

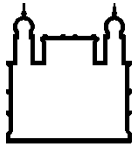
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETOR DA *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM*.**

**VANESSA DE ARAÚJO BARBOSA**

Rio de Janeiro  
Janeiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**VANESSA DE ARAÚJO BARBOSA**

Avaliação de uma nova estratégia de controle de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientador (es):** Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil  
Prof. Dr. James Gordon Hamilton

**RIO DE JANEIRO**

Janeiro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B238 Barbosa, Vanessa de Araújo

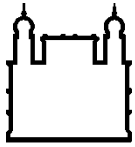
Avaliação de uma nova estratégia de controle de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania (Leishmania) infantum* / Vanessa de Araújo Barbosa. – Rio de Janeiro, 2016.  
xiv, 60 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.

Bibliografia: f. 49-60

1. Leishmanioses. 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. MILDs. 4. Feromônio sintético. 5. Controle. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

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

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: VANESSA DE ARAÚJO BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *LUTZOMYIA*  
*LONGIPALPIS* (DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETOR DA *LEISHMANIA*  
*(LEISHMANIA) INFANTUM*.**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil**  
**Prof. Dr. James Gordon Hamilton**

**Aprovada em: 26/01/2016**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Daniele Pereira de Castro – Presidente (IOC/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Israel de Souza Pinto (CPQRR/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Felipe de Mello Vigoder (UFRJ)**

**Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Moreira (IOC/Fiocruz)**

**Prof. Dr. Daniela de Pita Pereira (IOC/Fiocruz)**

Rio de Janeiro, 26 de janeiro de 2016

**Dedico este trabalho aos meus pais,  
Oswaldo e Edna; ao meu irmão  
Vinicius, pelo apoio e carinho.**

## **AGRADECIMENTOS:**

À família, que me deu incentivo e apoio durante toda minha vida. Vocês são os maiores responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional;

Ao meu querido mestre, Dr. Reginaldo Brazil, pelas oportunidades e seus ensinamentos. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial! Te admiro e sou muito grata pela sua orientação que vai além da vida acadêmica. Tenho muito orgulho em fazer parte da sua equipe! Tudo que aprendo com o senhor influencia não só minha carreira profissional, como também a pessoal;

Ao professor James Gordon Hamilton, que além de colaborador deste projeto também sempre esteve presente durante todo o desenvolvimento do trabalho como meu co-orientador. Obrigada por ser presente e me ajudar sempre que preciso.

À Andressa A. Fuzari Rodrigues, uma grande amiga, na qual só tenho o que agradecer por tudo que me ensinou. Admiro seu profissionalismo e grande mãe que se tornou! Você é um exemplo pra mim. Espero que nossa parceria e amizade perdurem por muito tempo;

Ao amigo, Cristian de Souza, por ser um dos protagonistas desse trabalho. Sempre prestativo e com boa vontade. Sem você, a execução desse projeto seria impossível! Obrigada pelas latas de doce de leite e por me aturar ao longo dessa trajetória;

Ao amigo Fábio Pieri que me recebeu em sua casa e me apresentou Governador Valadares. Só tenho que lhe agradecer pela receptividade, carinho e os momentos de descontração que compartilhamos. Você se tornou um grande amigo na minha vida!;

À turma querida de mestrado que sempre se manteve unida nas horas alegres de comemoração dos aniversários, mas também nas horas difíceis de dedicação e empenho durante as disciplinas. Admiro cada um pela coragem e trajetória até aqui! Só tenho a agradecer por tudo que aprendi com vocês e pelas amizades que construí e vou levar para o resto da vida! “Vocês são meus orguuuulhos!”

Ao Francisco, Wagner e André assim como toda equipe do laboratório de Doenças Parasitárias, sempre dispostos a ajudar;

À coordenação e secretaria acadêmica do programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pelo acolhimento e apoio ao longo do curso;

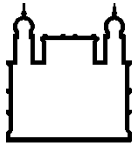
Ao corpo docente do programa de Pós-graduação em Medicina Tropical por fazer me apaixonar ainda mais pela minha profissão. Vocês fizeram toda diferença na minha formação! Muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro;

Ao Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz pelo suporte na realização deste trabalho.

**Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e,  
então, com todo o coração, dedicar-se  
a ele. (Siddhartha Gautama)**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETOR DA *Leishmania (Leishmania) infantum*.**

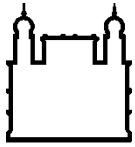
### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**Vanessa de Araújo Barbosa**

*Lutzomyia longipalpis* é considerado um complexo de espécies capaz de produzir diferentes quimiotipos de feromônios. A borrifação de inseticida residual para controle de flebotomíneos tem sido incapaz de impedir a propagação da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. Desta forma, novas abordagens com um bom custo-benefício são necessárias para controlar populações de *Lu. longipalpis*. Mosquiteiros Impregnados de Longa Duração (MILD) oferecem uma nova estratégia de controle e pode ser uma alternativa para borrifação em locais de agregação, tais como galinheiros, fixados em suas superfícies. O feromônio sintético ( $\pm$ ) -9-metilgermacreno-B pode aumentar a atração de *Lu. longipalpis* em ambientes naturais. Neste estudo, testamos duas estratégias potenciais para o controle de *Lu. longipalpis* utilizando o feromônio sintético em conjunto com MILDs, com o efeito de "atrair e matar" o vetor no mesmo local. Este estudo foi realizado em Governador Valadares, Minas Gerais, município de ocorrência de LVA Brasil. Experimentos de campo foram realizados em galinheiros experimentais para comparar a eficácia e efeito residual de inseticidas e mosquiteiros impregnados na mortalidade de *Lu. longipalpis*, associando ambos os tratamentos com feromônio sintético. Este estudo mostrou que o mosquiteiro impregnado e a borrifação mataram aproximadamente 100% dos flebotomíneos em até 2 meses após os tratamentos. Após 4 meses, o efeito letal do mosquiteiro impregnado reduziu para 69% e inseticida residual para 89%. Concluímos que o MILD é uma ferramenta potencial para matar flebotomíneos em locais de agregação, e o feromônio sintético pode aumentar a sua eficácia atraindo mais insetos para serem mortos pelo mosquiteiro. Mais testes de campo por um longo período são necessários para identificar a viabilidade de tratamento de superfícies com mosquiteiros impregnados como parte do programa de controle da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmanioses, *Lutzomyia longipalpis*, MILDs, feromônio sintético, controle.



Ministério da Saúde

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

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **EVALUATION OF A NEW CONTROL STRATEGY OF *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE), VECTOR OF *Leishmania (Leishmania) infantum*.**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL**

**Vanessa de Araújo Barbosa**

*Lutzomyia longipalpis* is considered a species complex with variability in pheromones production. The residual insecticide spraying to control sand flies have been unable to prevent the spread of the American visceral Leishmaniasis (AVL) across Brazil. In this way, new cost-effective approaches are needed to manage populations of the vector *Lu. Longipalpis*. Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) offer a new control strategy and can be an alternative of spraying on aggregation sites, such as chicken sheds, fixed in their surfaces. The synthetic pheromone ( $\pm$ ) -9-methylgermacrene-B can increase attraction of *Lu. longipalpis* in natural environments. Here, we test two potential strategies for *Lu. longipalpis* control using the synthetic pheromone in conjunction with LLINs, with the effect of "attracting and killing" the vector at the same site. This study was conducted in Governador Valadares, Minas Gerais, a municipality of the occurrence of AVL in Brazil. Field experiments were performed with experimental chicken sheds to compare the efficacy and residual effect of insecticide spraying and impregnated netting in *Lu. Longipalpis* mortality, associating both treatments with synthetic pheromone. This study showed that the impregnated netting and spraying killed approximately 100% of sandflies in up to 2 months after treatment. After 4 months of exposure treatments, the lethal effect of netting reduced to approximately 69% and residual insecticide to 89%. We concluded that insecticide impregnated netting is a potential tool in killing sand flies in aggregation sites, and synthetic pheromone can increase their effectiveness attracting more sand flies to be killed by netting. More field trials for a long period are needed to identify the feasibility of treating surfaces with impregnated netting as part of visceral leishmaniasis control program.

Keywords: Leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, LLINs, synthetic pheromone, control.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Flebotomíneos</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Posição Sistemática.....	1
1.1.2 Biologia dos flebotomíneos.....	1
1.1.3 Importância médico veterinária.....	3
1.1.4 O complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	6
<b>1.2 Comunicação química em insetos</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 O estudo dos feromônios em insetos .....	8
1.2.2 Feromônios no complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	10
<b>1.3 Controle de flebotomíneos</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Borrifação de inseticidas de ação residual.....	12
1.3.2 Mosquiteiros impregnados de longa duração (MILDs) .....	14
<b>1.4 Justificativa</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Considerações éticas</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Área de estudo</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Dispensadores de feromônio sintético</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4 Escolha dos inseticidas</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5 Galinheiros experimentais</b> .....	<b>22</b>
<b>3.6 Experimentos de campo</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7 Identificação de flebotomíneos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.8 Análise do feromônio</b> .....	<b>28</b>
<b>3.9 Análise dos dados</b> .....	<b>28</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Experimentos de campo da fase 1</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2 Experimentos de campo da fase 2</b> .....	<b>36</b>

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
	5.1 Experimentos de campo da fase 1 .....	41
	5.2 Experimentos de campo da fase 2.....	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVA</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo biológico dos flebotomíneos.....	2
Figura 1.2 Endemicidade da Leishmaniose Visceral, a nível mundial, de 2013.....	5
Figura 1.3 Machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com um par de pintas (A) e dois pares de pintas (B) nos tergitos abdominais.....	7
Figura 1.4 Nomenclatura e classificação dos semioquímicos.....	10
Figura 1.5 Inseticidas indicados para o controle químico de vetores.....	13
Figura 3.1 Foto de satélite da área de trabalho. No ponto vermelho estão localizadas as residências de estudo. Governador Valadares, Minas Gerais.....	21
Figura 3.2 Modelo de dispensador de feromônio sexual sintético.....	22
Figura 3.3 Borrifação (A) e Mosquiteiro (B) aplicados nos painéis de madeira.....	23
Figura 3.4 modelo de galinheiro experimental confeccionado com caixa de madeira.....	24
Figura 3.5 Painéis tratados e expostos para o desenvolvimento da fase 2 dos experimentos de campo.....	25
Figura 3.6 Casa 1: local de experimento de campo com a presença de galinheiro experimental e armadilha luminosa HP de monitoramento.....	26
Figura 3.7 Casa 2: local de experimento de campo com a presença de galinheiros experimentais.....	26
Figura 3.8 Fotos de lâminas de flebotomíneos visualizados ao microscópio óptico. <i>Lutzomyia longipalpis</i> macho (4x); Genitália masculina de <i>Lu. longipalpis</i> (10x).....	28

Figura 4.1 Total coletados de espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	30
Figura 4.2 Comparação da eficácia dos tratamentos em 14 horas.....	31
Figura 4.3 Comparação da eficácia dos tratamentos em 24 horas.....	32
Figura 4.4 Comparação dos tratamentos na fase 1.....	33
Figura 4.5 Comparação entre o total de espécimes coletados e mortos nas armadilhas de Monitoramento.....	34
Figura 4.6 Total coletados de espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	35
Figura 4.7 Eficácia do mosquiteiro impregnado ao longo de 24 horas .....	36
Figura 4.8 Efeito residual dos tratamentos na mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> .....	39

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

BA – Bahia

MG – Minas Gerais

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCM - Leishmaniose Cutânea Mucosa

LT – Leishmaniose Tegumentar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

MILDs – Mosquiteiros Impregnados de Longa Duração

MS – Ministério da Saúde

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

WHO – World Health Organization

OMS – Organização Mundial da Saúde

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Flebotomíneos

### 1.1.1 Posição Sistemática

Os flebotomíneos são insetos dípteros nematóceros, pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Sua classificação é baseada na morfologia dos adultos, machos e fêmeas (1, 2). De acordo com a proposta de Lewis e colaboradores em 1977, a subfamília agrupa seis gêneros: *Phlebotomus* Rondani, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot, 1920; e *Chinius* Leng, 1987 são encontrados no Velho Mundo, *Lutzomyia* França 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921; e *Warileya* Hertig, 1948 de ocorrência no Novo Mundo (3).

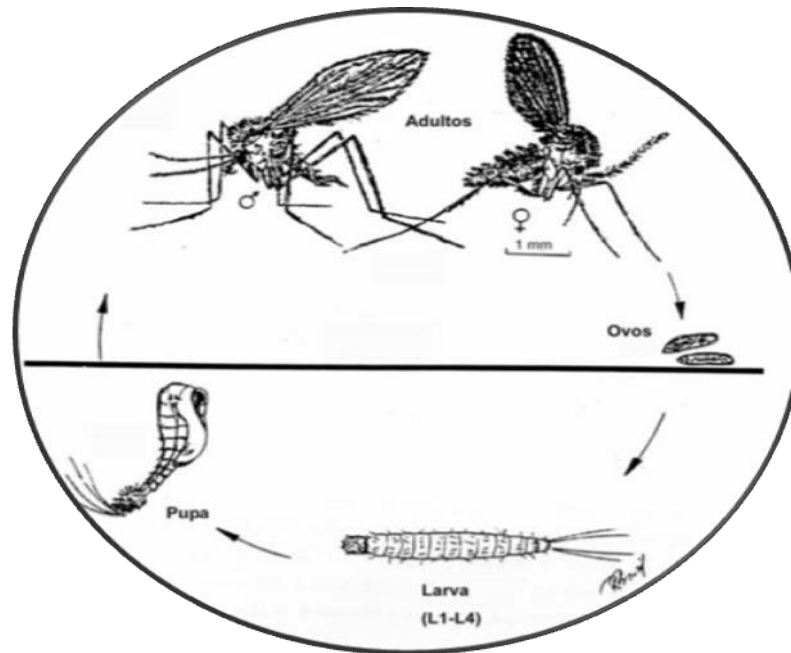
*Lutzomyia* é considerado o gênero com grande distribuição geográfica no novo mundo e agrupa insetos vetores de diversas espécies de *Leishmania* na região neotropical.

Em 1995, Galati propôs uma nova classificação utilizando uma abordagem filogenética, criando diversos gêneros e alguns subgêneros, e, elevando outros subgêneros já existentes (3, 4). Atualmente, existem mais de 1.000 espécies descritas de flebotomíneos no mundo e aproximadamente 530 espécies são encontradas na região Neotropical (5).

### 1.1.2 Biologia dos flebotomíneos

De acordo com seu desenvolvimento, os flebotomíneos são classificados como insetos holometábolos, em que o ciclo de vida compreende as seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais (L1-L4), pupa e adulto, fase em que apresentam dimorfismo sexual (Figura 1.1).





**Figura 1.1:** Ciclo biológico dos flebotomíneos. Fonte: (6)

Os ovos são pequenos, e uma vez eclodidos, geram larvas, que são de difícil visualização a olho nu nos primeiros estádios. As larvas alimentam-se da matéria orgânica presente no solo e no decorrer do seu desenvolvimento aumentam seu metabolismo e tamanho. Posteriormente, as larvas transformam-se em pupas, que se fixam no substrato e não se alimentam. Começa então a fase da metamorfose que resultará no inseto adulto (6).

Machos e fêmeas adultos necessitam de carboidratos como fonte de energia e se alimentam de derivados de açúcares de origem vegetal, retirando-os do néctar de flores e frutos, seivas de plantas e secreções de afídeos (7). A hematofagia restringe-se às fêmeas, necessária para a produção e maturação de seus ovos (1, 6, 8, 9). As fêmeas de flebotomíneos praticam a hematofagia em diversos grupos de animais silvestres, tais como: mamíferos, anfíbios e répteis. Porém, com a degradação do ambiente silvestre, animais domésticos como a galinha, o porco, o cão e o cavalo podem também ser fonte de sangue para os flebotomíneos (10-13).

A alimentação ocorre principalmente durante o período crepuscular em que um grande número de insetos se agrega perto dos hospedeiros (14). Apesar do repasto sanguíneo realizado somente pelas fêmeas, os machos também são atraídos para os hospedeiros onde demarcam território individual e esperam pelas fêmeas para o acasalamento (15). Essa atração aos

vertebrados ocorre em resposta a sinais químicos emitidos pelos hospedeiros, como o CO<sub>2</sub> ou outros caimônios (16-18). Em experimentos de campo, por exemplo, no ano de 1994, Hamilton e Ramsoondar (19) observaram que diferentes populações de *Lu. longipalpis* (colônias originárias de Jacobina e Lapinha no Brasil) apresentaram respostas diferenciadas aos odores humanos (19).

### 1.1.3 Importância Médica Veterinária

Os flebotomíneos são vetores naturais de alguns agentes etiológicos de doenças humanas e de animais, como protozoários do gênero *Leishmania*, da bactéria *Bartonella bacilliformis* e numerosos arbovírus (20), causando problemas de saúde ao homem e animais domésticos, tornando esses insetos importantes para a saúde pública (10, 21, 22).

A leishmaniose, principal enfermidade relacionada a estes patógenos, é composta por um grupo de doenças tropicais severas clinicamente heterogêneas e distribuídas em todos os continentes, sendo endêmica em 98 países (23, 24). Estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção e da ocorrência de dois milhões de novos casos cada ano (25, 26). Apesar da grande importância médica, a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada uma vez comparada com outras doenças tropicais (27, 28) e os flebotomíneos ainda são pouco estudados.

Compreende um grupo de zoonoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross 1903, da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. São heteroxênicos e parasitas intracelulares obrigatórios em hospedeiros vertebrados. As principais manifestações clínicas observadas são: Leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral (1, 29, 30).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é considerada uma zoonose endêmica em mais de 88 países do mundo e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de aproximadamente um milhão de casos de LT, sendo registrada no continente americano em quase todos os países, exceto Canadá, Chile e Uruguai (24).

As espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção são dermatrópicas. Quando o parasito é inoculado, uma lesão cutânea, de aspecto pápulo-vesiculoso, é formada no local da picada (Leishmaniose Cutânea - LC), que pode evoluir para uma regressão espontaneamente. A infecção pode continuar, surgindo lesões cutâneas disseminadas (Leishmaniose Cutânea Difusa - LCD) invadindo mucosas, comumente da nasofaríngea (Leishmaniose Cutânea Mucosa - LCM) (31). No Brasil, as espécies de *Leishmania* que causam LC são as *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi*. A LCD é causada por *L. (L.) amazonensis*, enquanto que na LCM a espécie mais envolvida é a *L. (V.) braziliensis* (32-35).

De acordo com Alvar e colaboradores (36), os dez países com maior incidência de leishmaniose cutânea são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru, onde ocorrem 70% a 75% dos casos da infecção.

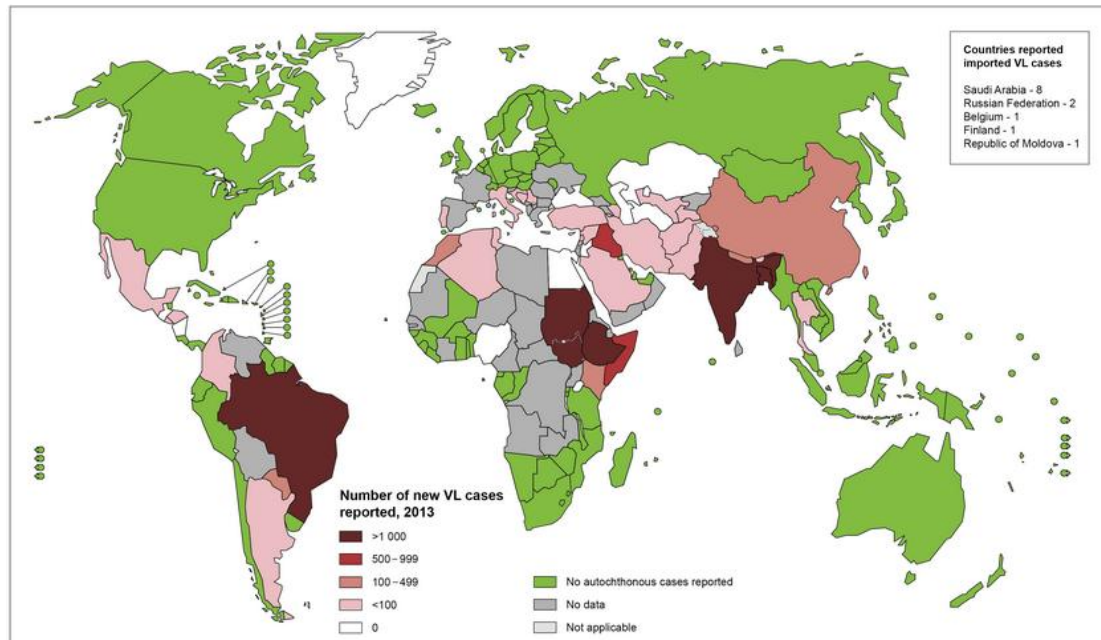
A leishmaniose tegumentar americana (LTA) consiste em um importante problema de saúde pública em muitos estados do Brasil. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35 mil novos casos de LTA no país. Entre 2001 e 2010 foram registrados no Brasil 269.855 casos de LTA. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 37,3% do total de casos registrados, no período) e com os coeficientes médios mais elevados (66,9 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (32,6 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (16,1 casos por 100.000 habitantes).

Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (31, 32). É uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle (37).

A leishmaniose visceral é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (38). No Brasil, é caracterizada por uma antropozoonose endêmica/epidêmica rural e periurbana, com forte tendência a urbanização (39, 40).

O agente etiológico é *Leishmania (Leishmania) infantum* e seu principal vetor *Lutzomyia longipalpis* (41, 42), está presente em grande parte do Brasil. Também foi incriminado como vetor *Lutzomyia cruzi* no estado do Mato Grosso do Sul (43, 44), com ocorrência também no sul da Bolívia (45).

É considerado um problema de saúde pública com grande expansão geográfica (Figura 1.2). É responsável por uma média anual de 300.000 casos com mais de 20.000 mortes e o Brasil está entre os seis países que representam 90% dos casos. Entre 2003 e 2009 foram registrados 34.583 casos de LVA no país. Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%) (24, 46).



**Figura 1.2:** Endemicidade da Leishmaniose Visceral, a nível mundial, de 2013. Fonte: (47).

A Leishmaniose Visceral vem apresentando diferentes padrões de transmissão. Inicialmente estava associada a áreas rurais, mas devido às diversas modificações ambientais, ocorreu a expansão das áreas endêmicas,

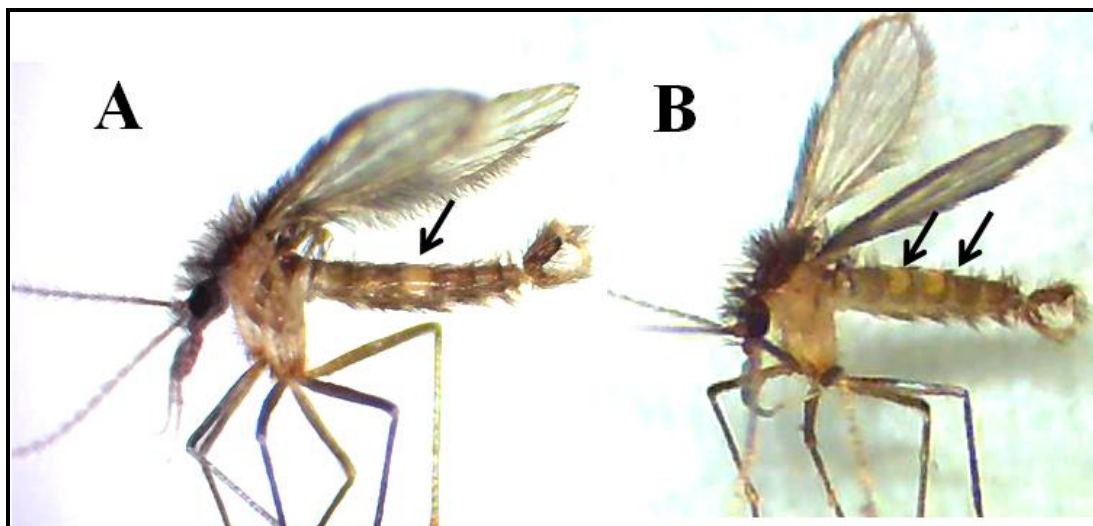
levando à urbanização da doença, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país. No estado de Minas Gerais, por exemplo, a doença ocorre desde 1940, quando foram registrados os primeiros casos humanos na região Norte do Estado, em áreas rurais. Diferente daquela época, atualmente, 84% dos casos confirmados de Leishmaniose Visceral são de pacientes residentes em áreas urbanas (48).

#### **1.1.4 O complexo *Lutzomyia longipalpis***

*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é o principal vetor da *Leishmania (Leishmania) infantum* no Brasil. É a espécie que mais atende aos critérios de competência vetorial, destacando a antropofilia correspondendo à distribuição espacial dos casos humanos, assim como a infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (8, 40, 49).

No Brasil, *Lu. longipalpis* possui ampla distribuição geográfica. Foi colonizando gradualmente os ambientes rurais e no final dos anos 1980, esta espécie iniciou sua introdução no ambiente urbano, sendo encontrado principalmente no intra e peridomicílio nas periferias das grandes cidades (42, 50).

O primeiro relato de variações em exemplares de *Lu. longipalpis* foi observado por Mangabeira (51), que verificou diferenças morfológicas nos machos de duas populações do Estado do Pará e Estado do Ceará. Insetos coletados no Estado do Pará apresentavam um par de pintas claras, localizadas no quarto segmento abdominal (fenótipo chamado de 1S) enquanto que machos coletados no Estado do Ceará apresentavam dois pares de pintas (fenótipo chamado de 2S) no terceiro e quarto segmento abdominal. Essas diferenças fenotípicas (Figura 1.3) junto ao fato das duas formas serem encontradas em condições ecológicas distintas levaram o autor a propor de que *Lu. longipalpis* pudesse ser um complexo de espécies.



**Figura 1.3:** Machos de *Lutzomyia longipalpis* com um par de pintas (A) e dois pares de pintas (B) nos tergitos abdominais. Fonte: (52)

Já na década de 1980, Ward e colaboradores (53,54) realizaram experimentos de cruzamento entre populações simpátricas e alopátricas com diferentes números de pintas. Eles observaram uma baixa taxa de inseminação após o cruzamento entre os insetos previamente capturados na mesma localidade (populações simpátricas) e que possuíam tanto o morfotipo 1S como o 2S. O mesmo resultado foi observado entre insetos com diferente número de pintas (2S e 1S) e provenientes de diferentes Estados (Ceará e Minas Gerais) assim como também entre insetos oriundos de diferentes Estados e apresentando o mesmo morfotipo 1S (53, 54).

Em 2008, Souza e colaboradores (55) realizaram novos experimentos de cruzamento entre populações alopátricas, de insetos oriundos de Lapinha (MG), Sobral (CE) e Natal (RG), como também entre populações simpátricas de Sobral (CE), e seus resultados mostraram que as pintas não poderiam ser utilizadas como caráter de diferenciação taxonômica. Porém, foi visto que o fenótipo de pintas poderia ser útil para distinguir duas espécies simpátricas no complexo *Lutzomyia longipalpis*. Isto foi verificado em Sobral (CE), onde coexistem populações com machos apresentando ambos os tipos (1S e 2S), no entanto, uma população está isolada reprodutivamente da outra (53-55). Estudos em outros países comparando amostras da América Central com a América do Sul também sugeriram que *Lu. longipalpis* seja um complexo de espécies (56, 57).

Diversas vertentes de estudos sustentam as idéias sobre a existência ou não de mais de uma espécie entre as populações brasileiras de *Lu. longipalpis*. Segundo alguns autores, em análises de isoenzimas e de genes mitocondriais não foram detectados um grau de divergências suficiente que suporte a separação taxonômica entre as populações (58-60). No entanto, outras pesquisas utilizando diferentes tipos de análises, incluindo tanto marcadores moleculares (genes envolvidos com o comportamento sexual e microssatélites) como sinais acústicos, mostraram diferenças que poderiam apontar uma separação entre as populações (55, 61-68).

## **1.2 Comunicação Química em Insetos**

### **1.2.1 O estudo dos feromônios em insetos**

A comunicação entre os organismos vivos ocorre essencialmente através de sinais sonoros e visuais, mas também por sinais químicos para transmissão de informações entre indivíduos. Este tipo de linguagem é considerado a mais antiga e difundida troca de informação na natureza, utilizada por animais, plantas e microorganismos (69, 70).

Essa troca de mensagens entre os organismos é realizada através de substâncias químicas, em geral, denominadas semioquímicos, termo proveniente da palavra grega *semeon* que significa “marca ou sinal químico” (71). Estes podem ser subdivididos em aleloquímicos ou feromônios, dependendo da ação que provocam.

Os aleloquímicos são substâncias de ação interespecífica, em que seus compostos são secretados por indivíduos de uma espécie e recebidos por indivíduos de outra. Possuem um papel importante nas relações entre predador-presa, herbívoro-planta, parasita-hospedeiro, entre outras (72, 73). Estes podem ser cairomônios, que beneficiam a espécie receptora do estímulo;

Alomônios, que na grande maioria são caracterizados como substâncias de defesa, beneficiam a espécie emissora; E sinomônios, que são produzidos por uma espécie e recebidos por outra, sendo que ambas as espécies são beneficiadas (74).

Já os feromônios, são compostos químicos de ação intra-específica. *Pherein*, em grego, quer dizer carregar e *horman*, estimular. Esta terminologia foi proposta por Karlson e colaboradores (75) para mencionar a substância química ou mistura de substâncias que atuam como mensageiros entre indivíduos de uma determinada espécie.

A comunicação por feromônios representa uma ferramenta de grande importância nas atividades vitais dos insetos. Podem atuar provocando uma ação imediata no comportamento dos indivíduos (desencadeadores) ou, por outro lado, agir na fisiologia e desenvolvimento do organismo receptor provocando uma resposta prolongada e mais lenta, designados de preparadores (76). Diferentes tipos de feromônios desencadeadores são reconhecidos. Os comportamentos mais comuns são: agregação, acasalamento, detecção do perigo ou alarme, demarcação de espaço, formação de trilha ou escolha de locais para oviposição. Já os feromônios preparadores estão geralmente relacionados a insetos sociais, como parte das estratégias no estabelecimento e manutenção da estrutura de colônias. Algumas respostas como o desenvolvimento reprodutivo ou a determinação das castas são reguladas por esse tipo de feromônios.

Apesar da classificação relacionada com o tipo de interação e modo de ação (Figura 1.4), os semioquímicos possuem ampla funcionalidade nos organismos vivos e podem ser definidos em diferentes categorias dependendo do ponto de vista com que se observa a ação provocada por eles (77, 78).



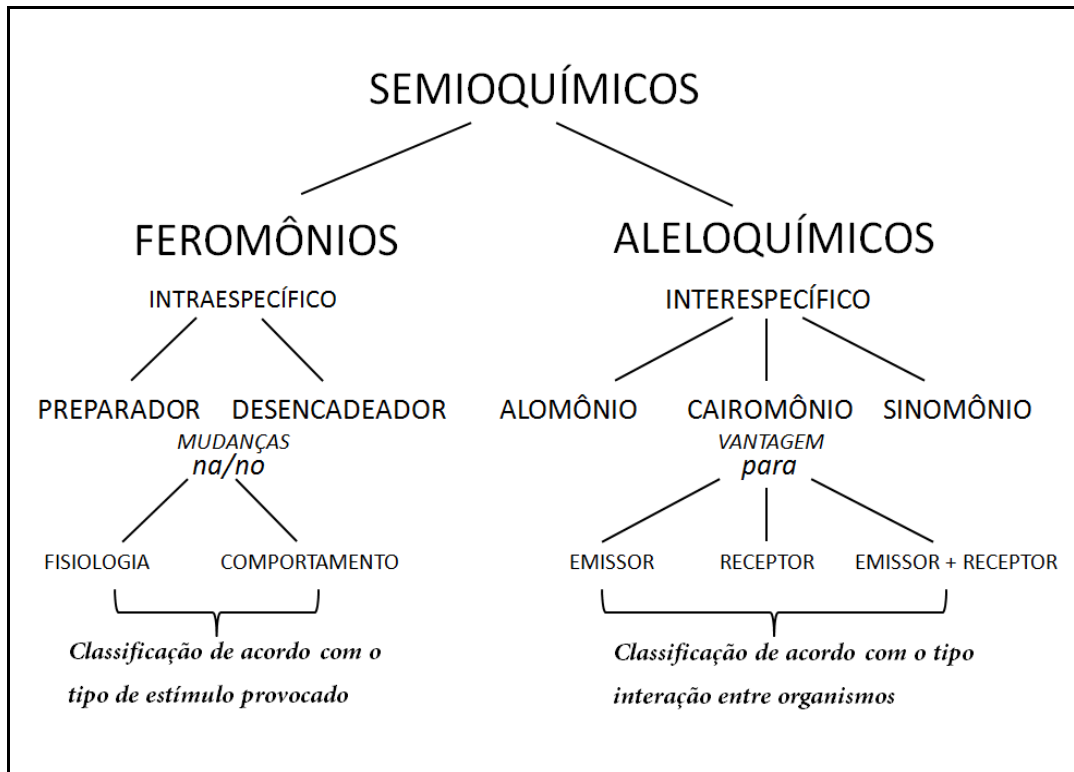


Figura 1.4: Nomenclatura e classificação dos semioquímicos. Fonte: (52, 74).

### 1.2.2 Feromônios no complexo *Lutzomyia longipalpis*

Após os diferentes estudos que derivaram de relatos das variações fenotípicas em indivíduos de *Lutzomyia longipalpis*, a estrutura superficial dos tergitos foi posteriormente examinada por Lane e Bernardes, em 1990 através de observações em microscópio eletrônico de varredura (79). Os pesquisadores ainda descreveram áreas sem as estruturas regularmente distribuídas no resto do corpo de insetos adultos, conhecidas como “macrotriquias”. Na mesma região os pesquisadores ainda descreveram a presença de pequenas pápulas com poros centrais, que poderiam representar as estruturas de disseminação de feromônios. Maiores detalhes das principais estruturas presentes na glândula foram ilustrados posteriormente em trabalhos de ultraestrutura e técnicas de citoquímica que contribuíram com a descrição do epitélio glandular. Foram identificadas típicas células secretoras conectadas à cutícula através de dutos e a presença de lipídeos no citoplasma (80).

Com base nos estudos que mostraram que as estruturas das pintas – denominadas de manchas terçais claras, foram coerentes com a localização do sítio de produção de feromônio em *Lu. longipalpis* (81-83), os compostos extraídos destes tecidos foram ensaiados através de análises químicas e de comportamento, a fim de explorar os componentes químicos que constituem o feromônio. Aquele componente presente em maior abundância no tecido analisado mostrou ser a responsável pela atração das fêmeas (84). Esses compostos foram identificados como pertencentes à classe química dos terpenos, uma vez analisados os feromônios de diferentes populações de *Lu. longipalpis* (85).

Os feromônios podem ser homosesquiterpenos, compostos de 16 carbonos ou diterpenos, compostos de 20 carbonos. Os homosesquiterpenos, (S)-9-metilgermacreno-B e -3-metil- $\alpha$ -himacaleno, são os componentes principais dos feromônios das populações de Lapinha, (MG) e de Jacobina, (BA) respectivamente. Enquanto que os diterpenos, que são isômeros de cembreno, são os compostos ativos das populações de Santarém, (PA); e Jaíba, (MG) entre outras respectivamente (85-89).

Dentre os feromônios já descritos, os homosesquiterpenos são os únicos já sintetizados. O feromônio sexual sintético ( $\pm$ )-9-metilgermacreno-B foi produzido a partir de um precursor de uma planta – *Geranium macrorrhizum*, e neste estudo, foi demonstrado sua capacidade de atração em flebotomíneos fêmeas no laboratório. Ainda, os pesquisadores desenvolveram um dispensador deste feromônio, utilizado em trabalhos de campo, onde observaram a atração de machos e fêmeas em galinheiros experimentais compostos de armadilhas luminosas e armadilhas adesivas (90).

Já em 2010, Bray e colaboradores (91) testaram o dispensador de feromônio sintético com capacidade de liberação ao longo de uma noite em galinheiros experimentais tratados com inseticida e sugeriram que esta poderia ser uma ferramenta eficaz para controle de flebotomíneos através da combinação com regimes de borrifação de inseticidas já existentes nos Programas de Controle de Leishmanioses (91).

Após os estudos que demonstraram a eficácia do feromônio sintético, através de um simples dispositivo utilizado no campo, os pesquisadores

aumentaram a concentração de feromônio carregado em cada dispensador e aperfeiçoaram sua área de superfície, que o tornou mais eficaz, podendo atrair o *Lu. longipalpis* por até doze semanas (92).

## **1.3 Controle de flebotomíneos**

### **1.3.1 Borrifação de inseticidas de ação residual**

Devido às características epidemiológicas da Leishmaniose Visceral bem como a falta de conhecimento de alguns elementos na cadeia de transmissão, as estratégias de controle ainda são pouco efetivas. O controle químico utilizado para redução da população de flebotomíneos integrado a outras medidas, como diagnóstico e tratamento precoce, eliminação de reservatórios e educação em saúde, representam atualmente as estratégias utilizadas no combate a esta endemia.

A utilização de inseticidas de ação residual é a medida de controle vetorial que tem como objetivo reduzir e/ou eliminar os flebotomíneos com efeito prolongado, evitando assim o contato entre o vetor e a população humana. Seu uso é recomendado para as seguintes áreas: com registro de primeiro caso autóctone de LV humano, após investigação entomológica; com transmissão moderada e intensa; com surto, nas quais o controle é realizado por meio de ciclos de borrifação no intradomicílio e abrigo de animais e anexos. Os produtos químicos para combater os vetores são considerados insumos estratégicos, e seu fornecimento para os estados e municípios está garantido pelo Ministério da Saúde, conforme determinado na Portaria nº 1.399, de 15 de dezembro de 1999 (93).

Apesar de ser recomendada pelo Ministério da Saúde, esta estratégia é insuficiente para o controle de vetores e incapaz de impedir a progressão da leishmaniose visceral no país. Em relação aos inseticidas, poucos estudos avaliam a resistência destes em flebotomíneos. Embora a maioria das espécies

seja susceptível as principais classes de inseticidas, existem evidências de alguns flebotomíneos estarem desenvolvendo resistência (94). Isto ainda não foi demonstrado em *Lu. longipalpis*, mas existem indícios de ocorrência nesta espécie (95, 96). Assegurar a concentração ideal de inseticida e o número de aplicações para matar os flebotomíneos é um fator importante para evitar o aparecimento de resistência (97, 98). Recentemente, Pessoa e colaboradores (99) realizaram testes de suscetibilidade ao alfa-cipermetrina em *Lu. longipalpis*. Por meio de bioensaios em laboratório e no campo, os autores consideraram que a população de *Lu. longipalpis* estudada foi classificada como adequada para a linha base de susceptibilidade da linhagem referência de acordo com critério recomendado pela Organização Pan-Americana da Saúde, demonstrando que os insetos são susceptíveis a inseticidas testados no campo (99).

Além do risco de desenvolvimento de resistência, ainda não está claro que a borrifação de inseticida residual tanto nas casas ou em abrigos de animais, como os galinheiros, contribuem no controle da transmissão da doença. Algumas evidências indicam que o efeito residual da borrifação nas paredes de casas pode ser curto (100, 101). A eficácia da borrifação residual pode depender também, do grau de adaptação dos flebotomíneos ao ambiente tratado. Assim, esta metodologia de controle se torna mais eficaz em áreas urbanas, onde cada casa e abrigo de animais são mais tratados do que nas áreas rurais. Nas áreas rurais as moradias borrifadas são poucas e dispersas e os insetos que picam o homem e os animais domésticos representam uma pequena proporção do total da população do vetor (94).

A utilização de inseticidas de ação residual pode parecer uma estratégia efetiva para o controle de *Lu. longipalpis*, reduzindo o número de flebotomíneos por meio da borrifação em locais de agregação como os galinheiros (102). Porém, a borrifação mata também os machos que chegam primeiro nestes locais para estabelecer a agregação em si e formar o “lek”<sup>1</sup>. Acredita-se que, com a morte dos machos não há a produção de feromônio e impossibilita a continuação da agregação e, conseqüentemente, da morte de um número significativo de fêmeas de flebotomíneos. Como conseqüência estes insetos se

---

<sup>1</sup> Lek: Termo em inglês que corresponde ao comportamento de agregação de insetos.

deslocam para locais não tratados, se aproximando do homem e animais domésticos como os cães (91, 103). Desta forma o uso de métodos de controle que interrompa este mecanismo pode aumentar a possibilidade de leishmaniose visceral para novas áreas.

### **1.3.2 Mosquiteiros impregnados de longa duração (MILDs)**

O controle integrado de insetos é o uso de diferentes formas de controle simultaneamente, tornando a estratégia mais eficaz e com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência.

Os mosquiteiros tratados com inseticidas de longa duração (MILDs) junto com a borrifação intradomiciliar representam as principais intervenções para o controle dos anofelinos, vetores dos agentes causadores da Malária. De acordo com a OMS, são medidas eficazes na redução da transmissão de Malária e da carga da doença (104, 105).

A utilização dos MILDs como método de controle de insetos têm como finalidade formar uma barreira física, reduzindo o contato do vetor com o indivíduo, além de servir como controle químico (barreira química), devido às partículas de inseticida presente entre os polímeros que formam suas fibras. Dessa forma, quando o inseto entra em contato com o mosquiteiro, essas partículas interagem com os receptores existentes nas patas, atingindo seu sistema nervoso central, e posteriormente causando sua morte.

O primeiro estudo sobre avaliação dos mosquiteiros impregnados foi feito por Brun & Sales (106) com inseticidas organofosforados. Com o aparecimento dos inseticidas piretróides, a possibilidade da utilização de mosquiteiros impregnados tornou-se mais promissora. Ranquel et al. (107), em Mali, foram os primeiros a realizar ensaio em grande escala.

Muitos trabalhos realizados em países da África e em Papua Nova Guiné indicaram que os MILDs podem contribuir para a redução da intensidade de transmissão da malária (108, 109); no número de casos de malária grave (110) e nas taxas de mortalidade infantil (111). Já no Brasil, são escassos os estudos com mosquiteiros impregnados de longa duração.

O uso de mosquiteiros impregnados ainda não é reconhecido oficialmente pelo Ministério da Saúde como uma estratégia de controle para as leishmanioses no Brasil. Porém, alguns estudos em diferentes países demonstram a possibilidade do uso do mosquiteiro para proteção pessoal contra flebotomíneos e, como consequência, na redução no número de novos casos da doença. Em 2003, na Turquia, Alten e colaboradores (112,113) demonstraram a eficácia do uso de mosquiteiros impregnados com deltametrina na redução na taxa de picada em indivíduos que dormem fora das casas em áreas nas quais foram realizados estudos de intervenção (112, 113). Outro resultado similar foi encontrado em um estudo desenvolvido em duas cidades Iranianas, onde os pesquisadores observaram uma diferença significativa na redução da incidência de novos casos de leishmaniose cutânea em áreas que receberam os mosquiteiros (114).

Em 2008, Ostyn e colaboradores (115), em uma revisão, mostraram que a borrifação residual intradomiciliar com inseticidas tem sido praticamente a única estratégia para o controle da leishmaniose visceral utilizada no subcontinente indiano atualmente, e sugerem que os MILDs podem aumentar os benefícios no controle de vetores (115). Já em 2014, outro trabalho realizado na Turquia mostrou a eficácia do mosquiteiro impregnado com permetrina na redução de 92.2% de casos anuais de leishmaniose cutânea (116).

No Brasil, estudos de mosquiteiros impregnados com deltametrina demonstraram uma redução na taxa de ocorrência de leishmaniose visceral americana (LVA) pelo vetor *Lu. longipalpis* em seres humanos, e um aumento na mortalidade de flebotomíneos em comparação com as redes não tratadas (117). No entanto, de acordo com os pesquisadores, como consequência do hábito alimentar crepuscular de *Lu. longipalpis*, mosquiteiros utilizados como proteção pessoal oferecem proteção limitada contra LVA em que mais de 50% das picadas ocorrem no início da noite, geralmente antes do horário em que as pessoas dormem sob as redes.

Apesar de muitos estudos demonstrarem a importância do uso de mosquiteiros impregnados para proteção pessoal reduzindo a taxa de picada de flebotomíneos e, conseqüentemente, na redução do risco de infecção das

leishmanioses, a maioria destas pesquisas não foi delineada para avaliar a ação e eficácia inseticida do mosquito contra os flebotomíneos. Dessa forma, Bray & Hamilton (118), desenvolveram o primeiro estudo em laboratório com a aplicação do mosquito impregnado com permetrina fixado em uma superfície de madeira que poderia atuar como uma alternativa para a borrifação de inseticida residual no controle de *Lu. longipalpis*, vetor da *L. (L.) infantum*. Os pesquisadores avaliaram a eficácia destes tratamentos em matar os flebotomíneos e observaram que em uma hora após a exposição, a borrifação com lambda-cialotrina matou mais insetos que o mosquito. Eles também avaliaram o efeito destes inseticidas em 6 e 12 meses após exposição e demonstraram que o mosquito mantém seu efeito em matar aproximadamente 100% dos flebotomíneos, enquanto que o efeito residual da borrifação reduziu aproximadamente 80% após 6 meses. Com os resultados encontrados, os autores sugeriram que o MILD pode ser uma solução de longo prazo para matar estes insetos e que poderiam ser fixados em galinheiros ou outros abrigos de animais substituindo então a borrifação em locais de agregação (118).

## 1.4 JUSTIFICATIVA

Os galinheiros são locais comuns de agregação de *Lutzomyia longipalpis*, oferecendo ao vetor tanto a alimentação sanguínea quanto superfícies adequadas como paredes e poleiros para corte e acasalamento, tornando esses locais importantes na dinâmica de transmissão da leishmaniose visceral.

A borrifação de inseticidas de ação residual apresenta algumas limitações: além da falta de conhecimento sobre o efeito dessa técnica em flebotomíneos, o alto custo da aplicação e manutenção, pode também, influenciar na interrupção do “Lek” e, conseqüentemente, no deslocamento desses insetos para áreas não tratadas. Esta estratégia de controle, portanto, é difícil de ser aplicada de forma eficaz. Devido ao grande número de locais

potenciais de agregação existentes, é inviável o tratamento de todos com inseticida, além dos danos que esta ação poderia causar ao meio ambiente e outros seres vivos.

Mosquiteiros impregnados de longa duração pode ser uma estratégia vantajosa, com um melhor custo-benefício, capaz de proteger o indivíduo tanto como uma barreira física quanto química contra insetos vetores. No Brasil, os estudos com mosquiteiros impregnados são escassos, mas pesquisadores de outros países apontam sua eficácia na redução da incidência de casos de leishmaniose. O horário de pico de atividade dos flebotomíneos pode ser um fator que faz esta estratégia ter um efeito limitado quando utilizada para proteção pessoal (barreira física). Porém, se utilizado para matar flebotomíneos, fixado nos locais de agregação e descanso destes insetos, como em paredes de galinheiros, pode ser uma alternativa direta ao uso da borrifação. Por ter um efeito de longa duração, não é necessária a reaplicação com a mesma frequência que a borrifação, o que gera um baixo custo no seu uso, além de ser de fácil manuseio e não precisar de equipamento específico.

Já o feromônio sintético pode ser associado ao mosquiteiro impregnado para aumentar sua eficácia, uma vez que devido a sua alta concentração, atrai mais insetos competindo com sucesso contra os níveis de feromônio liberado pelos machos em locais de agregação não tratados e o mosquiteiro, por sua vez, pode matar mais flebotomíneos que chegam para se estabelecer nesses locais de agregação. Com isso, estas duas estratégias passam a ter o efeito conjugado de “atrair e matar” os flebotomíneos. Utilizados atualmente para o monitoramento e controle de pragas agrícolas, são substâncias praticamente atóxicas, e poderão ocupar um importante papel no controle de vetores, já que são específicos para a espécie alvo e não afetam outros seres vivos e o meio ambiente.

Dessa forma, este é o primeiro estudo que avalia a possibilidade da utilização do mosquiteiro impregnado de longa duração como uma alternativa de controle de *Lu. longipalpis* em locais de agregação associado a um dispensador de feromônio sintético ( $\pm$ )-9-metilgermacreno-B para aprimorar a eficácia desta estratégia.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o uso do mosquiteiro impregnado de longa duração com alfa-cipermetrina (Interceptor-Basf) associado ao feromônio sintético de flebotomíneos (±)-9-metilgermacreno-B como uma nova estratégia para o controle de *Lutzomyia longipalpis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Comparar a ação e eficácia da estratégia associada: feromônio sintético em conjunto com mosquiteiro impregnado com alfa-cipermetrina feromônio sintético junto com a borrifação de lambda-cialotrina.
- ✓ Avaliar a capacidade do mosquiteiro impregnado com alfa-cipermetrina em matar flebotomíneos.
- ✓ Comparar a eficácia do mosquiteiro impregnado com a borrifação na mortalidade de *Lu. longipalpis*
- ✓ Avaliar a ação do efeito residual do mosquiteiro impregnado e da borrifação na mortalidade de *Lu. longipalpis*.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Considerações éticas**

Este projeto possui a autorização e licença para captura de flebotomíneos e autorização do SISBIO nº 32669-4 – IBAMA, para experimentos de campo com o feromônio sintético ( $\pm$ )-9-metilgermacreno-B.

### **3.2 Área de Estudo**

Governador Valadares (18 ° 51 '12 "S 41 ° 56' 42" O) é um município da região leste do estado de Minas Gerais e está inserido no Vale do Rio Doce, na região sudeste do Brasil. A cidade possui 263,689 habitantes distribuídos em 150 distritos (119). O clima da região é quente e úmido com temperatura média de 25,6°C. A topografia é caracterizada por um relevo montanhoso. A vegetação de floresta decidual e savana faz parte do ecossistema de Mata Atlântica. Com a exploração madeireira no passado, algumas espécies nativas foram substituídas por pastagens, mas alguns representantes estão em áreas de proteção ambiental no entorno do município.

Governador Valadares é uma área endêmica de LVA, onde casos da doença são registrados desde a década de 1960 (120, 121). Quando o programa de controle de leishmaniose visceral foi adotado, o município passou a ser considerada uma “área endêmica controlada”. Já nos anos 1990, as medidas de controle bem como a vigilância epidemiológica não foram realizadas regularmente na região, ocasionando a falta de notificação de casos humanos até 2007, em visto que de acordo com os dados do SINAN, de 2001 a 2006 foram registrados apenas 5 casos (122).

Desde 2008, casos humanos de LVA começaram a ser registrados no município de Governador Valadares, que passou a ser considerado um foco

reemergente desta endemia. De 2008 a 2011, 86 casos foram notificados, com 14 óbitos (120). Ainda, de acordo com Barata e colaboradores (120), 4.992 casos foram diagnosticados em cães neste mesmo período, com o encontro e predominância do vetor *Lu. longipalpis* na região. Mais recentemente, de 2012 até janeiro de 2015, 46 casos humanos foram confirmados, com 4 óbitos (122).

Os experimentos de campo foram realizados no bairro Vila Parque Ibituruna (Figura 3.1), e a escolha das residências para o estudo foi realizada de acordo com os seguintes critérios: duas residências nas quais deveriam ter um quintal e um galinheiro, além da presença de *Lu. longipalpis* com produção do feromônio (S)-9-metilgermacreno-B. Para a seleção desses locais foi realizada uma visita e uma coleta piloto em Julho de 2014, na qual realizamos uma captura de flebotomíneos para o encontro de *Lu. longipalpis* através da instalação de duas armadilhas luminosas HP tipo CDC nas duas residências de escolha que permaneceram ligadas aproximadamente 16 horas. A confirmação da presença do feromônio (S)-9-metilgermacreno-B nos exemplares machos de *Lu. longipalpis* capturados foi executada conforme descrito na subseção 3.8.



**Figura 3.1:** Foto de satélite da área de trabalho. No ponto vermelho estão localizadas as residências de estudo. Governador Valadares, Minas Gerais. Fonte: Google Earth.

### 3.3 Dispensadores de feromônio sintético

Para a análise no campo, foi utilizado um dispensador de longa duração capaz de liberar o feromônio sintético a uma taxa semelhante lançada por 450 machos por hora. Cada dispensador consiste em uma bolsa de plástico selada de 30 cm<sup>2</sup> carregada de 10 mg de feromônio sintético ( $\pm$ )-9-metilgermacreno-B (Figura 3.2). Feromônio sintético puro foi diluído em hexano, para obter uma solução a ser distribuída em cada dispensador (92).



**Figura3.2:** Modelo de dispensador de feromônio sexual sintético. Fonte: Vanessa Barbosa

### 3.4 Escolha dos inseticidas

A borrifação de inseticida de ação residual foi realizada conforme recomendação do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral: Lambda-cialotrina (piretróide classe III) – KARATE ZEON 50 CS na formulação em suspensão de encapsulado, 100 ml + 10L de H<sub>2</sub>O (93).

O mosquiteiro de escolha está conforme recomendação do Ministério da Saúde para o controle de vetores da Malária: Alfa-Cipermetrina (piretróide classe II) 6,7g/kg ou 200mg/m<sup>2</sup> – Interceptor, Basf.

Mosquiteiro e borrifação foram aplicados em painéis de madeira de 50 cm x 50 cm e 4 mm de espessura. Os painéis foram fixados em caixas de madeira que representaram os galinheiros experimentais utilizados neste estudo (Figura 3.3).



**Figura 3.3:** Borrifação (A) e Mosquiteiro (B) aplicados nos painéis de madeira. Fonte: Vanessa Barbosa.

### 3.5 Galinheiros experimentais

Os galinheiros experimentais foram confeccionados com caixas de madeira constituídas de quatro painéis (55 cm x 105 cm), encaixados e presos com lacres de plástico para formar uma caixa aberta (Figura 3.4). Cada painel possui três orifícios para facilitar a saída do odor do hospedeiro (galinha). Na borda superior um cabo de madeira foi colocado como suporte da armadilha luminosa HP do tipo CDC.

Experimentos de campo com este tipo de caixa já foram testados anteriormente para captura de flebotomíneos e análises com feromônio e borrifação de inseticida (90, 91).

Os painéis tratados com os inseticidas foram fixados em cada lado do interior das caixas de madeira.



**Figura 3.4:** modelo de galinheiro experimental confeccionado com caixa de madeira. Fonte: Vanessa Barbosa.

### 3.6 Experimentos de campo

Para o presente estudo, os experimentos de campo foram divididos em duas fases:

- (i) *Fase 1: avaliar a capacidade do mosquiteiro impregnado em matar flebotomíneos e comparar sua eficácia com a ação da borrifação na mortalidade de *Lu. longipalpis*. Foram realizados três experimentos de campo, aproximadamente um a cada dois meses (Tabela 3.1). Ambos os tratamentos (mosquiteiro e borrifação) foram associados ao feromônio sintético para aumentar a captura de *Lu. longipalpis*. Ao final de cada experimento, os painéis tratados eram acondicionados em local coberto impedindo a exposição dos inseticidas às intempéries.*

- (ii) *Fase 2: avaliar e comparar o efeito residual do mosquiteiro impregnado e da borrifação por um período de 4 meses. Nesta fase, os tratamentos também foram associados ao feromônio sintético para aumentar a captura de *Lu. longipalpis*. Para esta análise, ao final do último experimento da fase 1, os painéis foram expostos (Figura 3.5) e assim permanecerem para mais dois experimentos de campo realizados a cada dois meses.*



**Figura 3.5:** Painéis tratados e expostos para o desenvolvimento da fase 2 dos experimentos de campo. Fonte: Vanessa Barbosa.

**Tabela 3.1:** Cronograma de atividades de campo

Atividades	2014						2015												
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
Coleta preliminar de <i>Lutzomyia longipalpis</i>																			
Experimentos de campo Fase 1																			
Experimentos de campo Fase 2																			
Análise periódica do feromônio																			

A montagem do material nos quintais das duas residências foi realizada de acordo com a metodologia descrita a seguir:

Cada quintal recebeu quatro galinheiros experimentais (Figura 3.7), divididos em dois pares e posicionados com 5 metros de distância entre cada um. Cada galinheiro experimental era composto de uma armadilha luminosa com uma gaiola de pano para captura de flebotomíneos; um dispensador de feromônio sintético acoplado na parte interna da tampa da armadilha para garantir e aumentar a captura de *Lu. longipalpis*; e uma galinha no interior da caixa, para garantir a fonte de odor de um hospedeiro, representando um local

de agregação deste vetor. Ainda, em cada réplica, uma caixa recebeu os painéis tratados com o mosquiteiro impregnado e a outra caixa, a borrifação de inseticida residual.

Para monitoramento da sobrevivência de flebotomíneos sem exposição aos inseticidas, foi instalada em cada casa uma armadilha luminosa HP sem influência dos tratamentos e do feromônio sintético, conforme ilustrado na figura 3.6.



**Figura 3.6:** Casa 1: local de experimento de campo com a presença de galinheiro experimental e armadilha luminosa HP de monitoramento. Fonte: Vanessa Barbosa.



**Figura 3.7:** Casa 2: local de experimento de campo com a presença de galinheiros experimentais. Fonte: Vanessa Barbosa

Os experimentos de campo eram iniciados ao entardecer (aproximadamente às 18:00), coincidindo com o início do período de atividade dos flebotomíneos. A cada manhã (aproximadamente às 8:00) as gaiolas eram recolhidas dos galinheiros experimentais, os flebotomíneos capturados eram



retirados de todas as gaiolas e com auxílio de uma lupa, os espécimes de *Lu. longipalpis* eram separados e contados em vivos e mortos, machos e fêmeas. Os espécimes vivos eram mantidos em condições adequadas e uma nova contagem era feita 24 horas após início de exposição dos flebotomíneos aos tratamentos (aproximadamente às 18:00), considerando o hábito crepuscular destes insetos. Após as contagens, os espécimes de *Lu. longipalpis* e outros flebotomíneos foram mantidos em álcool 70% para posterior confirmação e identificação no laboratório.

A cada manhã, as caixas de cada par eram invertidas de posição para evitar qualquer influência de atração de flebotomíneos para um dos tratamentos.

Cada experimento de campo foi conduzido durante cinco dias e quatro noites.

### **3.7 Identificação de flebotomíneos**

A identificação de exemplares machos de *Lu. longipalpis* era confirmada através da visualização em lupa das estruturas da genitália e a presença de manchas terciais claras localizadas no abdômen. Para futuros estudos moleculares de infecção por *Leishmania* spp, as fêmeas de *Lu. longipalpis* foram preservadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml em solução de DMSO a 6%, e posteriormente foram dissecadas para confirmar a identificação, observando a cabeça e espermoteca através de microscopia ótica, segundo técnica empregada por Lainson (1997), com modificações (123).

Outros flebotomíneos capturados foram montados entre lâmina e lamínula (Figura 3.8), seguindo técnicas de montagem de rotina do Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos do Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz. As lâminas foram examinadas no microscópio óptico (Biosystems – Medilux, modelo L2000C) para a identificação das espécies de flebotomíneos, de acordo com a classificação de Galati (3).

O protocolo utilizado na montagem dos flebotomíneos foi o seguinte: os insetos permaneceram, em média, 16 horas no hidróxido de potássio (KOH) a 10%, para clarificação. Para neutralizar o processo de clarificação foram transferidos para ácido acético a 10% por 15 a 20 minutos. Logo após, passaram por uma desidratação seriada: álcool 70% - 10 minutos, álcool 90% - 10 minutos e álcool 100% - 10 minutos. Em seguida, colocados no eugenol por no mínimo 24 horas, para a diafanização das estruturas.

Após finalização do processo acima descrito, cada inseto foi colocado na lâmina sob uma gota de bálsamo do Canadá, com o auxílio de dois estiletos de pontas finas. Nas fêmeas separou-se a cabeça, o tórax e o abdome, a fim de visualizar as espermatecas e o cibário. Os exemplares machos foram montados separando a cabeça do resto do corpo. Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre o exemplar. E foi levado à estufa (37°C) para secagem e após 72 horas, colocou-se esmalte incolor em volta da lamínula para sua impermeabilização.



**Figura 3.8:** Fotos de lâminas de flebotomíneos visualizados ao microscópio óptico. *Lutzomyia longipalpis* macho (40x); Genitália masculina de *Lu. longipalpis* (100x).; Fonte: Andressa Fuzari.

### 3.8 Análise do feromônio

Para monitoramento do tipo de população de *Lu. longipalpis* estudada foram realizadas análises periódicas do feromônio. A cada duas coletas eram separados aproximadamente 10 machos vivos. Estes exemplares eram mortos por congelamento a -20°C e imediatamente transferidos individualmente para pipetas de vidro contendo cerca de 10 ul de hexano. Para cada ensaio, 1ul da substância contendo extratos de feromônio no hexano foi injetada em Cromatógrafo (Sigma-Aldrich Chem. Co, Dorset, UK). A análise da constituição do feromônio foi realizada através de espectrometria de massa com cromatografia gasosa acoplada (89).

### 3.9 Análise dos dados

Para comparação do número total de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados nas caixas tratadas com o mosquiteiro impregnado e nas caixas borrifadas, utilizamos o Teste t-Student para amostras pareadas para calcular a diferença do total de espécimes capturados entre cada par de galinheiros experimentais considerando o intervalo de confiança de 95% e valor de  $p < 0.05$  significativo estatisticamente.

Foi calculada a taxa de mortalidade de *Lu. longipalpis* em mosquiteiro impregnado e borrifação na fase 1 dos experimentos de campo para comparar a eficácia destes dois tratamentos na mortalidade de flebotomíneos. Consideramos a taxa de mortalidade de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de mortalidade (\%)} = \left( \frac{n^\circ \text{ de mortos}}{n^\circ \text{ de capturados}} \right) \times 100$$

Para comparação do efeito residual do mosquiteiro impregnado e da borrifação na mortalidade de *Lu. longipalpis* nos experimentos de campo da

fase 2 realizamos a análise de variância ANOVA para analisar o efeito residual de um determinado tratamento comparando os três intervalos de tempo de sua exposição (0, 2 e 4 meses) considerando  $p < 0.05$  significante estatisticamente. Para essa análise, foi considerada a mortalidade dos flebotomíneos após 24 horas de cada experimento.

A análise de sobrevivência dos espécimes de *Lu. longipalpis* capturados nas armadilhas de monitoramento foi realizada através do teste t-Student para amostras pareadas, comparando o número de flebotomíneos capturados com o número de mortos após 24 horas de cada experimento.

Todos as análises foram realizadas no software MiniTab 17. Os gráficos foram obtidos no software GraphPad Prism 6 e Excel 2010.

## 4 RESULTADOS

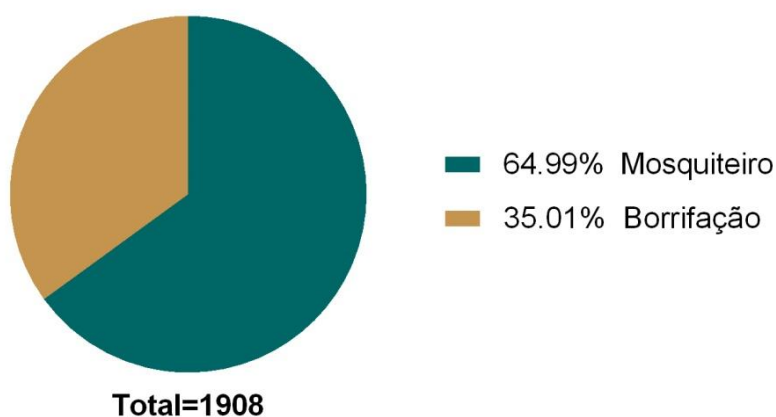
Em 5 experimentos de campo, totalizando 20 noites de captura, foram coletados 3391 flebotomíneos, dos quais 98,4 % (n = 3337) foram identificados como *Lutzomyia longipalpis*. Os outros espécimes foram identificados como *Evandromyia cortelezii* representando 1,6 % (n = 54).

Na identificação do feromônio sexual de machos de *Lutzomyia longipalpis* através da técnica de espectrometria de massa com cromatografia gasosa acoplada, os 10 machos analisados de cada mês conforme o cronograma (tabela 3.1), todos os quimiotipos foram identificados como (S)-9-metilgermacreno-B. O fenótipo de todos exemplares machos de *Lu. longipalpis* capturados foram caracterizados como 1S.

## 4.1 Experimentos de campo da Fase 1

No período de 3 experimentos de campo foram coletados um total de 1908 espécimes de *Lu. longipalpis* nos quintais das duas residências em área periurbana do município de Governador Valadares, MG. Deste total, 65% (n=1240) foram capturados nos galinheiros experimentais que estavam fixados os mosquiteiros impregnados contendo o dispensador de feromônio sintético, e 35% (n=668) capturados naqueles que foram tratados com a borrifação também com feromônio sintético, apresentando uma diferença significativa  $p < 0.05$  (Figura 4.1).

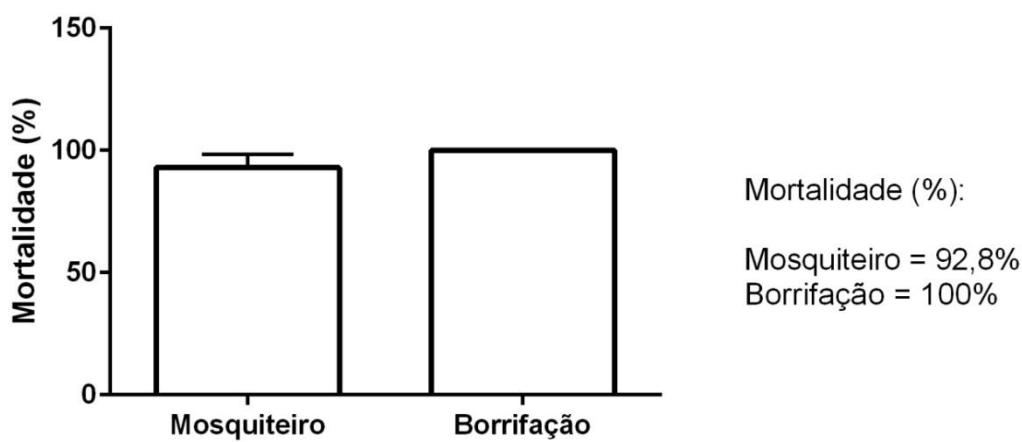
### Total coletados de espécimes de *Lutzomyia longipalpis*



**Figura 4.1:** Comparação do total de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* capturados na fase 1 nos galinheiros experimentais tratados com Mosquiteiro e Borrifação, com ambos tratamentos associados ao feromônio sintético. Teste T pareado para comparação do total de espécimes coletados nos dois tratamentos: (Média Mosquiteiro = 34,4; Média Borrifação = 18,5; Teste t-Student pareado = 2,55; Valor  $p = 0,017$ ).

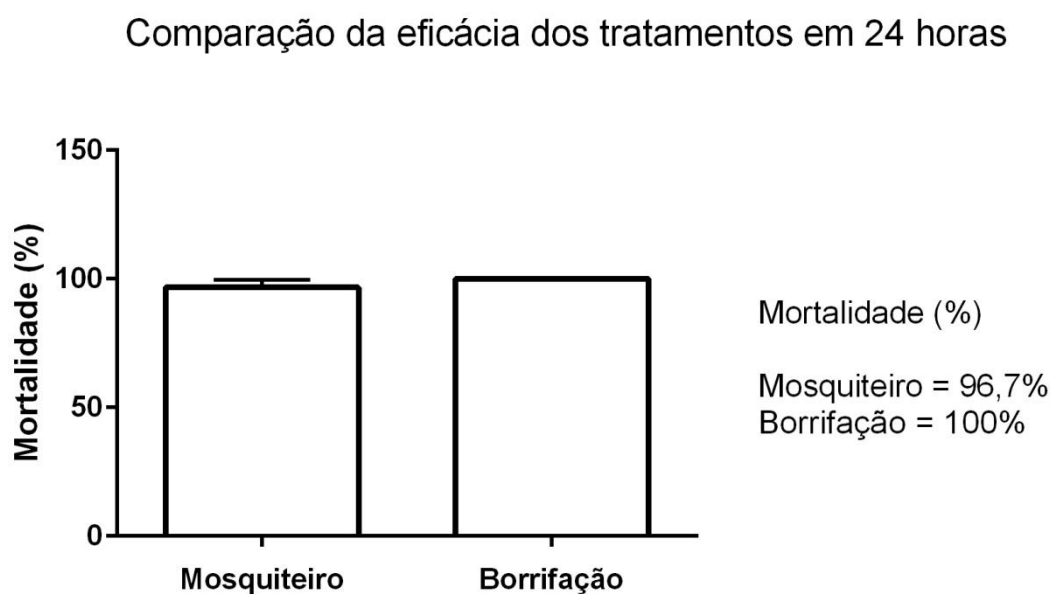
Para avaliação dos tratamentos após uma noite de experimento (aproximadamente 14 horas), foram comparadas as taxas de mortalidade de cada réplica entre mosquiteiro impregnado e borrifação. Os galinheiros experimentais que foram borrifados foram capazes de matar 100% dos espécimes de *Lu. longipalpis* capturados enquanto os que receberam o mosquiteiro mataram 92,8% do total de espécimes capturados. Ambos os tratamentos estavam associados ao feromônio sintético.

#### Comparação da eficácia dos tratamentos em 14 horas



**Figura 4.2:** Comparação das taxas de mortalidade de mosquiteiro impregnado e borrifação associados ao feromônio sintético em 14 horas do total de experimentos de campo na fase 1. Taxa de mortalidade de *Lu. longipalpis* nos galinheiros experimentais com mosquiteiro impregnado foi de 92,8% e com a borrifação foi de 100%.

Quando a mesma comparação foi realizada após 24 horas (aproximadamente às 18:00), do início de exposição dos flebotomíneos aos tratamentos, a taxa de mortalidade dos espécimes de *Lu. longipalpis* capturados nas caixas com mosquito (96,7%) e borrifação (100%) apresentaram eficácia semelhante. Ambos os tratamentos estavam associados ao feromônio sintético. Não foi realizada uma análise estatística para essa comparação pois a taxa de mortalidade na borrifação não teve variação e os dois tratamentos foram semelhantes.

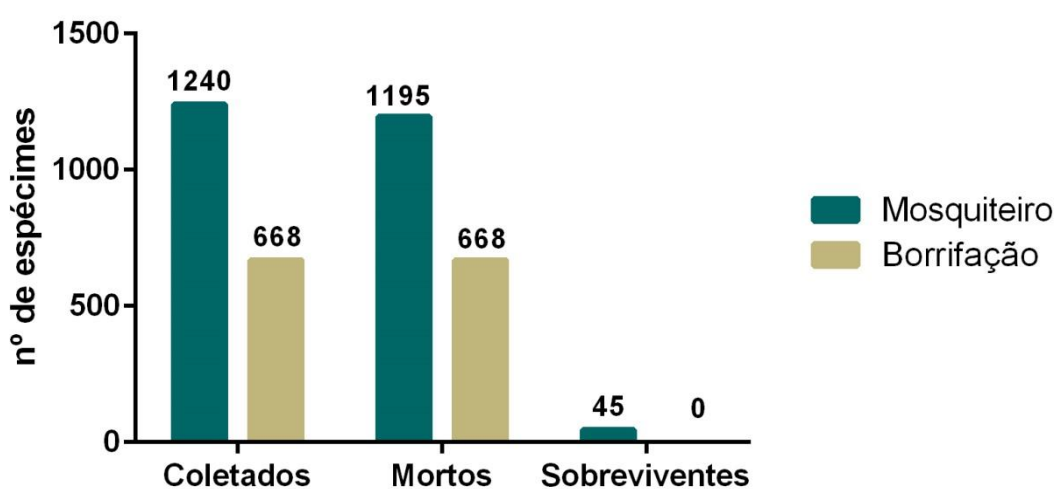


**Figura 4.3:** Comparação das taxas de mortalidade de mosquito e borrifação associados ao feromônio sintético em 24 horas do total de experimentos de campo na fase 1. Taxa de mortalidade de *Lu. longipalpis* nos galinheiros experimentais com mosquito impregnado foi de 96,7% e com a borrifação foi de 100%.



Na fase 1 dos experimentos de campo podemos observar que, com este resultado, os dois tratamentos associados ao feromônio sintético possuem eficácia em “atrair e matar” os espécimes de *Lu. longipalpis*. Dos 1240 espécimes capturados nos galinheiros experimentais com mosquiteiro, 45 sobreviveram após 24 horas, enquanto que na borrifação, todos morreram nesse mesmo período (n=668).

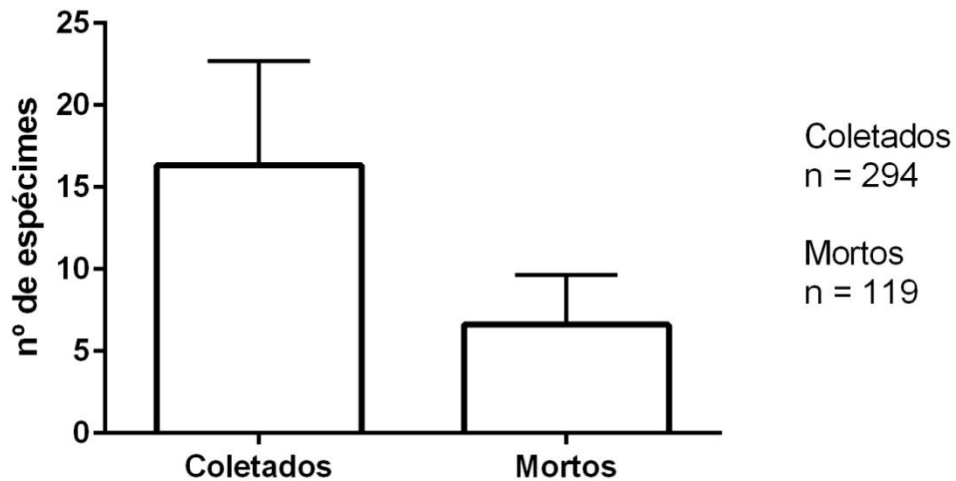
#### Comparação dos tratamentos na fase 1



**Figura 4.4:** Comparação entre mosquiteiro e borrifação associados ao feromônio sintético do número de espécimes de *Lu. longipalpis* coletados, mortos e sobreviventes nos experimentos de campo na fase 1.

Quando analisamos os espécimes capturados nas armadilhas sem tratamento e sem feromônio podemos observar uma diferença significativa  $p < 0,001$  entre o total de coletados e mortos em 24 horas (Figura 4.5).

### Comparação entre o total de espécimes coletados e mortos nas armadilhas de Monitoramento

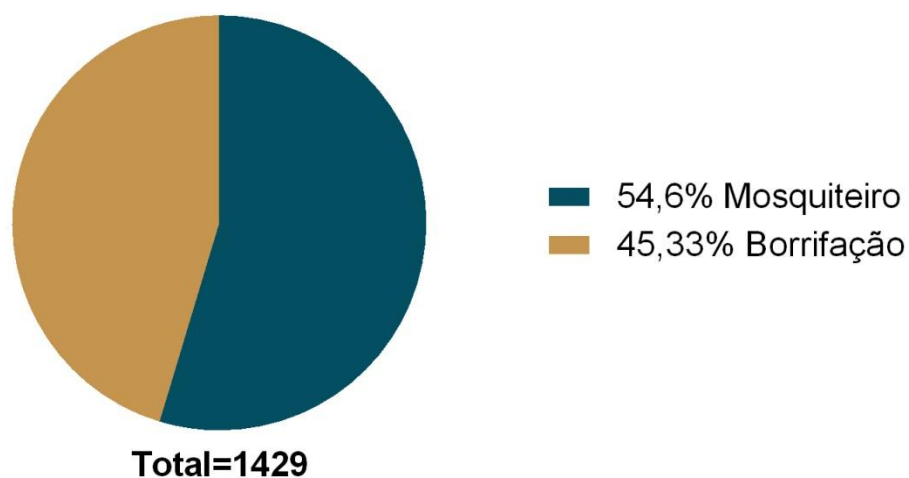


**Figura 4.5:** Comparação do número de espécimes coletados e mortos de *Lu. longipalpis* nas armadilhas de monitoramento dos experimentos de campo na fase 1. Teste t-Student pareado: (Média Coletados = 16,3; Média Mortos = 6,6; Teste T = 5,29; Valor  $p = 0,000$ ).

## 4.2 Experimentos de campo da Fase 2

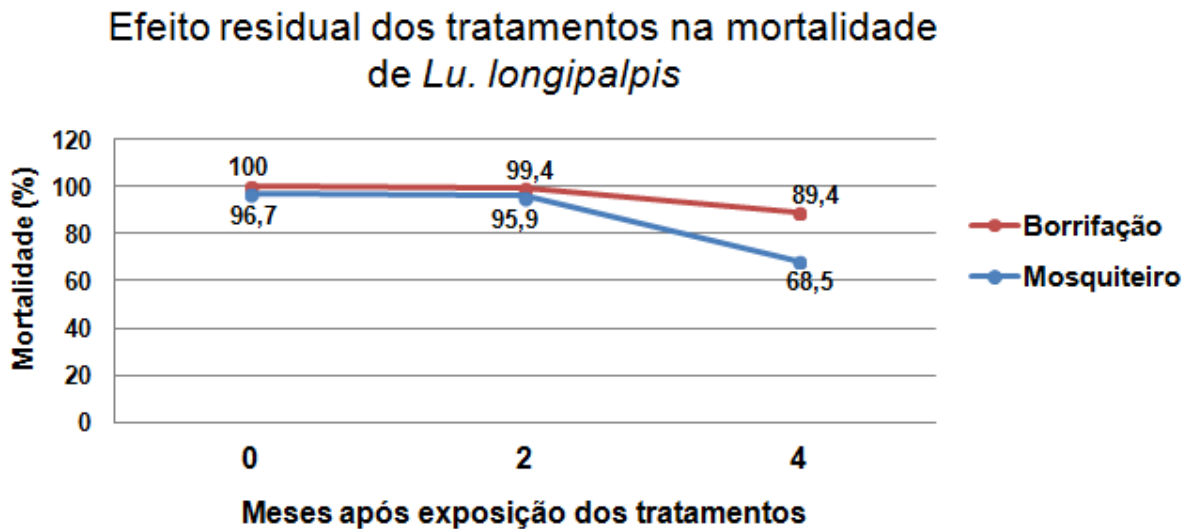
Na fase 2 dos experimentos de campo foram coletados um total de 1429 espécimes de *Lu. longipalpis* nos quintais das duas residências em área periurbana do município de Governador Valadares, MG. Deste total, 54,6% (n=781) foram capturados nos galinheiros experimentais que estavam fixados os mosquiteiros impregnados, e 45,3% (n=648) capturados naqueles que foram tratados com a borrifação (Figura 4.6). Ambos os tratamentos estavam associados ao feromônio sintético durante os experimentos. Não houve diferença significativa entre o total de espécimes coletados dos dois tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Total coletados de espécimes de *Lutzomyia longipalpis*



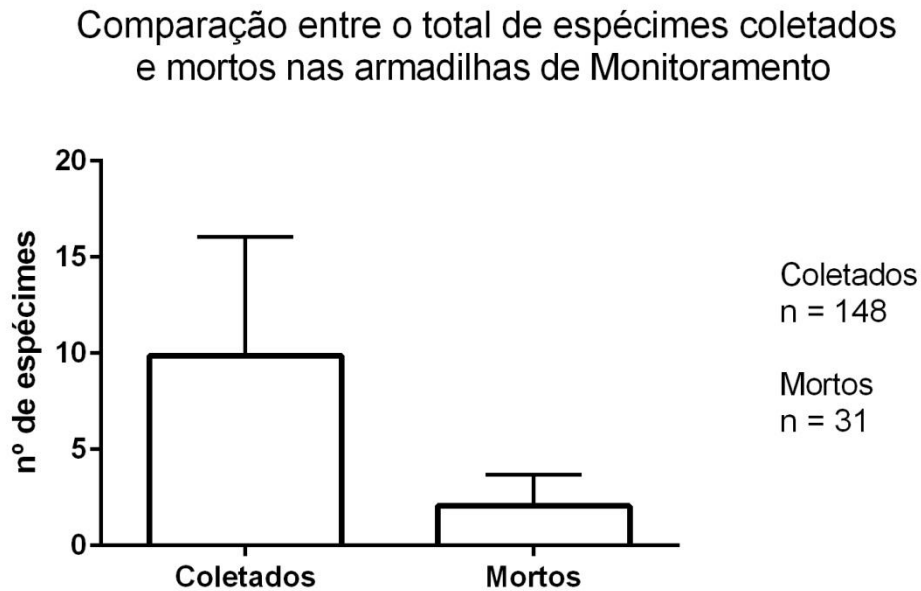
**Figura 4.6:** Comparação do total de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* capturados na fase 1 nos galinheiros experimentais tratados com Mosquiteiro e Borrifação com ambos tratamentos associados ao feromônio sintético. Teste T pareado para comparação do total de espécimes coletados nos dois tratamentos: (Média Mosquiteiro = 26,0; Média Borrifação = 21,6; Teste t-Student pareado = 1,17; Valor  $p = 0,250$ ).

Comparando a análise de variância do efeito residual de cada tratamento na mortalidade de *Lu. longipalpis* ao longo de 4 meses, a borrifação manteve eficácia de aproximadamente 100% em até dois meses após exposição dos tratamentos, reduzindo para 89,4% em 4 meses. Mosquiteiro também manteve eficácia de aproximadamente 100% em até dois meses, reduzido para 68,5% em 4 meses após exposição dos tratamentos.



**Figura 4.7:** Avaliação do efeito residual dos tratamentos na mortalidade de *Lu. longipalpis* em 24 horas de experimento ao longo de 4 meses após exposição dos tratamentos. ANOVA das taxas de mortalidade para os intervalos 0,2 e 4 meses. Borrifação  $F_{2,38} = 2,32$ ;  $p = 0,11$ . Mosquiteiro  $F_{2,38} = 12,19$ ;  $p = 0,00$ .

Quando analisamos os espécimes capturados nas armadilhas sem tratamento e feromônio sintético em 24 horas também podemos observar uma diferença significativa ( $p < 0,005$ ) entre o total coletados e mortos na fase 2 (Figura 4.10).



**Figura 4.8:** Comparação do número de espécimes coletados e mortos em 24 horas de *Lu. longipalpis* nas armadilhas de monitoramento dos experimentos de campo na fase 1. Teste T para amostra pareada: (Média Coletados = 9,87; Média Mortos = 2,07; Teste T = 3,56; Valor  $p = 0,003$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Do total de espécimes capturados, 1,6% foram identificados como *Evandromyia cortelezzii*. Esta espécie é encontrada em diversos tipos de habitats, como raízes, troncos e copas de árvores, abrigos de animais e paredes internas e externas de habitações (128) e já foi registrada em estudos anteriores em Governador Valadares (120,124). No município de Santa Luzia, MG, análises de PCR mostraram infecção de *Ev. cortelezzii* por *L. chagasi* (*L. infantum*) embora não seja possível incriminar o papel desta espécie na transmissão de LV nesta região, já que outros estudos para analisar o potencial vetorial precisam ser realizados e não há evidências sobre o mesmo em outras regiões do Brasil (129).

*Lutzomyia longipalpis* foi a espécie mais representativa neste estudo (98,4 %). É o principal vetor da *Leishmania* (*L.*) *infantum* no Brasil (38, 42). Possui uma ampla distribuição geográfica e dispersão para áreas urbanas (50, 22, 125) e é encontrado em todas as regiões geográficas do país, com exceção dos estados do Amazonas, Acre e Santa Catarina (22). No estado de Minas Gerais, alguns autores têm demonstrado a presença e abundância de *Lu. longipalpis* em áreas urbanas em que a leishmaniose visceral é endêmica (16, 35, 36) inclusive em Governador Valadares, é considerada uma região de ocorrência da doença (39, 120).

Na nossa área de estudo, todos os machos de *Lu. longipalpis* analisados foram identificados como uma população do quimiotipo (S)-9-metilgermacreno-B com fenótipo 1S. Este quimiotipo já foi anteriormente identificado em machos de *Lu. longipalpis* de outras áreas da região sudeste do Brasil, como na região oeste do estado de São Paulo, Lapinha-MG, Barra de Guaratiba-RJ, Montes Claros-MG e Araçatuba-SP (65, 90, 133-135). Em São Paulo, a identificação do feromônio em diferentes municípios contribuiu para entender a distribuição e dispersão das populações de *Lu. longipalpis* bem como os diferentes padrões epidemiológicos da LV observados no estado. Em Governador Valadares (MG), a identificação preliminar e periódica do feromônio (S)-9-metilgermacreno-B foi essencial para a aplicação apropriada do feromônio sintético e monitoramento

deste quimiotipo, evitando que outras populações interferissem nos resultados, caso fossem identificadas.

Alguns estudos no laboratório e no campo já comprovaram a eficácia do dispensador de feromônio sintético na atração de machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* (90-92). A partir desses resultados, abordou-se uma nova perspectiva para o controle de flebotomíneos associando esta estratégia à borrifação para aumentar sua eficácia, atraindo mais insetos para locais tratados com inseticida e conseqüentemente aumentando o número de insetos mortos (91,92).

O presente estudo não teve com um objetivo específico avaliar a eficácia do feromônio sintético, mas utilizamos essa estratégia como uma ferramenta para aprimorar a ação do mosquiteiro impregnado, uma vez que sabemos de sua capacidade de aumentar a captura de *Lu. longipalpis*, resultando em uma maior quantidade de flebotomíneos mortos pelo contato com o inseticida.

*Lu longipalpis s.l.* é a espécie predominante em Governador Valadares, como demonstrado em trabalhos anteriores (120, 124). Considerando que no nosso estudo realizamos poucos experimentos de campo em uma pequena área, podemos sugerir que a grande quantidade de exemplares capturados (n= 3337), possivelmente sofreu influência da ação do dispensador de feromônio sintético. Nos trabalhos anteriores, os autores identificaram 2.284 espécimes de *Lu. longipalpis* em um período de 9 meses de captura; e 649 exemplares em um período de 12 meses, respectivamente (120, 124).

## 5.1 Experimentos de campo da fase 1

Durante os experimentos de campo da primeira fase, um maior número de espécimes de *Lu. longipalpis* foi capturado nos galinheiros experimentais tratados com mosquiteiro associado ao feromônio sintético comparado nos galinheiros tratados com a borrifação, também associados ao feromônio sintético. No total, apenas 35% dos flebotomíneos estavam nas armadilhas das caixas borrifadas, enquanto que a nas caixas tratadas com mosquiteiro esse valor foi de 65% (Figura 4.1).

Os piretróides possuem modelos únicos de ação como a rapidez do efeito letal nos insetos, além do poder de repelência (136).

Pouco se sabe sobre o efeito da ação dos diferentes piretróides nos flebotomíneos, e a escolha do inseticida mais adequado é de grande importância, pois será o indicativo da efetividade dessa estratégia na redução da população de insetos. Neste estudo, a borrifação e o mosquiteiro eram compostos de inseticidas distintos. Apesar de as duas estratégias apresentarem eficácia semelhante na mortalidade de *Lu. longipalpis* (discutido na próxima subseção), a concentração do inseticida recomendada para borrifação é maior do que nos mosquiteiros impregnados, e este pode ser um fator que pode causar a morte dos insetos mais rapidamente, antes mesmo de eles entrarem nas armadilhas, podendo ser uma das justificativas para o resultado encontrado, uma vez que só consideramos aqueles insetos que estavam dentro das gaiolas.

A dose aplicada nos tratamentos também pode ser um fator que influencie no efeito repelente dos piretróides. Devido à baixa dosagem de inseticida utilizada na aplicação nos mosquiteiros, a borrifação pode ter um efeito repelente suficiente para deslocamento dos insetos. A repelência pode ser uma vantagem do uso de piretróides, pois oferece proteção individual contra as picadas reduzindo o contato do inseto com o indivíduo (137). Porém, no controle das Leishmanioses, a borrifação em todos os locais de agregação é inviável, e assim, o efeito repelente passar a ser danoso, pois pode influenciar



no deslocamento dos insetos para áreas não tratadas e conseqüentemente estar levando a doença para novas áreas.

Dessa forma, outros ensaios são necessários para determinar o mecanismo de ação e os possíveis efeitos dos piretróides em flebotomíneos.

Mosquiteiros impregnados de longa duração pode ser uma alternativa de controle para proteção individual mais adequada a fim de reduzir a transmissão intradomiciliar, mas seu uso descontínuo pode interferir na população do vetor dentro de casa. Ainda, os hábitos das pessoas que vivem em focos de Leishmaniose e as características epidemiológicas de cada localidade também podem limitar o uso dessa estratégia (117, 130).

Com isso, outros estudos com mosquiteiro impregnado começaram a ser desenvolvidos para conhecer sua ação sobre os flebotomíneos e avaliar sua possibilidade como uma estratégia para substituir a borrifação em paredes. Em 2013 foi realizado o primeiro estudo em laboratório que sugere o mosquiteiro impregnado como uma alternativa de controle de longa duração para *Lu. longipalpis* em abrigos de animais (galinheiros). Foi comparada a eficácia do mosquiteiro impregnado com permetrina com a borrifação de inseticida de ação residual (lambda-cialotrina) em superfícies de madeira. Os autores observaram uma mortalidade de 98,1% dos flebotomíneos expostos ao mosquiteiro e 97,2% na borrifação em um período de 24 horas (118). Em nosso estudo, primeiro a fazer essa mesma comparação em galinheiros experimentais em campo com a associação do uso de feromônio sintético obtivemos resultados semelhantes.

Para avaliação da eficácia dos tratamentos, analisamos a mortalidade de *Lu. longipalpis* em dois períodos: a cada manhã de experimento - 14 horas e com 24 horas após início de exposição. Podemos observar que a taxa de mortalidade dos espécimes expostos ao mosquiteiro subiu de 92,8% (Figura 4.2) para 96,7% (Figura 4.3) entre 14 horas e 24 horas, e aqueles expostos à borrifação morreram em 100% a cada manhã após exposição (Figura 4.2). Este resultado também sugere que o efeito do inseticida da borrifação ocorre mais rapidamente no inseto como discutido anteriormente. Porém, o uso do mosquiteiro associado ao feromônio sintético pode ser uma alternativa de longa duração (para ser usado, por exemplo, como cortinas em galinheiros),

oferecendo um efeito inseticida por mais tempo do que a borrifação, reduzindo o número de *Lu. longipalpis* nas paredes destes locais de agregação e conseqüentemente minimizar a possibilidade de picadas em humanos durante um longo período.

Outros estudos realizados anteriormente demonstraram a eficácia do mosquiteiro impregnado contra espécies de flebotomíneos endofílicas (131, 132). Porém a utilização desta estratégia para os vetores que são mais abundantes em ambientes peridomésticos, assim como *Lu. longipalpis* ainda é pouco conhecido. O presente trabalho mostrou a eficácia do mosquiteiro impregnado em matar *Lu. longipalpis* em galinheiros experimentais no ambiente peridoméstico em aproximadamente 100% assim como a borrifação (Figura 4.4), corroborando com os resultados encontrados nos testes em laboratórios (118).

Além da avaliação dos tratamentos em galinheiros experimentais realizada nesse estudo, em cada casa foi adicionada uma armadilha HP livre de qualquer influência inseticida que serviu de monitoramento da sobrevivência dos espécimes de *Lu. longipalpis* que não sofreram interferência dos tratamentos utilizados no estudo. Podemos observar que ocorreu uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre o total de coletados e mortos e que a maioria dos espécimes sobreviveu em 24 horas de cada experimento (Figura 4.5).

## 5.2 Experimentos de campo da fase 2

Já na fase 2 dos experimentos de campo, foram capturados um total de 1429 de espécimes de *Lu. longipalpis*. Deste total, 54,6% foram capturados nos galinheiros experimentais com mosquiteiro, e 45,3% capturados nos galinheiros experimentais borrifados. Essa comparação foi realizada ao longo dos 4 meses de exposição da borrifação e mosquiteiro, e diferente do resultado obtido na fase 1, não foi encontrada uma diferença estatística significativa ( $p>0.05$ ), o que reforça a hipótese de que essa diferença no total de espécimes capturados possa estar relacionado à dose letal ou a repelência dos tratamentos, uma vez que na fase 1, os tratamentos foram preservados de qualquer tipo de exposição, e aqui, a exposição pode ter causado alguma perda do efeito residual da borrifação. Porém, são necessárias outras análises que verifiquem o impacto do efeito residual de ambos os tratamentos na letalidade dos flebotomíneos.

Ainda não está claro que a borrifação de inseticida residual contribui na redução da transmissão da leishmaniose visceral. Em uma revisão realizada por Salomón e colaboradores em 2015 (125), foi apresentado alguns estudos mostrando que apesar de uma boa eficácia imediata, o efeito residual da borrifação de diferentes inseticidas não ultrapassa 4 meses (125). Em um estudo realizado na Ilha Margarita na Venezuela, os autores observaram uma redução na densidade de *Lu. longipalpis* no interior das casas após aplicação de lambdacialotrina. Porém, bioensaios em parede mostraram que o efeito residual do inseticida durou por cerca de 3 meses (100).

Nos experimentos de campo da fase 2 comparamos o efeito da borrifação e mosquiteiro ao longo de 24 horas do início de exposição em até 4 meses após o tratamento. Diferente dos resultados encontrados no trabalho citado anteriormente, a taxa de mortalidade de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados nos galinheiros experimentais tratados com a borrifação de lambdacialotrina se manteve próximo a 100% (Figura 4.7) durante todos os intervalos (0, 2 e 4 meses). Porém, a diferença encontrada na taxa de mortalidade entre os dois estudos pode estar relacionada à superfície borrifada. Na Ilha Margarita, as paredes dos interiores das casas eram pintadas a óleos

(100), podendo interferir na residualidade do inseticida. No nosso estudo, os galinheiros experimentais foram desenvolvidos com madeira de compensado sem nenhum tipo de pintura. Porém, mais estudos devem ser elaborados para avaliar o efeito da residualidade na taxa de mortalidade de flebotomíneos em diferentes superfícies borrifadas. Nos testes em laboratório com o mesmo inseticida, a letalidade foi de 97,2% no intervalo 0 caindo para 74% em 6 meses e 87,2% em 12 meses após o tratamento (118). A diferença da eficiência da borrifação entre os estudos de laboratório e de campo pode estar relacionada com os intervalos analisados, visto que em até 4 meses após tratamentos, nossos experimentos mostraram que o efeito se manteve aproximadamente em 100%. Já nos experimentos de laboratório, o intervalo entre as análises foi maior, podendo ser observada uma queda no efeito letal desse inseticida.

Nos insetos expostos ao mosquiteiro impregnado com alfa-cipermetrina a taxa de mortalidade se manteve próximo a 100% até dois meses após o tratamento, porém caiu para 68,5% em 4 meses após o tratamento (Figura 4.7). Em laboratório, os autores observaram que a letalidade dos flebotomíneos expostos ao mosquiteiro impregnado com permetrina se manteve próximo a 100% em até 12 meses após o tratamento (118). Entretanto, além do nosso trabalho de campo ser um estudo experimental, vale ressaltar que os painéis tratados que formavam nossos galinheiros experimentais foram expostos a condições extremas (Figura 3.5), como sol, chuva e variadas temperaturas, o que pode ter influenciado na queda da efetividade do mosquiteiro impregnado.

Na fase 2 dos experimentos de campo, dos espécimes capturados nas armadilhas de Monitoramento da sobrevivência dos espécimes de *Lu. longipalpis*, 17,3% morreram observando uma diferença significativa ( $p < 0,005$ ) entre o total de coletados e mortos e que a maioria dos espécimes sobreviveram em 24 horas de cada experimento (Figura 4.8).

A partir dos resultados aqui apresentados e discutidos, podemos considerar que o mosquiteiro impregnado tem uma eficácia semelhante à borrifação na mortalidade do *Lu. longipalpis*.

Sugerimos o mosquiteiro impregnado como uma nova ferramenta para ser uma alternativa direta para borrifação em locais de agregação de *Lu.*

*longipalpis*, por ser uma estratégia de baixo custo, fácil manuseio, além de ser menos tóxico para o homem e o ambiente, e com possível efeito de longa duração contra os flebotomíneos.

O presente estudo apresentou os primeiros testes em campo do uso do mosquito impregnado como uma nova estratégia de controle direcionada no combate à redução de população de flebotomíneos em potenciais locais de agregação. Uma vez que variados piretróides em diferentes concentrações são utilizados para tratar o mosquito e borrifação e conhecimento desses efeitos sobre os flebotomíneos ainda é desconhecido, estudos mais detalhados envolvendo bioensaios e testes de suscetibilidade comparando os mesmos inseticidas na borrifação e mosquito em diferentes concentrações, bem como, testes de longa duração em galinheiros reais, são essenciais no entendimento da efetividade dessas estratégias no combate as leishmanioses.

## 6 CONCLUSÕES

- Prevalência de *Lutzomyia longipalpis* com quimiotipo (S)-9-metilgermacreno-B no município de Governador Valadares MG;
- Os dois tipos de teste “Feromônio sintético associado ao Mosquiteiro impregnado e Feromônio sintético associado à Borrifação residual” são capazes de “atrair e matar” *Lutzomyia longipalpis* em galinheiros experimentais no campo;
- Mosquiteiro impregnado e Borrifação residual tiveram efeito semelhante em matar *Lu. longipalpis* (eficácia de aproximadamente 100%) em até 24 horas após início de exposição;
- Mosquiteiro impregnado tem efeito de aproximadamente 100% na letalidade de flebotomíneos em até 2 meses, decrescendo após esse período;
- O efeito da borrifação residual na letalidade de flebotomíneos se manteve próximo a 100% em até os 4 meses de exposição.

## **7 PERSPECTIVAS**

A partir dos resultados encontrados no desenvolvimento deste projeto, novos estudos serão realizados para avaliar detalhadamente a efetividade do efeito de “atrair e matar” do feromônio sintético associado ao mosquito impregnado. Dependendo da comprovação de sua eficácia essa estratégia poderá ser incorporada aos programas de controle das Leishmanioses – MS contra flebotomíneos. Cortinas impregnadas e o dispensador de feromônio sintético poderiam ser disponibilizados para população em forma de um kit para ser fixado nas paredes de galinheiros ou outros abrigos de animais, onde esses insetos se agregam em grande quantidade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: Editora Blucher. Editora da Universidade de São Paulo; 1973. 658 p.
2. Young DG, Ducan MA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, Florida: Associated Publishers; 1994. 888 p.
3. Galati EAB. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. 360 p.
4. Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bola Dir Malariol y San Amb.* 1995;35(1):133-42.
5. Brazil RP, Rodrigues AAF, Filho JDA. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol.* 2015;4:144.
6. Brazil RP, Brazil BG. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. 360 p.
7. Schlein Y, Warburg A. Phytophagy and the feeding cycle of Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol.* 1986;23(1):11-5.
8. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990;4(1):1-24.
9. Warburg A, Faiman R. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. *J Vector Ecol.* 2011;36 Suppl 1:S10-6.
10. Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Filho G, Sessa PA, Carias VR, et al. [Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):155-63.
11. Falqueto A, Varejao JB, Sessa PA. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1987;82(3):443.
12. Yoshida EL, Marques Sde A, Stolf HO, Barsotti LA, Bueno MM, Sogayar R. [Natural infection of *Equus caballus* by *Leishmania* sp--Sao Paulo, Brazil. (Brief scientific communication)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1988;30(2):79-80.



13. Rangel EF, Azevedo AC, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990;85(1):39-45.
14. Quinnell RJ, Dye C. An Experimental-Study of the Peridomestic Distribution of *Lutzomyia-Longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Bulletin of Entomological Research*. 1994;84(3):379-82.
15. Jarvis EK, Rutledge LC. Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 1992;29(2):171-7.
16. Oshaghi MA, McCall PJ, Ward RD. Response of adult sandflies, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), to sticky traps baited with host odour and tested in the laboratory. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994;88(4):439-44.
17. Nigan Y, Ward RD. The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Physiol Entomol*. 1991;16(3):305-12.
18. Pinto MC, Campbell-Lendrum DH, Lozovei AL, Teodoro U, Davies CR. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med Vet Entomol*. 2001;15(2):132-9.
19. Hamilton JG, Ramsoondar TM. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. *Med Vet Entomol*. 1994;8(4):375-80.
20. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*. 2013;58:227-50.
21. Brazil RP, Brazil BG. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014.
22. Vilela ML, Afonso MM, Costa SM, Costa WA, Rangel EF. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014.
23. Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(2):109-18.
24. Organization WH. *Leishmaniasis 2012* [updated 2012; cited 2012]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
25. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*. 1996;14(5):417-23.
26. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental and molecular pathology*. 2002;72(2):132-41.

27. Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Veterinary parasitology*. 2011;182(1):14-21.
28. Hotez P, Ottesen E, Fenwick A, Molyneux D. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. *Advances in experimental medicine and biology*. 2006;582:23-33.
29. Coutinho RBA, Mendonça SCF. Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 311-26.
30. Costa DL, Costa CHN. Leishmaniose Visceral. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 327-53.
31. Gontijo B, de Carvalho Mde L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(1):71-80.
32. Lainson R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1988;321(1207):389-404.
33. Sharma U, Singh S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *Journal of vector borne diseases*. 2008;45(4):255-72.
34. Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002;9(1):43-50.
35. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):937-54.
36. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
37. Saúde Md. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Epidemiológica DdV, Saúde SdVe*, editors. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.
38. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004;7:338-49.
39. Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira Mde F, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(5):570-80.

40. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24(12):2948-52.
41. Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1962;4:198-212.
42. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):811-27.
43. dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1998;12(3):315-7.
44. de Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop*. 2008;107(1):66-9.
45. Brazil RP, Passos WL, Brazil BG, Temeljkovitch M, Filho JDA. Diptera, Psychodidae, Phlebotominae Rondani, 1840: Range extension and new records from lowland Bolivia. *Check List*. 2010;6(4):587-8.
46. SUS. Informes Epidemiológicos Ministério da Saúde; 2012 [cited 2015]. Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1560](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560).
47. WHO. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2013: World Health Organization; 2013 [cited 2015]. Available from: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_2013\\_VL.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png).
48. Malafaia G. LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE MINAS GERAIS: PANORAMA, DESAFIOS E PERSPECTIVAS. 2009. 2009;4(1).
49. Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. In: Sanitária SNdE, editor. Rio de Janeiro 1956.
50. Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):263-4.
51. Mangabeira OF. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. *Rev Bras Malariol Doenças Tropicais*. 1969;12:3-26.
52. González CNN. Caracterização transcriptômica e proteômica da glândula de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

53. Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1983;78:269-80.
54. Ward R, PHILLIPS A, BURNET B, MARCONDES C. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: S M, editor. *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Oxford: Oxford University 1988. p. 258-69.
55. Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vigoder FM, Ward RD, Peixoto AA. Reproductive isolation between sympatric and allopatric Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(2):216-9.
56. Arrivillaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, et al. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *J Med Entomol*. 2003;40(5):615-27.
57. Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(6):839-47.
58. Mukhopadhyay J, Ghosh K, Azevedo AC, Rangel EF, Munstermann LE. Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Am Mosq Control Assoc*. 1998;14(3):277-82.
59. Mutebi JP, Alexander B, Sherlock I, Wellington J, Souza AA, Shaw J, et al. Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(1):149-57.
60. Azevedo ACd, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NAd, Rosa-Freitas MG, Rangel EF. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95:305-22.
61. Bauzer LG, Souza NA, Maingon RD, Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(1):1-12.
62. Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends Parasitol*. 2008;24(1):12-7.
63. Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, et al. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceara State, Brazil. *Mol Ecol*. 2003;12(7):1879-94.

64. Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *J Med Entomol*. 2004;41(5):906-13.

65. Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araujo IB, et al. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(1):e365.

66. Lins RM, Souza NA, Peixoto AA. Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(7):736-40.

67. Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LG, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect Genet Evol*. 2010;10(6):734-9.

68. Vigoder FM, Souza NA, Brazil RP, Bruno RV, Costa PL, Ritchie MG, et al. Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *Parasit Vectors*. 2015;8:290.

69. Steiger S, Schmitt T, Schaefer HM. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proc Biol Sci*. 2011;278(1708):970-9.

70. Arn H, Tóth M, Priesner E. Pherolist: Heinrich Arn; 2000 [cited 2015]. Available from: <http://www-pherolist.slu.se/pherolist.php>.

71. Law JH, Regnier FE. Pheromones. *Annu Rev Biochem*. 1971;40:533-48.

72. Price PW, Bouton CE, Gross P, McPheron BA, Thompson JN, Weis AE. Interactions Among Three Trophic Levels: Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores and Natural Enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1980;11(1):41-65.

73. Simpson SJ, Raubenheimer D. The Geometric Analysis of Nutrient-Allelochemical Interactions: A Case Study Using Locusts. *Ecology*. 2001;82(2):422-39.

74. FRANCKE W, SCHULZ S. Pheromones. *Comprehensive natural products chemistry*. 8: Elsevier; 1999. p. 197-261.

75. Karlson P, Luscher M. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 1959;183(4653):55-6.

76. Wilson EO, Bossert WH. CHEMICAL COMMUNICATION AMONG ANIMALS. Recent progress in hormone research. 1963;19:673-716.

77. Morse RA. Honey Bee Alarm Pheromone: Another Function. *Annals of the Entomological Society of America*. 1972;65(6):1430-.
78. Whitman D. Allelochemical interactions among plants, herbivores, and their predators. *Novel Aspects of Insect-Plant Interactions: Wiley-Interscience Publication*; 1988. p. 207-48.
79. Lane RP, Bernardes Dde S. Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1990;84(1):53-61.
80. Spiegel CN, Brazil RP, Soares MJ. Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae). *Arthropod Struct Dev*. 2002;30(3):219-27.
81. Morton IE, Ward RD. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. *Med Vet Entomol*. 1989;3(3):219-23.
82. Lane R, Ward R. The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) *Cahiers-ORSTOM Série Entomol Méd Parasit*. 1984;22(3):245-9.
83. Lane R, Phillips A, Molyneux DH, Procter G, Ward RD. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? *Ann Trop Med Parasitol*. 1985;79(2):225-9.
84. Hamilton JG, Dougherty MJ, Ward RD. Sex pheromone activity in a single component of tergal gland extract of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Northeastern Brazil. *J Chem Ecol*. 1994;20(1):141-51.
85. Hamilton JG. Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. *Parasite*. 2008;15(3):252-6.
86. Hamilton JG, Dawson GW, Pickett JA. 3-Methyl-alpha-himachalene: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *J Chem Ecol*. 1996;22(12):2331-40.
87. Hamilton JG, Dawson GW, Pickett JA. 9-Methylgermacrene-B; proposed structure for novel homosesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. *J Chem Ecol*. 1996;22(8):1477-91.
88. Hamilton JG, Hooper MA, Pickett AJ, Kenji M, Satoshi S. 3-Methyl-[small alpha]-himachalene is confirmed, and the relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. *Chemical Communications*. 1999(4):355-6.

89. Hamilton JG, Ibbotson CH, Hooper MA, Pickett AJ. 9-Methylgermacrene-B is confirmed as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as S. *Chemical Communications*. 1999(23):2335-6.
90. Bray DP, Bandi KK, Brazil RP, Oliveira AG, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. *J Med Entomol*. 2009;46(3):428-34.
91. Bray DP, Alves GB, Dorval ME, Brazil RP, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. *Parasit Vectors*. 2010;3:16.
92. Bray DP, Carter V, Alves GB, Brazil RP, Bandi KK, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone in a long-lasting lure attracts the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 weeks in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(3):e2723.
93. saúde Md. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. In: saúde Sdve, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2003. p. 63-6.
94. Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 2003;17(1):1-18.
95. Falcao AR, Pinto CT, Gontijo CM. Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* to deltamethrin. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1988;83(3):395-6.
96. Mazzarri MB, Feliciangeli MD, Maroli M, Hernandez A, Bravo A. Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to selected insecticides in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc*. 1997;13(4):335-41.
97. Alexander B, Barros VC, de Souza SF, Barros SS, Teodoro LP, Soares ZR, et al. Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Trop Med Int Health*. 2009;14(10):1272-7.
98. Chowdhury R, Huda MM, Kumar V, Das P, Joshi AB, Banjara MR, et al. The Indian and Nepalese programmes of indoor residual spraying for the elimination of visceral leishmaniasis: performance and effectiveness. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011;105(1):31-5.
99. Pessoa GC, Lopes JV, Rocha MF, Pinheiro LC, Rosa ACL, Michalsky ÉM, et al. Baseline susceptibility to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brazil). *Parasites & Vectors*. 2015;8:469.
100. Feliciangeli MD, Mazzarri MB, Blas SS, Zerpa O. Control trial of *Lutzomyia longipalpis* s.l. in the Island of Margarita, Venezuela. *Trop Med Int Health*. 2003;8(12):1131-6.

101. de Oliveira SS, de Araujo TM. [Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000)]. *Cad Saude Publica*. 2003;19(6):1681-90.
102. Kelly DW, Dye C. Pheromones, kairomones and aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Pheromones and animal behaviour*. Cambridge: Cambridge University; 1997. p. 721-31.
103. Kelly DW, Mustafa Z, Dye C. Differential application of lambda-cyhalothrin to control the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med Vet Entomol*. 1997;11(1):13-24.
104. WHO. Global malaria control and elimination: report of a technical review. Geneva: World Health Organization; 2008.
105. WHO. World malaria report Geneva: World Health Organization; 2012.
106. Brun L-O, Sales S. Stage IV evaluation of four organophosphorus insecticides, OMS-43, OMA-1155, OMS1197 and OMS-1424 applied at 0,2 gm/m<sup>2</sup> to cotton mosquito nets. World Health Organization; 1976.
107. Ranquel P, Touré TY, Soula G, Le Du DY, Traora O, Dufflo B, et al. Use of mosquito nets with deltamethrin in malaria control. XI International Congress of Tropical Medicine and malaria Calgary, Canada 1984.
108. Hii JL, Smith T, Vounatsou P, Alexander N, Mai A, Ibam E, et al. Area effects of bednet use in a malaria-endemic area in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95(1):7-13.
109. Lines JD, Myamba J, Curtis CF. Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and eave curtains against malaria vectors in Tanzania. *Med Vet Entomol*. 1987;1(1):37-51.
110. Howard SC, Omumbo J, Nevill C, Some ES, Donnelly CA, Snow RW. Evidence for a mass community effect of insecticide-treated bednets on the incidence of malaria on the Kenyan coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(4):357-60.
111. Binka FN, Indome F, Smith T. Impact of spatial distribution of permethrin-impregnated bed nets on child mortality in rural northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(1):80-5.
112. Alten B, Caglar SS, Kaynas S, Simsek FM. Evaluation of protective efficacy of K-OTAB impregnated bednets for cutaneous leishmaniasis control in Southeast Anatolia-Turkey. *J Vector Ecol*. 2003;28(1):53-64.
113. Alten B, Caglar SS, Simsek FM, Kaynas S. Effect of insecticide-treated bednets for malaria control in Southeast Anatolia-Turkey. *J Vector Ecol*. 2003;28(1):97-107.



114. Emami MM, Yazdi M, Guillet P. Efficacy of Olyset long-lasting bednets to control transmission of cutaneous leishmaniasis in Iran. *East Mediterr Health J*. 2009;15(5):1075-83.
115. Ostin B, Vanlerberghe V, Picado A, Dinesh DS, Sundar S, Chappuis F, et al. Vector control by insecticide-treated nets in the fight against visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent, what is the evidence? *Trop Med Int Health*. 2008;13(8):1073-85.
116. Gunay F, Karakus M, Oguz G, Dogan M, Karakaya Y, Ergan G, et al. Evaluation of the efficacy of Olyset(R) Plus in a village-based cohort study in the Cukurova Plain, Turkey, in an area of hyperendemic cutaneous leishmaniasis. *J Vector Ecol*. 2014;39(2):395-405.
117. Courtenay O, Gillingwater K, Gomes PA, Garcez LM, Davies CR. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. *Med Vet Entomol*. 2007;21(2):168-76.
118. Bray DP, Hamilton JG. Insecticide-impregnated netting as a potential tool for long-lasting control of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in animal shelters. *Parasit Vectors*. 2013;6:133.
119. IBGE. Governador Valadares: IBGE; 2014 [cited 2015]. Dados gerais do município]. Available from: [http://www.ibge.com.br/cidadesat/painel/painel.php?lang=\\_ES&codmun=312770&search=minas-gerais|governador-valadares|infograficos:-dados-gerais-do-municipio](http://www.ibge.com.br/cidadesat/painel/painel.php?lang=_ES&codmun=312770&search=minas-gerais|governador-valadares|infograficos:-dados-gerais-do-municipio).
120. Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinario EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. *Biomed Res Int*. 2013;2013:405083.
121. Lara-Silva OF. Leishmaniose Tegumentar Americana em Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores Belo Horizonte: Fiocruz; 2011.
122. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Ministério Da Saúde; 2014 [cited 2015]. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>.
123. Lainson R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*. 1997;11:29-40.
124. Barata RA, Paz GF, Bastos MC, Andrade RCO, Barros DCMd, Silva FOLe, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governador Valadares, a transmission area for American tegumentary leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44:136-9.

125. Salomón Oscar Daniel, Feliciangeli María Dora, Quintana María Gabriela, Afonso Margarete Martins dos Santos, Rangel Elizabeth Ferreira. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2015, 110( 7 ): 831-846.
126. Dantas-Torres Filipe, Brandão-Filho Sinval Pinto. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2006; 48 (3): 151-156.
127. Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis. 2002 Dec;8(12):1480-5.
128. Aguiar GM & Medeiros WM. Distribuição Regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF & Lainson R., editores. Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 207-255.
129. Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Lima ACMR, Gontijo CMF Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*- Endemic Area of Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8(3): 407-414.
130. Feliciangeli MD, Flores K, Espino C, Mazzarri M, Bravo A. Pilot study on the effect of long-lasting insecticidal bed nets (LNs) on visceral leishmaniasis vectors in Venezuela. Proceedings of the 7th International Symposium on Phlebotomine Sandflies, 2011 April 25-30, Kusadasi, p. 106.
131. Maroli M, Majori G: Permethrin-impregnated curtains against phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae): laboratory and field studies. *Parassitologia* 1991, 33(Suppl):399-404.
132. Alexander B, Usma M, Cadena H, Quesada B, Solarte Y, Roa W, Travi B: Evaluation of deltamethrin-impregnated bednets and curtains against phlebotomine sandflies in Valle Del Cauca, Colombia. *Med Vet Entomol* 1995, 9:279-283.
133. Casanova C, Colla-Jacques FE, Hamilton JGC, Brazil RP, Shaw JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. Bates PA, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(3):e0003620.
134. Hamilton J.G.C., Maingon R.D.C., Alexander B., Ward R.D., Brazil R.P. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. Medical and Veterinary Entomology. 2005, 19: 480–488.
135. Casanova Cláudio, Hamilton JGC, Trigo JR, Costa Antonio IP. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2006, 101( 1 ): 113-115.

136. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 2000, 14:1-5.

137. Kawada H, Ohashi K, Dida GO, et al. Insecticidal and repellent activities of pyrethroids to the three major pyrethroid-resistant malaria vectors in western Kenya. *Parasites & Vectors*. 2014;7:208. doi:10.1186/1756-3305-7-208.