

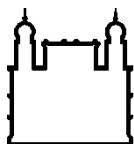
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE  
RESISTÊNCIA A INSETICIDAS USADOS PARA *Anopheles*  
(*Nyssorhynchus*) *darlingi* PELO PROGRAMA DE CONTROLE DE  
MALÁRIA DO MUNICÍPIO DE CRUZEIRO DO SUL – ACRE

THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA

Rio de Janeiro  
Setembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

*Thayna Maria Holanda de Souza*

Comparação de dois métodos para avaliação de resistência a inseticidas usados para *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* pelo Programa de Controle de Malária do município de Cruzeiro do Sul – Acre

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Vigilância e Controle de Vetores

**Orientadora:** Profa. Dra. Cynara de Melo Rodvalho

Rio de Janeiro  
Setembro de 2019

Souza, Thayna Maria Holanda de.

Comparação de dois métodos para avaliação de resistência a inseticidas usados para *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* pelo Programa de Controle de Malária do município de Cruzeiro do Sul - Acre / Thayna Maria Holanda de Souza. - Rio de Janeiro, 2019.

xix, 82 f.

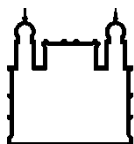
Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 2019.

Orientadora: Dra. Cynara de Melo Rodovalho.

Bibliografia: f. 63-72

1. *Anopheles darlingi*. 2. Malária. 3. Resistência a inseticidas. 4. Controle de vetores. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores**

**AUTOR: THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA**

**Comparação de dois métodos para avaliação de resistência a inseticidas usados para *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* pelo Programa de Controle de Malária do município de Cruzeiro do Sul – Acre**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Cynara de Melo Rodovalho**

**Aprovada em: 20 / 09 / 2019**

### **EXAMINADORES:**

**Dra. Denise Valle – Revisora e Presidente** (IOC/Fiocruz- RJ)

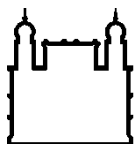
**Dra. Simone Ladeia Andrade** (IOC/Fiocruz- RJ)

**Dra. Tatiana Mingote Ferreira de Ázara** (Ministério da Saúde - DF)

**Dr. Hermano Gomes Albuquerque** (IOC/Fiocruz- RJ)

**Dr. André Luiz Quintanilha Torres** (Parque Tecnológico – UFRJ - RJ)

Rio de Janeiro, 20 de setembro de 2019




Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Ata da defesa de dissertação de mestrado profissional em Vigilância e Controle de Vetores de Thayna Maria Holanda de Souza, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Cynara de Melo Rodovalho . Ao vigésimo dia do mês de setembro de dois mil e dezenove, realizou-se às treze horas, no Auditório Maria Deane - Pavilhão Leonidas Deane, o exame da dissertação de mestrado profissional intitulada: **"Comparação de dois métodos para avaliação de resistência a inseticidas usados em anofelinos pelo Programa de Controle da Malária do município de Cruzeiro do Sul - Acre"**. No programa de Pós-graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Epidemiologia e controle de vetores, na linha de pesquisa: Vigilância. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Denise Valle – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Simone Ladeia Andrade– IOC/FIOCRUZ participando de forma síncrona remota, Dr<sup>a</sup>. Tatiana Mingote Ferreira de Azara – Ministério da Saúde/DF e como suplentes: Dr. Hermano Gomes de Albuquerque-ENSP/FIOCRUZ e Dr. André Luiz Quintanilha Torres - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado profissional. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca. o Coordenador do Programa Dr. Fernando Ariel Genta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 20 de setembro de 2019.

  
Dr<sup>a</sup>. Denise Valle (Presidente da Banca):

  
Dr. Fernando Ariel Genta (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho a Deus , que em sua infinita misericórdia me sustentou em todos os momentos.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para me proporcionar as melhores oportunidades, sempre me apoiando e ensinando, com muito amor, o melhor caminho a seguir.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela dádiva da vida e por guiar e iluminar os meus caminhos, sempre me abençoando e realizando os desejos do meu coração.

Sou grata a minha amiga querida, Raysa Martins, por praticamente ter feito a inscrição por mim (risos), pelos livros que buscou na biblioteca, pelo apoio e incentivo em todas as fases do processo de seleção e principalmente por acreditar que eu era capaz quando me faltou confiança. Muito obrigada “Maria”...você é Luz na minha vida.

Aos meus queridos pais, pelas orações, por me ensinarem o caminho que eu deveria andar, pela construção do meu caráter, por todo apoio, incentivo e amor incondicional. Sou muito grata por tudo que fizeram para que eu conquistasse os meus objetivos... a vocês o meu amor e admiração.

À minha irmãzinha (Thais), pela sua amizade, amor e apoio em todos os momentos da minha vida, pelos lanches feitos com tanto carinho. Você sabe o quanto sou grata pela sua existência... você é o meu coração fora do peito.

À Lou (Lourdes), pelo seu carinho, paciência e capacidade de me trazer paz nos momentos mais difíceis. Sou grata pelas avaliações críticas, por ser minha “plateia” nos ensaios das apresentações que tive que fazer durante o mestrado (risos), mas, principalmente, pelo seu amor e companheirismo durante toda essa trajetória.

À minha querida orientadora, Dra. Cynara Rodovalho, eu não tenho palavras para expressar toda minha gratidão e carinho por você. Sou muito grata por todo ensinamento, apoio, encorajamento, mas sobretudo pelo seu acolhimento, por ter me dado a liberdade de expor a minha opinião e quando necessário questioná-las com muita delicadeza e conhecimento. Obrigada por suas críticas sempre tão construtivas que me faziam buscar fazer o meu melhor... por ser tão presente em todas as etapas, por compartilhar mais do que conhecimento científico, pois com você aprendi mais sobre empatia, gentileza e ética. Muito Obrigada por acreditar em mim... a você toda minha admiração e carinho.

Ao Dr. José Bento que colaborou e apoiou esse trabalho desde a formulação do tema até a conclusão da dissertação.

À toda equipe do LAFICAVE, por todo ensinamento e colaboração na execução desse trabalho. Em especial, ao Diogo Bellinato, por todo ensinamento, incentivo, acompanhamento nos bioensaios, dicas, “brincas” (risos)... sou grata por toda sua ajuda e colaboração desde a bancada até nas avaliações dos textos, tabulação dos dados, apresentações... em todos os processos, mas principalmente pela sua acolhida, gentileza, boas risadas e amizade. Você é inteligentíssimo e um profissional sensacional.

Sou grata a Quesia e a Taiza por todo apoio e colaboração na execução dos bioensaios realizados em laboratório, além das minhas queridas, Raquel e Priscila, que tiveram muito trabalho para manter as colônias e assim possibilitar a execução dos ensaios de calibração das doses. Meninas vocês são maravilhosas... muito obrigada por todo ensinamento.

À Secretaria de Saúde do Município de Cruzeiro do Sul, pela parceria e disponibilização dos recursos necessários para execução das etapas de campo.

À Muana Araújo, coordenadora de vigilância entomológica de Cruzeiro do Sul, por todo apoio na execução das atividades de campo.

À equipe de entomologia (caça mosquitos) - Everton, Ana, Souza, Gustavo, Gerisson e especialmente ao meu amigo Freitas - por todo comprometimento, dedicação e ensinamento durante as coletas de campo e bioensaios. Vocês me emocionaram muito, pois são profissionais aguerridos e incansáveis que fazem o trabalho com amor e leveza.... a vocês minha eterna gratidão.

À Adriana Evangelista, Izanelda Magalhães, Dra. Suely Melo, Dra Marize Lucena e Dora Holanda (minha mãe) que deixaram um legado na área de controle da malária no Estado do Acre. Por todos os serviços prestados com competência, comprometimento, ética e honestidade... vocês me ensinaram pelo exemplo. Muito obrigada pelas oportunidades e apoio de sempre.

À Dra. Anelise Regiani, minha orientadora da iniciação científica que cultivou em mim a paixão pela pesquisa.



Aos meus colegas da 1ª turma do mestrado profissional de vigilância e controle de vetores, em especial aos meus amigos queridos de alojamento, Fabiane, Rosimere, Igo e Mara, por todos os momentos que vivemos juntos.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Vigilância e Controle de Vetores por compartilhar suas experiências e conhecimento.

À Rose e Helenice da secretaria acadêmica por todo apoio, colaboração e orientação nos processos acadêmicos.

À Dra. Denise Valle por aceitar ser revisora e presidente da banca, suas considerações foram fundamentais para finalização desse trabalho. Aproveito a oportunidade para dizer que foi uma honra tê-la como revisora.

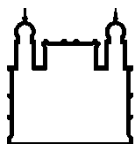
Aos membros da banca, Dra. Tatiana Mingote, Dra. Simone Ladeia, Dr. Hermano Albuquerque e Dr. André Torres, agradeço por aceitarem o convite.

À todos os meus amigos pelo apoio, torcida e boas vibrações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio.

“O saber contra a ignorância, a saúde contra a doença, a vida contra a morte. Mil reflexos da batalha permanente em que estamos todos envolvidos.”

(Oswaldo Cruz)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

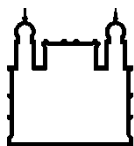
### Comparação de dois métodos para avaliação de resistência a inseticidas usados para *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* pelo Programa de Controle de Malária do município de Cruzeiro do Sul – Acre

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM VIGILÂNCIA E CONTROLE DE VETORES

**Thayna Maria Holanda de Souza**

A malária é um grave problema de saúde pública e, até o momento, no Brasil, não há dados sobre resistência, nem tampouco uma rede de monitoramento da resistência de anofelinos a inseticidas utilizados pelos programas de controle da malária. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza dois métodos para detecção de resistência a inseticidas: o método OMS de tubos com papéis impregnados com inseticidas e o método de garrafas impregnadas, originalmente desenvolvido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sendo assim, esse projeto teve como objetivo a comparação desses dois métodos para avaliação de populações de anofelinos do norte do Brasil, quanto ao *status* de resistência a dois inseticidas da classe dos piretroides (etofenprox e alfacipermetrina), usados pelos programas de controle. O estudo foi desenvolvido inicialmente em laboratório, onde foram realizados bioensaios para calibração de doses diagnósticas para garrafas impregnadas com a utilização de *Anopheles aquasalis*, mantida em laboratório há mais de 20 anos e usada como linhagem padrão de comparação. Nesse estudo foi considerada como dose diagnóstica, nos testes de garrafas impregnadas, a menor concentração de inseticida capaz de causar efeito *knockdown* em mais de 99 % das fêmeas expostas por 30 minutos e taxa de mortalidade superior a 99 % após 24 horas de recuperação. Para etofenprox, foi determinada a dose diagnóstica de 20,0 µg/garrafa, enquanto para alfacipermetrina, a dose encontrada foi de 20,5 µg/garrafa. Para os ensaios com tubos com papéis impregnados foram utilizadas as doses recomendadas pela OMS, que equivalem ao dobro da concentração de inseticida capaz de matar >99 % das fêmeas da linhagem de referência (0,5 % para etofenprox e 0,05 % para alfacipermetrina). As atividades de campo foram desenvolvidas em Cruzeiro do Sul (AC), onde 1.120 fêmeas de *Anopheles darlingi*, coletadas em três pontos do município em dias diferentes, foram levadas para o laboratório de entomologia do município e submetidas a bioensaios qualitativos, utilizando as doses de inseticidas determinadas nos ensaios de calibração e recomendadas pela OMS. A partir dos resultados obtidos, para ensaios de garrafa sugere-se alteração do critério de leitura de mortalidade no tempo diagnóstico de 30 minutos, para leitura após 24 horas de recuperação na ausência de inseticida, devido ao efeito *knockdown*. Com alteração desse critério de leitura, os anofelinos testados apresentaram resistência aos inseticidas avaliados em ambos os métodos. Ao comparar o uso de garrafas e papéis impregnados em laboratório e no campo, verificou-se que os dois métodos são eficazes para detecção da resistência a inseticidas, além de serem facilmente aplicados a diferentes espécies de *Anopheles*, permitindo a obtenção de resultados semelhantes para a mesma população. Estamos cientes das limitações desse estudo no que se refere à utilização de uma espécie de anofelino, para estabelecer a dose diagnóstica, diferente da testada em campo e à inexistência de uma linhagem de referência para as espécies vetoras do Brasil. Vale ressaltar que as duas metodologias apresentam vantagens e desvantagens quanto à infraestrutura, capacidade técnica, recursos humanos e financeiros necessários. Assim, a escolha do método a ser utilizado deve considerar as especificidades dos estados e municípios que executarão os bioensaios de detecção da resistência.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Comparison of two methods for evaluation of insecticide resistance used for *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* by the Malaria Control Program of Cruzeiro do Sul - Acre

#### ABSTRACT

#### MASTER'S DISSERTATION IN SURVEILLANCE AND VECTOR CONTROL

**Thayna Maria Holanda de Souza**

Malaria is a serious public health problem and so far, in Brazil, there is no data on resistance, nor there is a monitoring network for anopheline resistance to insecticides used by malaria control programs. The World Health Organization (WHO) recommends two methods for insecticide resistance detection: the WHO method of tubes with papers impregnated with insecticides and the method of impregnated bottles, originally developed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Thus, this project aimed to compare these two methods for the evaluation of anopheline populations from the North of Brazil, regarding the resistance status to two insecticides of the pyrethroids class (etofenprox and alphacypermethrin). The study was initially developed in the laboratory, where bioassays were performed to calibrate diagnostic doses for impregnated bottles using *Anopheles aquasalis*, kept in the laboratory for over 20 years and used as a comparison standard lineage. In this study it was considered as a diagnostic dose, in the impregnated bottle tests, the lowest concentration of insecticide capable of knockdown effect in more than 99% of females exposed for 30 minutes and mortality rate above 99% after 24 hours of recovery. For etofenprox the diagnostic dose of 20 µg/bottle was determined, while for alphacypermethrin the dose found was 20.5 µg/bottle. For the tests with tubes with impregnated papers, the recommended WHO doses were used, which is twice the concentration of insecticide capable of killing >99% of females of the reference line (0.5% for etofenprox and 0.05% for alphacypermethrin). Field experiments were carried out in Cruzeiro do Sul (AC), where 1,120 *Anopheles darlingi* females, collected at three sites of the municipality in different days, were taken to the entomology laboratory of the town and subjected to qualitative bioassays, using the insecticide doses determined in the calibration tests and recommended by WHO. From the obtained results, it is suggested to change the reading criterion for bottle assays at 30 minutes diagnostic time, to read after 24 hours of recovery for pyrethroids, due to knockdown effect. Altering this reading criterion, the tested anophelines showed resistance to the evaluated insecticides in both methods. By comparing the use of impregnated bottles and papers in the laboratory and in the field, it was found that both methods are effective for evaluating insecticide resistance and are easily applied for different species of *Anopheles*, allowing to obtain similar results for the same population. We are aware of the limitations of this study regarding the use of an anopheline species to establish the diagnostic dose, different from the field tested one and the lack of a reference lineage for the vector species from Brazil. It is worth mentioning, both methodologies have advantages and disadvantages in terms of infrastructure, technical capacity, human, and financial resources required. Thus, the choice of the method to be used should consider the specificities of the states and municipalities that will perform the resistance evaluation bioassays.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aspectos epidemiológicos da malária</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Vetor</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Estratégias de Controle da Malária</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 Controle Vetorial</b> .....	<b>7</b>
1.4.1 Histórico das Ações de Controle da Malária no Acre.....	10
<b>1.5 Classes de Inseticidas</b> .....	<b>13</b>
1.5.1 Organoclorados .....	13
1.5.2 Organofosforados .....	14
1.5.3 Carbamatos .....	15
1.5.4 Piretroides.....	15
1.5.5 Neonicotinoides .....	16
<b>1.6 Resistência a Inseticidas</b> .....	<b>16</b>
<b>1.7 Justificativa</b> .....	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Bioensaios de calibração e susceptibilidade</b> .....	<b>24</b>
3.1.1 Manutenção das espécies de Anopheles criadas em laboratório.....	24
3.1.2 Bioensaios com garrafas impregnadas, metodologia CDC (Centers for Disease Control and Prevention) .....	25
3.1.3 Bioensaio de tubos com papéis impregnados, metodologia OMS.....	26
<b>3.2 Coleta e bioensaios em campo</b> .....	<b>27</b>
3.2.1 Área de estudo .....	27
3.2.2 Coleta de adultos .....	28

3.2.3	Bioensaios em campo.....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
4.1	<b>Bioensaios de calibração e susceptibilidade .....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Bioensaios com garrafas impregnadas.....	33
4.1.2	Bioensaio de tubos com papéis impregnados .....	40
4.2	<b>Coleta de Adultos .....</b>	<b>43</b>
4.3	<b>Bioensaios de Campo .....</b>	<b>44</b>
4.3.1	Garrafas impregnadas .....	45
4.3.2	Tubos OMS com papéis impregnados.....	47
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>73</b>
9.1	<b>Anexo 1 - Licença emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais. ....</b>	<b>73</b>
9.2	<b>Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética Institucional.....</b>	<b>75</b>
9.3	<b>Anexo 3 - Autorização SISBIO para coleta de anofelinos.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa de risco da malária por local de infecção no Brasil, 2017. ....	2
<b>Figura 2:</b> Percentual de casos de Malária, segundo espécie parasitária, por UF de notificação, região amazônica - Brasil, 2018.....	3
<b>Figura 3:</b> Distribuição do número e percentual de casos de malária, por municípios endêmicos, do estado do Acre, 2018.....	4
<b>Figura 4:</b> Mapa dos sistemas de transmissão de malária no Brasil, 2019.....	5
<b>Figura 5:</b> Número de casos de malária notificados no Estado do Acre no período de 2003 a 2018 .....	10
<b>Figura 6:</b> Mapa Global da situação da suscetibilidade dos vetores relacionados à malária a inseticidas, 2010 a 2015 .....	19
<b>Figura 7:</b> Mapa Global da situação da suscetibilidade dos vetores relacionados à malária a quatro classes de inseticidas, 1955 a 2015 .....	20
<b>Figura 8:</b> Localização geográfica do município de Cruzeiro do Sul.....	28
<b>Figura 9:</b> Localização geográfica dos três pontos de captura, no município de Cruzeiro do Sul, estado do Acre, Brasil. ....	29
<b>Figura 10:</b> Esquema das atividades de coleta e bioensaios pareados (garrafas CDC e tubos OMS), realizados em três pontos do município de Cruzeiro do Sul, 2019 ...	30
<b>Figura 11:</b> Curvas de <i>knockdown</i> (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de <i>An. aquasalis</i> expostas a diferentes concentrações de etofenprox nos testes com garrafas impregnadas, durante o processo de calibração.....	34
<b>Figura 12:</b> Curvas de <i>knockdown</i> (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de <i>An. aquasalis</i> expostas a DD de etofenprox (20 µg /garrafa) .....	36
<b>Figura 13:</b> Curvas de <i>knockdown</i> (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de <i>An. abitarsis</i> expostas a DD de etofenprox (20 µg /garrafa). ....	36
<b>Figura 14:</b> Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a dose diagnóstica de etofenprox (20 µg /garrafa), utilizando mosquitos das espécies <i>An. aquasalis</i> e <i>An. albitarsis</i> .....	37
<b>Figura 15:</b> Curvas de <i>knockdown</i> (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de <i>An. aquasalis</i> expostas a diferentes concentrações de alfacipermetrina nos testes com garrafas impregnadas, durante os ensaios de calibração. ....	38

<b>Figura 16:</b> Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a dose diagnóstica de alfacipermetrina (20,5 µg/garrafa), utilizando mosquitos das espécies <i>An. aquasalis</i> e <i>An. albitarsis</i> . .....	<b>39</b>
<b>Figura 17:</b> Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com tubos com papéis impregnados com a dose diagnóstica de etofenprox (0,5 %), utilizando mosquitos das espécies <i>An. aquasalis</i> e <i>An. albitarsis</i> . .....	<b>41</b>
<b>Figura 18:</b> Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com tubos OMS com papéis impregnados com a dose diagnóstica de alfacipermetrina de 0,05 %, utilizando mosquitos das espécies <i>An. aquasalis</i> e <i>An. albitarsis</i> . .....	<b>43</b>
<b>Figura 19:</b> Curva de <i>knockdown</i> e mortalidade para fêmeas de <i>An. darlingi</i> expostas a dose diagnóstica de etofenprox (20 µg) no tempo diagnóstico de até 45 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas realizados em Cruzeiro do Sul, 2019.....	<b>46</b>
<b>Figura 20:</b> Curva de <i>knockdown</i> e mortalidade para fêmeas de <i>An. darlingi</i> expostas a DD de alfacipermetrina (20,5 µg) no tempo diagnóstico de até 45 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas realizados em Cruzeiro do Sul, 2019.....	<b>47</b>
<b>Figura 21:</b> Curva de <i>knockdown</i> e mortalidade para fêmeas de <i>An. darlingi</i> expostas a DD de etofenprox (0,5 %) nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com tubos OMS com papéis impregnados realizados em Cruzeiro do Sul, 2019.....	<b>48</b>
<b>Figura 22:</b> Curva de <i>knockdown</i> e mortalidade para fêmeas de <i>An. darlingi</i> expostas a DD de alfacipermetrina (0,05 %) nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com tubos OMS com papéis impregnados realizados em Cruzeiro do Sul, 2019 .....	<b>49</b>
<b>Figura 23:</b> Curva de <i>knockdown</i> e mortalidade para fêmeas de <i>An. darlingi</i> expostas as DD de etofenprox em bioensaios de susceptibilidade com (A) Garrafas Impregnadas e (B) tubos OMS com papéis impregnados. ....	<b>50</b>
<b>Figura 24:</b> Curva de <i>knockdown</i> e mortalidade para fêmeas de <i>An. darlingi</i> expostas as DD de alfacipermetrina em bioensaios de susceptibilidade com (A) Garrafas Impregnadas e (B) tubos OMS com papéis impregnados. ....	<b>50</b>



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Dados referentes ao processo de calibração das DD de etofenprox e alfacipermetrina e aos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas ..**25**
- Tabela 2:** Dados referentes aos bioensaios de susceptibilidade, realizados com mosquitos criados em laboratório, com tubos OMS com papéis impregnados, utilizando as DD de etofenprox e alfacipermetrina recomendadas pela OMS.....**27**
- Tabela 3:** Dados referentes aos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas e tubos OMS com papéis impregnados, utilizando as DD de etofenprox e alfacipermetrina com população de *An. darlingi* de campo, no município de Cruzeiro do Sul - AC.....**31**
- Tabela 4:** Número de fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. albitarsis* expostos nos processos de calibração das DD de etofenprox e alfacipermetrina e nos bioensaios de susceptibilidade às D, utilizando garrafas e tubos OMS com papéis impregnados.....**33**
- Tabela 5:** Dados referentes ao processo de calibração da DD de etofenprox para *An. aquasalis*, em ensaios com garrafas impregnadas, no tempo de 30 min e após 24 h de recuperação .....**34**
- Tabela 6:** Percentual de queda/mortalidade das fêmeas de *An. aquasalis* e *An. albitarsis* nos bioensaios de susceptibilidade, realizados com garrafas impregnadas, com a DD de etofenprox (20 µg /garrafa), mostrando também o número de vezes de uso das garrafas.....**35**
- Tabela 7:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaio de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a DD de etofenprox (20 µg/garrafa), utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis* .....**38**
- Tabela 8:** Dados referentes ao processo de calibração da DD de alfacipermetrina para *An. aquasalis*, em ensaios com garrafas impregnadas, no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24h de recuperação.....**39**
- Tabela 9:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaio de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a DD de alfacipermetrina (20,5 µg /garrafa), utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis* .....**40**
- Tabela 10:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas, utilizando fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. abitarsis*,

com a DD de alfacipermetrina (20,5 µg /garrafa), mostrando o número de vezes de uso das garrafas.....	41
<b>Tabela 11:</b> Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade realizados com tubos OMS com a DD de etofenprox de 0,5 %, utilizando fêmeas de mosquito de <i>An. aquasalis</i> e <i>An. albitarsis</i> .....	41
<b>Tabela 12:</b> Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade realizados com tubos OMS com a DD de alfacipermetrina de 0,05 %, utilizando fêmeas de mosquito de <i>An. aquasalis</i> e <i>An. albitarsis</i> .....	43
<b>Tabela 13:</b> Quantitativo e percentual de adultos das espécies de <i>Anopheles</i> coletadas nos pontos 1, 2 e 3 do município de Cruzeiro do Sul - Acre, 2019.....	44
<b>Tabela 14:</b> Número de fêmeas de mosquito de <i>An. darlingi</i> expostos às DD de etofenprox e alfacipermetrina nos bioensaios de susceptibilidade, utilizando garrafas e tubos OMS com papéis impregnados, realizados no município de Cruzeiro do Sul – Acre, 2019. ....	45
<b>Tabela 15:</b> Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas e tubos OMS, com as DD de etofenprox e alfacipermetrina, utilizando fêmeas de mosquito de <i>An. darlingi</i> .....	45
<b>Tabela 16:</b> Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a DD de etofenprox (20 µg /garrafa) e de alfacipermetrina (20,5 µg /garrafa), utilizando mosquitos das espécies <i>An. darlingi</i> .....	46
<b>Tabela 17:</b> Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade realizados com tubos OMS com a DD de etofenprox (0,5 %) e de alfacipermetrina (0,05 %), utilizando fêmeas de mosquito de <i>An. darlingi</i> .....	48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE	Acetilcolinesterase
BRI	Borrifação Residual Intradomiciliar
CA	Carbamato
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DD	Dose Diagnóstica
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IPA	Incidência Parasitária Anual
<i>kdr</i>	<i>knockdown resistance</i>
<i>KdT</i>	Ensaio do tipo tempo de <i>knockdown</i>
MILD	Mosquiteiros Impregnados de Longa duração
Nav	Canal de sódio regulado por voltagem
NN	Neonicotinoides
OC	Organoclorado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Organofosforado
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
PY	Piretroide
SIVEP	Sistema de Vigilância Epidemiológica
TAHP	Técnica de Atração por Humano Protegido
USAID	United States Agency for International Development

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos epidemiológicos da malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, também conhecida como paludismo, maleita ou sezão, cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Plasmodium* (MS, 2019a).

Atualmente são conhecidas cinco espécies de protozoários que podem causar malária humana, são elas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. As duas últimas espécies ocorrem apenas em regiões restritas da África e da Ásia (MS, 2019a). Além dessas, existem relatos de infecção acidental de humanos por *Plasmodium simium* na região da Mata Atlântica, no estado do Rio de Janeiro (BRASIL et al., 2017) e de infecção natural por *Plasmodium cynomolgi* na Malásia (GRIGNARD et al., 2019) e por *Plasmodium brasilianum* na Venezuela (LALREMRUATA et al., 2015).

De um modo geral, as espécies parasitárias *P. malariae* e *P. vivax* manifestam as formas clínicas mais brandas, enquanto a espécie *P. falciparum* pode causar as formas mais graves da doença, principalmente em crianças e gestantes, que podem evoluir para malária grave, caracterizada por manifestações clínicas e laboratoriais específicas (MS, 2010).

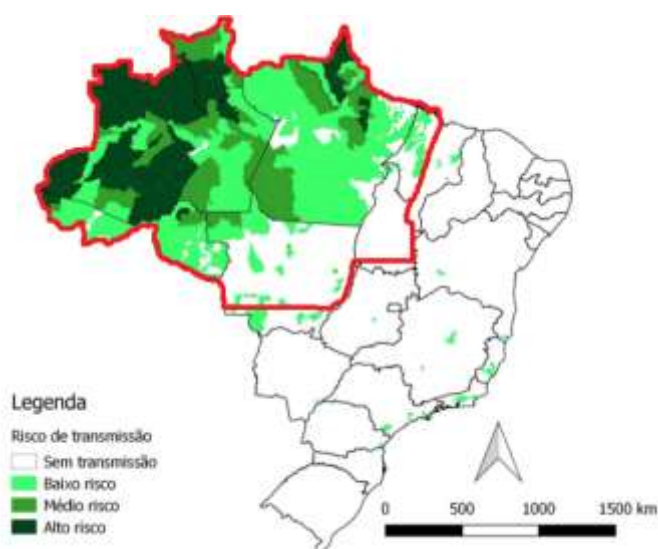
A malária ainda permanece como um sério problema de saúde pública, por sua gravidade clínica e alto potencial de disseminação, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2018a).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), divulgados por meio do relatório mundial sobre malária, reportam que, em 2017, ocorreram 219 milhões de casos e destes 435.000 evoluíram para óbito. A maior carga da doença está na África, que concentra 92% dos casos. Destaca-se ainda que 3,2 bilhões de pessoas, cerca de 40 % da população mundial, estão sob o risco de contrair a doença (WHO, 2018a).

De acordo com o referido relatório, o continente americano registrou aumento da incidência da malária no ano de 2017, principalmente devido ao acréscimo do número de casos registrados no Brasil, Nicarágua e Venezuela (WHO, 2018a).

Em 2018, foram registrados no Brasil cerca de 196.000 casos de malária. Quando comparado com os dados do ano anterior, no qual foram notificados 194.590 casos, observa-se que não houve progresso na redução da transmissão neste período (MS, 2019b). Quanto ao número de óbitos<sup>1</sup>, o registro mais recente é referente ao ano de 2017, quando foram notificadas 34 mortes por malária no país (MS, 2017).

No Brasil, a área de maior endemicidade é a região da Amazônia Legal (Figura 1), composta por nove estados brasileiros (Amazonas, Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Tocantins, Pará, Mato Grosso e Maranhão), que concentra mais de 99 % dos casos. Vale destacar que, apesar da Amazônia Legal ser uma área de alto risco para ocorrência de malária, a distribuição dos casos é heterogênea, pois os estados que compõem a referida região apresentam perfis epidemiológicos diferentes (BRAZ et al., 2013).



**Figura 1:** Mapa de risco da malária por local de ocorrência da infecção no Brasil, 2017. Em vermelho, área correspondente à Amazônia Legal.

**Fonte:** <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/16/Mapa-de-risco-mal--ria-2017.pdf>

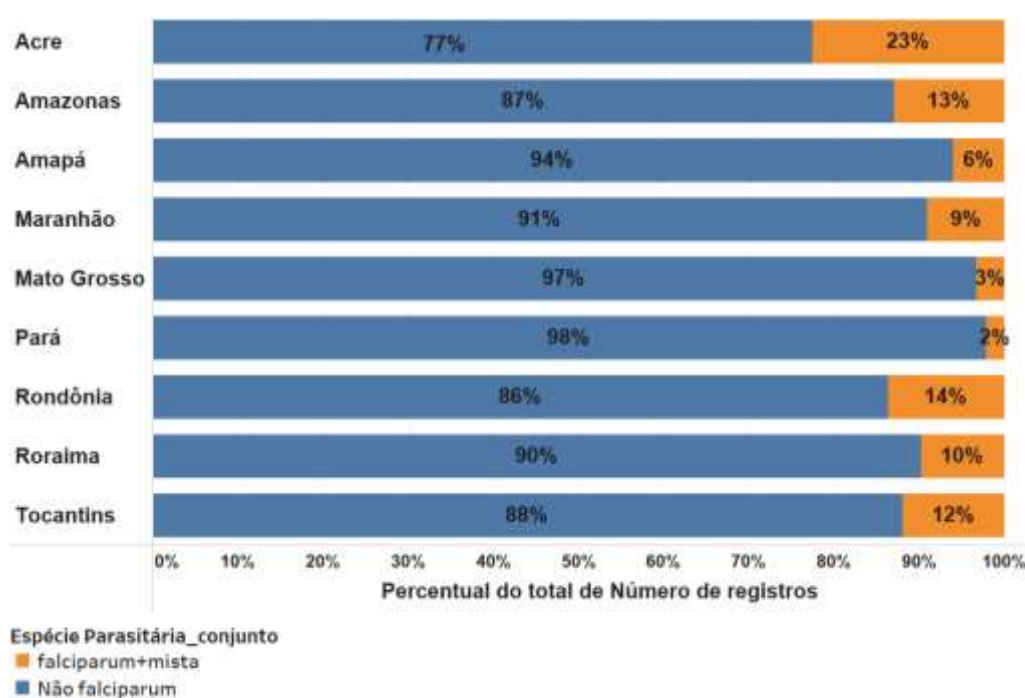
No ano de 2018, os estados do Acre e Amazonas apresentaram o maior percentual de participação no número de casos de malária do país. Juntos, concentraram mais de 51 % dos casos notificados no território brasileiro, com participação de 14 % e 37 %, respectivamente (MS, 2019b).

---

<sup>1</sup> O dado de mortalidade é referente ao ano de 2017, tendo em vista os prazos estabelecidos no Art. 37 da portaria Nº 116, 11 de fevereiro de 2009, o qual define que a divulgação dos dados de mortalidade se dá em 30 de dezembro do ano subsequente ao ano de ocorrência, em caráter oficial.

Segundo informações do Sistema de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde - SIVEP- Malária, em 2018 foram diagnosticados 26.306 casos de malária no estado do Acre. Ao comparar o número de casos registrados em 2018 com os dados do ano anterior, o estado do Acre apresentou redução de 28,21 % no total de casos da doença (MS, 2019b).

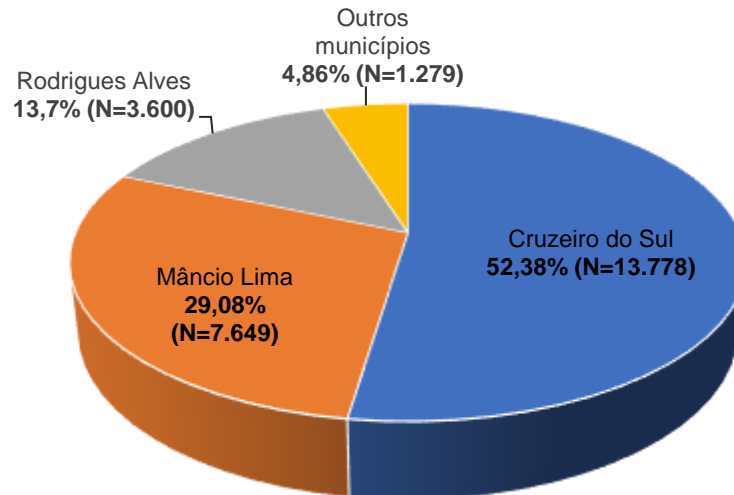
De acordo com os dados do SIVEP- Malária, em 2018, do total de casos registrados no estado do Acre, 23% foram ocasionados por *Plasmodium falciparum* e malária mista, considerada a forma mais grave da doença (Figura 2). Cabe destacar que o Acre apresentou o maior percentual destes casos quando comparado aos demais estados da região amazônica (MS, 2019b).



**Figura 2:** Percentual de casos de Malária, segundo espécie parasitária, por UF de notificação, região amazônica - Brasil, 2018.

**Fonte:** [https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep\\_regioAmaznica\\_2019\\_10\\_31/casos\\_notificados\\_2019\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep_regioAmaznica_2019_10_31/casos_notificados_2019_regio_Amaznica).

Ao analisar a distribuição dos casos de malária registrados no estado do Acre (Figura 3), por município de notificação, é possível verificar que mais de 50 % dos casos foram registrados no município de Cruzeiro do Sul, que junto com os municípios de Mâncio Lima e Rodrigues Alves concentram mais de 95 % dos casos de malária registrados no estado (MS, 2019b).



**Figura 3:** Distribuição do número e percentual de casos de malária, por municípios endêmicos, do estado do Acre, 2018.

**Fonte:** [https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep\\_regioAmaznica\\_2019\\_10\\_31/casos\\_notificados\\_2019\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep_regioAmaznica_2019_10_31/casos_notificados_2019_regio_Amaznica).

Outro dado importante a ser mencionado é a Incidência Parasitária Anual (IPA) dos municípios pertencentes a áreas endêmicas de malária do Brasil, que expressa a estimativa de risco de ocorrência da doença em uma determinada população (MS, 2019a).

De acordo com uma lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária divulgada pelo Ministério da Saúde, três municípios situados no estado do Acre: Mâncio Lima (IPA de 422,9 casos/1.000 hab), Rodrigues Alves (IPA de 226,0 casos/1.000 hab) e Cruzeiro do Sul (IPA de 147,5 casos/1.000 hab), estão entre os nove municípios de maior risco para ocorrência da doença no país (MS, 2019c).

## 1.2 Vetor

A transmissão da malária ocorre quando fêmeas de mosquitos anofelinos infectivas e infectadas com o agente etiológico inoculam as formas infectantes do plasmódio pela saliva, no momento do repasto sanguíneo (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Estima-se que aproximadamente 70 espécies de anofelinos sejam capazes de transmitir o parasita (FORATTINI, 2002).

Nas Américas, as principais espécies de vetores de *Plasmodium* são amplamente distribuídas em diferentes biomas e apresentam alta variabilidade nos padrões comportamentais (LAPORTA et al., 2015).

No Brasil, são conhecidas 54 espécies *Anopheles* e os principais vetores pertencem a dois subgêneros: *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (DEANE, 1986; TADEI & DUTARY, 2000).

De acordo com Carlos et al. (2019), existem três sistemas de transmissão de malária distintos no Brasil (Figura 4), que são mantidos por diferentes espécies de *Anopheles* e que apresentam características eco-epidemiológicas distintas.



**Figura 4:** Mapa dos sistemas de transmissão de malária no Brasil, 2019.  
**Fonte:** <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1581463>.

O sistema de transmissão mais importante está localizado na região da Floresta Amazônica e tem como principal vetor o *Anopheles darlingi* Root, 1926. Outro sistema existente, menos relevante, porém estável, ocorre na Mata Atlântica e envolve as espécies do gênero de *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 e *Anopheles bellator* Dyar & Knab, 1906. Por fim, o terceiro sistema, menos perceptível, responsável pela ocorrência dos surtos de malária, principalmente por *P. vivax*, é encontrado ao longo do litoral brasileiro e tem como vetor principal o *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 (CARLOS et al., 2019).

O principal vetor de plasmódios que causam malária no Brasil é *An. darlingi* (DEANE, 1986; OSORIO et al., 1996; TADEI et al., 1998) devido ao seu comportamento altamente antropofílico e endofágico, uma vez que apresenta alto potencial de se infectar com plasmódios humanos e transmiti-los no intra e



peridomicílio, com pico de atividade em horário crepuscular, podendo se estender ao longo da noite (DANIEL- RIBEIRO et al., 1990; COUTO et al., 2007). Além de ser antropofílico, adapta-se rapidamente e se beneficia de ambientes antropizados e possui capacidade de manter a transmissão ativa da doença mesmo em áreas de baixa densidade populacional de mosquitos, fatores que aumentam sua importância como vetor de plasmódios no país (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

*Anopheles darlingi* se desenvolve em águas profundas, límpidas, relativamente sombreadas, com pouca matéria orgânica e de baixo fluxo. No entanto, em locais que apresentam alta densidade do vetor, a espécie se reproduz em outros tipos de criadouro, tais como pequenas coleções hídricas e criadouros temporários (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Vale ressaltar que existem outras espécies com importância epidemiológica no Brasil, tais como: espécies do Complexo *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga, 1878, *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922), *Anopheles oswaldoi* Peryassú, 1922 e *Anopheles nuneztovari* Gabaldon, 1940 pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*, bem como *Anopheles homunculus* Komp, 1937 do subgênero *Kerteszia* (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; ROSA- FREITAS et al., 1998).

### **1.3 Estratégias de Controle da Malária**

O Brasil, apesar de apresentar redução do número de casos nos últimos cinco anos, ainda é um dos países com elevado número de casos de malária. Essa situação ocorre desde a segunda metade dos anos 1960, devido aos fatores geográficos, biológicos, ecológicos e ocupação acelerada e desordenada da região amazônica (BRAZ et al., 2013).

O Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) estabeleceu como política nacional o Controle Integrado da Malária, baseado na Estratégia Global para Malária adotada após a Conferência Interministerial de Amsterdã, patrocinada pela OMS, que ocorreu em outubro de 1992 (LAPOUBLE et al., 2015).

A Estratégia Global para Malária, além de mudar o foco do controle vetorial (mosquito) para o indivíduo doente (homem), incorporou medidas de controle integrado, preconizando três conjuntos de atividades (BARATA, 1995):

a) **Gestão da doença** consiste nas atividades relacionadas ao diagnóstico e tratamento dos casos de malária. O acesso ao diagnóstico oportuno e tratamento adequado, além de curar e reduzir o risco de complicações, permite a interrupção da cadeia de transmissão da doença, uma vez que diminui a produção de gametócitos. Desta forma, é fundamental a adoção dessas medidas, pois quanto mais precocemente o indivíduo for tratado, menos disseminará a doença.

b) **Prevenção da doença** inclui planejamento e implementação de medidas integradas e seletivas de controle vetorial, considerando as características das comunidades e a dinâmica de transmissão em cada localidade. Para realização adequada dessas atividades é crucial que as áreas a serem trabalhadas sejam estratificadas com base nas informações epidemiológicas e entomológicas geradas em âmbito local, haja vista que o uso de tais informações irá direcionar adequadamente para as áreas que deverão ser trabalhadas e, dessa forma, permitirá o uso eficaz dos recursos disponíveis, principalmente quanto ao uso mais racional de inseticidas no controle vetorial.

c) O terceiro conjunto de atividades refere-se à **prevenção e controle de epidemias**, incluindo o monitoramento regular do *status* da transmissão malária, quanto aos fatores condicionantes e determinantes, principalmente os de cunho social, econômico e ecológico.

Diante das novas estratégias recomendadas na conferência supracitada, o Brasil estabeleceu como política nacional o controle integrado da malária, que tem como pilar as seguintes intervenções: diagnóstico precoce, o tratamento oportuno dos casos da doença e as medidas seletivas de controle vetorial, considerando a estratificação de risco e as características particulares de transmissão existentes em cada localidade (LAPOUBLE et al., 2015).

#### **1.4 Controle Vetorial**

O controle de vetores é um dos principais componentes de prevenção da malária (WHO, 2019a), uma vez que o objetivo é reduzir o contato do homem com o vetor por meio do uso de barreiras físicas e/ ou químicas que impedem ou diminuem a chance de contato. Quando bem realizadas, estas medidas podem ter grande impacto, reduzindo a densidade de mosquitos (MS, 2005).

No Brasil, as primeiras ações de controle vetorial ocorreram na década de 1920 e consistiram em manejo de criadouros e controle larvário, com o uso do larvicida Verde-Paris (DEANE, 1988; GADELHA, 1998).

Após a descoberta do DDT (diclorodifeniltricloroetano) na metade do século XX, ocorreu mudança no foco dos métodos de controle do vetor e a principal ação passou a visar o controle do mosquito adulto (DEANE, 1988). No Brasil, a primeira aplicação de DDT no intradomicílio foi realizada no ano de 1945 no município de Breves no estado do Pará (TAUIL et al., 1985). Diante do sucesso, o DDT foi utilizado sistematicamente em outros estados, como Amapá, Rondônia e Amazonas (DEANE et al., 1948; LOURENÇO-de-OLIVEIRA et al., 1989). De acordo com Hochman (2008), o uso de DDT em toda a Amazônia foi realizado oficialmente apenas no ano de 1960.

Contudo, o uso do DDT nas atividades de saúde pública foi proibido no Brasil em 1998 devido aos danos que pode causar ao homem, bem como à fauna e à flora (Portaria nº11 Ministério da Saúde/ Diário Oficial da União de 21 de janeiro de 1998).

Apesar dos esforços feitos pelo Governo, por meio de elaboração e implementação de diferentes estratégias para redução dos casos de malária, a região amazônica permaneceu como área de alto risco para ocorrência da doença (LOIOLA, 2002). Por fim, no intuito de enfrentar essa situação, em 2003 foi estabelecido o PNCM, que consiste em diretrizes para os governos federal, estaduais e municipais, quanto às ações a serem realizadas (MS, 2009).

As medidas seletivas de controle vetorial recomendadas pelo PNCM no Brasil são: Borrifação Residual Intradomiciliar (BRI), implantação de Mosquiteiros Impregnados de Longa Duração (MILD), termonebulização e controle de criadouros. É importante destacar que as medidas devem ser utilizadas pelos municípios de acordo com os recursos disponíveis e considerando a situação epidemiológica e entomológica de cada localidade, a fim de que a medida de controle vetorial seja eficiente e efetiva. Além disso, para melhor efetividade das medidas de controle vetorial, é essencial que sejam realizadas atividades educativas e de sensibilização da comunidade para explicitar a importância dessas medidas (MS, 2009).

Dentre as estratégias de controle vetorial com uso de inseticida, destaca-se a BRI que deve ser realizada com base nos dados de distribuição dos casos de malária, nas características do vetor e das habitações. Para que a intervenção seja eficiente é necessário alcançar cobertura mínima de 80 % das residências das localidades

selecionadas, cumprir os ciclos de borrifação de acordo com a residualidade do inseticida, bem como realizar as aplicações de acordo com os parâmetros técnicos estabelecidos, a fim de garantir a qualidade da borrifação (MS, 2009).

MILD é outra medida de controle vetorial que prevê o uso de inseticida. De acordo com o Ministério da Saúde, esta estratégia deve ser implementada em áreas que apresentem evidências de transmissão intradomiciliar e devem ser cumpridos critérios operacionais rigorosos para o alcance do impacto esperado, tais como: distribuição e instalação gratuitas, ações educativas para sensibilização da população quanto à importância do uso e lavagem adequada dos mosquiteiros, bem como acompanhamento sistemático quanto à adesão e às condições físicas das redes impregnadas (MS, 2009).

Cabe destacar que nem todas as localidades são passíveis de ações de BRI e uso de MILD devido às características das casas, condições ambientais, hábitos dos indivíduos e comportamento dos vetores (MS, 2009).

Outra intervenção de controle vetorial com uso de inseticida recomendada pelo PNCM é a termonebulização, que consiste na aplicação espacial de inseticida por meio de equipamentos manuais que atingem altas temperaturas. É importante destacar que é uma estratégia que deve ser utilizada apenas em casos de surto e/ou epidemias, tendo em vista o alto custo operacional e o fato de sua efetividade ser limitada (MS, 2009).

Além das medidas supracitadas, atividades de manejo ambiental por meio de limpeza da vegetação das margens dos criadouros, drenagem de açudes, aterro de potenciais criadouros e pequenas obras de saneamento, podem reduzir a densidade larvária de anofelinos, sendo estas medidas de suma importância para o controle do vetor (MS, 2006).

Vale ressaltar que a OMS publicou recentemente a 1ª edição das diretrizes para o controle do vetor da malária, que consiste em novas recomendações por meio de revisões sistemáticas baseadas em evidências sobre a eficácia das operações de controle de vetores, bem como em recomendações já existentes desenvolvidas com base na opinião de especialistas (WHO, 2019a).

As diretrizes dividem as ações de controle em: intervenções centrais, suplementares, medidas de proteção individual e outras intervenções. As intervenções

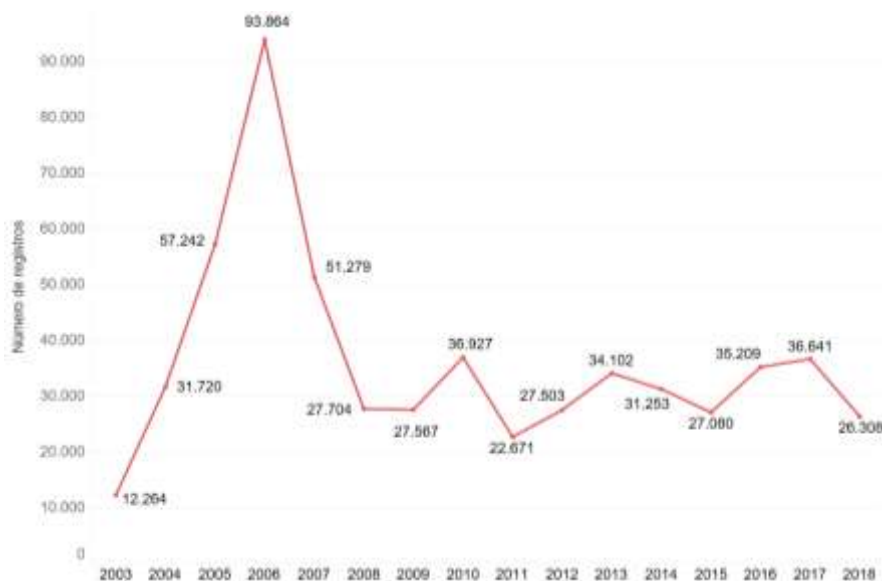
centrais são as ações de implantação de mosquiteiros impregnados com inseticida e a BRI, que devem ser aplicadas para todas as populações sob risco de contrair malária. As intervenções suplementares, uso de larvicidas químicos ou biológicos, poderão ser usadas de forma complementar às intervenções centrais, considerando as especificidades locais (WHO, 2019a). Vale destacar que as ações de termonebulização não foram recomendadas nesse novo documento da OMS.

#### **1.4.1 Histórico das Ações de Controle da Malária no Acre**

No final do século XIX, início da exploração da borracha, o estado do Acre, assim como outros estados da Amazônia, apresentou aumento da incidência de malária, possivelmente devido à imigração intensa de brasileiros, em sua maioria nordestinos, para a região (CESÁRIO & CESÁRIO, 2006).

Ao longo dos anos ocorreram modificações no perfil epidemiológico da malária no Acre, pois observou-se que a incidência da doença regrediu geograficamente, concentrando-se nos municípios da região do vale do Juruá, possivelmente devido a fatores relacionados à estruturação viária, urbanização e programas de prevenção e controle da malária (LANA, 2017).

Contudo, no ano de 2006 ocorreu uma epidemia de malária sem precedentes na história do Acre. Naquele ano foram notificados 93.864 casos da doença (Figura 5), dos quais, 90 % ocorreram nos municípios da região do Vale do Juruá, principalmente Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves (MS, 2019d).



**Figura 5:** Número de casos de malária notificados no Estado do Acre no período de 2003 a 2018.  
**Fonte:** [https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Dadosparacidade\\_2019/Autctone\\_Municipio](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Dadosparacidade_2019/Autctone_Municipio).

Os fatores que determinaram o aumento da incidência de casos a partir de 2004, especificamente nos municípios supracitados, foram: proximidade da população a ambientes favoráveis à transmissão da doença, mobilidade intensa de pessoas vindas de áreas de risco para áreas de baixo risco para ocorrência da doença, aumento do número de tanques de piscicultura e dificuldades operacionais do serviço local de vigilância e controle (CONFALONIERI, 2005).

Diante do quadro de epidemia, o governo do estado do Acre, em parceria com as prefeituras dos municípios e o Ministério da Saúde, elaborou e implementou um plano de intensificação das ações de prevenção e controle da malária, cujas principais estratégias foram: atividades pedagógicas junto às comunidades, contratação de profissionais qualificados, aquisição de testes rápidos para diagnóstico da malária, destinados, especialmente, a áreas remotas e de difícil acesso, organização das atividades de busca ativa de casos a fim de viabilizar o diagnóstico oportuno e tratamento precoce de infectados, ampliação do número de postos de diagnóstico, controle seletivo de vetores, introdução de novo medicamento para tratamento de malária por *P. falciparum* (combinação artesunato/mefloquina) produzido por Farmanguinhos®, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ (COSTA et al., 2010).

Após epidemia enfrentada no Acre no ano de 2006, as atividades de controle vetorial passaram a ser realizadas de forma integrada, tendo em vista a necessidade de reduzir ou interromper a transmissão da doença. São elas:

#### **a. Aplicação de Biolarvicida**

Uma das estratégias utilizadas foi aplicação de biolarvicida à base de *Bacillus sphaericus* em criadouros artificiais, principalmente tanques de piscicultura, a fim de reduzir a densidade vetorial. Vale ressaltar que essa ação fez parte de um projeto piloto desenvolvido nos municípios de Cruzeiro do Sul, Rodrigues Alves e Mâncio Lima, sendo que todos os criadouros identificados foram devidamente mapeados, inspecionados e tratados de acordo com suas especificidades pela equipe de entomologia da divisão de endemias (MAGALHÃES, 2007).

#### **b. Manejo Ambiental**

A ação de manejo ambiental foi realizada pela Divisão de Endemias estadual, tendo em vista a existência de muitos criadouros em condições favoráveis à proliferação do vetor e sem os devidos cuidados por parte dos responsáveis (COSTA et al., 2010). No entanto, após o período epidêmico, foram firmadas parcerias com as

associações de piscicultores a fim de responsabilizar os proprietários quanto à manutenção adequada dos tanques de piscicultura (potenciais criadouros) (PAHO, 2013).

#### **c. Termonebulização (FOG)**

No período epidêmico, assim como preconizado pelo Ministério da Saúde à época, foram realizadas ações de termonebulização. Entretanto, após o período crítico, essa atividade foi executada de forma racional, tendo em vista que a mesma não pode ser empregada como atividade de rotina. É válido ressaltar que esta estratégia não foi utilizada durante alguns anos no estado e, após análise da equipe local, não foi observada nenhuma influência negativa nos dados epidemiológicos do Acre (PAHO, 2012).

#### **d. Borrifação Intradomiciliar**

Foram realizadas as ações de borrifação intradomiciliar com base na estratificação das áreas de risco, bem como nas características das localidades seguindo as normas técnicas de aplicação.

Para o alcance da cobertura mínima da borrifação e cumprimento dos ciclos anuais, foram realizadas atividades de educação em saúde e parceria com o Ministério Público, a fim de reverter as recusas por parte dos moradores, sensibilizando os mesmos sobre a importância das aplicações como medida de prevenção (PAHO, 2012).

#### **e. Mosquiteiros Impregnados de Longa Duração - MILD**

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), no ano de 2007, junto ao PNCM, com recursos da United States Agency for International Development (USAID), fez uma doação de 7.000 unidades de mosquiteiros impregnados com deltametrina, que foram utilizados em 13 localidades dos municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves no vale do rio Juruá. Foram obtidos resultados positivos adotando metodologia específica para a distribuição e instalação destes mosquiteiros (PAHO, 2008).

Antes da distribuição dos mosquiteiros, foi aplicado questionário para avaliar os hábitos e costumes da população, as condições de moradia, além de verificar se havia pré-disposição quanto ao uso do mosquiteiro como meio de proteção individual (PAHO, 2008).

Posterior à distribuição, foi aplicado questionário para avaliar a adesão da população, bem como para identificar possíveis problemas decorrentes do uso das redes impregnadas. Após consolidação dos dados foi observado que a adesão ao uso dos mosquiteiros foi satisfatória, pois 97 % da população informou que havia utilizado os mosquiteiros na noite anterior (PAHO, 2008).

Com a avaliação inicial positiva de adesão aos mosquiteiros pela comunidade, o governo do estado do Acre implantou a estratégia em 100 % das áreas de alto risco para ocorrência de malária (PAHO, 2013).

### **Vigilância entomológica**

Apesar de todas essas ações, desde 2008, o estado do Acre não realiza estudo entomológico com anofelinos, devido à ação civil pública ajuizada pelo Ministério Público Federal no Acre, que proíbe a realização de captura de *Anopheles* por atração por humano protegido. A suspensão das atividades ocorreu por falta de protocolo técnico, bem como plano de mitigação de riscos à saúde dos profissionais, sendo liberadas as atividades apenas após apresentação destes documentos (MPF – AC, 2008). Contudo, o Ministério da Saúde publicou um guia para ações de captura de anofelino pela técnica de atração por humano protegido (TAHP) e acompanhamento dos riscos à saúde do profissional capturador em julho de 2019 (MS, 2019e). Espera-se que com a publicação desse guia as atividades de vigilância possam ser retomadas.

## **1.5 Classes de Inseticidas**

Atualmente a OMS qualifica cinco classes de inseticidas para serem utilizadas nas intervenções de controle vetorial da malária (WHO, 2019b), sendo que apenas quatro classes são pré-qualificadas para o uso nas ações de BRI. Os compostos dividem-se em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides e neonicotinoides; todos atuam no sistema nervoso central dos insetos (BRAGA & VALLE, 2007).

### **1.5.1 Organoclorados**

O grupo dos organoclorados é considerado o pioneiro dos inseticidas sintéticos. A estrutura molecular desses inseticidas é composta de carbono,



hidrogênio e cloro (WARE & WHITACRE, 2004). O DDT possivelmente é o inseticida mais conhecido dentre os pertencentes à classe dos organoclorados. Foi sintetizado pela primeira vez por Zeidler em 1874, porém, apenas em 1939 teve suas propriedades inseticidas descobertas por Paul Muller e então passou a ser utilizado nos programas de controle da malária (WARE & WHITACRE, 2004).

Os organoclorados agem nos canais de sódio (Na) e potássio (K) das células nervosas do sistema nervoso central, destruindo o equilíbrio entre os íons, impedindo a transmissão normal dos impulsos nervosos. Também podem atuar sobre o receptor ácido gama-aminobutírico (GABA), que participa do mecanismo inibitório de transmissão (WARE & WHITACRE, 2004).

No entanto, devido a estudos que indicaram persistência no meio ambiente e o acúmulo desses inseticidas em tecidos do organismo de humanos, houve pressões internacionais e nacionais que culminaram na proibição ou restrição do uso de organoclorados na saúde pública (BRAGA & VALLE, 2007). No Brasil, a fabricação, armazenamento, comercialização e uso do DDT foram proibidos pela lei de nº 11936, de 14 de maio de 2009. Além disso, o referido inseticida não é pré-qualificado pelo grupo de controle de vetores da equipe de Pré-Qualificação (PQT-VC) da OMS para ações de BRI (WHO, 2019b).

### **1.5.2 Organofosforados**

Os organofosforados constituem uma classe de inseticida que apresenta fósforo em sua composição. Foram descobertos posteriormente aos organoclorados e são divididos em três grupos: alifáticos, derivados de fenil e os derivados de heterocíclicos. A estrutura molecular e o mecanismo de ação destes inseticidas são similares aos dos gases neurotóxicos (WARE & WHITACRE, 2004).

Os compostos desta classe são muito utilizados em ações de saúde pública pelos programas de controle vetorial, por apresentarem alta eficiência e baixa toxicidade aos mamíferos (WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007). No Brasil, é recomendado o uso de organofosforado apenas em ação de nebulização espacial para o controle do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), vetor do vírus da dengue, chikungunya e Zika (MS, 2019f).

O modo de ação dos organofosforados ocorre por meio da inibição da enzima acetilcolinesterase (ACE), presente nas sinapses. Isto ocorre devido a uma ligação irreversível da mesma com o inseticida em um processo denominado de fosforilação.

A inibição da enzima resulta no acúmulo de acetilcolina na sinapse nervosa, levando à hiperexcitação do sistema nervoso, ocasionando contrações rápidas dos músculos voluntários, o que provoca a paralisia e, conseqüentemente, a morte do inseto (BISSET, 2002; WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007).

### **1.5.3 Carbamatos**

Desenvolvidos na Suíça em 1947, os inseticidas carbamatos são compostos por ésteres ácidos derivados do ácido carbâmico. Assim como os organofosforados, têm como alvo a acetilcolinesterase; apresentam ação rápida nos insetos, porém, têm baixo poder residual (CASIDA & QUISTAD, 1998; BRAGA & VALLE, 2007).

Os carbamatos agem na inibição da acetilcolinesterase por meio de uma reação de carbamilação. Após a reação, a enzima é rapidamente hidrolisada e desativada, impedindo sua atuação na degradação da acetilcolina. Apesar da atuação do carbamato ser semelhante à dos organofosforados, o mesmo apresenta duas diferenças. A primeira consiste no fato de que alguns carbamatos são fortes inibidores de aliesterase (esterase alifática, cuja função exata ainda não é conhecida) e a outra diferença é que a inibição de acetilcolinesterase por carbamatos é algo reversível (WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007).

Atualmente, no Brasil, o uso de carbamatos é recomendado para intervenção química em pontos estratégicos para o controle de *Ae. aegypti* (MS, 2019f).

### **1.5.4 Piretroides**

Os piretroides são inseticidas sintéticos compostos por grupos de ésteres derivados de piretrinas naturais, extraídas de flores de crisântemo (ZERBA, 1988). Constituem-se de produtos de alta eficácia no controle de pragas de importância econômica (VIJVERBERG & BERCKEN, 1990), além de serem bastante empregados em programas de saúde pública, uma vez que apresentam baixo grau de toxicidade ao homem e a outros animais (RANSON et al., 2011; KARUNAMOORTHY & SABESAN, 2013).

Os inseticidas pertencentes a esta classe agem de modo similar ao DDT, mantêm abertos os canais de sódio nas membranas dos axônios, afetando o sistema nervoso central e periférico do inseto, provocando paralisia rápida e morte (WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007).

O modo de ação dos piretroides causa um efeito conhecido como “*knockdown*”, visto que, após a exposição ao inseticida por pouco tempo, os insetos caem, aparentando estarem mortos. Contudo, caso a dose utilizada não tenha sido efetiva, depois de algum tempo, os insetos recuperam-se e podem tornar-se ativos novamente (BISSET, 2002; BRAGA & VALLE, 2007; NYKA et al., 2013).

Dentre as classes de inseticidas preconizados pela OMS para o controle do vetor, o PNCM adotou inseticidas da classe dos piretroides, especificamente etofenprox nas ações de BRI (MS, 2014) e o lambdacialotrina nas ações de termonebulização em casos de surtos e epidemias (MS, 2011).

### **1.5.5 Neonicotinoides**

Os neonicotinoides formam uma nova classe de inseticidas, sintetizados a partir da molécula da nicotina. Apresentam baixa toxicidade, eficácia alta, possibilidade de aplicação de baixas concentrações em intervalos de tempo maiores, bem como alta seletividade para receptores nicotínicos de insetos (TOMIZAWA & CASIDA, 2003).

Os inseticidas desta classe, atuam como agonistas dos receptores de acetilcolina, localizados nas membranas pós-sinápticas, provocando hiperatividade nervosa, paralisia e a morte do inseto (TOMIZAWA & CASIDA, 2003; WARE & WHITACRE, 2004).

## **1.6 Resistência a Inseticidas**

Conforme mencionado no tópico anterior, a OMS recomenda apenas cinco classes de inseticidas para serem utilizadas nas intervenções de controle químico da malária, que apresentam somente três modos distintos de atuação. Diante disso, há uma maior facilidade para seleção de resistência a inseticidas realizada sobre espécies importantes em saúde pública (KARUNAMOORTHY & SABESAN, 2013).

De acordo com a OMS, resistência é a habilidade de uma população de insetos sobreviver a uma concentração de inseticida que seria letal para a maioria dos indivíduos da população (WHO, 2016).

A propagação desse fenômeno ocorre devido ao uso persistente de inseticidas, que provoca uma pressão seletiva, permitindo que os insetos que apresentam alelo

resistente sobrevivam à dose letal, bem como transmitam a característica de resistência para sua prole (MALLET, 1989).

Os mecanismos que reduzem a sensibilidade dos insetos aos inseticidas são divididos em quatro categorias, são elas:

- **Modificação comportamental**

A modificação comportamental ocorre quando o inseto desenvolve a habilidade de perceber o inseticida e evitar o contato com o composto (HEMINGWAY et al., 2004), até mesmo reduzindo sua entrada nas habitações (MATHENGE et al., 2001).

Este mecanismo foi mais descrito para *Anopheles*, quando na presença de inseticidas nas atividades de BRI e telas impregnadas (SOUGOUFARA et al., 2017). Em estudo feito por Roberts & Alecrim (1991) foi observado que insetos adultos de *An. darlingi*, que tinham hábito de repousar nas paredes das habitações após o repasto sanguíneo, passaram a evitar o contato com superfícies borrifadas com DDT.

- **Resistência metabólica**

A resistência metabólica ocorre quando há o aumento da capacidade de metabolização dos inseticidas por meio de enzimas de detoxificação de xenobióticos (HEMINGWAY & RANSON, 2000). Este mecanismo caracteriza-se pela amplificação, superexpressão ou aumento na especificidade de algumas enzimas, como das classes glutathione-S-transferases (GST), esterases e oxidases de função mista (ou monooxigenases P450), produtos de superfamílias gênicas (RANSON et al., 2002), permitindo aos insetos resistentes a possibilidade de metabolização e degradação dos inseticidas antes de causarem o efeito tóxico no seu organismo (CORBEL & N'GUESSAN, 2013).

- **Penetração reduzida**

Este mecanismo de resistência está associado a modificações nas propriedades físico-químicas da cutícula, diminuindo sua permeabilidade e, conseqüentemente, reduzindo a taxa de penetração do inseticida (GEORGHIOU, 1994).

No entanto, apesar da mudança no nível da cutícula ser a barreira mais documentada, qualquer barreira biológica pode estar relacionada à redução da penetração do inseticida (SAHA, 2016).

- **Modificação nos sítios alvo**

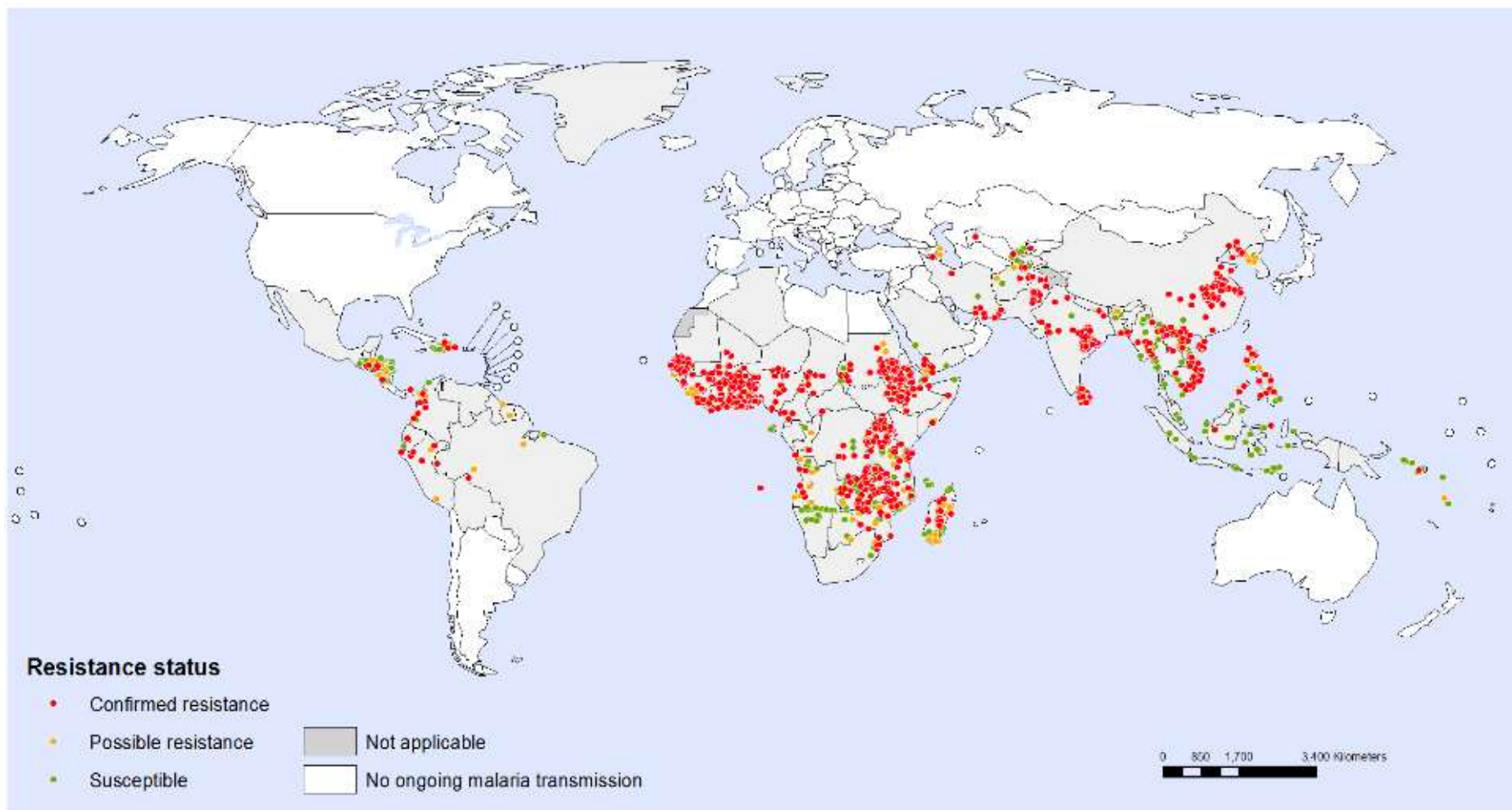
A resistência a inseticidas pode ocorrer devido a modificações nas moléculas alvo desses compostos, dificultando ou impedindo sua ligação ou eliminando seu efeito pesticida (PERRY et al., 2011).

Os inseticidas têm como alvo final moléculas diferentes do sistema nervoso central dos insetos. Um dos alvos é a enzima acetilcolinesterase, para os organofosforados e carbamatos, responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina e, o outro, é o canal de sódio regulado por voltagem (Nav), alvo para DDT e piretroides. Todos são responsáveis por elevar o potencial da atuação dos neurônios no processo de impulsos nervosos, bem como os receptores de acetilcolina, alvo dos neonicotinoides (PERRY et al., 2011; HIMEIDAN et al., 2012; KARAAĞAÇ, 2012).

A resistência a inseticida pode ocorrer, ainda, de forma cruzada ou múltipla. A resistência cruzada refere-se ao fato de um único mecanismo conferir resistência a dois ou mais inseticidas de uma mesma classe ou de classes diferentes. E a resistência múltipla caracteriza-se quando pelo menos dois diferentes mecanismos ocorrem concomitantemente (VALLE et al., 2015).

O conhecimento sobre mecanismos de resistência é fundamental para auxiliar na escolha de inseticidas com modos de ação distintos, bem como para dar subsídio aos programas de controle vetorial para adequações imediatas, no intuito de controlar o desenvolvimento e a disseminação de populações de vetores resistentes (HEMINGWAY & RANSON, 2000).

A OMS tem se preocupado com a resistência de populações de anofelinos aos inseticidas recomendados para uso no controle da malária, tendo em vista que, nos últimos anos, vários países vêm reportando resistência, principalmente em relação à classe dos piretroides (Figura 6). Além disso, Coleman et al (2017) apresentam série histórica do período de 1955 a 2015, que corrobora a resistência em 71 países com malária endêmica e 74 espécies de anofelinos para quatro classes de inseticidas (Figura 7).



**Figura 6:** Situação da suscetibilidade dos vetores relacionados à malária a inseticidas, 2010 a 2015. Mapa global que resume dados de bioensaios realizados com diferentes classes ou tipos de inseticidas, distintas espécies de mosquitos *Anopheles* e múltiplos intervalos de tempo.  
**Fonte:**[http://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/insecticide\\_resistance\\_database/en/](http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/insecticide_resistance_database/en/).

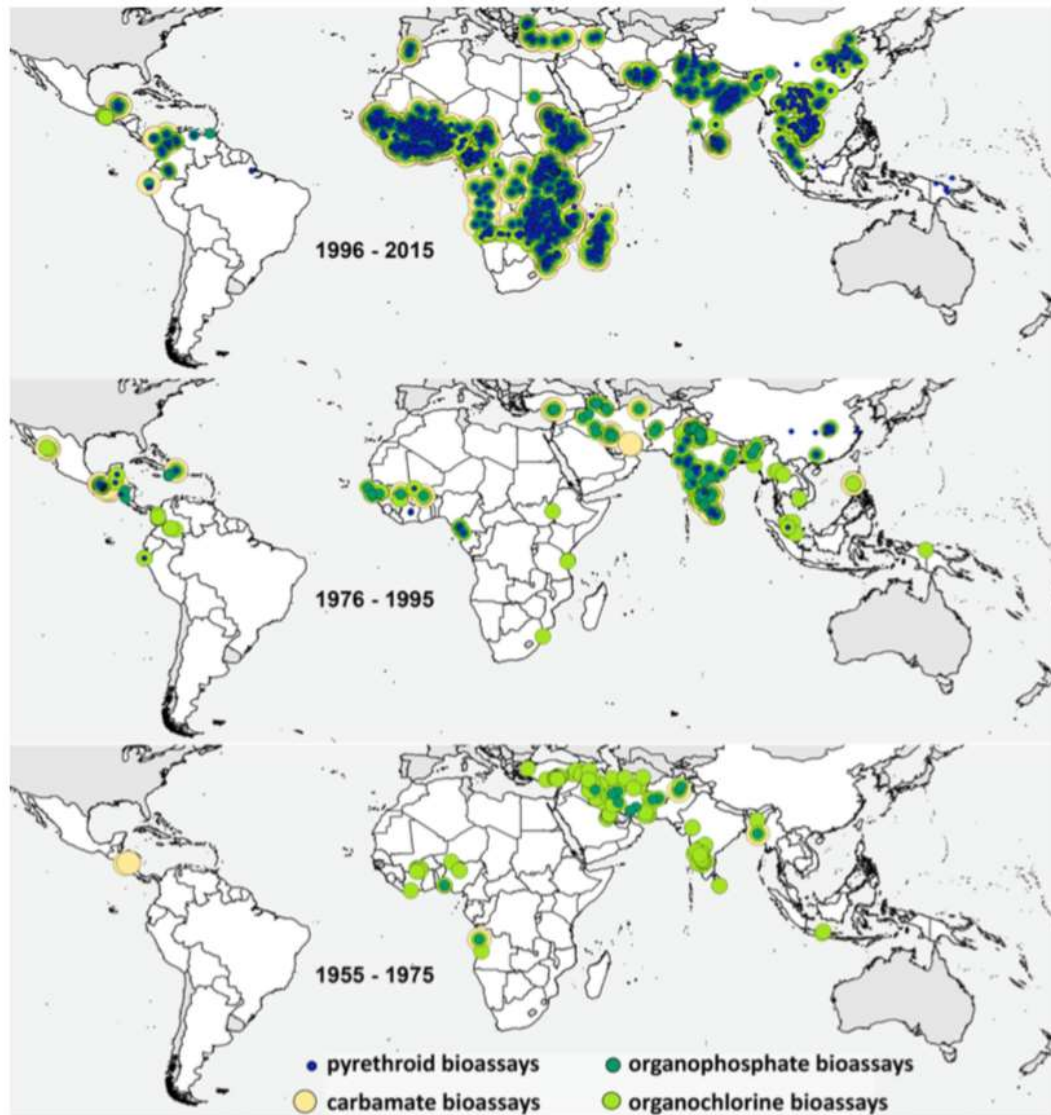


Fig. 1 Distribution of the 13,514 insecticide resistance mortality points collected and geopositioned to date

**Figura 7:** Situação da suscetibilidade dos vetores relacionados à malária a quatro classes de inseticidas, 1955 a 2015.

**Fonte:** Adaptado de Coleman et al. (2017).

As Figuras 6 e 7 mostram que vários países endêmicos reportaram resistência a inseticidas utilizados pelos programas de controle da malária, porém observa-se que, historicamente, quase não há informações do perfil de populações de anofelinos do Brasil quanto à suscetibilidade a inseticidas, devido aos poucos estudos realizados nessa área, bem como à falta de um programa de monitoramento de resistência estruturado para o país. Além disso, a dificuldade de manutenção de *Anopheles* em laboratório, bem como a inexistência de linhagens referência para as espécies vetoras do Brasil, dificultam a realização de ensaios e o estabelecimento de doses que sejam adequadas para o monitoramento da resistência, já que as doses recomendadas e

preconizadas pelos guias da OMS foram obtidas a partir de espécies que não são os principais vetores brasileiros.

Desde 2010, o Programa Global de Malária defende que um melhor monitoramento da resistência é de urgente necessidade e preocupa-se que muitas intervenções são aplicadas com nenhum ou insuficiente esforço de avaliação da resistência, de forma que decisões sobre escolha de inseticidas são tomadas sem considerar dados sobre sua efetividade.

Para detecção de resistência a inseticidas, a OMS recomenda bioensaios com duas metodologias: garrafas impregnadas (BROGDON & MCALLISTER, 1998) e tubos OMS com papéis impregnados (WHO, 1998).

O bioensaio com garrafas impregnadas com inseticidas, metodologia CDC, foi desenvolvido por Brogdon & Mcallister em 1998. Essa metodologia determina o tempo necessário para incapacitar os insetos suscetíveis usando uma dose preestabelecida de inseticida.

O bioensaio com tubos OMS com papéis impregnados mensura as taxas de mortalidade em insetos expostos a uma concentração letal de inseticida por um período fixo de tempo (WHO, 2016).

Apesar de serem técnicas diferentes, as duas metodologias têm apresentado resultados satisfatórios quanto à detecção de resistência de mosquitos a inseticidas. Porém, apresentam vantagens e desvantagens quando é avaliada sua implementação nas ações de vigilância entomológica a serem realizadas pelos diferentes programas de malária (SILVA et al, 2014).

## **1.7 Justificativa**

A malária é uma doença parasitária, cujo patógeno é transmitido por mosquitos do gênero *Anopheles*, que ainda permanece como um sério problema para a saúde pública mundial. É uma doença que compromete atividades diárias, agravando as condições de vida no que se refere à saúde e aos aspectos socioeconômicos (RODRIGUES & NETO, 2011).

O Brasil tem alcançado bons resultados quanto à redução dos casos de malária e uma das estratégias utilizadas é o controle vetorial por meio de intervenções químicas com uso de inseticidas, principalmente da classe dos piretroides.



No entanto, apesar do Brasil ser um país de grande importância epidemiológica e usar inseticidas continuamente nas ações de controle da malária, não há um programa de monitoramento rotineiro da resistência a inseticidas usados em anofelinos nas áreas endêmicas do Brasil. Isso deve-se, em parte, à dificuldade de criação e manutenção de diferentes espécies em laboratório, especialmente *An. darlingi* (SANTOS et al., 2007), falta de linhagens suscetíveis estabelecidas e doses discriminantes adequadas para espécies brasileiras.

Dessa forma, é fundamental conhecer o perfil de suscetibilidade das populações de anofelinos aos inseticidas utilizados atualmente por meio de um monitoramento constante.

Assim, é importante comparar as metodologias recomendadas para detecção de resistência a inseticidas e descrever as peculiaridades do uso e aplicação das referidas metodologias no campo e em laboratório, a fim de que seja possível a realização constante do monitoramento da resistência no Brasil.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivos a calibração de ensaios de garrafas impregnadas e tubos OMS para detecção de resistência a inseticidas usados pelos programas de controle de malária do Norte do Brasil e comparação destes métodos para monitoramento de resistência em populações brasileiras de *An. darlingi*. Propomos a utilização da criação de *An. aquasalis*, mantida no laboratório há mais de 20 anos, como linhagem que possa ser usada como padrão de comparação, já que é uma espécie brasileira, mantida em condições de laboratório há bastante tempo e, para alguns inseticidas e mecanismos de resistência testados, apresenta perfil de susceptibilidade parecido com o de outras linhagens referência já estabelecidas, como a linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti* (BRAGA, 2017). Além disso, buscamos determinar o perfil de susceptibilidade/resistência de uma população de campo de *An. darlingi* coletada em Cruzeiro do Sul.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Comparar dois métodos (garrafas impregnadas e tubos com papéis impregnados) preconizados pela OMS para avaliação de populações de anofelinos quanto ao *status* de resistência a inseticidas piretroides usados pelos programas de controle de malária do norte do Brasil.

### **2.2 Objetivos Específicos**

a) Determinar as doses diagnósticas para os piretroides etofenprox e alfacipermetrina mais adequadas para monitoramento de populações brasileiras de anofelinos;

b) Comparar os dois métodos (garrafas impregnadas e tubos com papéis impregnados) para avaliação do perfil de resistência, a fim de descrever as peculiaridades de aplicação dessas metodologias no campo e em laboratório;

c) Determinar o perfil de resistência de uma população de *An. darlingi* do norte do Brasil.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Bioensaios de calibração e susceptibilidade

Os bioensaios de calibração das metodologias e de verificação de susceptibilidade, utilizando espécies de *Anopheles* criadas em laboratório, foram realizados nas dependências do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – Laficave, do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Os bioensaios foram realizados com garrafas impregnadas e tubos contendo papéis impregnados (WHO, 2016). Dois inseticidas da classe dos PY usados nos programas de controle para borrifação de paredes (etofenprox) e para a impregnação de mosquiteiros (alfacipermetrina) foram avaliados.

#### 3.1.1 Manutenção das espécies de *Anopheles* criadas em laboratório

Para calibração dos bioensaios foram usados mosquitos *An. aquasalis* provenientes da criação mantida no Laficave por cerca de 20 anos. As larvas são criadas em bacias contendo água desclorada acrescida de solução salina na concentração de 0,2 % e alimentadas diariamente com ração triturada para peixes (Tetramin Tropical Flakes). As pupas são transferidas diariamente para gaiolas cilíndricas de papelão onde ocorre a emergência dos adultos. Os adultos são mantidos em insetário à temperatura de  $26 \pm 2$  °C, umidade  $70 \pm 10$  % e alimentados com solução de açúcar a 10 %. Para a obtenção de postura, as fêmeas são alimentadas em cobaias de acordo com o protocolo aprovado (CEUA L-004/2018 – Anexo 1) ou usando alimentador artificial Hemotek®. Nos bioensaios de susceptibilidade realizados após o processo de calibração, utilizou-se, além de *An. aquasalis*, fêmeas de *An. albitarsis*, também criadas no Laficave.

Adotamos *An. aquasalis* como linhagem padrão de comparação por não ter sido observada mutação *kdr* clássica L1014F (do inglês, *knockdown resistance*) envolvida com resistência a piretroide, como descrito por Braga (2017). Além disso, bioensaios com tubos OMS realizados com essa linhagem demonstraram perfil de susceptibilidade para deltametrina e malathion, comparável ao perfil apresentado pela linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti* (Braga, 2014). Em avaliação posterior, Braga (2017) confirmou a susceptibilidade dessa linhagem de *An. aquasalis* para os

inseticidas etofenprox, deltametrina, permetrina e malathion, quando realizou bioensaios com tubos e papéis impregnados com as doses recomendadas pela OMS.

### 3.1.2 Bioensaios com garrafas impregnadas, metodologia CDC (Centers for Disease Control and Prevention)

No processo de calibração das doses diagnósticas (DD) de etofenprox e alfacipermetrina, realizados com fêmeas de *An. aquasalis*, foram utilizadas garrafas de vidro de 250 mL (marca Wheaton) impregnadas com inseticida e garrafas controle impregnadas somente com o solvente (acetona).

Para etofenprox foram testadas cinco concentrações (12,5; 15; 19; 20 e 21 µg de inseticida/garrafa) e para alfacipermetrina utilizou-se sete concentrações distintas (12,5; 15; 17,5; 19; 20; 20,5 e 21 µg de inseticida/garrafa). Na Tabela 1 estão descritas as informações referentes ao processo de calibração quanto ao número de réplicas, quantitativo de exemplares por garrafa, idade dos espécimes, número de repetições e outras informações pertinentes.

Para determinação da DD foi adotado o tempo diagnóstico de 30 minutos (min), tempo este, recomendado pelo protocolo adaptado pela OMS (WHO, 2016) e leitura de mortalidade após 24 horas (h) de recuperação, na ausência de inseticida. Dessa forma, para este estudo foi considerada como DD a menor concentração capaz de causar efeito *knockdown* em mais de 99 % das fêmeas expostas em 30 min e taxa de mortalidade maior que 99 % após 24 h de recuperação.

Após o processo de calibração, foram realizados bioensaios de susceptibilidade, nos quais, fêmeas de mosquito da espécie *An. aquasalis* e *An. albitarsis* foram expostos às DD de etofenprox e alfacipermetrina encontradas. As informações relacionadas aos bioensaios estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Dados referentes ao processo de calibração das DD de etofenprox e alfacipermetrina e aos bioensaios qualitativos de susceptibilidade com garrafas impregnadas, metodologia CDC.

Bioensaio	Espécie	nº de Réplicas		nº♀/garrafa	Repetições
		Impregnadas	Controle		
Calibração	<i>An. aquasalis</i>	2/concentração	2	15 a 20	de 2 a 5/ concentração
Susceptibilidade	<i>An. aquasalis</i> <i>An. albitarsis</i>	4	2	20 a 25	3

♀ - fêmeas de mosquito com idade de 3 a 5 dias não alimentadas com sangue.

Nos ensaios, os períodos de exposição tiveram duração de 30 min, sendo a leitura do efeito *knockdown* realizada a cada 15 min. Após esse período de exposição, as fêmeas foram transferidas para gaiolas de papelão, sem inseticida, onde permaneciam por 24 h, quando era realizada a leitura de mortalidade. Cabe destacar que as repetições dos ensaios foram realizadas em dias diferentes e, como preconizado, as garrafas sempre foram utilizadas dentro de um período de 48 h.

Nos casos em que as garrafas controle apresentaram mortalidade entre 5 e 20 %, aplicou-se a fórmula de Abbott para correção de dados, conforme recomendado pela OMS (WHO, 2016).

**Fórmula de Abbott:** 
$$\frac{(\% \text{ de mortalidade nos expostos} - \% \text{ de mortalidade no controle})}{(100 - \% \text{ de mortalidade no controle})} \times 100$$

Neste trabalho, apenas os dados dos bioensaios com garrafas impregnadas com a DD de alfacipermetrina (20,5 µg/garrafa), utilizando fêmeas *An. aquasalis*, foram corrigidos pela fórmula de Abbott.

Nos ensaios em que a mortalidade da garrafa controle for superior a 20 %, os mesmos devem ser descartados. No entanto, esta condição não ocorreu no presente estudo.

### **3.1.3 Bioensaio de tubos com papéis impregnados, metodologia OMS**

Devido à mudança no processo de alimentação sanguínea das espécies de *Anopheles* mantidas no Laficave, houve uma diminuição da produção de ovos e, conseqüentemente, de adultos. Este fato impossibilitou a obtenção de fêmeas de mosquito de *An. aquasalis*, utilizados como padrão de comparação, suficientes para a calibração do teste com tubos OMS com papéis impregnados. Diante do ocorrido, optou-se por adotar as DD recomendadas pela OMS: 0,5 % para etofenprox e 0,05 % para alfacipermetrina.

Cabe destacar que a DD para o método de tubos OMS com papéis impregnados, equivale ao dobro da concentração de inseticida capaz de matar >99 % das fêmeas da linhagem de referência (DD = 2 x CL<sub>99</sub>).

Assim, foram realizados ensaios utilizando as DD recomendadas para avaliar o perfil de suscetibilidade das duas espécies de *Anopheles* (*An. aquasalis* e *An. albitarsis*) mantidas em laboratório.

Na Tabela 2 é possível verificar as informações referentes ao número de réplicas, quantitativo de exemplares por tubo, idade dos espécimes, número de repetições e outras informações pertinentes.

**Tabela 2:** Dados referentes aos bioensaios qualitativos de susceptibilidade realizados com mosquitos criados em laboratório, com tubos OMS com papéis impregnados, utilizando as DD de etofenprox e alfacipermetrina recomendadas pela OMS.

Bioensaio	Espécie	nº de Réplicas		nº♀/tubos	Repetições
		Impregnados	Controle		
Susceptibilidade	<i>An. aquasalis</i> <i>An. albitarsis</i>	4	2	20 a 25	3

♀ - fêmeas de mosquito com idade de 3 a 5 dias não alimentadas com sangue.

As fêmeas foram expostas aos inseticidas por uma hora e foi feita a leitura de *knockdown*, posteriormente os mosquitos foram transferidos para tubos de descanso, sem o inseticida, e depois de 24 h, foi realizada a leitura de mortalidade. As repetições dos ensaios foram realizadas em dias diferentes.

## 3.2 Coleta e bioensaios em campo

### 3.2.1 Área de estudo

Os ensaios de campo para comparação dos métodos para detecção de resistência, foram realizados no município de Cruzeiro do Sul no estado do Acre (Figura 8), que está localizado na mesorregião do Vale do Juruá e apresenta cerca de 80 mil habitantes. Foi o município do estado que apresentou maior número de casos de malária no ano de 2018.

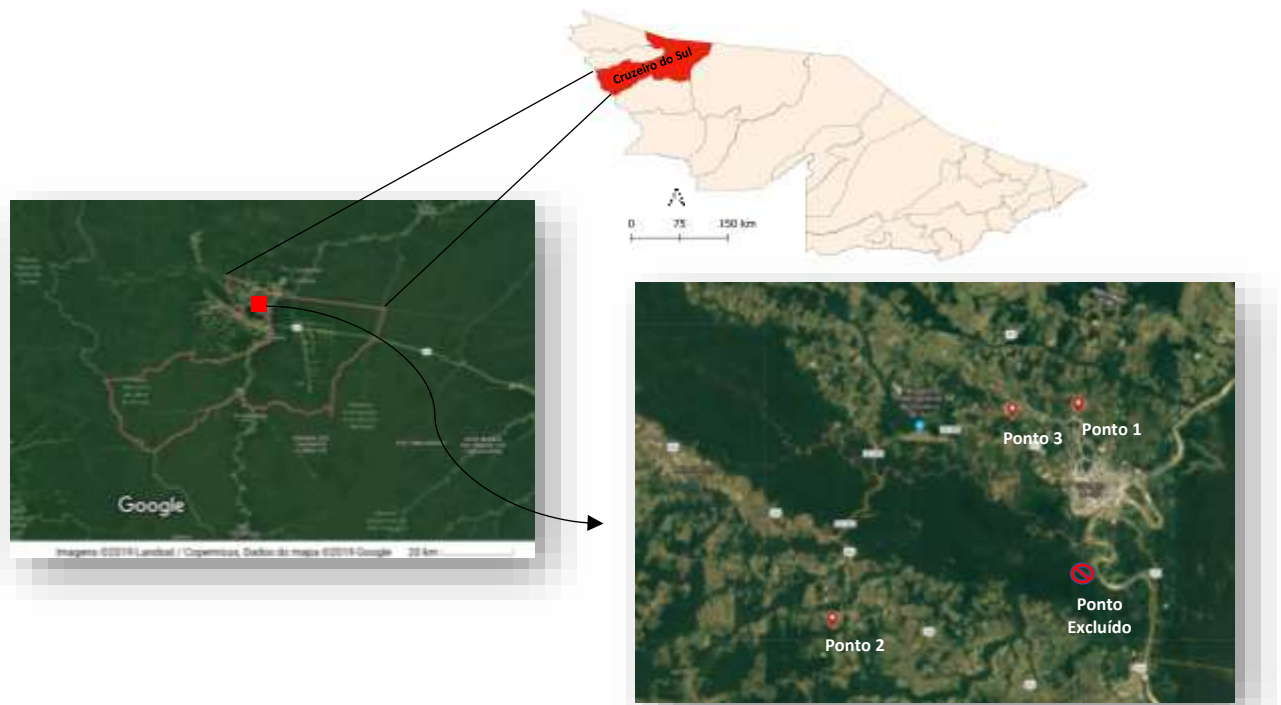


**Figura 8:** Localização geográfica do município de Cruzeiro do Sul, estado do Acre, Brasil.

### **3.2.2 Coleta de adultos**

Para obtenção de amostras das fêmeas de anofelinos adultos foi utilizado o método de captura por atração humana protegida e esclarecida, técnica com maior eficácia e viabilidade (MS, 2019e), aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC) por meio do parecer nº 2.972.974 (Anexo 2). Além disso, a coleta e o transporte de *Anopheles* foram autorizados pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Anexo 3).

As capturas foram realizadas em três localidades do município (Figura 9), definidas considerando aspectos entomológicos, epidemiológicos e sociais. Os locais escolhidos foram: Bairro Santa Terezinha (Ponto 1) localizado na área urbana, Ramal da Mariana I (Ponto 2) na área rural da cidade e a localidade Nova Olinda (Ponto 3) que é considerada uma área periurbana em expansão. Os pontos 1 e 3 apresentam cerca de quatro quilômetros (4 Km) de distância entre si e aproximadamente vinte quilômetros (20 Km) de distância em relação ao ponto 2. Vale destacar que inicialmente o ponto 3 de coleta seria na localidade Florianópolis, porém foi necessário substituí-lo devido a problemas relacionados à atuação de facções criminosas.



**Figura 9:** Localização geográfica dos três pontos de captura, no município de Cruzeiro do Sul, estado do Acre, Brasil.

As atividades de captura foram realizadas em parceria com a Prefeitura de Cruzeiro do Sul e a Secretaria Municipal de Saúde, por meio da Coordenação de Vigilância Entomológica, no período de 11 a 20 de junho de 2019. As coletas foram feitas por uma equipe de sete capturadores treinados e esclarecidos, entre as 17:30 e 21:30 h, em um ponto por noite. Foram estabelecidas duas coletas por ponto em semanas diferentes.

Os mosquitos foram capturados com um aspirador manual (capturador de Castro) ao pousar na meia dos capturadores e imediatamente transferidos para gaiolas cilíndricas teladas e transportados para laboratório, onde foram acondicionados e alimentados com solução açucarada até a manhã do dia seguinte, quando foram submetidos aos bioensaios

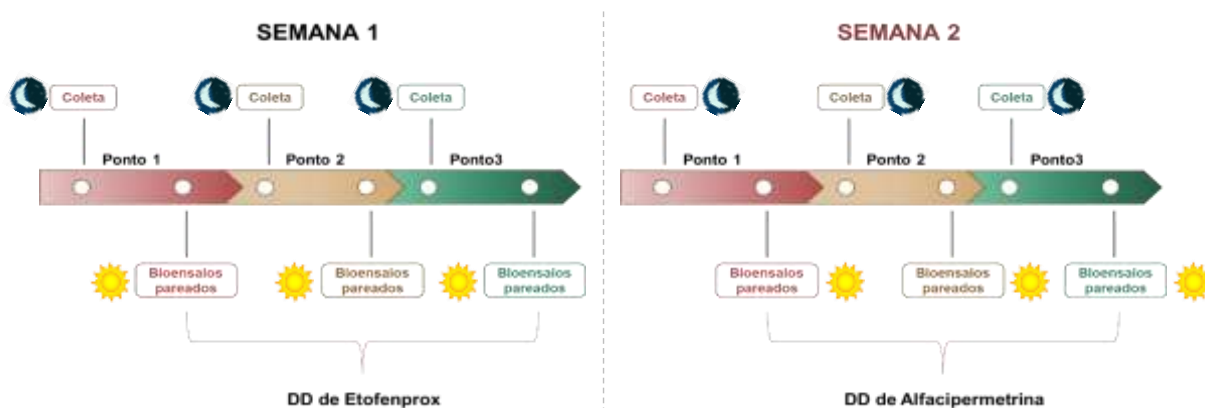
### **3.2.3 Bioensaios em campo**

Os bioensaios foram realizados em sala cedida pelo município, na sede da Coordenação de Vigilância Entomológica, contendo uma mesa, aparelho de ar condicionado, cadeiras, lupa entomológica, termo higrômetro, de forma que condições mínimas para controle de temperatura e umidade, manutenção e identificação dos mosquitos, preparo e realização dos ensaios puderam ser alcançadas.



No dia seguinte às coletas, as fêmeas capturadas foram expostas às DD de inseticidas determinadas nos ensaios de calibração para garrafas impregnadas e às DD recomendadas pela OMS para tubos com papéis impregnados, de acordo com o guia OMS de 2016, com algumas modificações (WHO, 2016).

Os ensaios foram realizados de forma pareada, ou seja, para cada ponto de coleta foram realizados os dois métodos simultaneamente, no intuito de comparar as peculiaridades de cada metodologia aplicada. Na primeira semana de atividades foram realizados os ensaios pareados (garrafas CDC e tubos OMS) utilizando a DD de etofenprox e, na segunda semana, foram realizados os ensaios pareados utilizando a DD de alfacipermetrina, conforme Figura 10.



**Figura 10.** Esquema das atividades de coleta e bioensaios pareados (garrafas CDC e tubos OMS), realizados em três pontos do município de Cruzeiro do Sul – AC, no período de 11 a 20 de junho de 2019.

Assim, foram realizados dois ensaios de cada metodologia para cada ponto de coleta em dias diferentes, um ensaio para cada piretroide (Tabela 3).

Nos bioensaios de campo, utilizando o método de garrafas impregnadas, a DD de etofenprox foi de 20 µg/garrafa e para alfacipermetrina foi de 20,5 µg/garrafa e as garrafas controle, impregnadas apenas com o solvente (acetona). Na Tabela 3 é possível verificar informações quanto ao número de réplicas, bem como outros dados relacionados aos bioensaios realizados. Cabe destacar que as garrafas impregnadas com etofenprox foram usadas no máximo duas vezes no prazo de até 48 h, tendo em vista, que após esse período, a mesma perde a eficácia (ver seções resultados e discussão, parte de calibração).

A duração mínima dos ensaios com garrafas impregnadas foi 30 min, sendo a leitura do efeito *knockdown* realizada a cada 15 min até o tempo máximo de 120 min

de exposição. Posteriormente, as fêmeas foram transferidas para gaiolas de papelão, sem inseticida, e, após 24 h, foi realizada a leitura de mortalidade (BROGDON & MCALLISTER, 1998; DA-CUNHA et al., 2005; FONTOURA et al., 2012).

No caso dos papéis impregnados, foram utilizadas as DD recomendadas pela OMS para ambos os inseticidas: etofenprox a DD foi de 0,5 % e para alfacipermetrina foi de 0,05 %. Os dados referentes aos bioensaios com tubos OMS podem ser verificados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Dados referentes aos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas e tubos OMS com papéis impregnados, utilizando as DD de etofenprox e alfacipermetrina com população de *An. darlingi* de campo, no município de Cruzeiro do Sul – AC, 2019.

Método	Inseticida	nº de Réplicas		nº♀/réplica	Repetições
		Impregnados	Controle		
Garrafas CDC	Etofenprox	4	2	15 a 20	1/ ponto de captura
	Alfacipermetrina	4	2	15 a 20	1/ ponto de captura
Tubos OMS	Etofenprox	2	2	15 a 20	1/ ponto de captura
	Alfacipermetrina	4	2	15 a 20	1/ ponto de captura

♀ - fêmeas de mosquito

Inicialmente, as fêmeas foram transferidas para os tubos de descanso, onde permaneceram de 40 a 60 min e, posteriormente, foram transferidas para os tubos de exposição, nos quais ficaram expostas aos inseticidas por uma hora, sendo feita a leitura do efeito *knockdown*. Após a leitura, os mosquitos foram transferidos para tubos de descanso, sem o inseticida, e depois de 24 h foi realizada a leitura de mortalidade.

Após a realização dos ensaios, os mosquitos foram identificados quanto à espécie pelo técnico de entomologia do município de Cruzeiro do Sul que utilizou chave dicotômica de Gorham et al. (1967) modificada e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

Para avaliar o *status* de resistência da população de *An. darlingi* do município de Cruzeiro do Sul, foi considerado o critério da OMS (WHO, 2016) quanto à taxa de mortalidade:

- a) maior ou igual a 98 % - população suscetível;
- b) entre 90 % e 97 % - possível resistência;

**c) abaixo de 90 % - população resistente.**

Vale destacar que todos os bioensaios foram acompanhados pela equipe de entomologia do município.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Bioensaios de calibração e susceptibilidade

Para realização dos bioensaios de calibração das DD de etofenprox e alfacipermetrina, com garrafas impregnadas, foram utilizadas 1.276 fêmeas de mosquito de *An. aquasalis*, já nos bioensaios de susceptibilidade, o total de mosquitos utilizados foi de 667 *An. aquasalis* e 592 *An. albitarsis* (Tabela 4).

Nos bioensaios de susceptibilidade com tubos com papéis impregnados, usando as DD de etofenprox e alfacipermetrina recomendadas pela OMS, foram utilizadas 603 fêmeas de *An. aquasalis* e 601 de *An. albitarsis* (Tabela 4).

**Tabela 4:** Número de fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. albitarsis* expostas durante o processo de calibração das doses de etofenprox e alfacipermetrina e nos bioensaios de susceptibilidade, utilizando garrafas e tubos OMS com papéis impregnados.

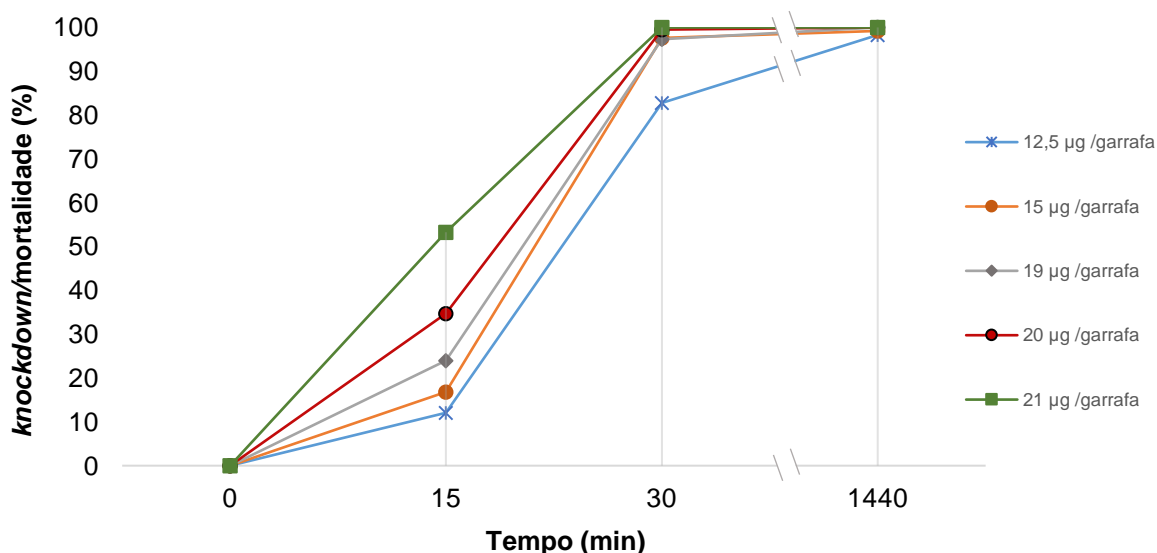
Método	Inseticida	Bioensaio	Espécie	n° total ♀
Garrafa CDC	Etofenprox	Calibração	<i>An. aquasalis</i>	592
		Susceptibilidade	<i>An. aquasalis</i>	404
	<i>An. albitarsis</i>		382	
	Alfacipermetrina	Calibração	<i>An. aquasalis</i>	684
		Susceptibilidade	<i>An. aquasalis</i>	263
	<i>An. albitarsis</i>		210	
Tubos OMS	Etofenprox	Susceptibilidade	<i>An. aquasalis</i>	299
			<i>An. albitarsis</i>	300
	Alfacipermetrina	Susceptibilidade	<i>An. aquasalis</i>	304
			<i>An. albitarsis</i>	301

♀ fêmeas de mosquito

#### 4.1.1 Bioensaios com garrafas impregnadas

##### a) Etofenprox

Durante o processo de calibração das doses para etofenprox, foram testadas cinco concentrações. A Figura 11 apresenta um resumo de todos os ensaios realizados e mostra o percentual de queda dos mosquitos (*knockdown*), bem como a taxa de mortalidade, nos tempos previstos para leitura.



**Figura 11:** Curvas de *knockdown* (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de *An. aquasalis* expostas a diferentes concentrações de etofenprox nos testes com garrafas impregnadas, durante o processo de calibração, no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação.

A Tabela 5 faz um resumo de todos os ensaios, mostrando a porcentagem de queda em 15 e 30 min e a porcentagem de mortalidade após 24 h de recuperação (1440 min).

**Tabela 5:** Dados referentes ao processo de calibração da DD de etofenprox para *An. aquasalis*, em ensaios com garrafas impregnadas, no tempo diagnóstico de 30 min e após 24 h de recuperação.

Concentração (µg /garrafa)	n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*			
		0	15	30	1440
12,5 µg /garrafa	116	0	12,0 ± 15,1	82,7 ± 14,7	98,2 ± 1,5
15 µg /garrafa	125	0	16,8 ± 8,7	97,6 ± 2,3	99,2 ± 1,5
19 µg /garrafa	75	0	24,0 ± 17,5	97,3 ± 3,9	100,0 ± 0
20 µg /garrafa	199	0	34,6 ± 10,6	99,5 ± 1,3	100,0 ± 0
21 µg /garrafa	77	0	53,2 ± 39,4	100,0 ± 0	100,0 ± 0

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

Observando a Tabela 5, pode-se perceber que a menor concentração capaz de matar >99 % dos mosquitos em 30 min foi a concentração de 20 µg/garrafa, pois apresentou 99,5 % de queda em 30 min e 100 % de mortalidade após 24 h de recuperação. Essa concentração foi escolhida como DD para os testes em campo.

Após estabelecer a DD de etofenprox, foram realizados bioensaios com fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. albicansis*, sendo realizados cinco bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas para cada espécie.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos após a realização dos bioensaios, mostrando o percentual de queda dos mosquitos em 30 min e a mortalidade após 24 h de recuperação, além de uma informação complementar quanto ao número de vezes que as garrafas foram utilizadas.

**Tabela 6:** Percentual de queda/mortalidade das fêmeas de *An. aquasalis* e *An. albitarsis* nos bioensaios de susceptibilidade, realizados com garrafas impregnadas, com a DD de etofenprox (20 µg /garrafa), nos tempos de 15 min, 30 min e após 24 h de recuperação, mostrando também o número de vezes de uso das garrafas.

Espécie	Bioensaio	n <sup>o</sup> ♀	N <sup>o</sup> de usos da garrafa	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*			
				0	15	30	1440
<i>An. aquasalis</i>	1	77	1	0	87,0 ± 6,5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	2	79	3	0	93,7 ± 1,2	98,7 ± 2	88,6 ± 9,1
	3	80	1	0	93,8 ± 4,8	98,8 ± 2,8	98,8 ± 2,8
	4	79	1	0	72,2 ± 27,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	5	89	2	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
					89,3 ± 10,6	99,5 ± 0,7	97,5 ± 5
<i>An. albitarsis</i>	1	75	2	0	98,7 ± 2,6	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	2	67	4	0	92,5 ± 7,5	100,0 ± 0,0	83,6 ± 11,2
	3	60	2	0	85,0 ± 11,4	100,0 ± 0,0	95,0 ± 6,4
	4	86	1	0	96,5 ± 5,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	5	94	1	0	97,9 ± 2,5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
					94,1 ± 5,6	100 ± 0	95,7 ± 7,1

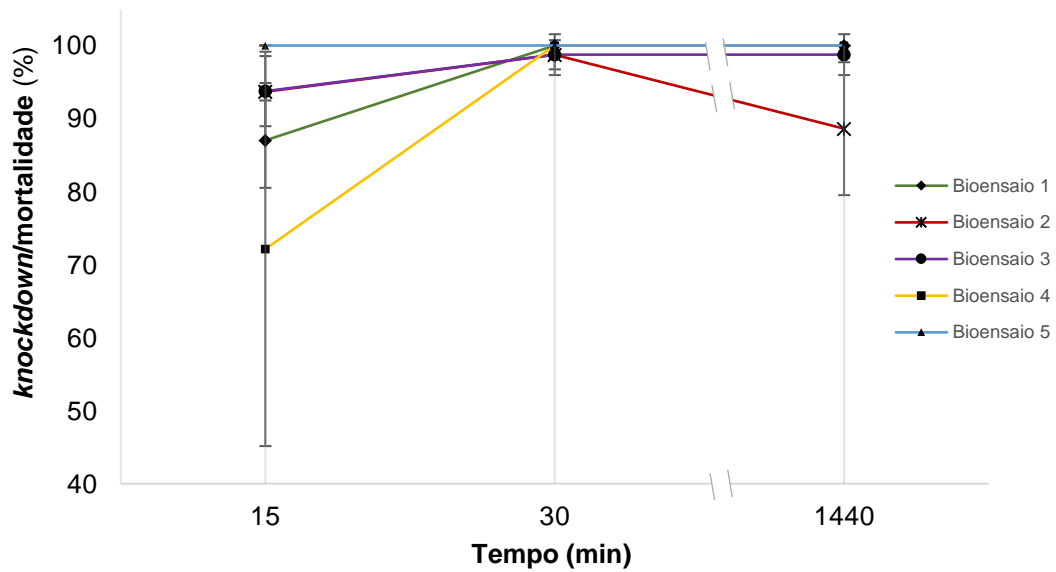
\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

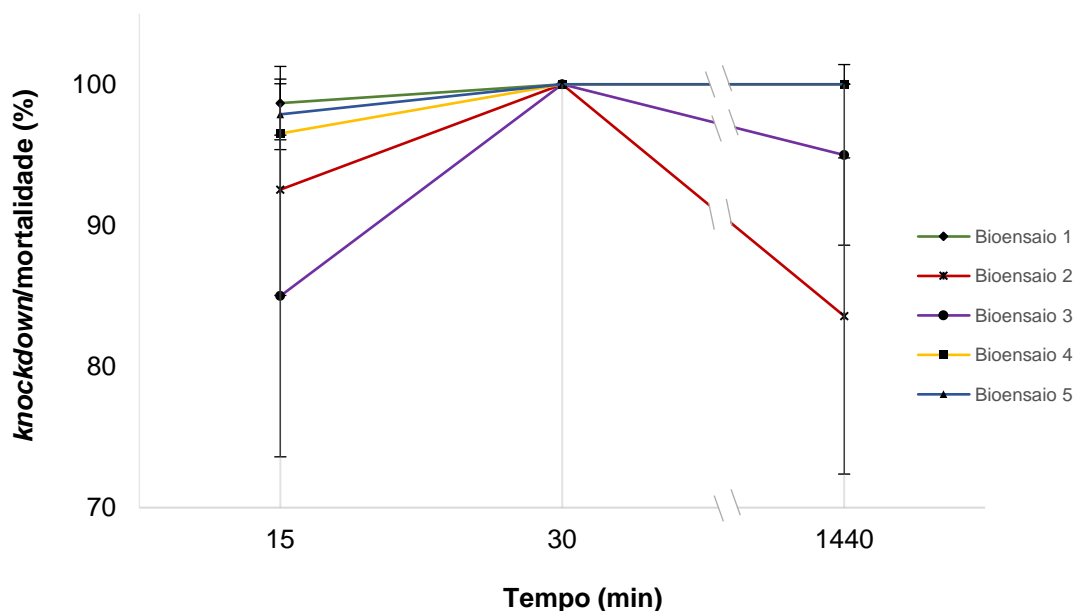
Ao analisar a Tabela 6, observa-se que os dados do percentual de mortalidade em 24 h dos bioensaios 2 e 3 diferem consideravelmente dos resultados dos demais ensaios e, conseqüentemente, diferem do padrão esperado. Pode-se notar que os desvios padrão também foram grandes. Estes fatos repetiram-se para ambas as espécies.

A Figura 12 apresenta as curvas de queda e mortalidade no tempo para bioensaios realizados com *An. aquasalis*, na qual pode-se observar que houve uma queda da taxa de mortalidade nos bioensaios 2 e 3 após 24 h de recuperação dos mosquitos expostos, sendo mais relevante no bioensaio 2.



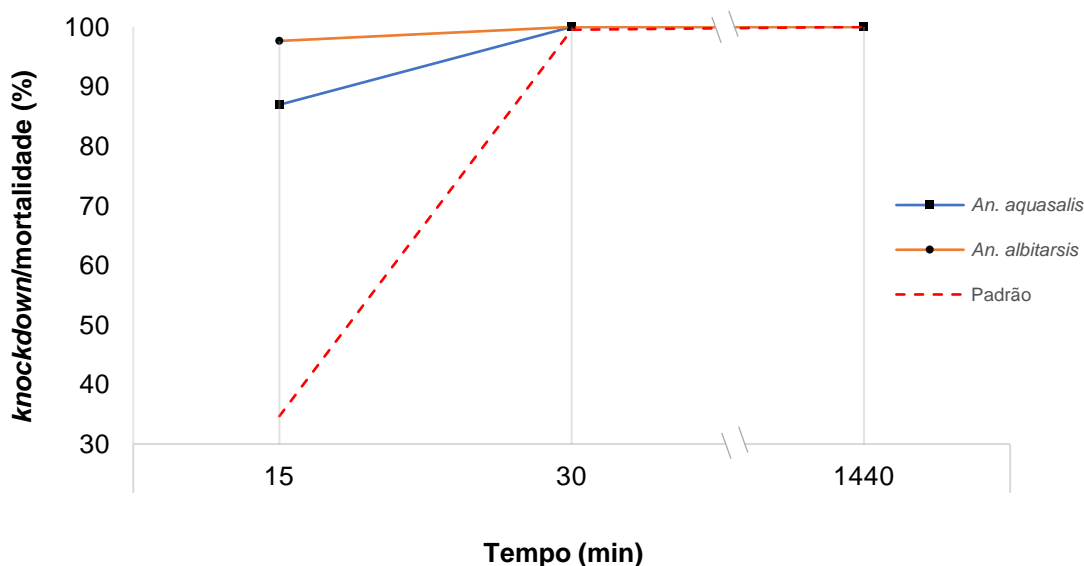
**Figura 12:** Curvas de *knockdown* (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de *An. aquasalis* expostas a dose diagnóstica de etofenprox (20 µg /garrafa), obtidas nos 5 bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas, no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação

Fato semelhante ocorreu nos bioensaios realizados com fêmeas de mosquito de *An. albitarsis*. Como é possível observar na Figura 13, houve uma queda considerável da taxa de mortalidade dos mosquitos nos bioensaios 2 e 3, após 24 h de recuperação.



**Figura 13:** Curvas de *knockdown* (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de *An. albitarsis* expostas a dose diagnóstica de etofenprox (20 µg /garrafa), obtidas nos 5 bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas, no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação.

A Figura 14 e a Tabela 7 trazem dados dos bioensaios realizados, excluindo-se os dois ensaios que apresentaram valores discrepantes, bem como mostram o percentual de queda (*knockdown*) dos mosquitos das espécies expostas em 30 min, a taxa de mortalidade após 24 h de recuperação e compara com o perfil do padrão estabelecido nos ensaios de calibração.



**Figura 14:** Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a dose diagnóstica de etofenprox (20 µg/garrafa), utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, no tempo diagnóstico de 30 min e mortalidade após 24 h de recuperação. Excluídos os dados dos bioensaios 2 e 3.

**Tabela 7:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaio de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a DD de etofenprox (20 µg/garrafa), utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, no tempo diagnóstico de 30 min e após 24 h de recuperação. Os dados dos bioensaios 2 e 3 foram excluídos.

Espécie	n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*			
		0	15	30	1440
<i>An. aquasalis</i>	245	0	86,9 ± 13,9	100 ± 0	100 ± 0
<i>An. albitarsis</i>	255	0	97,6 ± 1,1	100 ± 0	100 ± 0

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

♀ fêmeas de mosquito

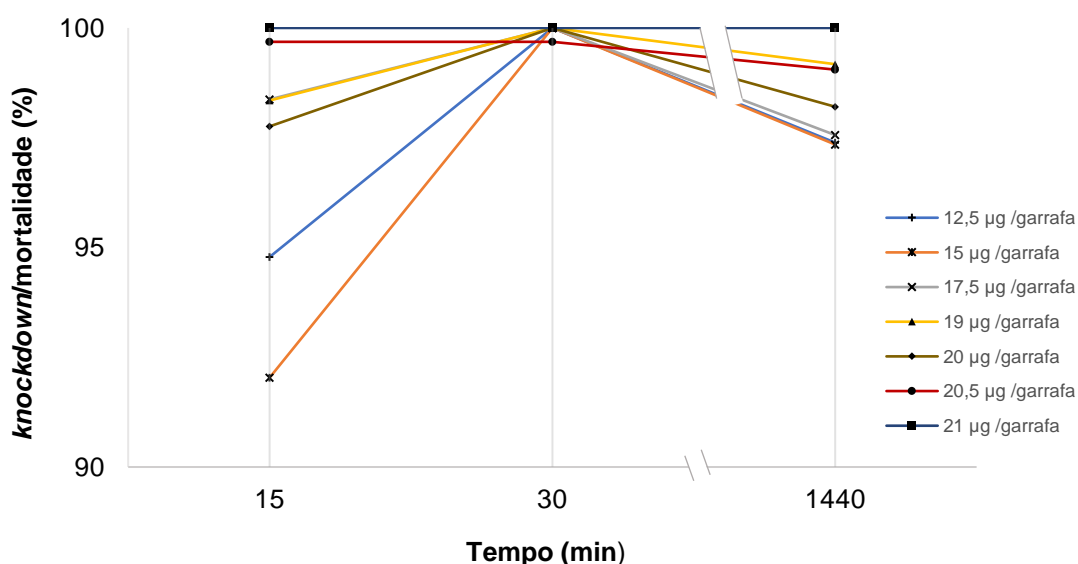
DD: Dose Diagnóstica

Ao analisar a Figura 14 e os dados da Tabela 7, observa-se que as duas espécies apresentaram um perfil de suscetibilidade semelhante ao padrão estabelecido no ensaio de calibração, uma vez que ambas as espécies apresentaram percentual de queda e taxa de mortalidade de 100 % após o período de recuperação (24 h na ausência de inseticida).



## b) Alfacipermetrina

Na Figura 15 é possível visualizar as curvas das sete concentrações testadas de alfacipermetrina obtidas no processo de calibração da DD do inseticida, por meio de testes com garrafas impregnadas. Além disso, mostra o percentual de queda dos mosquitos, ou *knockdown*, bem como a taxa de mortalidade nos tempos previstos para leitura.



**Figura 15:** Curvas de *knockdown* (tempo de queda) e mortalidade para fêmeas de *An. aquasalis* expostas a diferentes concentrações de alfacipermetrina nos testes com garrafas impregnadas, durante os ensaios de calibração, no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação.

De forma semelhante, a Tabela 8 faz um resumo de todos os ensaios, mostrando a porcentagem de queda em 15 e 30 min e a porcentagem de mortalidade após 24 h de recuperação (1.440 min).

**Tabela 8:** Dados referentes ao processo de calibração da DD de alfacipermetrina para *An. aquasalis*, em ensaios com garrafas impregnadas, no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24h de recuperação.

Concentração (µg /garrafa)	n° ♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*			
		0	15	30	1440
12,5 µg /garrafa	115	0	94,8 ± 2,3	100 ± 0,0	97,4 ± 0,2
15 µg /garrafa	113	0	92,0 ± 3,3	100 ± 0,0	97,3 ± 2,8
17,5 µg /garrafa	123	0	98,4 ± 1,3	100 ± 0,0	97,6 ± 3,4
19 µg /garrafa	121	0	98,3 ± 2,7	100 ± 0,0	99,2 ± 1,5
20 µg /garrafa	223	0	97,8 ± 4,6	100 ± 0,0	98,2 ± 3,3
20,5 µg /garrafa	316	0	99,7 ± 0,5	99,7 ± 0,6	99,1 ± 1,3
21 µg /garrafa	136	0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

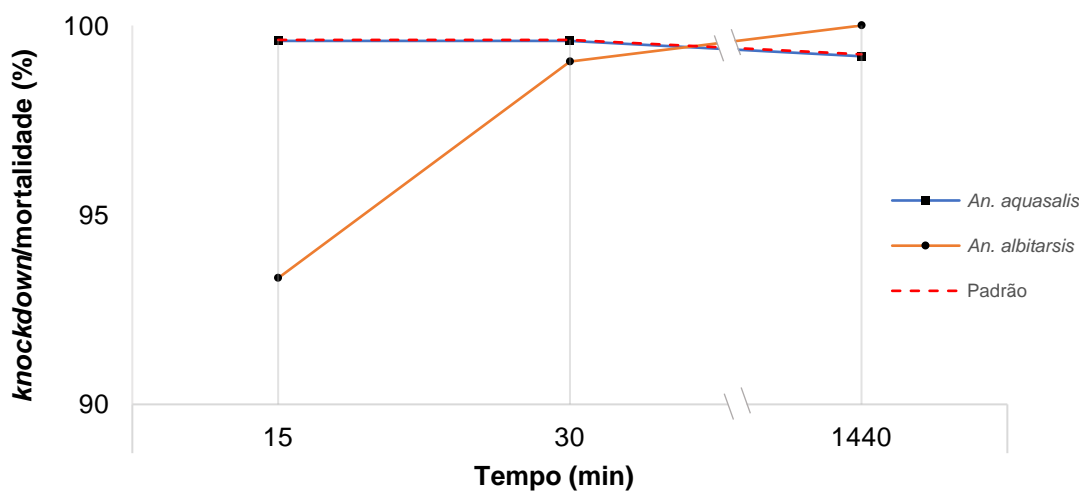
♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

Ao analisar a Tabela 8, observa-se inicialmente que, levando em conta os desvios padrão, a dose diagnóstica de alfacipermetrina poderia ter sido qualquer concentração a partir de 17,5 ug/garrafa. Porém, ao analisar os percentuais de queda e mortalidade obtidos nos testes realizados com as sete concentrações de alfacipermetrina, levando-se em conta o número de mosquitos testados por concentração e os desvios obtidos, a DD escolhida para os testes em campo foi a concentração de 20,5 µg /garrafa. Para essa concentração foi testado um maior número de fêmeas de mosquitos, sendo a que apresentou menor desvio padrão.

Posteriormente, também foram realizados bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a DD de alfacipermetrina (20,5 µg/garrafa), utilizando fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. albitarsis*.

A Figura 16 apresenta um resumo dos três bioensaios realizados com a DD de alfacipermetrina e mostra o percentual de queda dos mosquitos, ou *knockdown*, bem como a taxa de mortalidade nos tempos previstos para leitura e compara com o perfil do padrão estabelecido nos ensaios de calibração.



**Figura 16:** Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a dose diagnóstica de alfacipermetrina (20,5 µg/garrafa), utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação.

Ao analisar a Figura 16 e os dados da Tabela 9, observa-se que as duas espécies apresentaram perfil de suscetibilidade a alfacipermetrina parecido. Os mosquitos de ambas espécies apresentaram percentual de queda em 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação  $\geq 99$  %.

**Tabela 9:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a DD de alfacipermetrina (20,5 µg /garrafa), utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis* no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação.

Espécie	n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*			
		0	15	30	1440
<i>An. aquasalis</i>	263	0	99,6 ± 0,6	99,6 ± 0,7	99,2 ± 1,4
<i>An. albitarsis</i>	210	0	93,3 ± 3,4	99 ± 0,8	100 ± 0

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

Vale destacar que para os bioensaios realizados com garrafas impregnadas com alfacipermetrina, não foi observada influência quanto ao número de vezes que a garrafa foi utilizada, conforme mostrado na Tabela 10.

**Tabela 10:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas, utilizando fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. abitarsis*, com a DD de alfacipermetrina (20,5 µg /garrafa) nos tempos de 15 min, 30 min e após 24 h de recuperação, mostrando o número de vezes de uso das garrafas.

Espécie	Bioensaio	n°♀	N° de usos da garrafa	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*			
				0	15	30	1440
<i>An. aquasalis</i>	1	80	1	0	100,0 ± 0,0	98,75 ± 2,3	97,5 ± 5,0
	2	95	3	0	98,95 ± 2,4	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	3	88	1	0	100,0 ± 0,0	100 ± 0,0	100,0 ± 0,0
					99,7 ± 0,6	99,6 ± 0,7	99,2 ± 1,4
<i>An. albitarsis</i>	1	82	2	0	96,34 ± 2,6	98,78 ± 2,9	100,0 ± 0,0
	2	61	4	0	93,44 ± 5,4	98,36 ± 3,1	100,0 ± 0,0
	3	67	2	0	89,55 ± 6,1	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
					93,1 ± 3,4	99,0 ± 0,9	100,0 ± 0,0

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

#### 4.1.2 Bioensaio de tubos com papéis impregnados

Diante da impossibilidade de calibração das DD de etofenprox e alfacipermetrina, utilizando *An. aquasalis* como linhagem padrão de comparação, foram realizados apenas os bioensaios para avaliar a susceptibilidade das duas espécies de anofelinos mantidas no Laficave frente às DD recomendadas pela OMS e, assim, utilizá-las nos bioensaios de campo.

##### a) Etofenprox

Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos após a realização dos bioensaios, mostrando o tempo de queda dos mosquitos em 60 min de exposição e a mortalidade após 24 h de recuperação, na ausência de inseticida.

**Tabela 11:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade realizados com tubos OMS com a DD de etofenprox de 0,5 %, utilizando fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação.

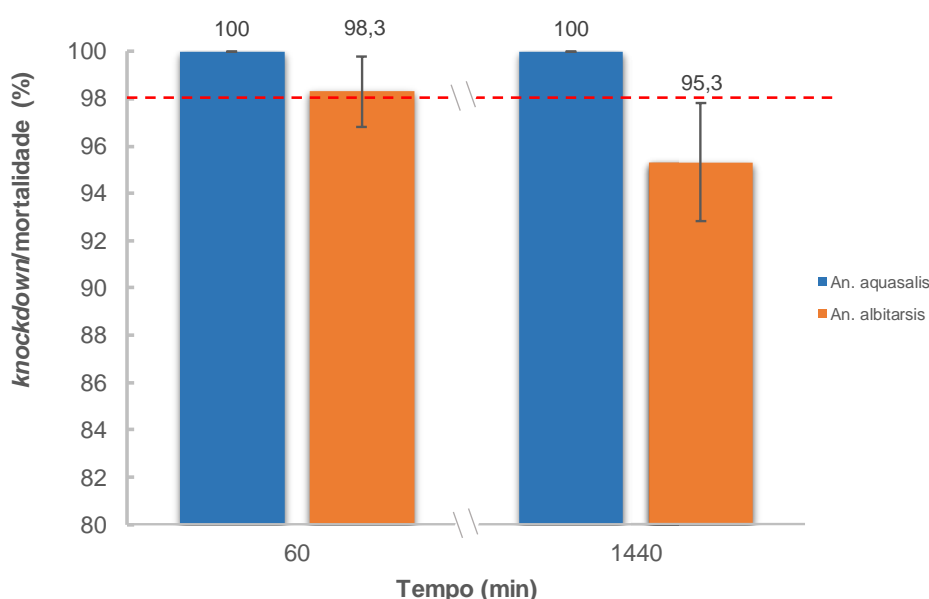
Espécie	n° ♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*		
		0	60	1440
<i>An. aquasalis</i>	299	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
<i>An. albitarsis</i>	300	0	98,33 ± 1,5	95,3 ± 2,5

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

Analisando a Figura 17, pode-se observar que houve recuperação do *knockdown* de algumas fêmeas de *An. albitarsis* após 24 h, diferente do que ocorreu com *An. aquasalis*, que apresentou 100 % de mortalidade.



**Figura 17:** Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com tubos com papéis impregnados com a dose diagnóstica de etofenprox (0,5 %), utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação. A linha vermelha pontilhada indica o ponto de corte de 98 % de mortalidade, critério estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

Ao analisar a Figura 17 e os dados da Tabela 11, observa-se que, de acordo com os parâmetros da OMS para definição de resistência, apenas os exemplares de *An. aquasalis* apresentaram um perfil de suscetibilidade para o etofenprox, visto que a mortalidade foi acima de 98 %. Ao contrário, a mortalidade das fêmeas de *An. albitarsis* foi de 95,3 %, sugerindo resistência da população ou talvez que a dose diagnóstica utilizada não seja adequada para *An. albitarsis*.

## b) Alfacipermetrina

Para os bioensaios com papéis impregnados com alfacipermetrina foi utilizada a DD de 0,05 %. No total utilizaram-se 304 fêmeas de mosquito *An. aquasalis* e 301 de *An. albitarsis* em dias diferentes.

A Tabela 12 apresenta um resumo dos três bioensaios realizados com a DD de alfacipermetrina e mostra o percentual de queda dos mosquitos, ou *knockdown*, bem como a taxa de mortalidade nos tempos previstos para leitura.

**Tabela 12:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade realizados com tubos OMS com a dose diagnóstica de alfacipermetrina de 0,05 %, utilizando fêmeas de mosquito de *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, nos tempos de 60 min e 24 h de recuperação.

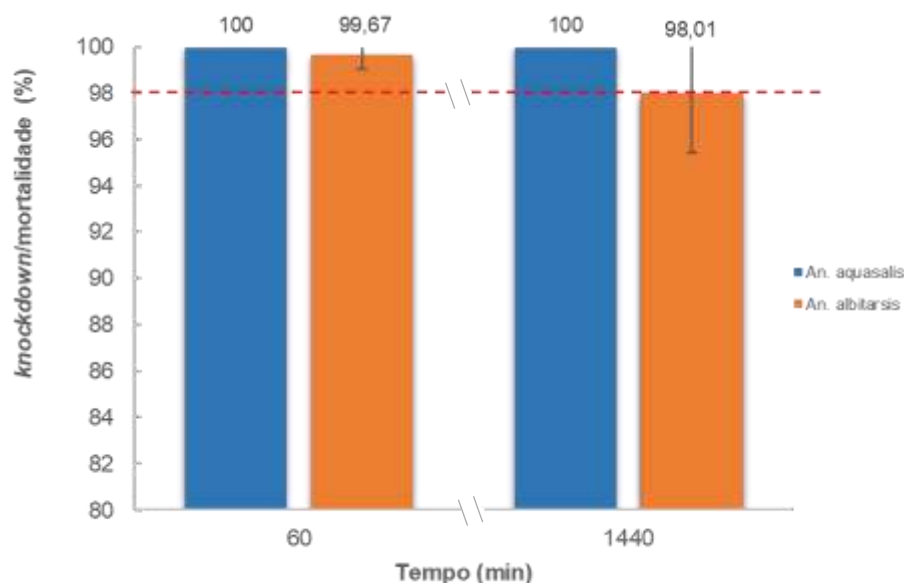
Espécie	n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*		
		0	60	1440
<i>An. aquasalis</i>	304	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
<i>An. albitarsis</i>	301	0	99,67 ± 0,6	98,01 ± 2,6

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão.

♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

Ao analisar os dados da Tabela 12 e a Figura 18, observa-se que as duas espécies apresentaram suscetibilidade a alfacipermetrina, uma vez que ambas apresentaram média de mortalidade acima de 98 %, de acordo com critério da OMS. Contudo, ao considerar o desvio padrão do percentual de mortalidade das fêmeas de *An. albitarsis*, observa-se possível resistência da população ou talvez que a dose diagnóstica não seja a mais adequada para *An. albitarsis*, ou ainda, a necessidade de mais ensaios.



**Figura 18:** Dados de queda e mortalidade dos bioensaios de susceptibilidade com tubos OMS com papéis impregnados com a dose diagnóstica de alfacipermetrina de 0,05 %, utilizando mosquitos das espécies *An. aquasalis* e *An. albicansis*, nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação. A linha vermelha pontilhada indica o ponto de corte de 98 % de mortalidade, critério estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

## 4.2 Coleta de Adultos

Nas coletas realizadas no município de Cruzeiro do Sul, foram capturados 1.125 anofelinos adultos nos três pontos de captura.

Na Tabela 13 é possível observar a distribuição do quantitativo de mosquitos capturados por espécie nos três pontos de coleta.

**Tabela 13:** Quantitativo e percentual de adultos das espécies de *Anopheles* coletadas nos pontos 1, 2 e 3 do município de Cruzeiro do Sul - Acre, 2019.

Espécies	Santa Terezinha (1)	Ramal da Mariana I (2)	Nova Olinda (3)	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>An. darlingi</i>	338 (98,54)	454 (100)	328 (100)	1.120 (99,55)
<i>An. rangeli</i>	4 (1,16)	0 (0)	0 (0)	4 (0,35)
<i>Anopheles</i> spp.	1 (0,28)	0 (0)	0 (0)	1 (0,10)
<b>Total</b>	<b>343 (30,49)</b>	<b>454 (40,35)</b>	<b>328 (29,16)</b>	<b>1.125 (100)</b>

Os mosquitos capturados foram identificados com base na morfologia externa, sendo identificadas duas espécies de anofelinos, *An. darlingi* e *Anopheles rangeli* Gabald., Covo-gar. et Lopez, 1940. Somente um exemplar não foi identificado até o nível de espécie.

De acordo com os dados na Tabela 13, a espécie *An. darlingi* foi encontrada em maior abundância nos três pontos de coleta, totalizando mais de 99 % dos exemplares coletados.

A maior abundância de anofelinos foi observada no ramal da Mariana I, localizado na área rural do município, onde foram capturados 454 espécimes, cerca de 40 % do total de indivíduos coletados.

Durante as atividades de captura, a temperatura variou de 22,8 °C (mínima) a 27,6 °C (máxima) e a umidade relativa variou entre 70,2 % (mínima) a 97 % (máxima).

### 4.3 Bioensaios de Campo

Nos bioensaios de susceptibilidade, realizados no município de Cruzeiro do Sul – AC, 720 fêmeas de mosquito *An. darlingi* foram expostos às DD de inseticidas determinadas nos ensaios de calibração (garrafas impregnadas) e às DD recomendadas pela OMS (tubos com papéis impregnados). Na Tabela 14 é possível visualizar o número de fêmeas de mosquito de *An. darlingi* expostos por inseticida e metodologia.

**Tabela 14:** Número de fêmeas de mosquito de *An. darlingi* expostos às DD de etofenprox e alfacipermetrina nos bioensaios de susceptibilidade, utilizando garrafas e tubos OMS com papéis impregnados, realizados no município de Cruzeiro do Sul – Acre, 2019.

Inseticida	Método	n° total ♀
Etofenprox	Garrafa CDC	190
	Tubo OMS	111
Alfacipermetrina	Garrafa CDC	227
	Tubo OMS	192

♀ fêmeas de mosquito  
DD: Dose Diagnóstica

Na Tabela 15 são apresentados os resultados obtidos após a realização dos bioensaios de susceptibilidade, utilizando fêmeas de *An. darlingi*, com garrafas impregnadas e tubos com papéis impregnados por ponto de coleta, mostrando o percentual de queda e mortalidade dos mosquitos nos tempos específicos de leitura para cada método.

**Tabela 15:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas e tubos OMS, com as DD de etofenprox e alfacipermetrina, utilizando fêmeas de mosquito de *An. darlingi*, nos tempos de leitura\* de cada método por ponto de coleta.

Garrafas CDC								Tubos OMS			
Inseticida	Ponto de coleta	n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*					n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*		
			0	15*	30*	45*	1440		0	60*	1440
Etofenprox	1	52	0	80,7	100	-	67,3	25	0	80,0	84,0
	2	73	0	82,1	98,6	100	50,6	44	0	65,9	70,4
	3	65	0	89,2	100	-	66,1	42	0	85,7	90,5
Alfacipermetrina	1	68	0	86,8	98,5	100	92,6	59	0	38,90	47,50
	2	96	0	93,8	100	-	87,5	75	0	52,0	38,7
	3	63	0	87,3	98,4	100	77,8	58	0	12,1	13,8

♀ fêmeas de mosquito

DD: Dose Diagnóstica

\***Queda:** leitura de 15,30 e 45 min para garrafa e 60 minutos para tubos;

\***Mortalidade:** leitura aos 1440 min (24 h) para os dois métodos.

#### 4.3.1 Garrafas impregnadas

Na Tabela 16 são apresentados os resultados obtidos após a realização dos bioensaios de susceptibilidade, utilizando fêmeas de *An. darlingi*, com a DD de etofenprox (20 µg /garrafa) e de alfacipermetrina (20,5 µg /garrafa), mostrando percentual de queda dos mosquitos em 30 min e a mortalidade após 24 h de recuperação.

**Tabela 16:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas com a DD de etofenprox (20 µg /garrafa) e de alfacipermetrina (20,5 µg /garrafa), utilizando mosquitos das espécies *An. darlingi* no tempo diagnóstico de 30 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação.

Inseticida	n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*				
		0	15	30	45	1440
Etofenprox	190	0	84,1 ± 4,5	99,5 ± 0,8	100 ± 0	61,4 ± 9,3
Alfacipermetrina	227	0	88,6 ± 3,6	98,9 ± 1,4	100 ± 0	87,6 ± 7,9

\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão

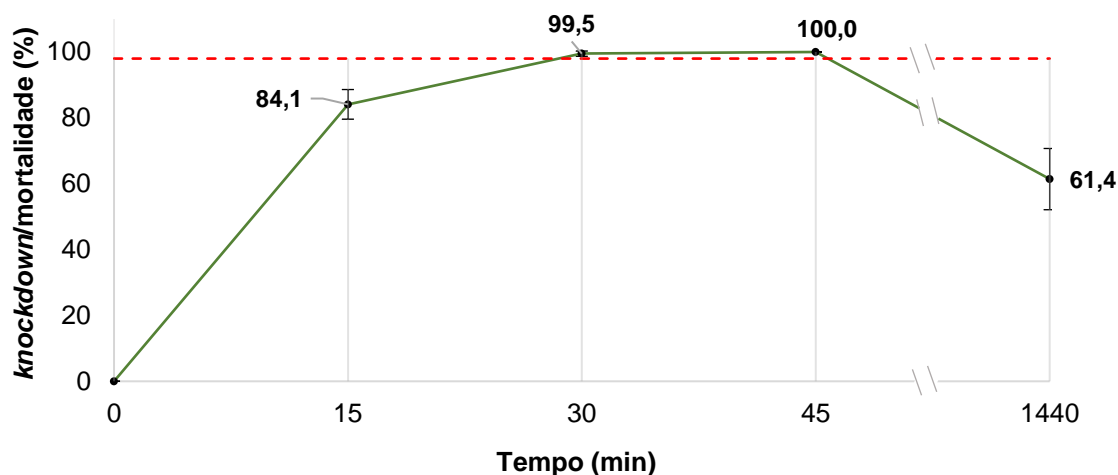
DD: Dose Diagnóstica

♀ fêmeas de mosquito



### a) Etofenprox

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos após a realização dos três bioensaios com fêmeas de mosquito de campo, mostrando o percentual de queda das fêmeas expostas em 30 min, a taxa de mortalidade após 24 h de recuperação e compara com o padrão esperado para populações suscetíveis a inseticidas, conforme critério estabelecido pela OMS (queda/mortalidade acima de 98%).

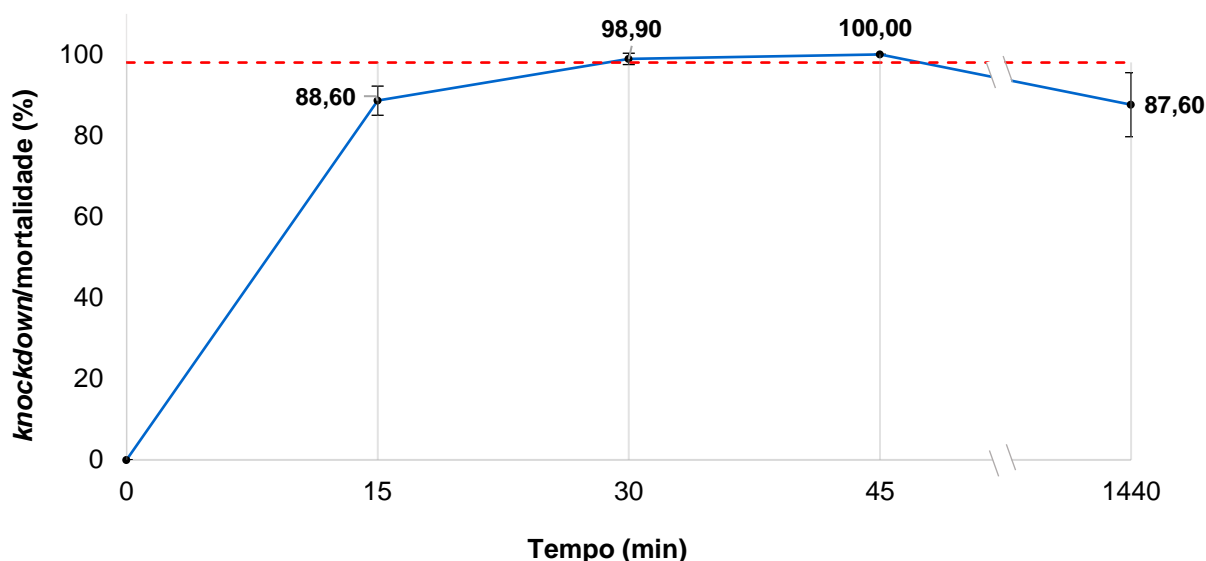


**Figura 19:** Curva de *knockdown* e mortalidade para fêmeas de *An. darlingi* expostas a dose diagnóstica de etofenprox (20 µg) no tempo diagnóstico de até 45 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas realizados em Cruzeiro do Sul, em junho de 2019. A linha vermelha pontilhada indica o ponto de corte de 98 % de mortalidade, critério estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

Ao analisar a Figura 19, observa-se que houve recuperação do *knockdown*, visto que o percentual de queda em 30 min foi de 99,5 % e na leitura de 24 h o percentual de mortalidade foi de 61,4%.

### b) Alfacipermetrina

A Figura 20 apresenta o percentual de queda das fêmeas expostas até 45 min, a taxa de mortalidade após 24 h de recuperação e compara com o critério estabelecido pela OMS quanto ao *status* de população suscetível a inseticidas.



**Figura 20:** Curva de *knockdown* e mortalidade para fêmeas de *An. darlingi* expostas a dose diagnóstica de alfacipermetrina (20,5 µg) no tempo diagnóstico de até 45 min e taxa de mortalidade após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com garrafas impregnadas realizados em Cruzeiro do Sul, em junho de 2019. A linha vermelha pontilhada indica o ponto de corte de 98 % de mortalidade, critério estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

Ao analisar os resultados obtidos é possível observar que em 30 min de exposição o percentual de queda foi de 98,9 %, porém, após 24 h na ausência de inseticida, houve recuperação de mosquitos e a taxa de mortalidade apresentada foi de 87,6 %.

#### 4.3.2 Tubos OMS com papéis impregnados

A Tabela 17 traz um resumo dos resultados obtidos após a realização dos bioensaios de susceptibilidade, utilizando fêmeas de *An. darlingi*, com a DD de etofenprox (0,5 %) e de alfacipermetrina (0,05 %), mostrando o tempo de queda dos mosquitos em 60 min de exposição e a mortalidade após 24 h de recuperação, na ausência de inseticida.

**Tabela 17:** Percentual de queda/mortalidade nos bioensaios de susceptibilidade realizados com tubos OMS com a DD de etofenprox (0,5 %) e de alfacipermetrina (0,05 %), utilizando fêmeas de mosquito de *An. darlingi*, nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação.

Inseticida	n°♀	% Queda/mortalidade ao longo do tempo (min)*		
		0	60	1440
Etofenprox	111	0	77,2 ± 10,2	81,6 ± 10,2
Alfacipermetrina	192	0	35,0 ± 17,4	37,1 ± 16,5

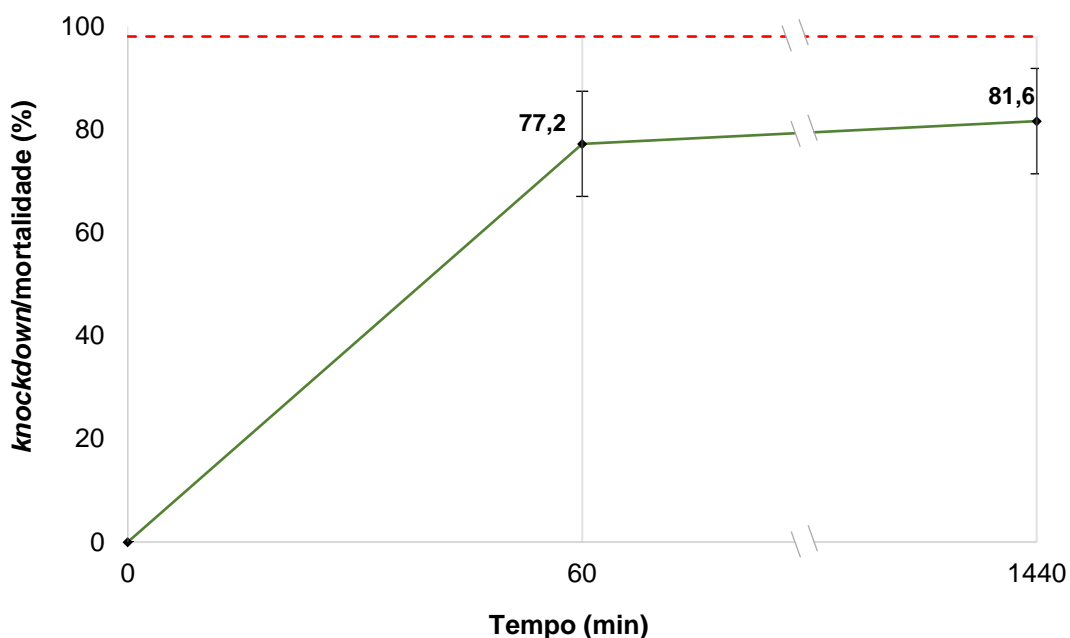
\*Os dados mostrados são valores das médias ± desvio padrão

DD: Dose diagnóstica

♀fêmeas de mosquito

### a) Etofenprox

A Figura 21 apresenta o percentual de queda das fêmeas e a taxa de mortalidade nos tempos de leitura, bem como o padrão estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

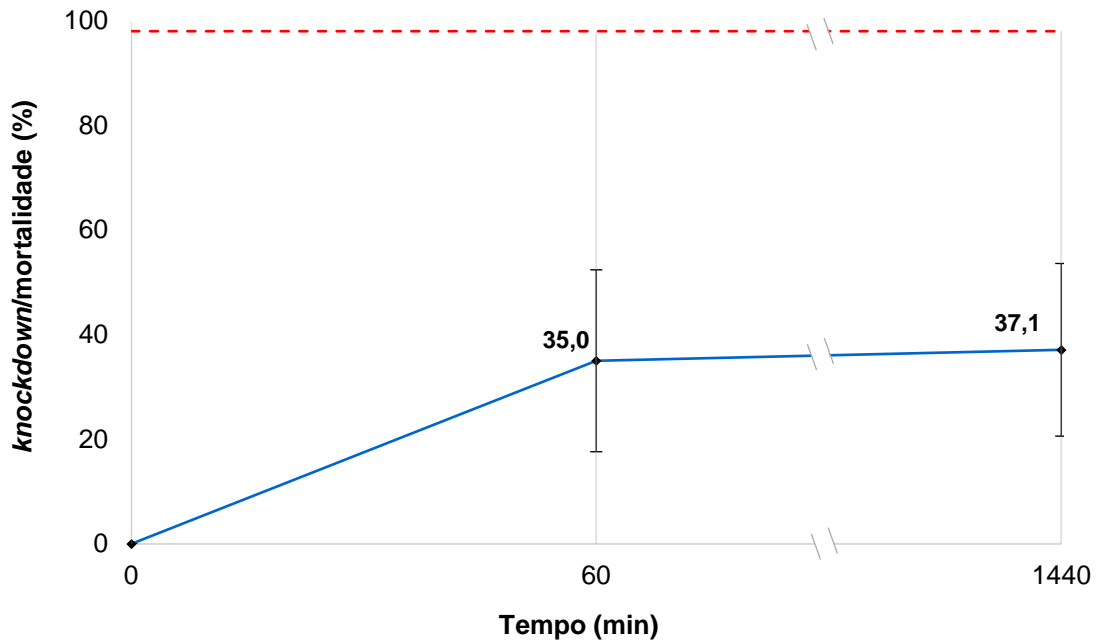


**Figura 21:** Curva de *knockdown* e mortalidade para fêmeas de *An. darlingi* expostas a dose diagnóstica de etofenprox (0,5 %) nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com tubos OMS com papéis impregnados realizados em Cruzeiro do Sul em 2019. A linha vermelha pontilhada indica o ponto de corte de 98 % de mortalidade, critério estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

Ao analisar a figura 21 é possível observar que o percentual de mortalidade após 24 h de recuperação foi de 81,6 %, sendo essa taxa abaixo do padrão estabelecido pela OMS para população suscetível ao inseticida, sugerindo uma possível resistência da população de *An. darlingi* ao etofenprox.

### b) Alfacipermetrina

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos nos ensaios realizados, mostrando o percentual de queda das fêmeas e a taxa de mortalidade nos tempos de leitura, bem como possibilita a comparação dos mesmos com o padrão estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

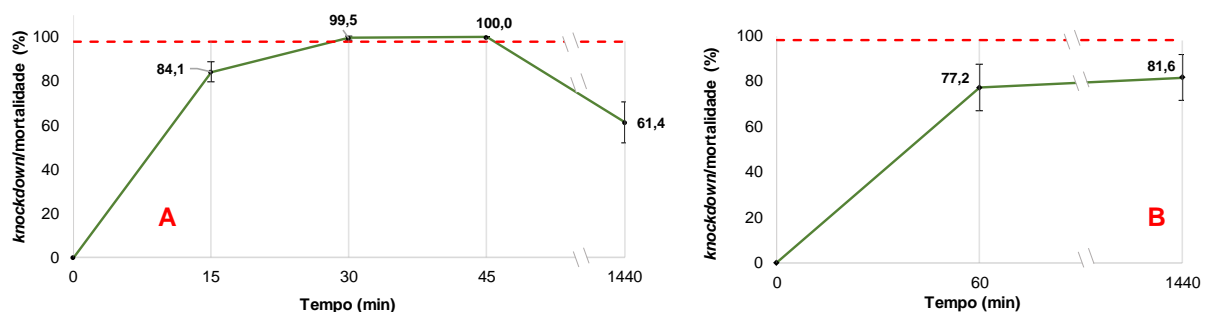


**Figura 22:** Curva de *knockdown* e mortalidade para fêmeas de *An. darlingi* expostas a dose diagnóstica de alfacipermetrina (0,05 %) nos tempos de 60 min e após 24 h de recuperação, em bioensaios de susceptibilidade com tubos OMS com papéis impregnados realizados em Cruzeiro do Sul em 2019. A linha vermelha pontilhada indica o ponto de corte de 98 % de mortalidade, critério estabelecido pela OMS para população suscetível a inseticidas.

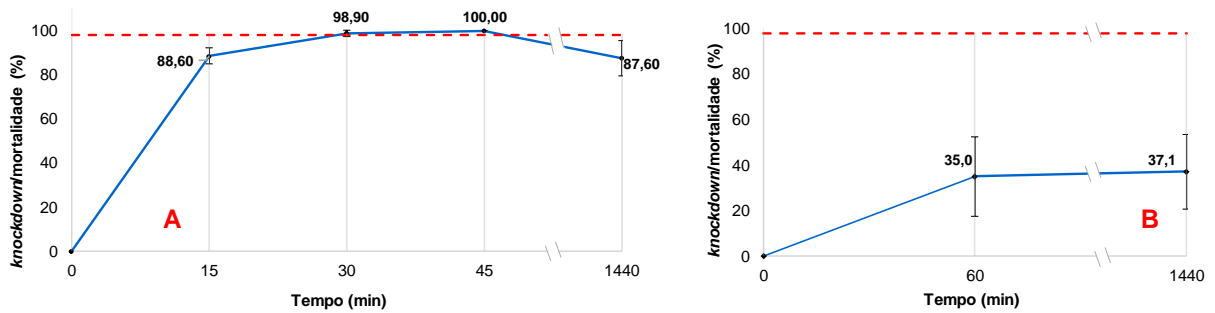
Ao analisar a Figura 22, observa-se que o percentual de mortalidade em 24 h de recuperação foi de 37,1 %, sendo essa taxa muito abaixo do padrão estabelecido pela OMS quanto população suscetível a inseticida, sugerindo uma possível resistência da população de *An. darlingi* à alfacipermetrina.

### Dados dos Ensaio Pareados:

As figuras 23 e 24 mostram os resultados obtidos nos bioensaios pareados, utilizando garrafas e tubos com papéis impregnados com as DD de etofenprox e alfacipermetrina.



**Figura 23:** Curva de *knockdown* e mortalidade para fêmeas de *An. darlingi* expostas as DD de etofenprox em bioensaios de susceptibilidade com (A) Garrafas Impregnadas e (B) tubos OMS com papéis impregnados.



**Figura 24:** Curva de *knockdown* e mortalidade para fêmeas de *An. darlingi* expostas as DD de alfacipermetrina em bioensaios de susceptibilidade com (A) Garrafas Impregnadas e (B) tubos OMS com papéis impregnados.

Ao analisar as figuras verifica-se que, após a leitura de 24 h de recuperação, os dois métodos foram consistentes para sugerir resistência da população de *An. darlingi* a etofenprox e alfacipermetrina. É possível observar, ainda, que ocorre maior mortalidade das fêmeas no método de garrafas, o que pode estar ligado a diferenças intrínsecas das metodologias.

Além disso, ao observar a figura 24 verifica-se que os ensaios só podem ser avaliados qualitativamente, pois ao analisar os dados de mortalidade utilizando as DD de alfacipermetrina, os maiores e menores índices de mortalidade foram obtidos nos ensaios com garrafas e tubos, respectivamente.

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, a OMS indica o uso de dois métodos para avaliação do perfil de resistência a inseticidas: garrafas (BROGDON & MCALLISTER, 1998) e teste de tubos OMS com papéis (WHO, 1998), ambos impregnados com inseticidas.

Apesar de serem técnicas distintas, ambas as metodologias detectam a resistência, possibilitando a avaliação de diferentes classes de inseticidas, como visto por outros autores para diversas espécies de *Anopheles* em diferentes países (RAKOTOSON et al., 2017; COLEMAN et al., 2017; THIAW et al., 2018; LEMINE et al., 2018; WHO 2018b).

De acordo com a literatura, vários países endêmicos reportaram resistência a inseticidas utilizados pelos programas de controle da malária, porém, poucos registros foram apresentados pelo Brasil, possivelmente devido à ausência de um programa de monitoramento de resistência estruturado para o país, sendo que os poucos dados registrados são oriundos de projetos de pesquisa (QUIÑONES et al., 2015; COLEMAN et al., 2017; WHO, 2018b).

Vale destacar que há alguns fatores que dificultam a estruturação de um programa de monitoramento no país, tais como: a dificuldade de manutenção em laboratório das espécies de anofelinos brasileiras e a inexistência de linhagens referência para as espécies vetores do Brasil, o que dificulta o estabelecimento de DD adequadas para o monitoramento (SANTOS et al., 2007) e realização de ensaios quantitativos.

Devido à ausência de uma linhagem de referência, utilizou-se uma linhagem como padrão de comparação, *An. aquasalis*, mantida no Laficave há mais de 20 anos, com intuito de calibrar as metodologias e propor DD que possam ser usadas para monitoramento de populações brasileiras. Esta linhagem não apresenta a mutação *kdr* L1014F, relacionada com resistência a piretroide, tampouco perfil de resistência a alguns inseticidas já testados (BRAGA, 2014; 2017). Sabemos das limitações de usar espécie diferente para calibração de doses e da dificuldade para afirmar que esta linhagem realmente não apresenta perfil de resistência, porém há necessidade de estabelecer um ponto de partida e critérios básicos para avaliação de populações de anofelinos brasileiras quanto à resistência a inseticidas.

Inicialmente, foram realizados bioensaios com garrafas impregnadas, a fim de estabelecer a DD de etofenprox. Dentre as concentrações testadas, a de 20 µg/garrafa foi a menor dose capaz de causar efeito *knockdown* >99 % dos mosquitos em 30 minutos, apresentando percentual de queda de 99,5 % e mortalidade de 100 % em 24 horas.

Para a calibração do bioensaio com garrafas impregnadas com alfacipermetrina, foram testadas sete diferentes concentrações. Dentre as mesmas, a concentração de 20,5 µg/garrafa foi a menor dose capaz de causar efeito *knockdown* em >99 % dos mosquitos em 30 minutos, apresentando percentual de queda de 99,7 % e mortalidade de 99,1 % em 24 horas.

Na Colômbia, Fonseca-González et al (2010), utilizando metodologia CDC de garrafas impregnadas, estabeleceram como DD de etofenprox para *An. darlingi* a concentração de 6,25 µg/garrafa em 30 minutos. Embora a calibração da DD tenha como referência a leitura no tempo diagnóstico de 30 minutos, para inseticidas da classe dos piretroides faz-se necessária uma leitura após 24 horas da exposição, tendo em vista que os inseticidas dessa classe causam um efeito de queda, conhecido como *knockdown* nos mosquitos. Quando os mosquitos são expostos aos piretroides, caem aparentemente mortos, porém após alguns minutos se recuperam e podem permanecer ativos (BISSET, 2002; BRAGA & VALLE, 2007; NYKA et al., 2013). Sendo assim, somente após 24 horas é possível inferir a real taxa de mortalidade e estabelecer a DD.

Vale destacar que, apesar de estudos reportarem ensaios com garrafas impregnadas para detecção de resistência de *Anopheles* utilizando a concentração de 12,5 µg de alfacipermetrina conforme guia da OMS, com taxa de mortalidade avaliada no tempo de 30 minutos (GALARDO et al., 2015; MESSENGER et al., 2017; ORJUELA et al., 2018), essa concentração não foi considerada a DD nos ensaios de calibração realizados com *An. aquasalis*. Apesar de se observar 100 % de queda no tempo de 30 minutos, verificou-se que houve recuperação do *knockdown* após 24 h na ausência de inseticida e a taxa de mortalidade foi de 97,3 %. Logo, reforça-se a importância da leitura da taxa de mortalidade após as 24 horas da exposição ao inseticida, tendo em vista o efeito de *knockdown* dos inseticidas da classe dos piretroides.

Além da utilização de espécies de *Anopheles* diferentes e uso de critérios de leitura de mortalidade distintos, a diferença das DD estabelecidas no Laficave, as DD recomendadas pela OMS e aquela determinada por Fonseca-González et al (2010), também pode estar relacionada com uma possível resistência metabólica a piretroides não detectada pelos ensaios já realizados. Outra questão a ser considerada refere-se a diferenças entre laboratórios. Segundo Braga et al (2004), valores absolutos de DD estabelecidos podem variar entre laboratórios, até mesmo entre diferentes testes realizados por um mesmo laboratório em anos diferentes, mesmo quando utiliza-se linhagens de referência.

Um aspecto importante na aplicação da metodologia CDC é saber quantas vezes podemos utilizar uma mesma garrafa impregnada com inseticida. Durante os ensaios com a DD de etofenprox realizados com mosquitos de *An. aquasalis* e *An. albitarsis*, foi possível observar uma redução expressiva no percentual de *knockdown* e da taxa de mortalidade quando a garrafa impregnada foi utilizada pela terceira e quarta vez (bioensaio 2 apresentou os maiores desvios padrão), sugerindo que a mesma perde o efeito após dois usos. Situação semelhante a esta foi reportada por Perea et al. (2009), que sugerem como possíveis fatores a redistribuição do inseticida devido ao contato com os mosquitos e capturadores, umidade do ar ou até mesmo umidade causada pela aspiração bucal. Diferentemente do resultado encontrado para etofenprox, as garrafas impregnadas por alfacipermetrina podem ser usadas pelo menos quatro vezes, sem observação de diminuição da eficácia do inseticida.

Observou-se também que houve redução no percentual de *knockdown* e da taxa de mortalidade no bioensaio 3 com DD de etofenprox (20 µg/garrafa). Possivelmente houve interferência do ambiente, uma vez que no momento do ensaio a temperatura da sala estava acima de 29 °C e fora dos parâmetros estabelecidos pela metodologia (26 ± 2 °C). Por isso, os bioensaios 2 e 3 foram excluídos da análise e optou-se por avaliar apenas os bioensaios nos quais as garrafas impregnadas com a DD de etofenprox foram utilizadas até duas vezes e em que as condições de temperatura (26 ± 2 °C) e umidade relativa (70 ± 10 %) do laboratório eram ideais.

Para todos os bioensaios realizados com *An. aquasalis* e *An. albitarsis* com as DD obtidas para garrafas e com as DD recomendadas pela OMS, ambas as espécies apresentaram-se suscetíveis, exceto para a dose de etofenprox em papel impregnado. Tal fato já foi relatado por Braga (2017), que verificou que as referidas linhagens do



laboratório apresentaram perfis de susceptibilidade diferentes, sendo que os mosquitos *An. albiparvus* mostraram-se mais tolerantes. Outra questão a ser considerada é que a dose OMS pode não ser a mais indicada para identificação de resistência em mosquitos dessa espécie.

Para realização dos bioensaios de campo foi escolhido como área de estudo, o município de Cruzeiro do Sul, devido à alta incidência de malária e por ser um município da Região Norte, apresentando condições mais altas de umidade e temperatura, que poderiam influenciar na realização dos ensaios. Foram estabelecidos pontos de coletas de adultos considerando aspectos entomológicos, epidemiológicos e de segurança pública.

Nos pontos de coleta foram capturados 1.125 anofelinos de três espécies distintas, sendo o *An. darlingi*, principal vetor de plasmódios no Brasil, encontrado em maior abundância, correspondendo a 99,55 % das espécies coletadas.

Estudo realizado no município de Cruzeiro do Sul, no período de 2012 a 2016, também havia mostrado predominância da espécie *An. darlingi*, correspondendo a 99,5 % das espécies capturadas (SUCUPIRA, 2017).

Apesar de algumas desvantagens no uso de mosquitos coletados diretamente no campo (falta de informação sobre idade, aspectos fisiológicos, exposição prévia a inseticidas e outros xenobióticos), a OMS sugere o uso desse tipo de material como alternativa para detecção de resistência. A principal vantagem do uso direto de fêmeas capturadas na natureza é a conveniência e o fato de que elas são a população operacionalmente relevante (WHO, 2016). O manuseio dessas amostras não requer laboratórios especializados, de forma que os testes podem ser conduzidos em uma gama maior de locais.

Nos bioensaios com garrafas impregnadas com as DD de 20,0 µg e 20,5 µg de etofenprox e alfacipermetrina, respectivamente, o percentual de queda em 30 min foi de 99,5 % para etofenprox e 98,9 % para alfacipermetrina. Todavia, a taxa de mortalidade em 24 h foi de 61,4 % nos bioensaios com etofenprox e de 87,6 % para alfacipermetrina.

Diante dos dados apresentados, verificou-se que, assim como nos ensaios de garrafa no laboratório, com amostras do campo, também ocorreu a recuperação de alguns insetos após 24 h da exposição. Dessa forma, considerou-se a taxa de

mortalidade obtida após 24 h para detecção do perfil de suscetibilidade da população de *An. darlingi* de Cruzeiro do Sul. Tal modificação foi feita no intuito de diferenciar o efeito *knockdown* ocasionado pelos piretroides e a real mortalidade dos insetos (DA-CUNHA et al., 2005) e pelo fato de que algum nível de resistência pode ser perdido caso não seja considerado esse tempo de recuperação (OWUSU, 2015).

Ao adotar como critério a leitura de 24 h para calcular a taxa de mortalidade, pode-se inferir que os mosquitos de *An. darlingi* apresentaram resistência aos piretroides testados, uma vez que o percentual de mortalidade foi abaixo do estabelecido pela OMS para populações suscetíveis (WHO, 2016).

Para os bioensaios com tubos OMS com papéis impregnados com as DD de etofenprox (0,5 %) e alfacipermetrina (0,05 %), foi detectada resistência dos *An. darlingi* oriundos de Cruzeiro do Sul, uma vez que as taxas de mortalidade foram de 81,6 % para etofenprox e de 37,1 % para alfacipermetrina.

Os resultados obtidos nos bioensaios para detecção de resistência de anofelinos eram previstos, visto que o município de Cruzeiro do Sul, historicamente, apresenta alta incidência de malária e, conseqüentemente, vem utilizando intensamente o controle químico como medida de controle da doença, uma vez que o PNCM prevê o uso de inseticida na maioria das ações de controle (SUCUPIRA, 2017).

Corroborando nossos dados, estudo realizado por Sucupira (2017) em Cruzeiro do Sul, utilizando método de garrafas impregnadas, detectou resistência de *An. darlingi* ao etofenprox, bem como a outros inseticidas testados: deltametrina, cipermetrina e lambdacialotrina.

Todavia, estudo realizado no Amapá demonstrou que mosquitos de *An. darlingi* foram suscetíveis a deltametrina, cipermetrina e alfacipermetrina (GALARDO et al., 2015). Vale ressaltar que os autores fizeram somente a leitura de 30 minutos (*knockdown*), não sendo possível inferir sobre a taxa de mortalidade destes mosquitos, visto que não foi realizada leitura após 24 horas de recuperação, na ausência de inseticida.

Assim, sugere-se que esse critério de classificação baseado somente na leitura de 30 minutos para o teste com garrafas impregnadas, recomendado pela OMS, seja revisto. Ao comparar os resultados obtidos pelas duas metodologias no presente estudo, a população de *An. darlingi* de Cruzeiro do Sul seria considerada suscetível

por um método (garrafa impregnada) e resistente pelo outro (tubos OMS). Adotando-se a leitura após 24 horas de recuperação, na ausência do inseticida, os dados obtidos em ambas metodologias tornam-se concordantes, reforçando que os indícios do efeito *knockdown* causado por piretroides não seja um bom preditor de mortalidade (DACCUNHA et al., 2005; OWUSU, 2015).

O Programa Global de Malária defende que um monitoramento contínuo da resistência é de urgente necessidade e preocupa-se que muitas intervenções sejam aplicadas com nenhum ou insuficiente esforço de monitoramento, de forma que decisões sobre escolha dos mesmos são tomadas sem considerar dados sobre a resistência (WHO, 2010).

Os dados do presente estudo demonstram a importância da implantação de uma rede de monitoramento do perfil de susceptibilidade de anofelinos aos inseticidas utilizados pelos programas de controle da malária no Brasil de forma rotineira e não apenas por meio de pesquisas pontuais. Tendo em vista que a identificação precoce do *status* de resistência permite a tomada de decisão por parte do Ministério da Saúde quanto à mudança ou manutenção de estratégias de controle vetorial, torna-se essencial a escolha de um método para detecção de resistência.

Alguns trabalhos foram publicados com intuito de comparar as metodologias de tubos OMS e garrafas impregnadas, indicando que ambos métodos são complementares e eficazes para avaliar o perfil de suscetibilidade (AIZOUN et al., 2013; 2014; OWUSU et al., 2015). Entretanto, segundo Owusu et al. (2015), os dois testes não podem ser realizados indistintamente, pois apresentam elevado nível de inconsistência entre si devido a diferenças nas configurações básicas de cada ensaio.

De qualquer forma, ambos métodos são válidos e recomendados pela OMS e o objetivo do nosso estudo foi a comparação dos dois testes, levando-se em conta aspectos operacionais, condições ambientais e outros fatores que possam influenciar a execução dos ensaios por parte dos diferentes municípios, a fim de se estabelecer um monitoramento rotineiro da resistência pelos programas de malária.

As duas metodologias são de simples execução, porém alguns aspectos precisam ser considerados para a escolha do método a ser utilizado. Durante a execução dos bioensaios realizados no laboratório e no município de Cruzeiro do Sul, foi possível observar as peculiaridades de uso e aplicação de cada metodologia,

principalmente quanto às condições ambientais, processos de impregnação, risco de contaminação e aquisição de materiais.

De acordo com Silva et al (2014), a umidade relativa da região amazônica pode ser considerada um fator limitante para realização de testes com garrafas impregnadas em campo, por dificultar a leitura da mortalidade e do *knockdown* dos insetos, uma vez que pode haver condensação no interior da garrafa e causar confusão entre os insetos mortos pela ação do inseticida e os que aderiram à parede da garrafa.

Porém, esta variável não foi considerada como limitante na execução dos bioensaios deste estudo, pois os mosquitos coletados no campo foram devidamente acondicionados, alimentados com solução açucarada a 10 % e transportados para o laboratório de entomologia do município que apresentava climatização ambiente, proporcionando as condições de temperatura e umidade favoráveis à realização de ambos os métodos.

Vale destacar que a temperatura do município de Cruzeiro do Sul variou de 21 °C (mínima) a 31 °C (máxima) no período de realização dos bioensaios e a umidade relativa do ar permaneceu acima de 60 %, atingindo 97 %. Caso os ensaios fossem realizados em condições ambientais locais, possivelmente haveria dificuldades, uma vez que um bioensaio no laboratório foi descartado devido à temperatura acima de 29 °C. Tais dados enfatizam a importância de ter um controle mínimo dessas variáveis para a realização adequada dos ensaios, sendo observado que é algo possível mesmo no âmbito dos municípios.

O processo de impregnação é um fator importante a ser considerado, pois as garrafas podem ser impregnadas pelo próprio usuário, o que viabiliza estudos com diferentes concentrações para diferentes classes de inseticidas de forma rápida, robusta e econômica (PEREA et al., 2009). Diferentemente, a impregnação dos papéis requer um procedimento meticuloso, que na prática poderia ser realizado por qualquer centro de pesquisa de resistência. Porém, atualmente, é realizado de forma centralizada apenas por instituição devidamente credenciada e aprovada pela OMS (Universiti Sains Malaysia) e deve ser comprado e importado.

No entanto, para realizar as impregnações das garrafas é necessário o preparo adequado das soluções e, apesar de não exigir equipamentos especializados, é necessário ter uma estrutura mínima de laboratório para realizar essa atividade corretamente (capela de exaustão química ou máscara, vidraria adequada, pipetas).

Além disso, o processo de impregnação das garrafas é primordial e, se não executado de forma correta e homogênea, influenciará diretamente na qualidade dos resultados dos testes, diferente dos ensaios com papéis que, por serem impregnados de forma centralizada, possibilitam maior controle de qualidade (OWUSU, 2015).

Outro ponto importante é a possível contaminação dos bioensaios ou do operador. Nos ensaios com os tubos OMS os riscos são mínimos, visto que os mosquitos são introduzidos nos tubos de descanso que contêm apenas papéis de filtro, não tendo contato do capturador com o inseticida. Ao contrário do que ocorre no teste com garrafas, que apresenta alta probabilidade de contaminação das amostras, ao inserir ou retirar os insetos (SILVA, 2014), principalmente se os mosquitos forem transferidos para gaiolas de descanso a fim de realizar a leitura de 24 h.

Todas as etapas dos bioensaios realizados em Cruzeiro do Sul foram acompanhadas pelos técnicos de entomologia do município que consideraram os testes com papéis impregnados mais práticos, porém, assim como destacado por Perea et al. (2009), a burocracia para aquisição dos mesmos pode inviabilizar a realização dos ensaios.

Contudo, é válido destacar que antes os papéis eram impregnados apenas por um centro colaborador da OMS, na Malásia, mas atualmente o Laficave está se adequando para realizar a impregnação e o fornecimento de papéis, de forma que os insumos possam ser adquiridos de forma mais rápida e provavelmente com menor custo.

Além da burocracia em relação à aquisição dos papéis, cabe considerar o custo do *kit* de tubos, composto por 6 tubos. Atualmente, o valor é de US\$ 78,00 (setenta e oito dólares), aproximadamente R\$ 323,70<sup>2</sup>. Já um *kit* de garrafas, composto por 6 garrafas, custa cerca de R\$ 300,00 (trezentos reais). Ambos os materiais utilizados apresentam valor de aquisição similar, não levando-se em consideração quantidade mínima para compra, taxas de frete e de importação.

As duas metodologias foram facilmente aplicadas no laboratório e em campo e apresentam vantagens e desvantagens no processo de execução, porém para escolha do método a ser implantado para o monitoramento da resistência no Brasil é necessário considerar aspectos de cada município, relacionados à infraestrutura, recursos humanos e financeiros, capacidade técnica, entre outros.

---

<sup>2</sup> Cotação em 31 de agosto de 2019: US\$ 1,00 = R\$ 4,15.

Além disso, é essencial a articulação das três esferas de governo para o fortalecimento da vigilância entomológica e discussão quanto a viabilidade da implementação de uma rede de monitoramento do *status* de susceptibilidade dos anofelinos no país, considerando as particularidades dos municípios da região amazônica.

Apesar das limitações desse estudo, como: a falta de uma linhagem de referência e o uso de uma espécie de *Anopheles* para estabelecer a DD de inseticidas diferente da que foi testada em campo, o mesmo aponta a importância de se buscar alternativas para os fatores que limitam a realização do monitoramento da resistência de anofelinos a inseticidas utilizados pelos programas de malária do Brasil.

Uma possível alternativa para compensar a ausência de uma linhagem de referência para calibração das DD, seria a realização de ensaios do tipo tempo de *knockdown* (*KdT*). Essa metodologia usa o mesmo número de réplicas e mosquitos que um ensaio DD, porém, apresenta a vantagem de fornecer dados quantitativos, já que o percentual de queda ou mortalidade é avaliado ao longo do tempo de exposição a uma dose única do inseticida.

Outra abordagem poderia ser a realização de avaliação regular de uma população de *Anopheles* para obtenção de dados sequenciais que possibilitem verificar alterações no perfil de resistência a determinado inseticida ao longo do tempo. Tal avaliação poderia ser realizada pelos profissionais de entomologia dos municípios.

Por meio deste trabalho foi possível observar as particularidades dos dois métodos para detecção de resistência a inseticidas, recomendados pela OMS. Também foi possível aplicá-los em campo de forma eficiente e efetiva, demonstrando que é viável a realização dos mesmos no âmbito do município. Cabe destacar que os profissionais de entomologia de Cruzeiro do Sul, envolvidos na execução desse trabalho, apresentaram alto grau de comprometimento e conhecimento para o desenvolvimento dos ensaios.

Ainda que não seja pertinente inferir que as DD de etofenprox e alfacipermetrina, encontradas no processo de calibração dos testes de garrafa, sejam as mais adequadas para realização de monitoramento das populações de *Anopheles* do Brasil, foi possível sugerir o perfil de susceptibilidade da população *An. darlingi*, coletada em Cruzeiro do Sul, frente aos piretroides: etofenprox e alfacipermetrina.

Estas informações poderão subsidiar o Ministério da Saúde na realização de ensaios para avaliação de resistência de diferentes populações de *Anopheles* no país.

Por meio desse trabalho, também foi possível refletir o quanto a falta de incentivo e priorização das atividades de vigilância entomológica podem desmotivar profissionais e impossibilitar avanços dos programas de controle de doenças, cujo agente etiológico é transmitido por vetores. A equipe de entomologia de Cruzeiro do Sul expôs o quanto a participação nesse projeto despertou o interesse em retomar as atividades de vigilância entomológica no município. Espera-se que, com essa motivação e a publicação do guia para ações de captura de anofelino pela TAHP, as atividades de vigilância entomológica sejam retomadas.

Ademais, o principal intuito desse trabalho foi preencher lacunas de conhecimentos quanto à viabilidade do uso das metodologias para avaliação de resistência a inseticidas, recomendadas pela OMS, e assim, contribuir para o fortalecimento da vigilância entomológica de *Anopheles* e, conseqüentemente, no direcionamento das ações de controle vetorial.

## 6 CONCLUSÕES

Para bioensaios com garrafas impregnadas, foram encontradas as doses diagnósticas de 20 µg/garrafa de etofenprox e 20,5 µg/garrafa de alfacipermetrina. Estas doses foram definidas com base em ensaios com população de *An. aquasalis* mantida em laboratório há duas décadas.

Sugere-se como possíveis alternativas para compensar a ausência de uma linhagem de referência para calibração das DD: ensaio semi - quantitativo do tipo tempo letal (*KdT*) ou uma avaliação sistemática de uma população de *Anopheles* para verificar alterações no perfil de resistência a determinado inseticida ao longo do tempo.

Sugere-se revisar a leitura de 30 minutos de exposição nos testes garrafa para avaliação da taxa de mortalidade, já que pode haver recuperação de alguns insetos após 24 horas da exposição.

A população de *An. darlingi* de Cruzeiro do Sul apresentou resistência aos piretroides testados tanto nos ensaios de garrafas impregnadas, considerando-se a leitura de 24 horas, quanto nos testes com tubos OMS.

As duas metodologias recomendadas pela OMS para detecção de resistência a inseticidas foram eficazes e de fácil aplicação no âmbito do município de Cruzeiro do Sul, competindo aos estados e municípios escolher qual método apresenta melhor custo benefício considerando as especificidades de cada local.



## **7 PERSPECTIVAS**

Para complementar os achados deste estudo, será realizada avaliação da presença de mutação *kdr* nos mosquitos coletados no município de Cruzeiro do Sul que foram submetidos aos bioensaios para detecção de resistência.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aïzoun N, Aïkpon R, Azondekon R, Gnanguenon V et al. Centre for Disease Control and Prevention (CDC) bottle bioassay: A real complementary method to World Health Organization (WHO) susceptibility test for the determination of insecticide susceptibility in malaria vectors. *Journal of Parasitology and Vector Biology*. 2014; 6(3): 42-47.

Aïzoun N, Ossè R, Azondekon R, Alia R, Oussou O, Gnanguenon V et al. Comparison of the standard WHO susceptibility test and CDC bottle bioassays for the determination of insecticides susceptibility in malaria vectors and their correlations with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors*. 2013; 6:147.

Barata RCB. Malária no Brasil: Panorama Epidemiológico na Última Década. *Caderno de saúde pública*. Rio de Janeiro, 1995; 11 (1): 128-136.

Bisset JA 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Rev Cubana Med Trop* 54:202-219.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saude*. 2007; 16 (4): 279-293.

Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2004; 99(2): 199-203.

Braga TA 2017. Estudo do perfil de resistência a inseticidas e seus mecanismos de ação em *Anopheles albitarsis* s. s. (Arribáizaga, 1878) e *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932) mantidos em laboratório e *Anopheles albitarsis* s. s. capturados no campo. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Biologia Parasitária. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xvi+ 70 pp.

Braga, TA. Adequação de método OMS para a avaliação do status de susceptibilidade/resistência de populações de anofelinos neotropicais a inseticidas químicos. Monografia [Graduação em Ciências Biológicas] – Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2014.

Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*. 2017; 5 (10): 1038-1046.

Braz RM, Duarte EC, Tauil PL. Caracterización de las epidemias de malaria en los municipios de la Amazonia brasileña en 2010. *Cad Saúde Pública*. 2013;10.

Brogdon WG, McAllister JC. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1998; 14 (2): 159 - 164.

Carlos BC, Rona LDP, Christophides GK, Souza-Neto JA. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. *Pathog Glob Health*. 2 de janeiro de 2019;113(1):1–13.

Casida JE, Quistad GB. Golden age of insecticide research: past, present, or future. *Annual Review Entomological*. 1998; 43: 1–16.

Cesário M, Cesário RR. Malária, Amazônia e desenvolvimento. *Sci American Brasil*. 2006; 54:54–5.

Coleman M, Hemingway J, Gleave KA, Wiebe A, Gething PW, Moyes CL. Developing global maps of insecticide resistance risk to improve vector control. *Malar. J.* 2017; 16:86.

Confalonieri UEC. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para a análise de paisagens e doenças. *Estud Av.* 2005;53(19):221–36.

Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ; 1994. 225 p.

Corbel V, N'Guessan R. Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. In: Manguin S. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. INTECH; 2013. 579- 633.

Costa KMM, Almeida WAF, Magalhães IB, Montoya R, Moura MS, Lacerda MVG. Malária em Cruzeiro do Sul (Amazônia Ocidental brasileira): análise da série histórica de 1998 a 2008. *Rev Panam Salud Public*. 2010 nov;28(5):353-60.

Couto AARD, Zimmerman RH, Lounibos LP, Arruda M, Galardo AKR, Wirtz R. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1o de março de 2007;76(3):461–9.

da-Cunha M, Lima JBL, Brogdon WG, Moya GF, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(4): 441-444.

Daniel-Ribeiro CT, Lourenço-De-Oliveira R, Teva A, Deane LM, de Oliveira-Ferreira J. Natural Malaria Infections in Anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1o de julho de 1990;43(1):6–10.

Deane LM, Ledo JF, Freire EPS, Cotrim J, Sutter VA, Andrade GC. Controle da malária na Amazônia pela aplicação domiciliar de DDT e sua avaliação pela determinação do índice de transmissão. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 1948; 2: 545-560.

Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(2):223-30.

Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(suppl 2):5–14.

Fonseca-González I et al. Dosis diagnósticas para vigilar la resistencia a insecticidas de los vectores de malaria en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología.*2010; 36 (1): 54-61.

Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107 (3): 387-395.

Forattini OP. *Culicidologia médica.* São Paulo: Edusp; 2002.

Gadelha P. Conforming strategies of public health campaigns to disease specificity and national contexts: Rockefeller Foundation's early campaigns against hookworm and malaria in Brazil. *Parassitologia.* 1998;40(1-2):159-75.

Galardo AKR et al. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2015; 48(6):765-769.

Georghiou GP. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection.*1994; 75(4): 51-9.

Gorham JR, Stojanovich CJ, Scott HG. *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de sudamerica oriental.* United States Department of Health, Education, and Welfare. 1967, 64 p.

Grignard L, Shan S, Chua TH, William T, et al. Natural Human Infections With *Plasmodium cynomolgi* and Other Malaria Species in an Elimination Setting in Sabah, Malaysia. *The Journal of Infectious Diseases,* 2019; 220:1946–9.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004; 34: 653-65.

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol*. 2000; 45: 371-391.

Himeidan YE, Temu EA, Kweka EJ. Insecticides for Vector-Borne Diseases: Current Use, Benefits, Hazard and Resistance. In: Perveen F. *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. INTECH; 2012. 683- 708.

Hochman G. From autonomy to partial alignment: National Malaria Program in the time of global eradication, Brazil, (1941 - 1961). *Bull Can Hist Med*, 2008; 25: 161-192.

Karaağaç SU. Insecticide Resistance. In: Perveen F. *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. INTECH; 2012. 469- 478.

Karunamoorthi K, Sabesan S. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Disease with Special Reference to Mosquitoes: A Potential Threat to Global Public Health. *Health Scope*. 2013; 2(1): 4-18.

Lalremruata A, Magris M, Vivaas-Martínez S, Koehler M, et al. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*. 2015; (2): 1186 –1192.

Lana RM 2017. *Malária e Dengue no Acre: Análise da dinâmica espacial e temporal em um estado em transformação*. Tese de doutorado. Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, 230 pp.

Laporta GZ, Linton Y-M, Wilkerson RC, Bergo ES, Nagaki SS, Sant’Ana DC, et al. Malaria vectors in South America: current and future scenarios. *Parasit Vectors*. dezembro de 2015;8(1):426.

Lapouble OMM, Santelli ACFS, Muniz-Junqueira MI. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. *Rev. Panam. Salud Publica* 2015; 38(4):300–306.

Lemine AMM et al. Pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles arabiensis* in Nouakchott, Mauritania. *Parasites & Vectors*. 2018; 11:344.

Loiola CCP, Mangabeira da Silva CJ, Tauil PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev Panam Salud Publica* 2002;11(4):235-44.

Lourenço-de-Oliveira R, Guimarães AEG, Arlé M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, Deane LM. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondônia state, Amazon Region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1989; 84: 501-514.

Magalhães IB. Controle de *Anopheles spp.* com *Bacillus sphaericus*, caso Acre – Vale do Juruá. Simpósio de Controle Biológico - SICONBIOL: inovar para preservar a vida [Internet]. 2007 dez; Brasília - DF, Brasil [acesso em 20 de abril de 2019]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/186025>.

Mallet J . The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? Trends Ecol Evol. 1989; 4(11): 336-40.

Mathenge EM, Gimnig J E, Kolczak M. Effect of permethrinimpregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. J. Med. Entomol. 2001; 38: 531 -536.

Messenger LA et al. Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* from Ethiopia (2012–2016): a nationwide study for insecticide resistance monitoring. Malaria Journal. 2017; 16:469.

MPF-AC 2008. Ministério Público Federal no Acre. MPF/AC leva caso das iscas humanas à Justiça. 2008 [acesso em 13 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://www.prac.mpf.mp.br/noticias/casos-das-iscas-humanas>.

MS 2005. Uso racional de inseticidas para o controle de vetores da malária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica N.º 187/2005 - DIGES/SVS/MS.

MS 2006. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 52p.

MS 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Guia de gestão local do controle da malária. Módulo 2. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 59p.

MS 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. 36 p.

MS 2011. Uso da termonebulização no controle da malária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica N.º 09/2011 – CGPNM/DEVEP/SVS/MS.

MS 2014. Uso do etofenprox PM 20% para Borrifação Residual Intradomiciliar no controle da malária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Informativa N.º 010, de 2014- CGPNM/DEVEP/SVS/MS.

MS 2017. Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM [Internet]. 2017 [acesso em 18 de outubro de 2019]. Disponível em: <http://http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.

MS 2019a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da epidemiologia em Serviços. Guia de vigilância em saúde. 3ª ed. Vol. Único. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. 740 p.

MS 2019b. Ministério da Saúde. Dados epidemiológicos de malária [Internet]. 2019 [acesso em 06 de dezembro de 2019]. Disponível em: [https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1519\\_2019\\_03\\_11/casos\\_notificados\\_2018\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1519_2019_03_11/casos_notificados_2018_regio_Amaznica).

MS 2019c. Ministério da Saúde. Lista de municípios pertencentes as áreas de risco ou endêmicas para malária [Internet]. 2018 [citado 25 de junho de 2019]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/25/Lista-de-municipios-pertencentes-as-areas-de-risco-ou-endemicas-para-malaria.pdf>.

MS 2019d. Ministério da Saúde. Dados epidemiológicos de malária [Internet]. 2019 [acesso em 2 de abril de 2019]. Disponível em: [https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Dadosparacidade\\_2019/Auctone\\_Municipio](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Dadosparacidade_2019/Auctone_Municipio).

MS 2019e. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Guia para o Planejamento das Ações de Captura de Anofelinos pela Técnica de Atração por Humano Protegido (TAHP) e Acompanhamento dos Riscos à Saúde do Profissional Capturador. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. 27p.

MS 2019f. Ministério da Saúde. Controle de vetores [Internet]. 2019 [acesso em 14 de abril de 2019]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/controle-de-vetores>.

Nyka TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2013; 43:407-416.

Orjuela LI et al. Insecticide Resistance and Its Intensity in Populations of Malaria Vectors in Colombia. *BioMed Research International*. 2018, Volume 2018, 12 p.

Osorio Quintero L, Dutary Thatcher B, Tadei WP. Biología de anofelinos amazônicos. XXL ocorrência de espécies de *Anopheles* e outros culicídeos na área de influência da hidrelétrica de Balbina - cinco anos após o enchimento do reservatório. *Acta Amaz*. dezembro de 1996;26(4):281–95.

Owusu HF, Jančárová D, Malone D, Müller P. Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology? *Parasites & Vectors*. 2015; 8:357.

PAHO 2008. Avaliação da aceitação e uso de mosquiteiros impregnados de longa duração (MILD) pela população do vale do Juruá, AC. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=document&layout=default&alias=127-vigilancia-epidemiologica-e-ambiental-tc-35-produtos-prioritarios-2009-2010-7&category\\_slug=produtos-prioritarios-2009-2010-088&Itemid=965](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=127-vigilancia-epidemiologica-e-ambiental-tc-35-produtos-prioritarios-2009-2010-7&category_slug=produtos-prioritarios-2009-2010-088&Itemid=965).

PAHO 2012. Malaria Champion of the Americas - Pan American Health Organization. Disponível em: <<http://www.paho.org/campeonesmalaria/?lang=es>>.

PAHO 2013. Malaria Champion of the Americas - Pan American Health Organization. Disponível em: <<http://www.paho.org/campeonesmalaria/?lang=es>>.

Perea EZ, León RB, Salcedo MP, Brogdon WG, Devine GJ. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malar. J*. 2009; 8: 208.

Perry, T., Batterham, P., Daborn, P.J.. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 2011; 41, 411-422.

Quiñones ML, Norris DE, Conn JE et al. Insecticide Resistance in Areas Under Investigation by the International Centers of Excellence for Malaria Research: A Challenge for Malaria Control and Elimination. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015; 93(3): 69-78.



- Rakotoson JD et al. Insecticide resistance status of three malaria vectors, *Anopheles gambiae* (s.l.), *An. funestus* and *An. mascarensis*, from the south, central and east coasts of Madagascar. *Parasites & Vectors*. 2017; 10:396.
- Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 2002; 298: 179-181.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol*. 2011; 27(2): 91-98.
- Roberts DR, Alecrim WD. Behavioral Response of *Anopheles darlingi* to DDT sprayed House Walls in Amazonia. *Bull Pan Am Health Organ*. 1991; 25(3): 210-217.
- Rodrigues EC, Neto DL Controle da malária em um município amazônico. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 2011; 19(6):[09 telas].
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ de, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline Species Complexes in Brazil. Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. setembro de 1998;93(5):651-5.
- Saha D. Biochemical Insecticide Resistance in Tea Pests. In: *Insecticides Resistance*. INTECH; 2016. 347- 390.
- Santos RLC et al. Avaliação do efeito residual de piretroides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. *Rev. Saúde Pública*. 2007; 41(2): 276 - 283.
- Silva APB, Alves WS, Martins AJR, Tadei WP, Santos JMM. Adaptação de um Bioensaio Simplificado para Avaliação do Status de Susceptibilidade em Larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao Piretroide Deltametrina. *BioAssay*. 2014; 9:4.
- Sougoufara S, Thiaw O, Cailleau A, Diagne N, Harry M, Bouganali C et al. The Impact of Periodic Distribution Campaigns of Long-Lasting Insecticidal-Treated Bed Nets on Malaria Vector Dynamics and Human Exposure in Dielmo, Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017; 98(5):1343-1352.
- Sucupira IMC 2017. Biologia da transmissão de malária e da suscetibilidade de *Anopheles spp* aos inseticidas piretroides em área ambiental modificada e não

modificada da Amazônia brasileira. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas, Belém - PA, 113 pp.

Tadei WP, Dutary Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. Rev Inst Med Trop São Paulo. abril de 2000;42(2):87–94.

Tadei WP, Scarpassa VM, Thatcher BD, Santos JM, Rafael MS, Rodrigues IB. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1o de agosto de 1998;59(2):325–35.

Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C. A malária no Brasil. Caderno de saúde pública. Rio de Janeiro, 1985; 1 (1): 71-111.

Thiaw O et al. Investigating insecticide resistance and knock-down resistance (kdr) mutation in Dielmo, Senegal, an area under long lasting insecticidal-treated nets universal coverage for 10 years. Malaria Journal. 2018; 17:123.

Tomizawa M., Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. Annual Review Entomology. 2003; 48: 339– 64.

Valle D, Belinato TA, Martins AJ 2015. Controle químico de *Aedes aegypti*. Resistência a inseticidas e alternativas. In Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (Orgs.). Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 93-126.

Vijverberg HPM, Bercken J 1990. Neurotoxicological Effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Toxicology p:105-126.

Ware GW, Whitacre DM 2004. An introduction to insecticides [online]; Minnesota. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>.

WHO 1998. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/CPC/ MAL/98.12.

WHO 2010. World Health Organization. The technical basis for coordinated action against insecticide resistance: preserving the effectiveness of modern malaria vector control. Geneva: World Health Organization, Meeting report. 2010.

WHO 2016. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2<sup>nd</sup> ed. Geneva: World Health Organization; 2016.

WHO 2018a. World Health Organization. World malaria report 2018.

WHO 2018b. World Health Organization. Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010-2016. Geneva:(World Health Organization), 2018.

WHO 2019a. Guidelines for malaria vector control – 1<sup>st</sup> ed. Geneva: World Health Organization; 2019.

WHO 2019b. World Health Organization. Prequalification Vector Control [Internet]. 2019 [acesso em 24 de junho de 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/pq-vector-control/en/>.

Zerba E. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitology Today*. 1988; 4 (7): 53-57.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo 1 - Licença emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais.



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

## LICENÇA

**L-004/2018**

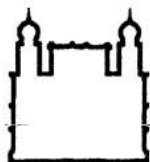
Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-003/2018), intitulado “**Estudos da fisiologia, desenvolvimento e controle de artrópodes vetores**”, sob a responsabilidade de **José Bento Pereira Lima** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/03/2022 e inclui o uso total de:

Animal	espécie ou linhagem	quant (total)	♂	♀	idade	peso	origem (*)
<input checked="" type="checkbox"/> camundongo	Mus musculus (Swiss Webster)		96				ICTB/Fiocruz
<input type="checkbox"/> Rato							
<input type="checkbox"/> Coelho							
<input type="checkbox"/> Hamster							
<input type="checkbox"/> Aves							
<input type="checkbox"/> primata não humano							
<input checked="" type="checkbox"/> Outros	Cavia porcellus		72	72			ICTB/Fiocruz

**Observação:** Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 19 de março de 2018.



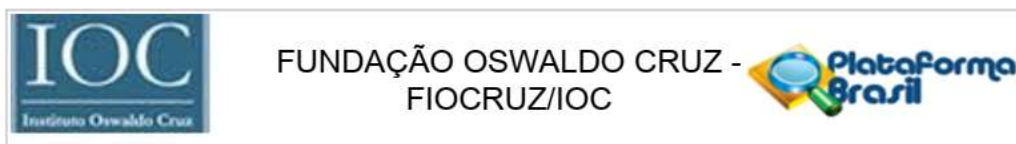
Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

Flávio Alves Lara  
Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz  
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

## 9.2 Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética Institucional



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Comparação de dois métodos para avaliação de resistência a inseticidas usados em anofelinos pelos programas de controle do norte do Brasil

**Pesquisador:** THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 98624718.4.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
FUNDACAO OSWALDO CRUZ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.972.974

#### Apresentação do Projeto:

O projeto de Pesquisa é desenvolvido para obtenção de título de Mestrado, sendo a Aluna, a qual assina como Responsável principal pelo projeto, que aborda a comparação de dois métodos para avaliar a resistência a inseticidas comumente usados no controle de anofelinos na região Nordeste do Brasil. No Brasil, a área de maior endemicidade para estas enfermidade é a região da Amazônia Legal que é composta por nove estados brasileiros (Amazonas, Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Tocantins, Pará, Mato Grosso e Maranhão) que concentra mais de 99 % dos casos do país. Vale destacar que apesar da Amazônia Legal ser uma área de alto risco para ocorrência de malária, a distribuição dos casos de malária é heterogêneo, pois os estados que compõem a referida região apresentam perfis epidemiológicos distintos. Assim a malária vem sendo um grave problema de saúde pública e até o momento, no Brasil, não há dados sobre resistência do vetor, nem tampouco uma rede de monitoramento que avalie a interação desta para os anofelinos com os inseticidas utilizados pelos programas de controle da malária. Sendo assim, esse projeto tem como objetivo a comparação de dois métodos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para avaliação de populações de anofelinos do norte do Brasil, bem como conhecer o nível de resistência dos anofelinos a inseticidas usados pelos programas de controle. O projeto prevê uma etapa de padronização de ensaios de garrafas impregnadas e tubos (OMS) com papéis impregnados e posteriormente a realização de testes em campo, nos quais as fêmeas de

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.972.974

*Anopheles darlingi*, principal espécie vetora do patógeno que causa malária no Brasil, serão coletadas em Cruzeiro do Sul (AC), município com alta incidência de malária, e expostas às doses de inseticidas determinadas nos ensaios de laboratório, com avaliação da mortalidade. Com esse estudo, pretende-se descrever as peculiaridades do uso e aplicação das referidas metodologias no campo e em laboratório, a fim de que seja possível a realização constante do monitoramento da resistência no país, levando-se em conta diferenças climáticas e de infraestrutura das diferentes regiões.

O Projeto de pesquisa é todo fundamentado para captura e análise da resistência, em comparação a dois inseticidas, das populações de mosquitos anofelinos, entretanto o meu ver o projeto está sendo enviado para este comitê devido a necessidade de utilização de atração humana, por um período de duas horas, para atrair estes mosquitos que apresentam comportamento altamente antropofílico.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Geral:

Comparar dois métodos preconizados pela OMS para avaliação de populações de anofelinos quanto ao status de resistência a inseticidas usados pelos programas de controle de malária do norte do Brasil.

Objetivos específicos:

- a) Padronizar o bioensaio com garrafa impregnada com dois inseticidas, tendo como referência *Anopheles* mantidos em laboratório.
- b) Padronizar o bioensaio de tubos com papéis impregnados com dois inseticidas, tendo como referência *Anopheles* mantidos em laboratório;
- c) Comparar os dois métodos para avaliação do perfil de resistência de populações de *A. darlingi* provenientes de Cruzeiro do Sul, município da região Amazônica.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Na realidade os riscos apresentados pelo Pesquisador são referentes ao próprio pesquisador e sua Equipe que estarão realizando as capturas no campo (ambiente natural) do vetor, pois o foco

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 2.972.974

de seu estudo não se baseia nos seres humanos. Desta forma, as ações de execução das atividades de comparação à resistência dos mosquitos do gênero Anopheles, apresentada neste protocolo tem como risco somente aquele que a Equipe de pesquisa terá ao submeter os 4 voluntários (não da pesquisa, mas voluntários para realizar a captura dos anofelinos).

Então, segundo o Pesquisador:

“O método de captura de mosquitos anofelinos por atração humana protegida é atualmente a técnica com maior eficácia e viabilidade, segundo o Ministério da Saúde (MS, 2017b). Os capturadores são pessoas treinadas, protegidas com meias grossas, o que torna o risco de serem picados e contraírem malária muito pequeno, menor do que o risco que existe para moradores da área. Essa técnica é a mais indicada para coleta de Anopheles darlingi, garantindo maior número de espécimes em cada coleta, quando comparada com dados de captura realizadas com uso de armadilhas (Lima et al, 2017).”

Benefícios:

Como a pesquisa não tem como meta precípua o voluntário humano, o benefício pelo Pesquisador apresentado não refere-se ao mesmo. Então para o Pesquisador o Benefício está em uma quantidade maior de insetos, uma vez que seguiu a especificidade parasitaria do mosquito.

A captura de fêmeas de Anopheles darlingi usando atração humana protegida realizada por técnicos treinados, apresentará mais sucesso e número suficiente de mosquitos para realização de todos os ensaios necessários para avaliação de resistência a piretróides em campo.”

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto de pesquisa será desenvolvido no Laboratório (LAFICAVE) de reconhecida expertise neste campo de pesquisa. Entretanto o envio deste protocolo de estudo é tão somente para legitimar a utilização dos Agentes de Saúde como atrativo humano, para capturar espécies do Gênero Anopheles. Os mesmos além de EPIs, também farão uso da armadilha MOSQ Tent, que protege a fonte de atração do contato direto com os insetos.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os documentos abaixo relacionados. estão em conformidade com a RS CNS466/12

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 2.972.974

- Folha de Rosto-OK – Devidamente Assinada pelo Vice-Diretor da Unidade FIOCRUZ/ IOC – Embora a mesma esteja assinada pela Aluna, a Orientadora Dra Cynara Rodvalho também assina.
- Projeto de pesquisa- OK
- Projeto de pesquisa Plataforma Brasil- OK
- Cronograma- OK
- TCLEs- OK-
- Orçamento -OK

**Recomendações:**

Recomendamos que o TCLE, seja adequado, isto é, incluindo neste termo um tópico de como será a participação dos Agentes de Saúde e de seu comprometimento em utilizar os EPIs necessários para o desenvolvimento da pesquisa. Também sugerimos a retirada do tópico onde há a solicitação do documento de identificação do Agente que efetuará a captura.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Em conformidade com a RS CNS466/12 e com base na apreciação realizada pelos membros do CEP nos documentos apresentados na Plataforma Brasil, vimos concluir que o projeto se encontra APROVADO, pois as medidas profiláticas serão empregadas de modo a manter a integridade do pessoal que já tem como parte de sua rotina a captura de mosquitos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, em sua 243ª Reunião Ordinária, realizada em 16.10.2018, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 decidiu sobre a APROVAÇÃO, deste protocolo de Pesquisa dentro dos moldes apresentados.

Cabe ressaltar que a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Apresentar relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de cinco anos após o término da pesquisa.

Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.972.974

pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto.

Justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. (Res CNS 466/12, item XI).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1084892.pdf	14/09/2018 15:45:37		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto.pdf	14/09/2018 15:44:21	THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado.pdf	09/08/2018 11:28:18	THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	09/08/2018 11:24:36	THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 20 de Outubro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Maria Regina Reis Amendoeira**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

### 9.3 Anexo 3 - Autorização SISBIO para coleta de anofelinos.



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

#### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64267-1	Data da Emissão: 04/09/2018 19:38:21	Data da Revalidação*: 04/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Cynara de Melo Rodovalho	CPF: 053.498.796-69
Nome da Instituição: Fundação Oswaldo Cruz	CNPJ: 33.781.055/0001-35

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e transporte de Anopheles	11/2018	06/2019

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA	Pesquisadora	332.465.398-39	Brasileira

#### Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
4	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cogen">www.mma.gov.br/cogen</a> .

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Caverna?	Tipo
1	Bairros	Não	Fora de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0642670120180904

Página 1/3



### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64267-1	Data da Emissão: 04/09/2018 19:38:21	Data da Revalidação*: 04/09/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Cynara de Melo Rodvalho	CPF: 053.498.796-69
Nome da Instituição: Fundação Oswaldo Cruz	CNPJ: 33.781.055/0001-35

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anopheles	5000

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Coleta manual, Outros métodos de captura/coleta(Armadilha Mosqtent)

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Prefeitura Municipal de Cruzeiro do Sul - AC	Outro

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0642670120180904

Página 2/3



