobreviventes à exposição à subdoses de pyriproxyfen;
- c) Investigar o efeito da ingestão do pyriproxyfen sobre a viabilidade reprodutiva de fêmeas e machos de *Ae. aegypti*;
- d) Avaliar, em condições simuladas de campo, o efeito combinado das iscas tóxicas de pyriproxyfen com as unidades disseminadoras desse inseticida, para o controle de *Ae aegypti*.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Colônia de *Aedes aegypti*

A espécie-alvo deste estudo foi o mosquito *Ae. aegypti* proveniente da colônia Recife-Laboratório (ReCL), mantida desde 1996 no Departamento de Entomologia/Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz (ARAÚJO et al., 2007). As formas jovens e adultas desta espécie foram mantidas no insetário, em salas com condições controladas de temperatura ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa (50 a 60%) e fotoperíodo (14:10 claro:escuro). As formas adultas foram mantidas em gaiolas de contenção, alimentadas diariamente com uma solução de sacarose a 10%, e para as fêmeas também foram oferecidas alimentações artificiais com sangue desfibrinado de coelho (*Oryctolagus cuniculus* raça Nova Zelândia) semanalmente, para a obtenção de ovos. As formas jovens (larvas e pupas) foram acondicionadas em cubas contendo água potável, alimentadas com ração para gatos Friskas®.

7.2 Inseticida análogo do hormônio juvenil

O pyriproxyfen (Pyr) foi avaliado neste estudo em duas composições. A primeira delas, o princípio ativo puro (P.A.) (Piriproxifeno Pestanal®; 99,3%, Lote: SZBE185XV); a segunda, o produto comercial Sumilarv® 0,5G (Sumitomo Chemical do Brasil. Lote: 5701F4), cuja formulação em grânulos de areia contém 0,5% de princípio ativo.

7.3 Avaliação de efeito ovicida

O efeito do pyriproxyfen (Pyr) sobre a embriogênese de *Ae. aegypti* foi avaliado utilizando o P.A. e o Sumilarv® 0,5G.

Numa primeira abordagem, quantidades já conhecidas de ovos com 24 e 48 horas da postura foram diretamente expostos à água tratada com Sumilarv® 0,5G, na dosagem de 2mg/L (0,01mg/L de Pyr), recomendada pelo PNCD para tratamento focal nos reservatórios de água potável. Um grupo controle de ovos com 24h foi exposto apenas à água.

No teste seguinte, substratos para oviposição de *Ae. aegypti* representados por papel Kraft absorvente (4 x 7cm) (papelotes), foram submetidos a um tratamento com soluções de 500 mg/L do Sumilarv® 0,5G (2,5 mg/L de Pyr) e 50mg/L do P.A., equivalentes, respectivamente, a 250 e 5.000 vezes a concentração de Pyr recomendada para campo. Posteriormente, os papelotes foram submersos por uma hora na água tratada, para garantir a absorção e impregnação do produto, permanecendo em contato parcial com a mesma água tratada durante cinco dias consecutivos.

Três grupos compostos por 10 casais de *Ae. aegypti* foram formados. As fêmeas com cinco dias de vida foram alimentadas com sangue, após o acasalamento, e submetidas ao contato com os papelotes tratados com o Pyr. Três dias após a oviposição, os ovos foram contados e os papelotes foram novamente imersos em água, por até cinco dias, para promover a eclosão das larvas. A mensuração do efeito ovicida se deu pela contagem das larvas que eclodiram do total de ovos em cada grupo.

7.4 Efeitos de concentrações subletais de pyriproxyfen sobre a longevidade e reprodução de *Aedes aegypti*

Ensaio foram realizados no insetário do departamento do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), utilizando mosquitos da linhagem RecL, para avaliar os efeitos causados por concentrações subletais/residuais do análogo do hormônio juvenil na formulação comercial Sumilarv® 0,5G. Os testes foram conduzidos com a finalidade de determinar a longevidade dos insetos sobreviventes, assim como as taxas de fecundidade e fertilidade dos mesmos.

Os sobreviventes às exposições foram submetidos a cruzamentos entre si para avaliação do potencial reprodutivo destes indivíduos. Os dados obtidos foram comparados ao grupo controle, formados apenas por indivíduos não tratados, cruzados entre si na mesma proporção. A exposição das larvas foi realizada em cubas de 4 litros tratadas com duas concentrações distintas do Sumilarv® 0,5G: 0,12 e 0,04 mg/L (equivalentes a 5% e 2% da dose preconizada para uso em campo pelo PNCD, respectivamente), onde 400 larvas jovens de quarto estágio (L4) foram inseridas, sendo diariamente alimentadas com 3mg de ração para gato Whiskas®. O

desenvolvimento das larvas foi acompanhado até a mortalidade ou emergência dos mosquitos. Após o período de desenvolvimento, os adultos foram transferidos para gaiolas, separados por sexo e alimentados com solução de sacarose a 10%. Dois grupos foram formados para os cruzamentos neste ensaio: 1) Machos expostos x fêmeas expostas (grupo tratado); 2) Machos não expostos x fêmeas não expostas (grupo controle). O teste de Tukey foi utilizado para comparação do número de médio de ovos e de larvas entre os grupos, com nível de significância $p \leq 0,05$. A longevidade dos mosquitos foi registrada diariamente até a morte do último indivíduo e, posteriormente, os valores foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), quando as médias foram comparadas entre os grupos tratados por sexo.

7.5 Efeito da ingestão do Pyriproxyfen sobre a reprodução de *Aedes aegypti*

Testes foram conduzidos com mosquitos adultos de *Ae. aegypti* para avaliar o efeito da ingestão do Pyr associado à alimentação sanguínea ou à diferentes fontes de carboidrato, sobre a fecundidade e fertilidade destes insetos.

No primeiro ensaio, fêmeas do mosquito com até cinco dias de vida foram submetidas à alimentação artificial com sangue (desfibrinado de coelho) tratado com o P.A. do Pyr na concentração de 50 mg/L. No total, 40 fêmeas por grupo, inseminadas, foram submetidas à alimentação durante 1 hora. Após esse intervalo, as fêmeas ingurgitadas foram transferidas para uma gaiola de contenção onde foram disponibilizados os papelotes para oviposição. Os ovos postos foram contados e colocados em água para eclosão das larvas.

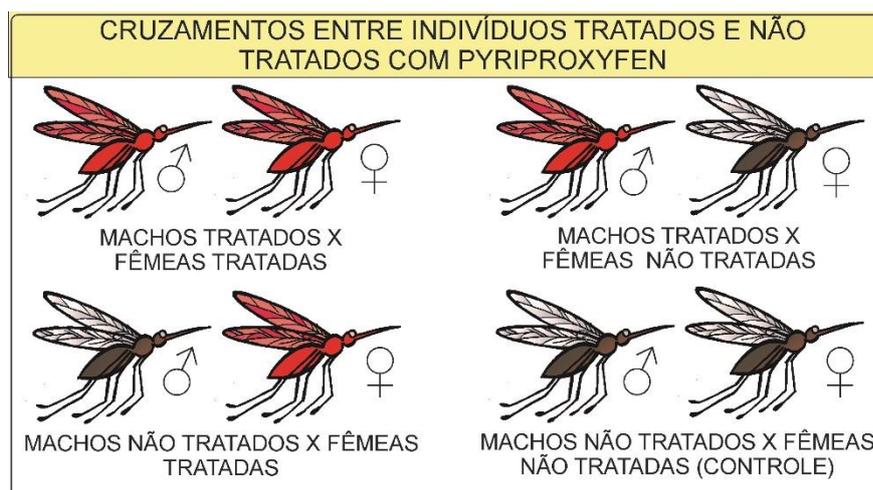
Cinco dias após a primeira postura, os grupos foram realimentados com sangue limpo, sem o Pyr, para verificar se o efeito associado ao produto persistia nas fêmeas expostas e conseqüentemente nos ovos postos por elas (segunda oviposição). A análise dos resultados deste teste considerou os seguintes fatores: número de ovos postos por cada grupo e percentual de eclosão das larvas tanto na primeira, quanto na segunda oviposição.

Uma segunda modalidade de teste envolvendo alimentação com Pyr foi conduzida com machos e fêmeas, utilizando uma solução de sacarose a 20% tratada com 50mg/L de P.A. do Pyr. Esta solução foi disponibilizada para

alimentação dos insetos desde o instante da sua emergência. O grupo controle foi alimentado apenas com a sacarose a 20%.

No quinto dia de vida, os mosquitos de todos os grupos foram submetidos a cruzamentos entre si, onde indivíduos tratados e não tratados participaram da seguinte forma: 1) fêmeas tratadas (FT) x machos tratados (MT); 2) fêmeas não tratadas (FN) x machos tratados (MT); 3) fêmeas tratadas (FT) x machos não tratados (MN) e 4) fêmeas não tratadas (FN) x machos não tratados (MN) (controle) (Fig. 8). Após 48h, as fêmeas de todos os grupos foram alimentadas com sangue e substratos para oviposição foram disponibilizados nas gaiolas por cinco dias consecutivos. Os ovos resultantes deste teste foram contabilizados e a análise seguiu o mesmo procedimento da alimentação sanguínea.

Figura 5 – Cruzamentos realizados nos testes de exposição ao pyriproxyfen.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Indivíduos vermelhos: Tratados/Expostos; indivíduos marrons: Não tratados/não expostos.

Nota: Este esquema de cruzamento foi utilizado em outros testes, onde mosquitos tratados/expostos foram postos para acasalar com mosquitos não tratados/não expostos.

A outra fonte de carboidrato testada foi o mel/Manuka (Kiwi Manuka™®), também considerada atrativa para os mosquitos. Duas soluções de mel a 50% foram utilizadas como iscas atrativas, a primeira tratada com 50mg/L do P.A. do Pyr e a segunda com 10g/L do Sumilarv® 0,5G, correspondendo a 50mg/L do P.A. O grupo controle foi alimentado apenas com a solução de mel a 50%.

As iscas foram preparadas e oferecidas a grupos de 10 mosquitos (machos e fêmeas) desde o momento de sua emergência. Nestes testes, tanto com sacarose,

quanto com mel, também foram registrados dois eventos de postura, sendo apenas o primeiro precedido pela alimentação tratada com Pyr.

Para a análise estatística de todos os testes foram utilizadas análises de variância (ANOVA) juntamente com teste *a posteriori* de Tukey, onde o valor de $p < 0,05$ indicou a significância dos resultados obtidos.

7.6 Avaliação do potencial de dispersão do pyriproxyfen por fêmeas do mosquito

O produto comercial utilizado nessa avaliação foi o Sumilarv® 0,5G. O produto foi submetido a um processo adicional de maceração para a redução da sua granulometria, visando favorecer sua adesão às patas e outras partes do corpo dos mosquitos.

A dispersão do produto foi avaliada em condições de laboratório, através de armadilhas de oviposição (ovitrampas) adaptadas do modelo descrito por Abad-Franch et al. (2015), denominada unidade disseminadora (UD). A UD foi composta por um recipiente plástico preto, revestido internamente por um tecido 100% poliéster, de cor escura, impregnado com 20 g/m² do inseticida em forma de pó úmido e preenchido com 200 ml de água. Para a detecção da dispersão do inseticida foram utilizadas ovitrampas sentinelas (OVT-S), compostas por um recipiente plástico de cor preta, preenchido com 200 ml de água. No geral, foram utilizadas quatro gaiolas com as seguintes dimensões: Gaiola A1 (Figura 6A), medindo 1,6 x 1,6 x 2,0 m ($\cong 5$ m²); gaiolas B1 e B2 (Figura 6B), ambas medindo 0,5 x 1,1 x 0,5 m ($\cong 0,3$ m²); e gaiola B3 (Figura 6B), medindo 1 x 0,8 x 0,8 m ($\cong 0,6$ m²).

Figura 6 – Gaiolas utilizadas nos testes de dispersão de pyriproxyfen por fêmeas de *Aedes aegypti*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: A: Gaiola A1, localizada na área externa do IAM; B: Gaiolas B1 (acima), B2 (posicionada por trás da B1) e B3 (abaixo), localizadas nas dependências do Departamento de Entomologia /IAM.

Os testes de dispersão foram realizados em gaiolas considerando as seguintes quantidades de fêmeas com relação ao espaço, número de UD e OVT-S: na gaiola A1, foram utilizadas 30 fêmeas/m², com o posicionamento de uma UD e três OVT-S, distantes no mínimo 1,6 m e no máximo de 2,5 m entre si; nas gaiolas B1, B2 e B3, foram posicionadas uma UD e uma OVT-S distantes 0,8 m entre si, nas extremidades opostas de cada gaiola. Cinco fêmeas/0,3 m² foram liberadas na gaiola B1, 10 fêmeas/0,3 m² na B2 e 15 fêmeas/0,6 m², na B3. Todas as fêmeas estavam acasaladas, alimentadas com sangue e permaneceram nas gaiolas por cinco dias. Após este período, todas as OVT-S foram recolhidas e o seu conteúdo foi transferido para recipientes plásticos, colonizados com 15 larvas L3, cujo desenvolvimento foi acompanhado até a emergência dos adultos ou morte das pupas (inibição da emergência).

Outro teste de dispersão foi realizado na gaiola B3, onde foram utilizados duas formas distintas de disponibilização do criadouro artificial, com o objetivo de verificar a capacidade de disseminação do produto e de preferência do local do criadouro. O criadouro foi representado por um copo plástico de cor preta, preenchido com 200 ml de água, contendo um papelote (3 x 8 cm). Na primeira

forma, o criadouro foi inserido em uma caixa de papelão medindo 15 x 15 x 7 cm, com abertura superior de 3 x 4 cm, simulando um criadouro críptico ou de difícil acesso, e na segunda forma, o criadouro foi deixado livre na gaiola. Uma UD foi posicionada no centro da gaiola B3 e os dois criadouros, nas extremidades opostas. Um grupo de 15 fêmeas acasaladas e alimentadas com sangue foi liberado na gaiola, onde permaneceram por cinco dias, cujo procedimento de colonização e acompanhamento dos sobreviventes foi semelhante ao referido no item 7.5. Os ovos postos nos papelotes também foram contados e submetidos a eclosão das larvas em cubas contendo água limpa e fervida.

Um último teste de dispersão foi realizado nas gaiolas B1 e B2 para avaliar o efeito conjunto da isca de mel tratada com Pyr e da técnica de dispersão do produto. Para tanto, uma OVT-S contendo o papelote e uma UD foram posicionadas nas extremidades opostas da gaiola, e no centro foi colocado um recipiente contendo um algodão embebido com a solução de mel tratado com o P.A. do Pyr. Foram liberadas na gaiola 15 fêmeas acasaladas e recém-alimentadas com sangue, onde permaneceram por sete dias. No final deste período, o conteúdo das sentinelas foi recolhido, colonizado com 15 larvas L3 e acompanhado, assim como os ovos postos nos papelotes foram contados e postos para eclosão das larvas, como apresentado no teste anterior. Um grupo controle também foi testado, onde a variável foi a isca de mel, que não possuía nenhum tipo de tratamento.

Neste teste, além da avaliação da dispersão, dada pelo percentual de mortalidade das pupas e/ou emergência de adultos nas OVT-S, o potencial reprodutivo das fêmeas liberadas nas gaiolas também foi verificado através da taxa de oviposição e o percentual de eclosão das larvas provenientes dos ovos postos nos papelotes disponibilizados durante o teste, comparados ao controle.

8 RESULTADOS

8.1 Efeito ovicida

No primeiro teste, quando os ovos com 24 e 48 horas da postura foram expostos diretamente à água tratada com Sumilarv® 0,5 G (2 mg/L), foi observado cerca de 90% de eclosão das larvas nos dois grupos, tratado e controle, até o final do quinto dia de exposição ao produto (Tabela 1). A análise de variância (ANOVA) indicou não haver diferenças entre os grupos tratados e controle ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Viabilidade de ovos de *Aedes aegypti* com diferentes tempos de embriogênese, expostos à água tratada com 2 mg/L do Sumilarv® 0,5G (dosagem de rotulo), correspondendo a 0,01 mg/L do pyriproxyfen. Ovos e larvas apresentados como média \pm desvio padrão.

Grupos	Embriogênese (horas)	Total ovos	Nº médio de ovos (\pm DP)	Nº médio de larvas (\pm DP)	Eclosão (%)
Sumilarv® 0,5G	24	675	225 \pm 125	213 \pm 129	94,6
	48	765	255 \pm 88	230 \pm 88	90,3
Controle	24	664	221 \pm 96	206 \pm 93	93,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferiram entre si estaticamente pela análise de variância ($p > 0,05$).

Os testes realizados com os papelotes tratados com o Sumilarv® 0,5G e o P.A. do Pyr, em superdosagens, 250 e 5000 vezes a quantidade de Pyr da dosagem de rotulo, respectivamente, revelaram uma taxa de eclosão das larvas um pouco menor do que o grupo controle, cuja analise da variância não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Viabilidade de ovos de *Aedes aegypti* recém postos, expostos à água tratada com superdosagens do Pyriproxyfen P.A. e do Sumilarv® 0,5G, inferida pela eclosão das larvas. Ovos e larvas apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

Grupos/concentração de Pyr	Total ovos expostos	Nº médio de ovos (\pm DP)	Nº médio de larvas (\pm DP)	Eclosão (%)
Pyriproxyfen P.A./50 mg/L	2152	717 \pm 87	555 \pm 201 ^A	77,4
Sumilarv® 0,5G/2,5 mg/L	2560	853 \pm 138	672 \pm 180 ^A	78,8
Controle	2510	836 \pm 199	811 \pm 185 ^A	97,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

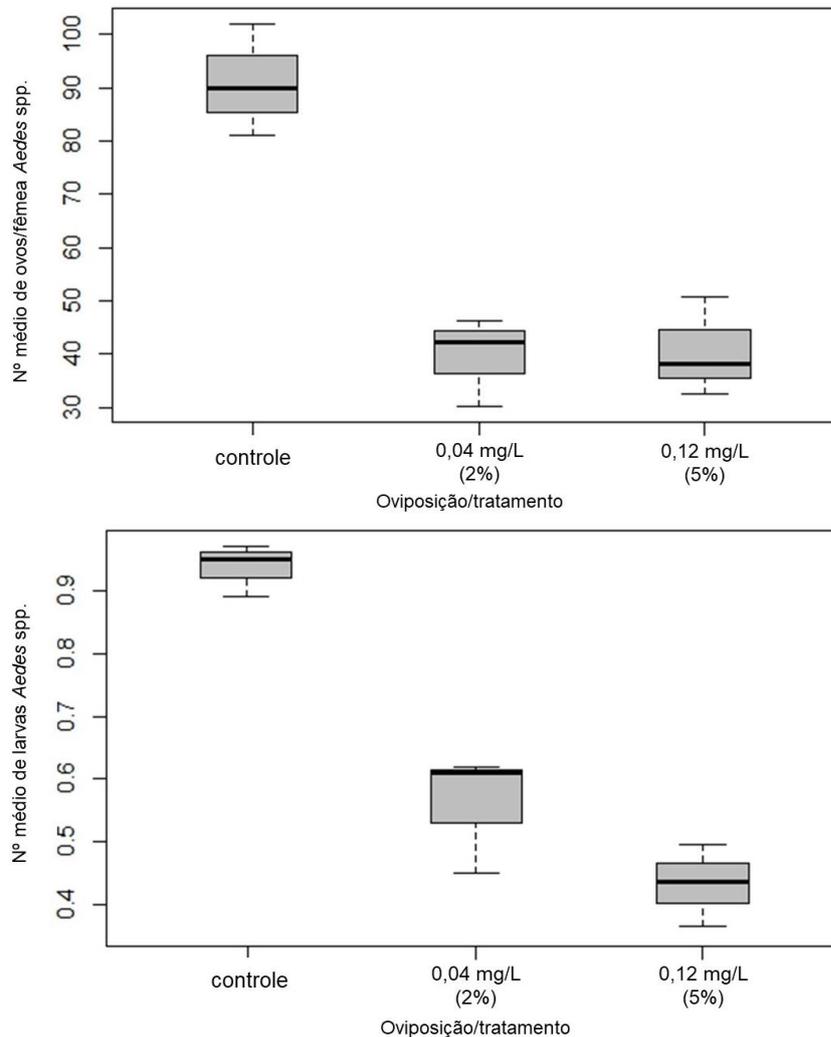
Legenda: valores seguidos da mesma letra nas colunas não diferiram entre si estatisticamente na análise de variância ($p > 0,05$).

8.2 Efeitos de concentrações subletais sobre a longevidade e reprodução de *Aedes aegypti*

Os ensaios conduzidos em cubas com capacidade para 4L de água tratada com doses do Sumilarv® 0,5G inferiores às recomendadas pelo Ministério da Saúde, revelaram uma alta mortalidade nas duas concentrações testadas, 0,04 mg/L e 0,1 mg/L, quando o produto matou em média 78,7% e 87,3%, respectivamente. A triagem dos sobreviventes não revelou alterações na proporção de machos e fêmeas associadas à exposição ao produto. Os resultados obtidos, no entanto, foram influenciados pela quantidade reduzida de sobreviventes, os quais permitiram apenas os cruzamentos entre os indivíduos sobreviventes ao tratamento comparado ao grupo controle (fêmeas e machos não expostos).

Nas duas subdoses avaliadas foram detectadas reduções significativas do número médio de ovos ($p=0,0008$) e da sua viabilidade ($p=0,0003$) em relação ao grupo controle (Gráfico 1), cujos percentuais variaram de 43% a 53% e de 92% a 93%, respectivamente.

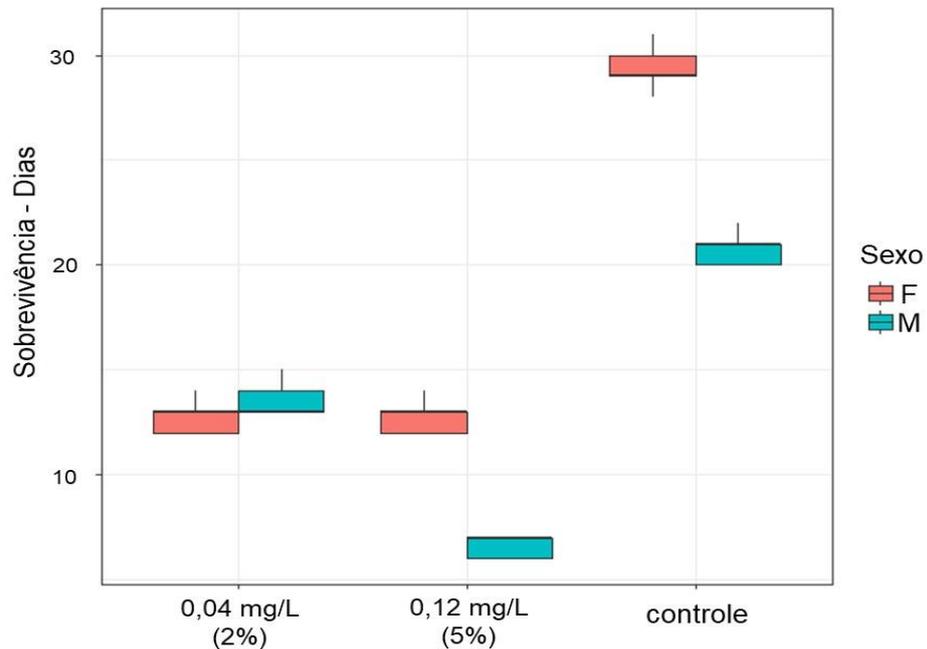
Gráfico 1 – Oviposição resultante do cruzamento entre indivíduos sobreviventes à exposição de duas concentrações (0,04 e 0,12mg/L) do Sumilarv® 0,5G e controle.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando a longevidade de machos e fêmeas em ambos os tratamentos foi avaliada em comparação com o grupo controle, foi observada uma redução significativa ($<0,005$) no tempo total de vida dos indivíduos sobreviventes às subdoses do Sumilarv® 0,5G. Na maior dosagem (0,12 mg/L), os machos sobreviveram em média 6,5 dias e as fêmeas 12,6, respectivamente. Para o grupo com a menor concentração (0,04 mg/L), a média foi de 12,8 para os machos e 13,4 para fêmeas. Os indivíduos do grupo controle sobreviveram bem mais, 20,8 dias os machos e 29,3 fêmeas (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Longevidade média de machos e fêmeas de *Aedes aegypti* sobreviventes a subdosagens (0,04 e 0,12 mg/L) do Sumilarv® 0,5G.



Fonte: elaborado pelo autor.

8.3 Efeito da ingestão do Pyriproxyfen sobre a reprodução de *Aedes aegypti*

Neste teste, onde o princípio ativo do Pyr foi diluído em sangue desfibrinado de coelho e oferecido às fêmeas de *Ae. aegypti* já acasaladas, foi observada uma diminuição significativa do número médio de ovos ($F=44,27$; $p<0,001$) entre os grupos tratado e controle. No entanto, os valores de redução observados na 1ª e na 2ª oviposição do grupo tratado não variaram ($F=1,63$; $p>0,05$), indicando a permanência do efeito do pyr sobre a fecundidade das fêmeas expostas.

Quanto a eclosão das larvas, o comportamento de redução diferiu estatisticamente intra e intergrupos ($F=243,99$; $p<0,001$) (Gráfico 3), embora, na 1ª oviposição 99,2% dos 2001 ovos estivessem inviáveis e na 2ª, apenas 55,7% dos 2.330 ovos ($F=9,67$; $p<0,001$). Neste último caso a diferença apontou para o aumento da viabilidade dos ovos, haja vista que o percentual antes inferior a 1% passou para 44,3%. A tabela 3 traz os resultados do efeito da ingestão do Pyr na redução da fecundidade e fertilidade das fêmeas.

As fêmeas submetidas a uma segunda alimentação com sangue sem tratamento com o Pyr permaneceram ovipositando menos do que as do grupo controle, porém este efeito quimioesterilizante do Pyr reduziu drasticamente quando

comparado a primeira oviposição das fêmeas tratadas. Estes resultados revelam que a concentração testada (50 mg/L) promoveu um efeito semi-esterilizante temporário nos indivíduos expostos, que não se manteve igual e em níveis elevados após dois ciclos de oviposição.

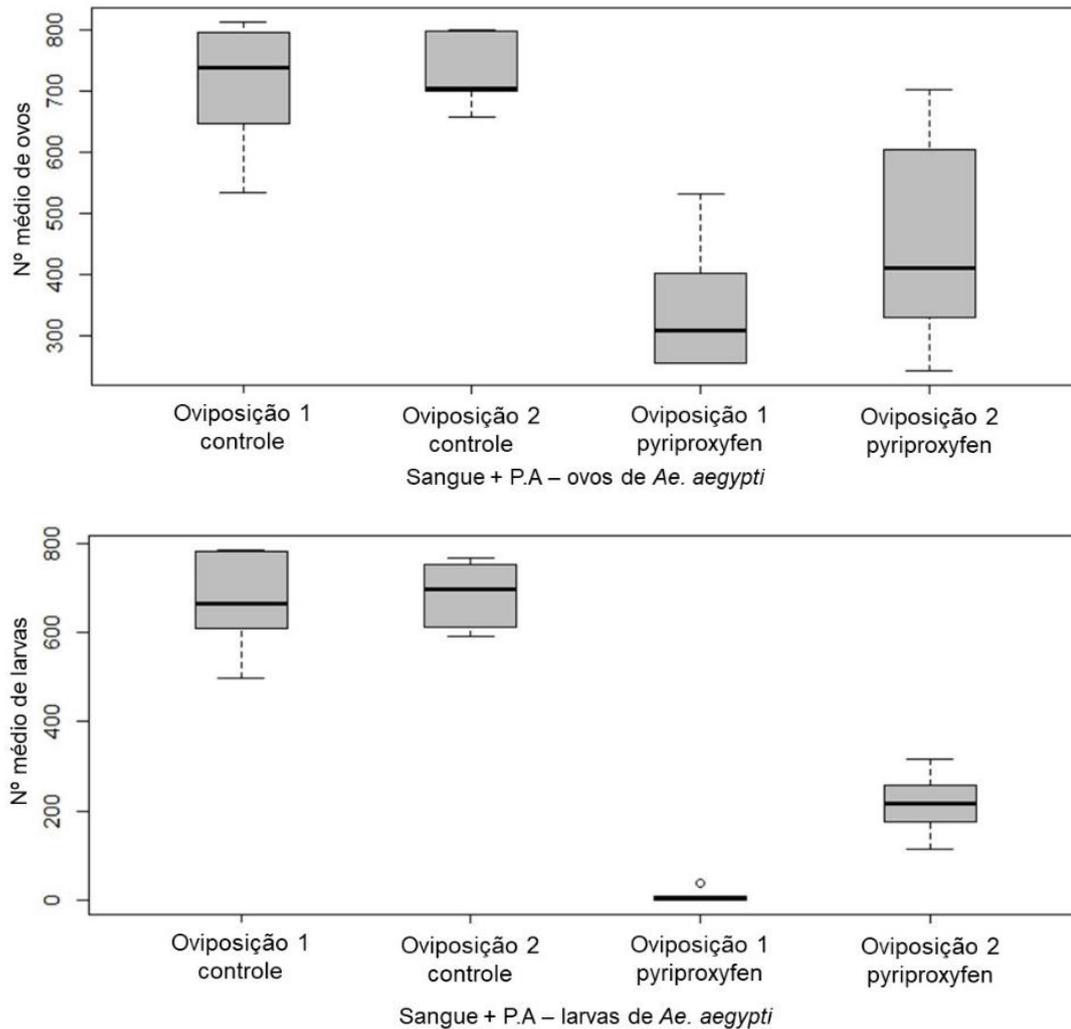
Tabela 3 – Efeito da alimentação de sangue tratado com o pyriproxyfen (50 mg/L) sobre a fecundidade e fertilidade de fêmeas de *Aedes aegypti*, em dois ciclos sequenciais de oviposição. Número de ovos e larvas apresentados como média \pm desvio padrão.

Grupo	N de fêmeas	Total ovos	Nº médio de ovos (\pm DP)	Nº médio de Larvas (\pm DP)	Eclosão (%)
1ª Oviposição – alimentação de sangue com Pyriproxyfen					
Tratado	30	2001	309 \pm 116 ^A	8 \pm 14 ^A	0,8
Controle	30	3452	710 \pm 110 ^B	667 \pm 110 ^B	93,3
2ª Oviposição – alimentação de sangue sem tratamento					
Tratado*	30	2330	450 \pm 174 ^A	215 \pm 69 ^C	44,3
Controle	30	3712	738 \pm 58 ^B	685 \pm 71 ^B	92,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: *: Dados referentes ao grupo que recebeu repasto sanguíneo tratado apenas na primeira oviposição; médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferiram entre si estaticamente na análise de variância ($p > 0,05$); médias com letras diferentes = $p < 0,05$.

Gráfico 3 – Efeitos da ingestão do repasto de sangue tratado com 50 mg/L de pyriproxyfen sobre a fecundidade e fertilidade de fêmeas de *Aedes aegypti*, em dois ciclos sucessivos de oviposição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os testes utilizando as iscas de carboidrato tratadas com pyriproxyfen mostraram respostas variadas na redução da fecundidade e fertilidade, em função da fonte utilizada (sacarose ou mel) e dos diferentes cruzamentos entre os indivíduos expostos e não expostos. A redução mais expressiva no número de ovos e em sua viabilidade ocorreu no grupo em que ambos os sexos foram tratados (Tabelas 4 e 5).

Ao realizar cruzamentos com apenas um dos sexos tratados com o Pyr não foram observadas diferenças significativas sobre a fecundidade das fêmeas alimentadas com sacarose ($F=3,65$; $p=0,07$), sendo apenas a fertilidade afetada ($F=4,81$; $p=0,04$) (Tabelas 4 e 5). A comparação entre os grupos alimentados com sacarose e mel revelou que esse último foi mais efetivo em diminuir tanto a

quantidade de ovos postos ($F=36,32$; $p<0,001$) quanto sua viabilidade, haja vista que em mais de 79% deles as larvas não eclodiram. Quando ambos, machos e fêmeas, foram expostos, esse valor foi ainda maior, aproximadamente 97% ($F=113,24$; $p<0,001$). Na segunda oviposição, quando o tratamento com Pyr foi suspenso, as taxas de viabilidade aumentaram em todos os grupos, embora permanecessem significativamente menores ($F=6,03$; $p<0,001$) do que o grupo controle (tabelas 4 e 5).

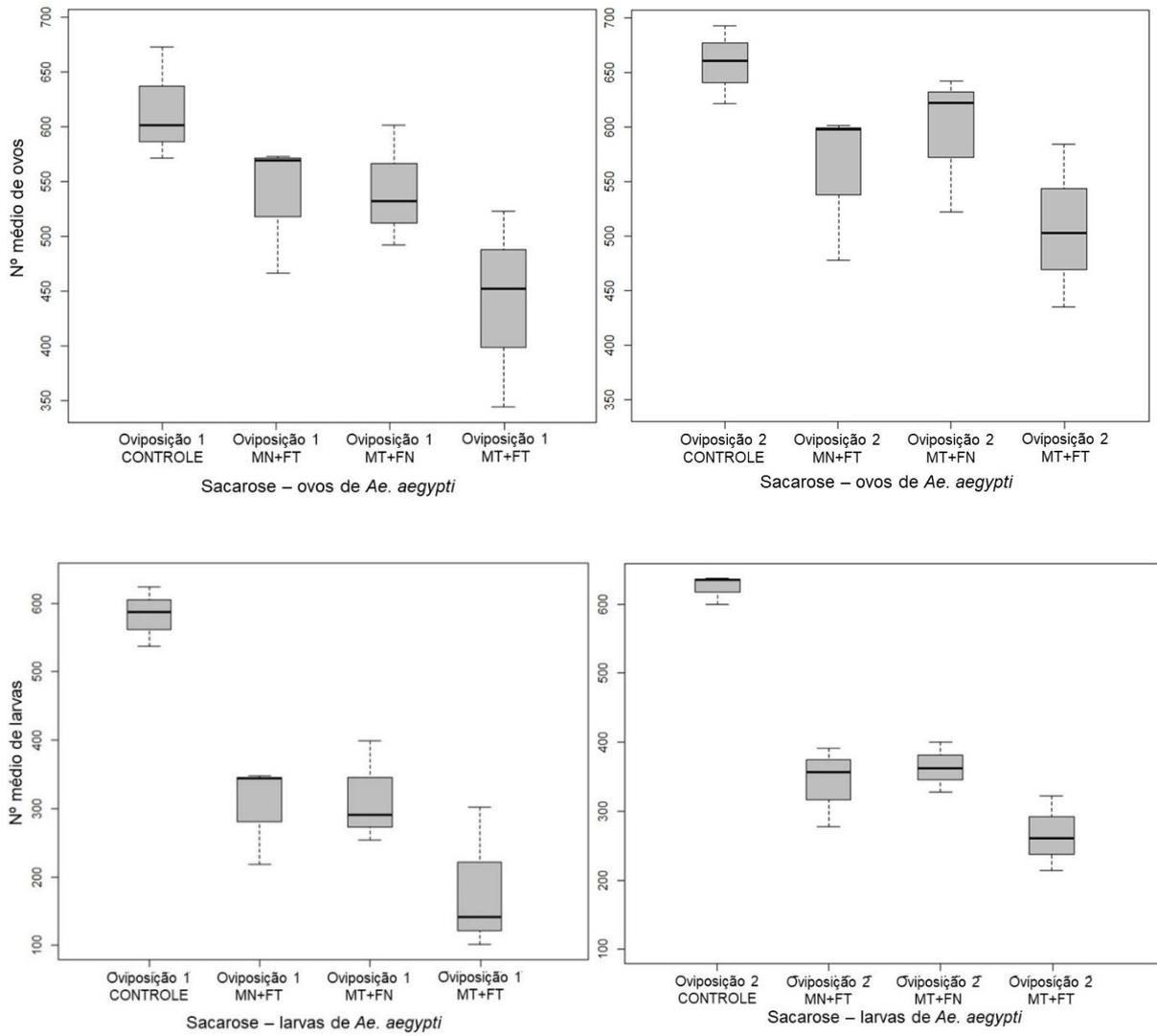
Tabela 4 – Comparação dos efeitos da ingestão de iscas de sacarose e mel tratados com P.A. do pyriproxyfen na reprodução de *Aedes aegypti* em dois ciclos de oviposição. Ovos e larvas apresentados como média \pm desvio padrão.

Grupos	N casais	Nº médio de ovos (\pm DP)		Nº médio de larvas (\pm DP)		Eclosão (%)	
		Sacarose	P.A. mel	Sacarose	P.A. mel	Sacarose	P.A. mel
1ª oviposição – Iscas tratadas com o pyriproxyfen P.A.							
1. ♂T x ♀T	30	439 \pm 90 ^A	325 \pm 60 ^A	181 \pm 106 ^A	9 \pm 6 ^A	41,2	2,9
2. ♂N x ♀T	30	536 \pm 60 ^B	430 \pm 49 ^B	271 \pm 65 ^B	90 \pm 9 ^A	57,9	20,4
3. ♂T x ♀N	30	541 \pm 55 ^B	384 \pm 39 ^A	313 \pm 55 ^B	78 \pm 16 ^A	56,5	20,9
4. ♂N x ♀N	30	615 \pm 52 ^C	687 \pm 21 ^C	582 \pm 43 ^C	642 \pm 37 ^B	94,7	93,5
2ª oviposição- Iscas não tratadas com o pyriproxyfen							
1. ♂T x ♀T	30	507 \pm 74 ^A	355 \pm 84 ^A	288 \pm 9 ^A	137 \pm 46 ^A	52,3	38,7
2. ♂N x ♀T	30	559 \pm 70 ^A	442 \pm 52 ^B	341 \pm 58 ^A	245 \pm 100 ^A	64,0	52,6
3. ♂T x ♀N	30	595 \pm 64 ^A	404 \pm 68 ^B	363 \pm 36 ^A	212 \pm 68 ^A	61,1	42,7
4. ♂N x ♀N	30	658 \pm 36 ^A	627 \pm 60 ^C	624 \pm 20 ^B	559 \pm 44 ^B	94,7	89,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: ♂♀T: Machos/Fêmeas tratados/expostos ao pyriproxyfen; ♂♀N: Machos/Fêmeas não tratados/não expostos ao pyriproxyfen; médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferiram entre si estaticamente na análise de variância ($p>0,05$); médias com letras diferentes = $p<0,05$.

Gráfico 4 – Fecundidade de fêmeas de *Aedes aegypti* resultante do cruzamento entre indivíduos alimentados com iscas de sacarose a 20% tratadas e não tratadas com pyriproxyfen (P.A.). Valores observados em dois ciclos sequenciais de oviposição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: MN: Machos não tratados; MT: Machos Tratados; FN: Fêmeas não tratadas; FT: Fêmeas tratadas.

Tabela 5 – Comparação dos efeitos da ingestão de iscas de sacarose e mel tratados com P.A. do pyriproxyfen e Sumilarv® 0,5G na reprodução de *Aedes aegypti* em dois ciclos de oviposição. Ovos e larvas apresentados como média \pm desvio padrão.

Grupos	Nº médio de ovos (\pm DP)		Nº médio de larvas (\pm DP)		Eclosão (%)		
	N casais	Mel P.A.	Sumilarv®	Mel P.A.	Sumilarv®	Mel P.A.	Sumilarv®
1ª oviposição - alimentação de mel tratado com o pyriproxyfen							
1. ♂T x ♀T	30	325 \pm 60 ^A	254 \pm 66 ^A	9 \pm 6 ^A	27 \pm 11 ^A	2,9	10,7
2. ♂T x ♀N	30	430 \pm 49 ^B	330 \pm 46 ^B	90 \pm 9 ^A	83 \pm 12 ^A	20,4	25,3
3. ♂N x ♀T	30	384 \pm 39 ^B	261 \pm 42 ^B	78 \pm 16 ^A	60 \pm 5 ^A	20,9	22,9
4. ♂N x ♀N	30	687 \pm 21 ^C	753 \pm 90 ^C	642 \pm 37 ^B	704 \pm 80 ^B	93,5	93,5
2ª oviposição - alimentação de carboidrato sem tratamento							
1. ♂T x ♀T	30	355 \pm 84 ^A	418 \pm 67 ^A	137 \pm 46 ^A	195 \pm 38 ^A	38,7	46,7
2. ♂T x ♀N	30	442 \pm 52 ^B	393 \pm 98 ^A	245 \pm 100 ^A	184 \pm 44 ^A	52,6	53,8
3. ♂N x ♀T	30	404 \pm 68 ^B	451 \pm 60 ^A	212 \pm 68 ^A	243 \pm 50 ^A	42,7	46,8
4. ♂N x ♀N	30	627 \pm 60 ^C	639 \pm 56 ^B	559 \pm 44 ^B	600 \pm 66 ^B	89,2	94,0

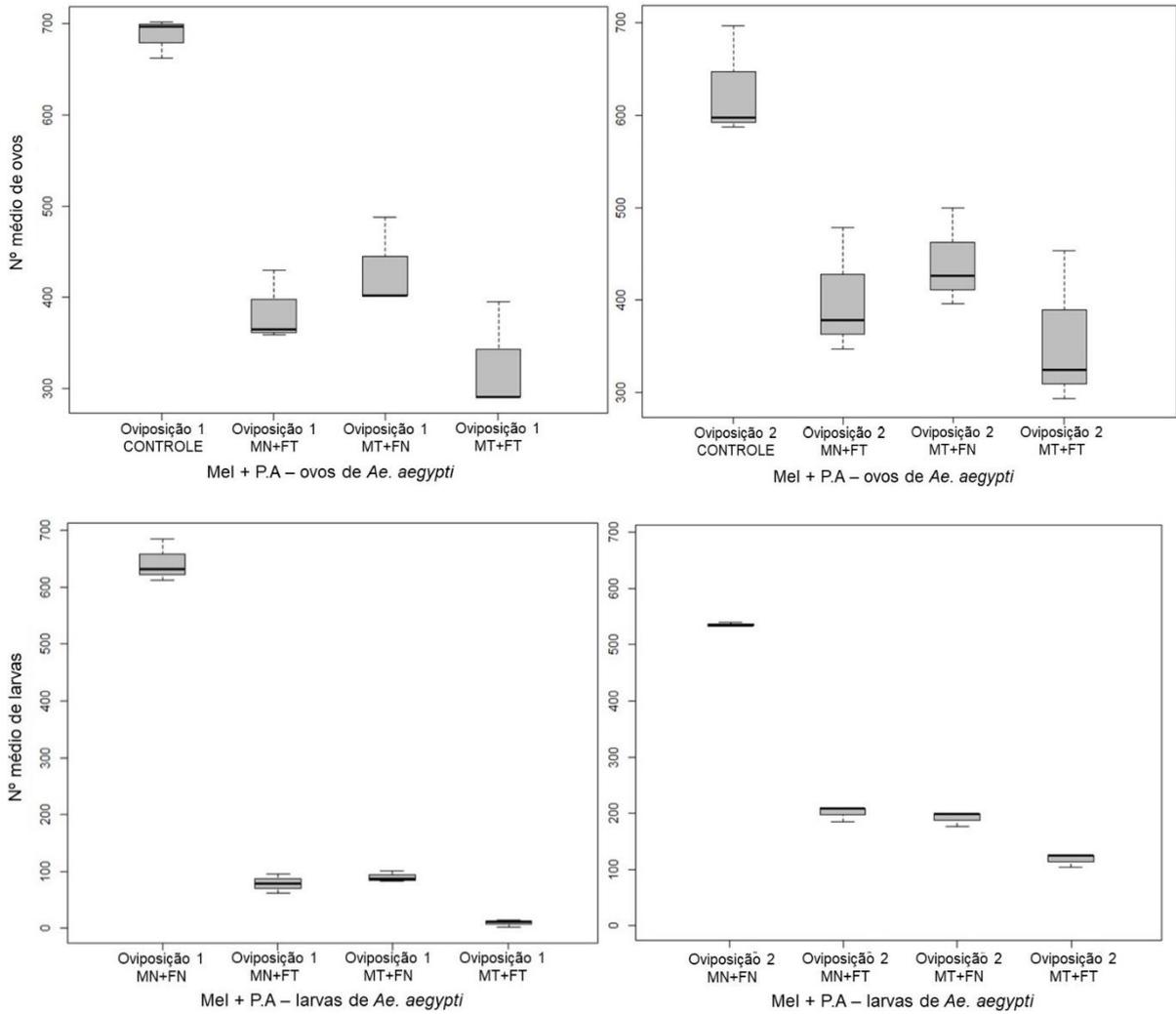
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: ♂♀T: Machos/Fêmeas tratados/expostos ao pyriproxyfen; ♂♀N: Machos/Fêmeas não tratados/não expostos ao pyriproxyfen; médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferiram entre si estaticamente na análise de variância ($p > 0,05$); médias com letras diferentes = $p < 0,05$.

O impacto negativo nos processos reprodutivos dos mosquitos foi similar entre o produto comercial Sumilarv® 0,5G e o princípio ativo puro do pyriproxyfen (Tabela 5), indicando que qualquer um dos dois poderia ser utilizado na preparação da isca tóxica.

Os testes utilizando as iscas de carboidrato com pyriproxyfen mostraram respostas de redução da fecundidade e fertilidade similares àquelas observadas com sangue, embora o efeito de esterilização parcial tenha sido mais pronunciado neste último grupo.

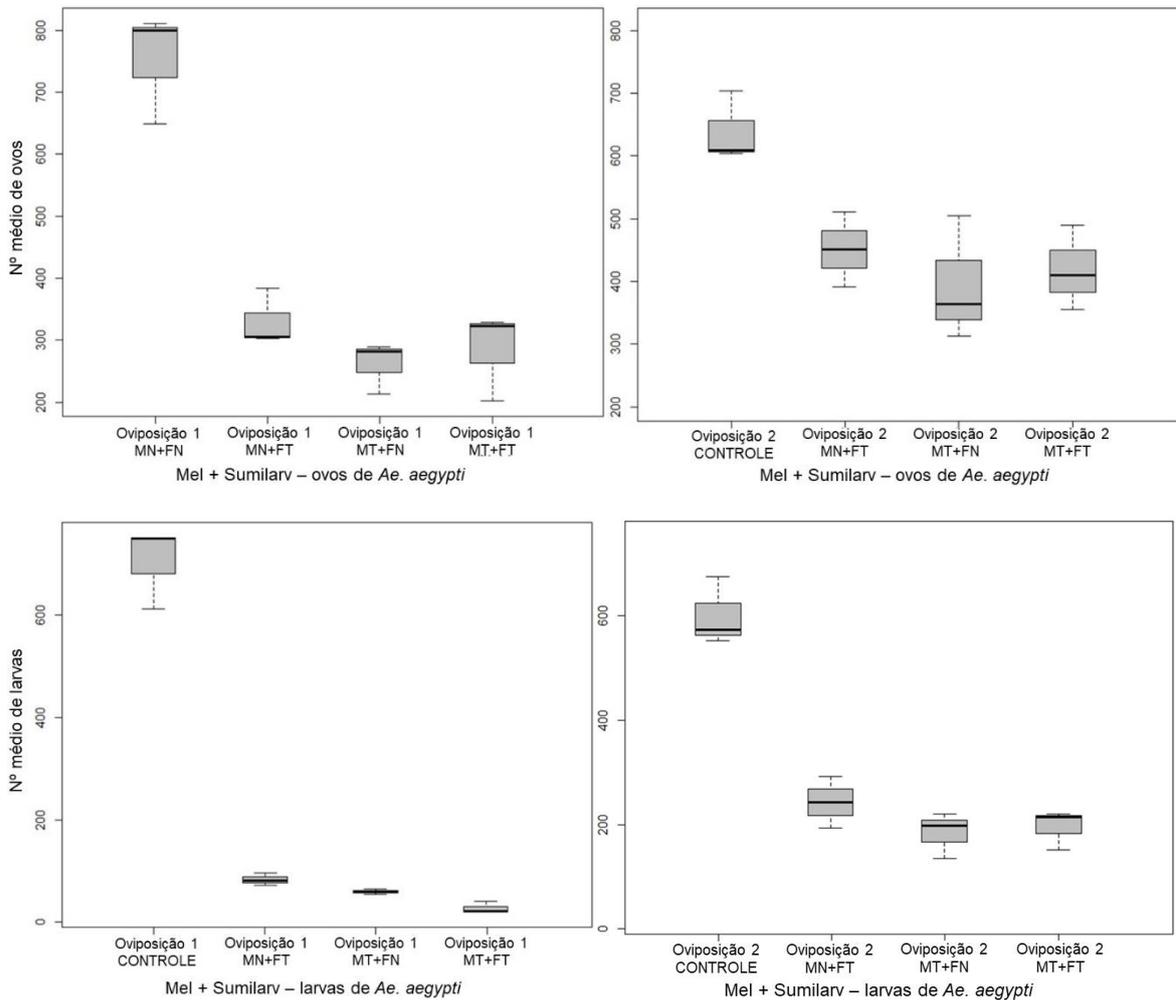
Gráfico 5 – Fertilidade de *Aedes aegypti* resultante do cruzamento entre indivíduos alimentados com iscas de sacarose a 20% tratadas e não tratadas com pyriproxyfen (P.A.). Valores observados em dois ciclos sequenciais de oviposição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: MN: Machos não tratados; MT: Machos Tratados; FN: Fêmeas não tratadas; FT: Fêmeas tratadas.

Gráfico 6 – Fecundidade e fertilidade de fêmeas de *Aedes aegypti* resultante do cruzamento entre indivíduos alimentados com iscas de mel/Manuka a 50%, tratadas e não tratadas com Sumilarv® 0,5G. Valores observados em dois ciclos sequenciais de oviposição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

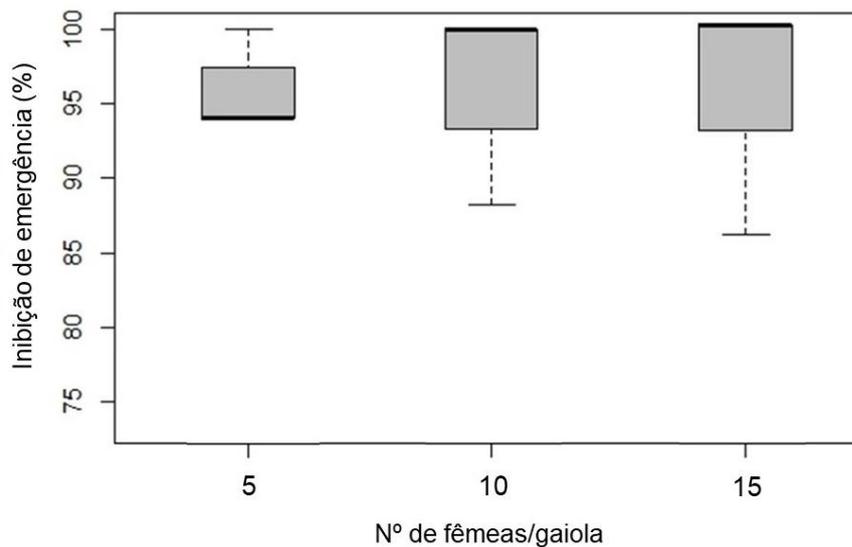
Legenda: MN: Machos não tratados; MT: Machos Tratados; FN: Fêmeas não tratadas; FT: Fêmeas tratadas.

8.4 Dispersão de pyriproxyfen por fêmeas de *Aedes aegypti*

Nos testes realizados com a liberação de quantidades diferentes de fêmeas/m², em gaiolas com uma sentinela e uma UD, foi verificada a dispersão para as ovitrampas sentinelas (OVT-S), cujo percentual médio de inibição foi $\geq 90\%$ para todas as situações testadas (Gráfico 1). Resultados semelhantes foram obtidos, também, quando o número de OVT-S foi aumentado de 1 para 3 na gaiola A1, onde 30 fêmeas/m² foram liberadas, levando a uma inibição de emergência de $>97\%$ em todas as OVT-S. A análise de variância (ANOVA) revelou não haver diferenças ($F=0.1905$; $p=0.8314$) entre os testes, demonstrando que o Pyr foi transferido da UD

para as OVT-S em quantidades suficientes para inibir a emergência da maioria das larvas expostas, em todas as repetições.

Gráfico 7 – Inibição da emergência de *Aedes aegypti* promovida pelo pyriproxyfen em ovitrampas-sentinelas (OVT-S) da dispersão do produto por fêmeas, em gaiolas sob condições simuladas de campo.

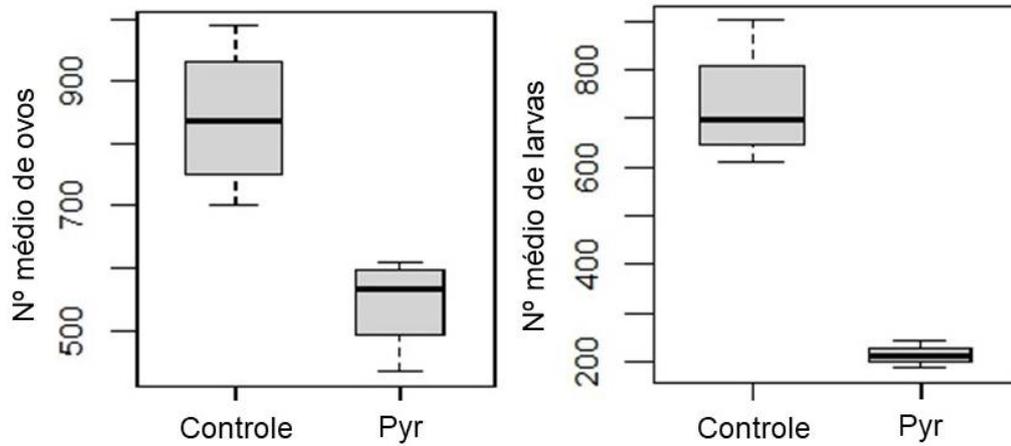


Fonte: dados do autor.

Os testes realizados para avaliar a capacidade de dispersão do Pyr pelas fêmeas revelou que 2.275 ovos foram postos nos criadouros crípticos e 1.644 ovos nos criadouros expostos, não havendo, portanto, pelo teste T de *Student*, diferença estatística ($p=0,09$) que indicassem a preferência por qualquer um dos criadouros. A constatação da completa inibição da emergência dos indivíduos expostos nas OVT-S, demonstrou que as fêmeas foram capazes de transferir o produtor mesmo para o criadouro menos acessível.

Por fim, nos testes utilizando as UD associadas às iscas de carboidrato tratadas com Pyr, os resultados demonstraram que as fêmeas ao se alimentarem com o mel tratado com o análogo do HJ, tiveram uma redução de 24% na fecundidade ($F=16.84$; $p=0.006$), 64,3% na fertilidade ($F=66.07$; $p<0.001$) e 100% de inibição da emergência das larvas presentes nas OVT-S. Além disso, também foi detectado um elevado percentual (33,6%) de ovos com aparente má formação associadas à coloração atípica, córion colabado e ausência de embrião, não observadas no grupo controle.

Gráfico 8 – Teste de dispersão utilizando iscas tóxicas de mel tratadas com pyriproxyfen. Dados apenas dos efeitos das iscas tóxicas comparadas ao grupo controle.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Ovos postos por fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com mel tratado com pyriproxyfen (A) e não tratado (B).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Setas vermelhas indicam ovos que possuem algum tipo de deformação.

9 DISCUSSÃO

Este trabalho traz evidências importantes dos efeitos adversos do pyriproxyfen sobre a longevidade, fecundidade e fertilidade de *Ae. aegypti*, tanto para indivíduos expostos ao contato em criadouros aquáticos, quanto por ingestão do composto, em iscas alimentares de carboidrato.

Uma das comprovadas vantagens deste análogo do HJ é sua efetividade e elevada persistência de controle em criadouros de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, em baixas concentrações, sobretudo o produto comercial Sumilarv® 0,5G (OO et al., 2018; SUZUKI, et al., 1989).

Nossos resultados corroboram a existência de impactos negativos de doses subletais do Sumilarv® 0,5G sobre a fecundidade e a fertilidade de *Ae. aegypti*, tal como referidos por MIURA et al., (1976) e FOURNET et al., (1993), acrescentando que o efeito também se estende a redução da longevidade dos mosquitos adultos. O aparente custo biológico associado à sobrevivência reduziu em até 50% o potencial biótico dos indivíduos. Outros relatos com espécies de *Anopheles* também confirmam o efeito das subdosagens do Pyr sobre o desempenho reprodutivo dos indivíduos expostos (MBARE et al., 2013). Os poucos trabalhos que avaliam os efeitos secundários causados pelo Pyr estão associados à resistência metabólica ao composto em outros insetos, como *Musca domestica* e *Bemisia tabaci* (MA et al., 2010; SHAH et al., 2015; ZHANG et al., 1992).

O impacto sobre os parâmetros reprodutivos e a longevidade observados em nossos testes pode ser explicado pelo aporte exógeno do pyriproxyfen, mimetizando a ação do hormônio juvenil natural em momentos onde ele não deveria estar atuando. Desta forma é possível sugerir que mesmo que não exista a concentração necessária para matar todas as larvas e pupas em um criadouro, seja pela reposição sistemática da água nos reservatórios tratados ou pela insuficiência de produtos carregados por outras técnicas de dispersão, subdoses superiores a CL₈₀, poderão levar a formação de adultos com baixo rendimento reprodutivo. Tais efeitos adversos são relevantes sob o ponto de vista de controle populacional de *Ae. aegypti*.

Nosso estudo também trouxe como resposta a inexistência do efeito ovicida do pyriproxyfen para *Ae. aegypti*, mesmo quando utilizado em concentrações maiores do que 250 vezes a recomendada para campo, tanto em sua apresentação

comercial Sumilarv® 0,5G como no princípio ativo (P.A.). Harburguer et al. (2014) testando a dosagem de rótulo deste mesmo produto também referiram a ausência do efeito sobre os ovos. Segundo os autores, a concentração do princípio ativo e/ou o tempo de exposição ao composto podem ter sido insuficientes para produzir um efeito sobre a eclosão das larvas. Um outro argumento levantado foi que o córion poderia apresentar uma baixa permeabilidade a moléculas grandes, tais como as dos inseticidas. É de conhecimento comum que ao serem postos sobre a superfície, os ovos de *Ae. aegypti* estão envoltos apenas pelo córion, que é secretado pelo epitélio folicular do ovário. O córion permite a entrada de água durante as primeiras horas após a postura, esta permeabilidade vai sendo diminuída com o passar do tempo, provavelmente em função da secreção de uma camada de cera associada à cutícula serosa, que ajuda os ovos a resistirem à perda excessiva de água para o ambiente (CLEMENTS 1992; LAZZARO et al., 2008). Nossos resultados parecem indicar que o simples aumento da concentração não explica a ausência de efeito sobre a embriogênese, mas talvez que o curto tempo de contato com o produto, antes do enrijecimento definitivo do córion, tenha bloqueado a entrada do pyriproxyfen, impermeabilizando o ovo e protegendo o embrião do contato prolongado com o análogo do HJ.

Outros estudos também já demonstravam que a exposição ao pyriproxyfen não afetava o desenvolvimento embrionário, nem a morfogênese de ovos de mariposas e moscas (RIDDIFORD et al., 1967; TRUMAN et al., 1999).

Nossos resultados, por outro lado, revelaram que por ingestão o pyriproxyfen tem efeito quimioesterilizante parcial na concentração testada (50 mg/L) capaz de diminuir o desempenho reprodutivo de *Ae. aegypti*.

As fêmeas do mosquito não hesitaram em se alimentar de sangue contendo uma alta concentração do Pyr, que não se mostrou letal para as fêmeas alimentadas, porém, reduziu sua fecundidade e sobretudo sua fertilidade. Estes achados corroboram as pesquisas realizadas por Meola (2000), que também, em um sistema artificial, alimentou pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, com sangue tratado com concentrações de até 100 mg/L do pyriproxyfen. Embora altas, as concentrações oferecidas não se mostraram letais para as pulgas, porém, os ovos postos pelos indivíduos tratados estavam inviáveis.

Em outro trabalho, Meola et al. (1996) demonstraram que a razão pela qual as pulgas tratadas com pyriproxyfen depositavam ovos inviáveis era a degeneração dos ovócitos, que já eram encaminhados para o oviduto com o córion enfraquecido. A ação de contração muscular realizada pelo oviduto, aparentemente, danificava o óvulo levando a deposição de ovos vazios, quebrados e inviáveis. Resultados semelhantes de esterilização também foram observados em outros trabalhos com pulgas, mostrando que esta técnica de tratamento com pyriproxyfen, diretamente no sangue ou na superfície onde estes insetos se alimentam, pode ser muito eficiente na inviabilização da prole dos indivíduos tratados (BRATTSTEN, 1986; DONAHUE, 1993; PALMA, 1993).

Experiências utilizando “iscas alimentares tóxicas” para o controle de insetos e em especial de mosquitos, são reportadas desde década de 1960 (FIOREZZANO, 2017).

Em nossos testes em condições simuladas de campo, pareceu existir uma preferência pela solução feita com o mel Manuka como fonte de carboidrato, embora a sacarose (açúcar comum) também tenha se mostrado um candidato eficiente para a associação com o pyriproxyfen. Este comportamento pode estar relacionado a maior ingestão da solução de mel devido à maior concentração de carboidrato (50%) do que a de açúcar (20%), como também a sua composição, mais rica em frutose, fonte de carboidrato encontrada com mais frequência na natureza (GOUAGNA et al., 2010; MARTINEZ-IBARRA et al., 1997).

Os testes combinando as iscas de mel tratado com pyriproxyfen com as unidades disseminadoras (UD) do produto revelaram: uma redução no quantitativo de ovos, a diminuição do número de larvas que eclodiram destes ovos e a completa eliminação daquelas que entraram em contato com a água dos criadouros-sentinelas. A presença da isca tóxica potencializou o efeito da UD, uma vez que as fêmeas alimentadas com o pyriproxyfen foram tão capazes quanto as não alimentadas em carrear o produto para os criadouros-sentinelas. Embora estas respostas sejam animadoras, o efeito sobre tais parâmetros reprodutivos decaiu após a primeira oviposição, se os indivíduos não realizarem novas alimentações com o pyriproxyfen.

A dispersão do pyriproxyfen para habitats larvais através das fêmeas grávidas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* tem sido comprovada em situações de

laboratório, campo simulado e campo, em diferentes contextos (ABAD-FRANCH et al., 2015, 2017; CAPUTO, 2012; CHANDEL, 2016; ITOH, 1995; DEVINE, 2009; SIHUNINCHA, 2005; SUMAN, 2014). Um estudo em particular, realizado por Chandel et al., (2016), sugere que as fêmeas que *Ae. albopictus*, contaminadas com o Pyr, são capazes de dispersar o produto para criadouros mais escondidos (criadouros crípticos). O comportamento de preferência foi constatado em laboratório por verificar que 70% dos ovos foram postos em tais criadouros e que o pyr carregado para os mesmos inibiu a emergência de 30-40% dos indivíduos expostos. Resultados preliminares do nosso estudo não indicam um comportamento similar para *Ae. aegypti*, haja vista que as fêmeas colonizaram indistintamente criadouros “crípticos” e expostos, com a mesma eficiência na disseminação do Pyr, cuja inibição da emergência foi de aproximadamente 100%, em todas as repetições do teste.

Larvas de mosquitos como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são frequentemente encontradas em objetos como garrafas, latas, canos, pneus em desuso, calhas e outros locais que acumulam água e podem apresentar algum grau de natureza críptica (DEVINE, 2009; FARAJOLLAHI, 2013; FONSECA, 2013; LI, 2014;) ou de difícil acesso para a aplicação rotineira de inseticidas pelo PNCD. Este comportamento ajuda a entender a complexidade envolvida com a eliminação de criadouros daquelas espécies. Algumas áreas como cemitérios, borracharias, pontos de reciclagem e ferros-velhos são consideradas pontos estratégicos, por acumularem um grande número de criadouros em um espaço bem reduzido. Nossos resultados revelaram que 6 fêmeas/m² disseminaram, em até cinco dias, quantidades suficientes do produto para tratar três OVT-S, cada uma com 200 ml de água, e promover aproximadamente 100% de inibição da emergência dos indivíduos.

Os resultados observados em nosso estudo, de modo geral, trouxeram informações pioneiras sobre o potencial do uso do pyriproxyfen em iscas tóxicas de carboidrato, e ainda da sua possibilidade de associação às UD's de pyriproxyfen, como estratégia inovadora no controle de *Ae. aegypti*.

10 CONCLUSÕES

- a) O pyriproxyfen não apresentou efeito letal direto sobre os embriões de *Ae. aegypti* (efeito ovicida), quando os ovos foram submetidos à água tratada com do produto, mesmo em concentrações muito elevadas;
- b) Concentrações subletais do pyriproxyfen, que eliminam cerca de 80% de larvas/pupas de *Ae. aegypti*, comprometem a longevidade e capacidade reprodutiva dos mosquitos adultos sobreviventes;
- c) A ingestão do pyriproxyfen por fêmeas e machos de *Ae. aegypti*, em iscas alimentares de carboidrato, reduz a fecundidade e a fertilidade dos indivíduos expostos, funcionando como um quimioesterilizante;
- d) O uso da isca toxica de carboidrato tratada com pyriproxyfen potencializou em mais de 50% o controle de *Ae. aegypti* promovido pela técnica de dispersão do pyriproxyfen, pelas fêmeas do mosquito.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. et al. Mosquito-disseminated pyriproxyfen yields high breeding-site coverage and boosts juvenile mosquito mortality at the neighborhood scale. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e0003702, 2015.
- ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA, E.; LUZ, S. L. B. Mosquito-disseminated insecticide for citywide vector control and its potential to block arbovirus epidemics: Entomological observations and modeling results from Amazonian Brazil. **PLoS medicine**, San Francisco, v. 14, n. 1, p. e1002213, 2017.
- ALPHEY, L. et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 10, n. 3, p. 295-311, 2010.
- ARAÚJO, A. P. **Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), de municípios do Estado de Pernambuco**. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
- ARAÚJO, H. R. C. et al. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, Basel, v. 6, n. 2, p. 576-594, 2015..
- BAJER, E. **Brock team finds first *Aedes aegypti* mosquitoes in Canada**. 2016 Disponível em: <<https://brocku.ca/brock-news/2016/10/brock-team-finds-first-aedes-aegypti-mosquitoes-in-canada/>>. Acesso em: 11 mar. 2017.
- BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, London, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BEADLES, M. L. et al. The horn fly: methoprene in drinking water of cattle for control. **Journal of economic entomology**, Colege Park, v. 68, n. 6, p. 781-785, 1975.
- BOYER, S. Sterile insect technique: targeted control without insecticide. **Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial**, Marseille, v. 72, p. 60-62, 2012.
- BECKER, N. et al. Chemical Control. In: _____. **Mosquitoes and their control**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. cap. 12, p. 377-405.
- BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 2, n. 16, p. 113-118, 2007a.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, p. 279-293, 2007b.
- BRAGA, I. A.; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 179-293, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa nacional de controle da dengue**. Brasília, DF, 2002a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância epidemiológica**. Brasília, DF, 2002b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano diretor de erradicação do *Aedes aegypti* no Brasil**. Brasília, DF, 1996
- BRASIL. Secretaria de vigilância em Saude. **Ofício Circular nº 123/2014/GAB/SVS/MS**. Brasília, 14 ago. 2014.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Controle de vetores: Inseticidas e Larvicidas**. Brasília, 2014. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/632-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/11387-larvicidas>>. Acesso em: 15 set. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Reunião Técnica Para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti***. Rio de Janeiro, 2006b.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.
- CAPUTO, Beniamino et al. The “auto-dissemination” approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e1793, 2012.
- CHANDEL, K. et al. Targeting a Hidden Enemy: Pyriproxyfen Autodissemination Strategy for the Control of the Container Mosquito *Aedes albopictus* in Cryptic Habitats. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0005235, 2016.
- CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. v.1. London: Chapman & Hall, 1992.
- COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest management science**, West Sussex, v. 57, n. 10, p. 946-950, 2001.

- COLTON, Y. M.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. **Medical and veterinary entomology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 195-204, 2003.
- CONSOLI, R. A. G. B.; DE OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- CONDINOI, M. L. F. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 671-676, 2006.
- DAALEN, J. J. V. et al. A selective insecticide with a novel mode of action. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 59, n. 7, p. 312-313, 1972.
- DARBOUX, I. et al. The receptor of Bacillus sphaericus binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect biochemistry and molecular biology**, Amsterdam, v. 31, n. 10, p. 981-990, 2001.
- DEVINE, Gregor J. et al. Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 28, p. 11530-11534, 2009.
- DE OLIVEIRA, Nathalia Cavichioli; DE SOUZA, Antonio Pancrácio. Aumento da Sobrevivência de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus), em Condições de Laboratório, pela Ingestão de Néctar Extrafloral de *Euphorbia milii* Des Moul.(Euphorbiaceae). **EntomoBrasilis**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 49-51, 2014.
- DONALÍSIO, M. R., GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 5, p. 259-279, 2002.
- DUBROVSKY, E. B. Hormonal cross talk in insect development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 16, n. 1, p. 6-11, 2005.
- FERRARI, J. A. Insecticide resistance. **The biology of disease vectors**, Denver, p. 512-529, 1996.
- FIORENZANO, J. M.; KOEHLER, P. G.; XUE, R.-D. Attractive Toxic Sugar Bait (ATSB) For Control of Mosquitoes and Its Impact on Non-Target Organisms: A Review. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 14, n. 4, p. 398, 2017.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 2002. v. 2. 860 p.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. v. 1, 1973.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: Edusp, 1996. v. 2.

FOURNET, F.; SANNIER, C.; MONTENY, N. Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News**, Fresno, v. 9, n. 4, p. 426-430, 1993.

FULCHER, A. et al. Attractive toxic sugar baits mixed with pyriproxyfen sprayed on plants against adult and larval *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 51, n. 4, p. 896-899, 2014.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Plano de Intensificação das ações de Controle da Dengue (PIACD)**. Brasília, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Vigilância epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília, 2002.

GILBERT, L. I.; GILL, S. S. (Ed.). **Insect control: biological and synthetic agents**. San Diego: Academic Press, 2010.

GRENIER, S.; GRENIER, A. Fenoxycarb, a fairly new Insect Growth Regulator: review of its effects on insects. **Annals of applied biology**, London, v. 122, n. 2, p. 369-403, 1993.

HARRIS, R. L.; CHAMBERLAIN, W. F.; FRAZAR, E. D. Horn flies and stable flies: Free-choice feeding of methoprene mineral blocks to cattle for control. **Journal of economic entomology**, College Park MD, v. 67, n. 3, p. 384-386, 1974.

HARBURGUER, L.; ZERBA, E.; LICASTRO, S. Sublethal effect of pyriproxyfen released from a fumigant formulation on fecundity, fertility, and ovicidal action in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 51, n. 2, p. 436-443, 2014.

HARRIS, C. et al. Sterilising effects of pyriproxyfen on *Anopheles arabiensis* and its potential use in malaria control. **Parasites & vectors**, London, v. 6, n. 1, p. 144, 2013.

HATAKOSHI, M. An inhibitory mechanism over oviposition in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* by juvenile hormone analogue pyriproxyfen. **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 38, n. 10, p. 793-801, 1992.

HENRICK, C. A. Methoprene. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. sp2, p. 225-239, 2007.

IMPOINVIL, D. E. et al. Feeding and survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* on plants growing in Kenya. **Medical and veterinary entomology**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 108-115, 2004.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Dengue: Vírus e Vetor**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

KOPEĆ, S. Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. **The Biological Bulletin**, Moskva, v. 42, n. 6, p. 323-342, 1922.

KAWADA, H.; HIRANO, M. Insecticidal effects of the insect growth regulators methoprene and pyriproxyfen on the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 33, n. 5, p. 819-822, 1996.

KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emergency medicine clinics of North America**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. sp2, p. 133-163, 2007.

LIMA, J. B. P. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brasil. **American journal of tropical medicine and hygiene**. Baltimore, v. 62, p. 329-333, 2003.

LIMA, J. A.; MOURATO, M. J.; NUNES, E. S. **Comportamento epidemiológico da dengue no município de Serra Talhada-PE no período de 2001 a 2007**. 2008. Tese (Doutorado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MA, W. et al. Pyriproxyfen resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B: metabolic mechanism. **Journal of economic entomology**, Colege Park, v. 103, n. 1, p. 158-165, 2010.

MACORIS, M. L. G. et al. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MACORIS, M. L. G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 703-708, 2003.

MARTINEZ-IBARRA, Jose Alejandro et al. Influence of plant abundance on nectar feeding by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in southern Mexico. **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 34, n. 6, p. 589-593, 1997.

MASSONNET-BRUNEEL, B. et al. Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e62711, 2013.

MENN, J. (Ed.). **Insect juvenile hormones: chemistry and action**. Amsterdam Elsevier, 2012.

MEOLA, R. et al. Effect of pyriproxyfen in the blood diet of cat fleas on adult survival, egg viability, and larval development. **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 37, n. 4, p. 503-506, 2000.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 49. **Boletim epidemiológico**, Brasília, v. 47, 2016.

MITTAL, P. K. et al. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. **Journal of vector borne diseases**, Delhi, v. 40, n. 1/2, p. 20, 2003.

MIURA, T. et al. Effects of the Insect Growth Inhibitor, Dimilin,® on Hatching of Mosquito Eggs. **Journal of economic entomology**, Colege Park, v. 69, n. 5, p. 655-658, 1976.

MBARE, O.; LINDSAY, S. W.; FILLINGER, U. Dose–response tests and semi-field evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv® 0.5 G) for the control of the malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu lato. **Malaria journal**, Tahallassee, v. 12, n. 1, p. 94, 2013.

MBARE, O.; LINDSAY, S. W.; FILLINGER, U. Pyriproxyfen for mosquito control: female sterilization or horizontal transfer to oviposition substrates by *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Culex quinquefasciatus*. **Parasites & vectors**, London, v. 7, n. 1, p. 280, 2014.

MULLA M. S., DARWAZEH H. A. New insect growth regulators against flood and stagnant water mosquitoes-effects on non-target organisms. **Mosquitoes News**, New York, v. 2, p 33-35, 1979.

OO, S. Z. M. et al. Effectiveness of a novel long-lasting pyriproxyfen larvicide (SumiLarv® 2MR) against *Aedes* mosquitoes in schools in Yangon, Myanmar. **Parasites & vectors**, London, v. 11, n. 1, p. 16, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report of the fourth WHOPES working group meeting**: WH. Geneva, 2001.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas**: guías para su prevención y control. Washington, 1995.

PALLI, S. R.; RETNAKARAN, A. Molecular and biochemical aspects of chitin synthesis inhibition. **Exs**, Basel, v. 87, p. 85-98, 1998.

RESENDE, M. C.; GAMA, R. A. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 72-75, 2006.

RANKIN, S. M. et al. In vitro inhibition of juvenile hormone synthesis by corpora allata of the viviparous cockroach, *Diploptera punctata*. **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 151-156, 1986.

RIDDIFORD, L. M.; WILLIAMS, C. M. The effects of juvenile hormone analogues on the embryonic development of silkworms. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 57, n. 3, p. 595-601, 1967.

- RIDDIFORD, L. M. et al. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1327-1338, 2003.
- RIDDIFORD, L. M. Juvenile hormone action: a 2007 perspective. **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 895-901, 2008.
- SHAH, R. M.; SHAD, S. A.; ABBAS, N. Mechanism, stability and fitness cost of resistance to pyriproxyfen in the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Pesticide biochemistry and physiology**, San Diego, v. 119, p. 67-73, 2015.
- SIHUINCHA, M. et al. Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 42, n. 4, p. 620-630, 2005.
- SIHUINCHA, Moisés et al. Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 42, n. 4, p. 620-630, 2005.
- SOPER, F. L. Rehabilitation of the Eradication Concept in Prevention of Communicable Diseases. **Public Health Reports**, Boston, v. 80, n. 10, p. 855-869, 1965.
- SUMAN, Devi S. et al. Point-source and area-wide field studies of pyriproxyfen autodissemination against urban container-inhabiting mosquitoes. **Acta tropica**, Basel, v. 135, p. 96-103, 2014.
- SUZUKI, Hiroshi et al. Field evaluation of a new insect growth regulator, pyriproxyfen, against *Anopheles farauti*, the main vector of malaria in the Solomon Islands. **Medical entomology and zoology**, Tokyo, v. 40, n. 4, p. 253-257, 1989.
- TIONO, A. B. et al. The AvecNet Trial to assess whether addition of pyriproxyfen, an insect juvenile hormone mimic, to long-lasting insecticidal mosquito nets provides additional protection against clinical malaria over current best practice in an area with pyrethroid-resistant vectors in rural Burkina Faso: study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**, London, v. 16, n. 1, p. 113, 2015.
- TUNAZ, H.; UYGUN, N. Insect growth regulators for insect pest control. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Turquia, v. 28, n. 6, p. 377-387, 2004.
- VAIL, K. M.; WILLIAMS, D. F. Pharaoh ant (Hymenoptera: Formicidae) colony development after consumption of pyriproxyfen baits. **Journal of economic entomology**, College Park MD, v. 88, n. 6, p. 1695-1702, 1995.
- WIGGLESWORTH, V. B. Memoirs: the function of the Corpus Allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). **Journal of Cell Science**, London, v. 2, n. 313, p. 91-121, 1936.

WILDER-SMITH, A. et al. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. **Global health action**, London, v. 5, p. 14-17, 2012.

ZHANG, L.; HARADA, K.; SHONO, T. Genetic analysis of pyriproxyfen resistance in the housefly, *Musca domestica* L. **Applied entomology and zoology**, Tokyo, v. 32, n. 1, p. 217-226, 1997.

