

CONTROLE QUÍMICO

Adaptação de um Bioensaio Simplificado para Avaliação do *Status* de Susceptibilidade em Larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao Piretroide Deltametrina

ANA PAULA B. SILVA¹; WALLISON S. ALVES¹; ADEMIR J. MARTINS^{2,3}; WANDERLI P. TADEI¹; JOSELITA M.M. SANTOS¹

¹Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Email: silva_apb@yahoo.com.br; anna@inpa.gov.br; ²Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ; ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.

BioAssay 9:4 (2014)

Adapting a simplified bioassay for the evaluation of susceptibility status in *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* larvae to the pyrethroid deltamethrin

ABSTRACT - Malaria remains one of the most serious public health problems in the world. The most effective strategic tool to reducing the transmission of the disease is the elimination of the mosquito vectors, through applying chemical insecticides against the adult form. However, the overuse of such compounds has been causing a strong selection pressure on vector populations, resulting in the emergence of resistance. In this study, we aimed to adapt a method for assessing susceptibility status to pyrethroid insecticides on larvae of *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara*. This method was previously named as Knockdown Simplified Bioassay. The samples were collected in Manaus, São Gabriel da Cachoeira and Iranduba in the state of Amazonas, in Macapá, Amapá, and Rio Branco, Acre. Bioassays were performed using 4th instar larvae. Each larva was placed in cups containing 20 mL of the insecticide solution and the time of knockdown was observed for 30 minutes. Based on natural population most susceptible (São Gabriel da Cachoeira), diagnostic doses obtained were 0.1 and 0.4 ppm. Loss of susceptibility was observed in populations of Manaus and Iranduba, possibly due to selection effect of insecticides on the specific resistance alleles.

KEY WORDS - Insecticides, anophelines, malaria, pyrethroid, susceptibility.

RESUMO - A malária ainda é um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo. A ferramenta estratégica mais efetiva para tentar diminuir a transmissão da doença é a eliminação de vetores na forma adulta por meio da aplicação de inseticidas químicos. No entanto, o uso exacerbado de tais compostos tem provocado uma forte pressão de seleção sobre as populações de vetores, resultando na evolução da resistência. Nesse trabalho, objetivamos adaptar um método de avaliação do perfil de susceptibilidade aos inseticidas piretroides sobre larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara*. Tal método é conhecido como Bioensaio Simplificado de Knockdown. As amostras foram coletadas em Manaus, São Gabriel da Cachoeira e Iranduba, no estado do Amazonas, em Macapá, no Amapá, e em Rio Branco, no Acre. Os bioensaios foram conduzidos usando larvas de 4^o estágio. Cada larva foi colocada em copos contendo 20 mL da solução de inseticida e o tempo de knockdown foi observado durante 30 minutos. Com base na população natural mais susceptível (São Gabriel da Cachoeira), as doses diagnósticas obtidas foram 0,1 e 0,4 ppm. Foram observadas perda de susceptibilidade nas populações de Manaus e Iranduba, possivelmente, devido ao efeito de seleção dos inseticidas sobre os alelos de resistência específicos.

PALAVRAS-CHAVE - Inseticidas, anofelinos, malária, piretroide, susceptibilidade.

A malária é uma grave doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (Neves, 1988). Na região amazônica, que concentra aproximadamente 99% do total de casos da doença diagnosticados no Brasil (SIVEP-Malaria, 2013), *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* são considerados dois eficientes vetores (Povoa *et al.*, 2001, Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010, Hiwat & Bretas, 2011). Os fatores que contribuem para isso são a elevada antropofilia/endofagia e a susceptibilidade frente aos agentes etiológicos *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (Forattini, 1987, Forattini, 2002, Grieco *et al.*, 2005).

Dentre as ferramentas estratégicas existentes para o combate à malária, a eliminação de mosquitos adultos, por meio da utilização de inseticidas neurotóxicos aplicados dentro e fora dos domicílios, é considerada a mais eficaz (Rose, 2001, WHO, 2009, WHO, 2012). Sob esse aspecto, existem quatro grandes grupos de inseticidas: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides. De todos eles, os piretroides são tidos como os mais eficientes, por conta da baixa toxicidade em mamíferos, da maior capacidade letal contra os insetos, bastando pequenas doses do produto para um efeito satisfatório, e por serem biodegradáveis e não cumulativos (COUNCIL, 1986, Omoto, 2000, Schleier III & Peterson, 2011). Além disso, é a única classe aprovada pelo Programa de Avaliação de Pesticidas da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization Pesticide Scheme/WHOPES) para impregnação de telas e mosquiteiros (Phillips-Howard *et al.*, 2003, WHO, 2007, WHOPES, 2014).

Entretanto, o uso exacerbado de inseticidas tem provocado uma forte pressão de seleção sobre algumas populações de vetores, resultando no surgimento do fenômeno de resistência, conforme aconteceu para outras classes de inseticidas, colocando em risco a viabilidade de seu uso nas campanhas de combate aos insetos de importância médica e também de pragas na agricultura (Brogdon & Mcallister, 1998a, Hemingway & Ranson, 2000, Brogdon & Chan, 2013).

Na região amazônica a utilização de piretroides contra populações de anofelinos é constante, principalmente durante surtos epidêmicos de malária. Os inseticidas usados são lambdacialotrina 5% para ações de termonebulização e alfacipermetrina 20% para borrifação intradomiciliar e ultrabaixo volume (UBV) (WHO, 2009). Além disso, mosquiteiros de longa duração impregnados com permetrina 2% (Long Lasting Insecticidal Net/LLIN), da marca OlySet Net® (Sumitomo Chemical Company, Ltd), têm sido recentemente distribuídos para os moradores das áreas de alto risco (observação pessoal). Assim sendo, a região norte do Brasil tem potencial para a seleção de populações de mosquitos resistentes. Nesse contexto, monitorar o nível de susceptibilidade, ou até mesmo de resistência, dessas populações aos inseticidas se faz de extrema importância.

A resistência em uma dada população é inicialmente avaliada e caracterizada por meio de bioensaios. Os testes podem ser do tipo qualitativo, no qual se avalia a taxa de mortalidade da população exposta a uma ‘dose diagnóstica’,

geralmente definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), ou do tipo quantitativo, onde os insetos do campo são expostos a uma série de concentrações diferentes e idealmente comparados com uma linhagem padrão. Portanto, uma população teste pode ser definida como susceptível ou resistente, considerando o nível de mortalidade no ensaio de dose-diagnóstica, ou ter o nível de resistência estimado, se avaliada em ensaio dose-dependente. Neste caso, são calculadas as razões de resistência (RR) daquela população (WHO, 2006).

Alternativamente, resistência ao efeito *knockdown* dos piretróides pode ser avaliada através da observação da queda do inseto exposto a uma única dose do inseticida, porém ao longo de intervalos de tempo, de forma que se gera uma curva *knockdown* x tempo, portanto também uma análise quantitativa (WHO, 1981, WHO, 2013a).

Entre os bioensaios mais empregados na detecção de resistência em anofelinos constam: testes com papéis (kits OMS) (WHO, 2006) ou garrafas de vidro (Brogdon & Mcallister, 1998b), impregnados com inseticida. A aplicabilidade destas metodologias depende de alguns aspectos que vão além dos parâmetros biológicos do mosquito em si.

Os testes padrões da OMS com papéis impregnados, embora úteis e eficazes, tornaram-se caros ao longo dos anos, requerem uma grande quantidade de insetos a serem testados, não estão disponíveis para alguns inseticidas e as dosagens disponíveis não são aplicáveis a todas as espécies de vetores (Brogdon & Mcallister, 1998b). Soma-se a isto o fato de que a burocracia atrasa a importação dos papéis impregnados, que acabam por chegar com prazo de validade vencido.

As provas de garrafas de vidro, por sua vez, muito embora sejam de baixo custo, também requerem uma grande quantidade de insetos adultos. Além disso, o avaliador pode contaminar a si próprio, ou as amostras, ao introduzir ou retirar os insetos de dentro das garrafas impregnadas (Brogdon & Chan, 2013). Outro aspecto negativo é o fato de que a alta umidade relativa do ar pode prejudicar o andamento do ensaio em campo, como é o caso da região amazônica.

Como a maioria das espécies de anofelinos brasileiros ainda não são colonizáveis em laboratório, a obtenção de uma quantidade suficiente de indivíduos para serem utilizados nos bioensaios é um fator limitante. Portanto, o objetivo desse trabalho foi adaptar uma metodologia simples, rápida e de baixo custo para avaliar o *status* de susceptibilidade das populações de *A. darlingi* e *A. marajoara* frente à deltametrina, bem como determinar as doses diagnósticas desse inseticida para o ensaio proposto.

Material e Métodos

Área de coleta. Foram estudadas populações procedentes de cinco municípios da região Norte do Brasil: Manaus, São Gabriel da Cachoeira e Iranduba, no estado do Amazonas; Macapá, no estado do Amapá; e Rio Branco, no estado do Acre (Figura1).

O estado do Amazonas possui uma área absoluta de 1.559.159,148 km² e uma população de 3.807.921

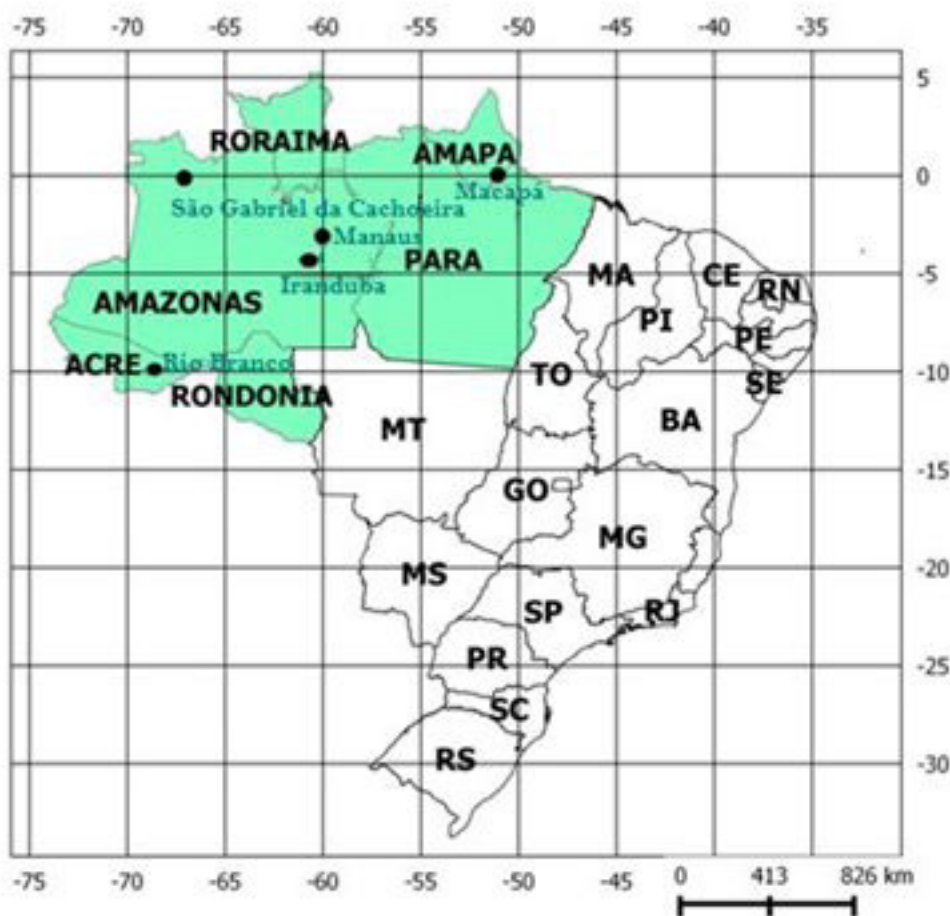


Figura 1. Mapa do Brasil enfatizando as localidades onde as populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* foram coletadas.

habitantes, sendo o segundo estado menos populoso do Brasil (aproximadamente 2,23 habitantes por km²) (IBGE, 2013). Apresenta clima equatorial úmido, com temperaturas médias anuais sempre acima de 22 °C e duas estações bem definidas: chuvosa (dezembro a maio) e seca ou menos chuvosa (junho a novembro). Manaus (3°07'07,78"S; 60°01'18,07"O) e Iranduba (3°08'44,48"S; 60°15'26,63"O) estão localizadas na Mesorregião denominada Centro Amazonense e são duas das oito cidades que compõem a Região Metropolitana de Manaus. São Gabriel da Cachoeira (0°33'29,66"S; 68°08'35,31"O) está localizado na mesorregião Norte Amazonense, noroeste do estado, distando cerca de 850 km da capital Manaus (IBGE, 2013).

O estado do Amapá possui uma área absoluta de 142.828,512 km² e uma população de 734.996 habitantes (4,69 habitantes por km²). Apresenta clima equatorial úmido, com temperaturas médias anuais de 27 °C e duas estações bem definidas: verão (julho a dezembro) e inverno (janeiro a junho) (IBGE, 2013). Macapá (0°24'29,53"N; 50°55'44,13"O), a capital do estado, está situada a sudoeste, pertencendo à mesorregião Sul do Amapá e à microrregião Macapá (IEPA, 2014).

O estado do Acre possui uma área absoluta de 164.123,040 km² e uma população de 776.463 habitantes (4,47 habitantes por km²). Apresenta clima equatorial úmido, com temperaturas médias anuais variando de 24 a 32 °C e duas estações bem definidas: chuvosa (novembro a abril) e seca (maio a outubro). Rio Branco (9°58'29"S; 67°48'36"O), a capital do estado, pertence à mesorregião Vale do Acre e à microrregião Rio Branco (IBGE, 2013).

Obtenção das amostras. Para a obtenção das amostras, os mosquitos foram capturados na forma alada, entre 18:00 e 24:00 horas, entre dezembro de 2009 e julho de 2013 (Manaus: dezembro a fevereiro de 2009 e de março a maio de 2011; São Gabriel da Cachoeira: setembro a novembro de 2010; Iranduba: fevereiro a julho de 2013; Macapá: junho e julho de 2011; Rio Branco: outubro e novembro de 2012). Os espécimes foram capturados a cada 60 minutos, das 17:00 até as 24:00 h, com auxílio de um aspirador manual movido à pilha. Essas coletas foram realizadas dentro e fora dos domicílios, e também nas paredes dos currais, seguindo os critérios e as recomendações da OMS (WHO, 1975).

As fêmeas capturadas foram transferidas para copos telados acondicionados em uma caixa térmica de poliestireno



Figura 2. (a) Copos telados acondicionados em caixa de poliestireno usados para o transporte das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara*; (b) copos plásticos com filó usados para oviposição; (c) cubas esmaltadas onde as larvas eram criadas.

(Figura 2a) e transportadas para o Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Após o repasto sanguíneo, que foi feito usando um hamster (*Mesocricetus auratus*), elas foram isoladas em copos telados para postura individual (Figura 2b). A identificação dos adultos, dos ovos e das larvas foi feita utilizando as chaves taxonômicas de [Gorham *et al.* \(1967\)](#), [Faran & Linthicum \(1981\)](#) e [Consoli & Lourenço-de-Oliveira \(1994\)](#).

Na manutenção dos mosquitos em laboratório, foi utilizado o método descrito em [Santos *et al.* \(1981\)](#). Cada desova foi colocada em cubas esmaltadas de 13 cm ou, alternativamente, 16 cm de diâmetro, por 6 cm de altura (Fig. 2c). Em cada cuba, foram adicionados 450 mL ou 500 mL de água destilada, respectivamente, e a troca de água realizada a cada dois dias. A alimentação das larvas consistiu de ração para peixes moída, Tetramin e Goldfish (proporção 2:1). Os mosquitos foram criados em um insetário com temperatura constante de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa entre 80% e 90%, até atingirem o 4º estágio larval.

Bioensaio simplificado de knockdown. Para avaliar a resistência ao efeito *knockdown* provocado pelos piretroides foi utilizado um bioensaio simplificado de larvas, adaptado a partir da metodologia descrita em [Kawada *et al.* \(2009\)](#). De acordo com esse bioensaio, larvas de 4º estágio foram individualmente colocadas em copos plásticos contendo 20 mL da solução de inseticida, sendo acompanhado o tempo de *knockdown* a cada 5 minutos, por até 30 minutos (Figura 3).

O inseticida usado foi deltametrina grau-técnico (Sigma/ lote: 97B0276B3) diluída em Acetona (P.A.), conforme recomendações do fabricante, a partir do qual foram testadas sete distintas concentrações (em ppm: 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6) para a determinação das doses diagnósticas desse inseticida sobre as populações de anofelinos. Entendem-se aqui como doses diagnósticas a menor e a maior concentração capazes de atingir o KT_{50} das larvas da população susceptível (ou população de referência).

A deltametrina foi selecionada por ser um piretroide do tipo II, ou seja, compostos que apresentam o grupo α -ciano em sua estrutura molecular ([Schleier III & Peterson, 2011](#)), sendo, portanto, considerado o inseticida mais potente já conhecido ([Davies *et al.*, 2007](#)). Embora a alfa-cipermetrina seja o composto atualmente mais utilizado no controle de anofelinos, a deltametrina tem sido amplamente utilizada

contra o vetor de dengue, em ultra-baixo volume (UBV). Desta forma, ainda que indiretamente, pressão com este inseticida também é exercida sobre populações urbanas de anofelinos da região amazônica. Assim sendo, consideramos a deltametrina um composto adequado para uma análise inicial e adaptação da metodologia aqui pretendida.

O tempo médio de *knockdown* (KT_{50}), ou seja, o tempo necessário para que 50% das larvas de uma dada população sofram o efeito do inseticida foram contabilizados em seis categorias: 1 – de 0 a 5 minutos; 2 – de 6 a 10 minutos; 3 –

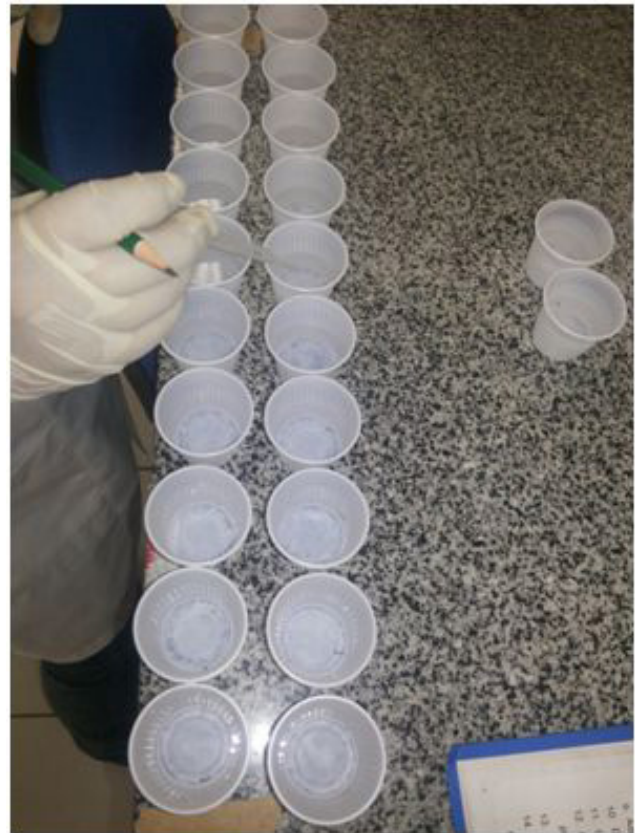


Figura 3. Bioensaio simplificado de *knockdown* sendo aplicado em larvas de anofelinos.

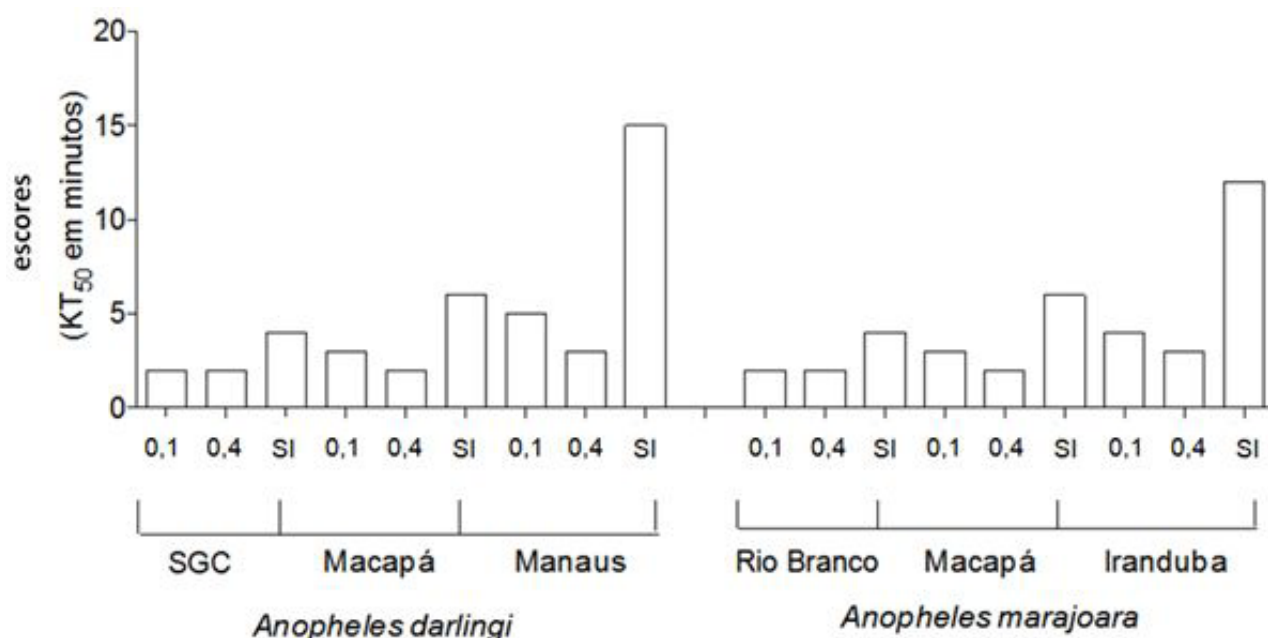


Figura 4. Perfil de susceptibilidade à deltametrina em populações naturais de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* da Amazônia brasileira. Os tempos medianos de *knockdown* de cada população (KT_{50}) foram calculados para 0,1 e 0,4 ppm de inseticida. SI = índice de susceptibilidade, SGC = São Gabriel da Cachoeira.

de 11 a 15 minutos; 4 – de 16 a 20 minutos; 5 – de 21 a 30 minutos; 6 - acima de 30 minutos.

Por definição, efeito *knockdown* é a perda da coordenação e paralisia provocada pelo inseticida, frequentemente acompanhada por espasmos e tremores (WHO, 2013a). Assim sendo, as larvas que apresentavam tremores, que permaneciam no fundo do copo ou eram incapazes de nadar e flutuar, ou até mesmo ficavam paralisadas, foram consideradas sob efeito *knockdown*.

Os experimentos foram realizados em triplicata, usando 20 larvas por experimento, sendo um controle, no qual foi inserido somente o solvente (Acetona P.A.), para avaliar se este, por si só, estaria comprometendo a viabilidade das larvas.

Após a obtenção das doses discriminantes, foi calculado o índice de susceptibilidade, ou seja, o produto do KT_{50} da menor dose pelo KT_{50} da maior dose. O índice de susceptibilidade varia de 1 a 36, assim sendo, a população menos tolerante teria valor próximo de 1 e a mais tolerante um valor próximo de 36. Finalizado os experimentos, as larvas foram inseridas individualmente em microtubos devidamente etiquetados, contendo isopropanol absoluto (100%) e mantidas à temperatura ambiente para futuras análises moleculares.

Uma das dificuldades na realização de bioensaios em anofelinos brasileiros é a falta de colônias autônomas em condições de laboratório e disponíveis para a realização de ensaios em larga escala, à exceção de *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitarsis* s.s., mantidas em laboratório da Fiocruz (RJ) (Horosko et al., 1997, Lima et al., 2004).

Assim sendo, não teremos ainda no curto prazo colônias de anofelinos que possam ser usadas como referência para avaliação de susceptibilidade aos inseticidas, disponíveis na

Região Norte do país. No entanto, existe um consenso de que populações coletadas em áreas com pouca ou nenhuma utilização de inseticidas possam ser usadas para esse fim. Dessa forma, a população de São Gabriel da Cachoeira foi utilizada com esse propósito, pois as amostras foram coletadas em um sítio na BR-307 distando cerca de 9 km do centro da cidade (00o08'48.6"S; 66°57'29.5"W), que por estar longe de áreas urbanas, não recebe aplicação direta de inseticidas.

Resultados e Discussão

Muito embora a malária seja um grave problema de saúde pública no Brasil, existem poucos estudos avaliando a resistência aos inseticidas nas populações de seus vetores (Brown & Pal, 1973, Brown, 1986, Santos et al., 1999, Santos et al., 2007). Isso ocorre, principalmente, devido à falta de colonização desses mosquitos, que dificulta a execução e padronização de bioensaios entre grupos, sendo, portanto, um empecilho para a obtenção de um perfil bem definido do real *status* de susceptibilidade das populações de anofelinos da Amazônia brasileira (Santos et al., 1999).

Portanto, descrevemos aqui pela primeira vez a adaptação de um bioensaio de *knockdown* aplicado em larvas. Essa metodologia é uma alternativa aos testes tradicionais e por ser simples, rápida e de baixo custo, pode inclusive ser usada sob condições de campo.

O bioensaio de *knockdown* foi inicialmente desenvolvido por Kawada et al. (2009) para testar o nível de susceptibilidade das larvas de *Aedes aegypti* frente aos piretroides. Esses autores concluíram que o novo método foi eficiente quando

comparado aos testes tradicionais, principalmente, quando o objetivo foi mapear resistência tipo *kdr*, que se manifesta durante todos os estágios do ciclo de vida do mosquito.

No entanto, para um panorama mais completo, os testes com papéis ou garrafas de vidro impregnados com inseticidas devem ser considerados para mosquitos adultos, uma vez que os mecanismos de resistência metabólica podem se expressar, especificamente, em determinados estágios do desenvolvimento dos insetos (WHO, 2013b).

Com base na população de referência (SGC), foram identificadas as concentrações de 0,1 e 0,4 ppm como as doses diagnósticas de deltametrina para as populações de anofelinos brasileiros (dados não mostrados). Assim sendo, na Fig. 4 são mostrados os índices de susceptibilidade para cada uma das populações avaliadas.

Tratando-se de *A. darlingi*, SGC foi a que exibiu menor tolerância (SI=4) (Figura 4). Esse resultado é esperado, uma vez que as coletas realizadas nessa localidade foram feitas em um sítio distante de áreas urbanas, e que, portanto, não recebe aplicação direta de inseticidas.

Baixa tolerância (SI=6) também foi obtida na população de Macapá. Já a maior tolerância foi evidenciada em Manaus (SI=15). Em comparação com Macapá, a cidade de Manaus é maior e mais populosa, apresentando maiores índices de malária e dengue, tendo, dessa forma, maior aplicação de piretroides. Assim sendo, a pressão de seleção sofrida pelos anofelinos em Manaus é maior do que em Macapá e isso poderia explicar a diferença de susceptibilidade apresentada por essas duas populações.

Além disso, em Manaus a situação é agravada pelo constante fluxo migratório de pessoas rumo à capital do estado que, sem ter onde morar, invadem as áreas periurbanas da cidade, aumentando o contato homem-vetor, resultando em elevados surtos epidêmicos de malária (Tadei *et al.*, 1993).

No caso de *A. marajoara*, a população de Iranduba foi a que apresentou maior tolerância (SI=12), quando comparada com as populações de Rio Branco (SI=4) e Macapá (SI=6). Da mesma forma, é possível que a perda de susceptibilidade da população de Iranduba esteja relacionada com sua proximidade da capital Manaus. Somente 20 km separam esses dois municípios, que estão atualmente conectados pela Ponte Rio Negro. Portanto, as medidas estratégicas de combate aos anofelinos adotadas em Iranduba, podem ser um reflexo daquelas adotadas em Manaus.

Muito embora a malária seja um grave problema de saúde pública no Brasil, existem poucos estudos avaliando a resistência aos inseticidas nas populações de seus vetores. Mesmo assim, resistência fisiológica intermediária ao DDT foi detectada três décadas atrás em populações de *A. albiparvus* do Mato Grosso (Brown & Pal, 1973) e em populações de *A. galvoii* e *A. rondoni* de São Paulo (Brown, 1986). No entanto, um estudo mais recente, conduzido pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, tem evidenciado populações brasileiras de *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. nuneztovari* e *A. albiparvus* susceptíveis à cipermetrina, seguindo os padrões descritos para o gênero (Santos *et al.*, 2007).

Em países vizinhos, o primeiro registro de populações de *A. darlingi* resistentes a inseticidas foi em amostras

coletadas em Quibdó, Chocó, nordeste da Colômbia (Quiñones *et al.*, 1987, Suarez *et al.*, 1990). Nesse mesmo país, recentemente foi identificada resistência cruzada entre DDT e lambdacialotrina em populações oriundas de Medio Atrato, Chocó (Fonseca-González *et al.*, 2009). Também na Colômbia, foram identificadas populações de *A. marajoara* resistentes a DDT (Quiñones & Suarez, 1990).

A aquisição de piretroides pelo Ministério da Saúde para combater os vetores da malária no Brasil teve início em 1996, com cipermetrina na formulação pó molhável (Santos *et al.*, 2007), e hoje utiliza lambdacialotrina 5% (termonebulização) e alfacipermetrina 20% (borrifração intradomiciliar e UBV), conforme as recomendações da OMS (WHO, 2009). A utilização constante de uma única classe de inseticida além de aumentar a pressão de seleção, aumenta a frequência dos genótipos de resistências. A detoxificação enzimática (Esterases e Oxidases de Função Mista) pode ser o principal mecanismo reduzindo a susceptibilidade das populações brasileiras de *A. darlingi* e *A. marajoara*, conforme evidenciado por Fonseca-González *et al.* (2009) na Colômbia.

De acordo com Omoto (2000), uma boa estratégia para o manejo da resistência ou da perda de susceptibilidade dos insetos é a rotação e mistura de inseticidas. Essa estratégia consiste na utilização rotacionada de inseticidas estruturalmente distintos e com diferentes modos de ação, baseado no fato de que a frequência da resistência a um produto tende a diminuir quando produtos com diferentes modos de ação e detoxificação são utilizados.

No entanto, apenas quatro classes são permissivas em saúde pública e somente os piretroides para a impregnação de telas e mosquiteiros (WHO, 2013a, WHOPES, 2014). Novas classes de inseticidas, bem como novas estratégias mais modernas são urgentes. Consideramos que uso de inseticida seja na verdade uma medida paliativa para o controle de vetores. Melhores condições de moradia e de infraestrutura sanitária apresentam o real potencial de diminuir a transmissão da malária, pelo menos nas regiões urbanas e suburbanas. Como essas questões dependem essencialmente de decisões e realizações políticas, é provável que o uso de inseticida seja, portanto, ainda muito utilizado no médio e longo prazos.

Com base nos resultados aqui obtidos, consideramos que o bioensaio rápido em larvas apresentou-se como uma importante ferramenta para avaliação inicial do perfil de susceptibilidade de populações naturais de anofelinos a piretroides. Trata-se de um ensaio prático, que pode ser executado com diversas espécies/populações simultaneamente sem a necessidade de manutenção de distintas colônias até a formação de adultos. Pretendemos realizar ensaios adicionais para testar a correlação destes resultados com o perfil observado em mosquitos adultos, uma vez que a resistência metabólica pode ser expressa de forma distinta em diferentes etapas do desenvolvimento do inseto. Esperamos que este ensaio possa colaborar para ensaios que visem avaliar um panorama geral dos níveis de susceptibilidade a piretroides em anofelinos neotropicais, uma demanda recorrente do Programa Nacional de Controle de Malária.

Agradecimentos

Ao grupo do Laboratório de Vetores da Malária e Dengue do INPA, pelo apoio nas coletas. Ao Dr. Carlos Eduardo Freitas Lemos pela ajuda na confecção do mapa. Ao Dr. José Bento Pereira Lima pelos esclarecimentos sempre que necessários.

Literatura Citada

- Brogdon, W.G. & Chan, A. 2013. Diretrizes para avaliar a resistência a inseticida em vetores usando o bioensaio com garrafa do CDC. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria>>. Acesso em 28 jan. 2013.
- Brogdon, W.G. & Mcallister, J.C. 1998a. Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Diseases*, 4(4): 605-613.
- Brogdon, W.G. & Mcallister, J.C. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 14(2): 159-164.
- Brown, A.W.A. & Pal, R. 1973. Resistance des arthropods aux insecticides. Geneva, World Health Organization, 541 p.
- Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 2: 123-140.
- Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p.
- COUNCIL. 1986. Pesticides Resistance: strategies and tactics for management. Washington D.C., The National Academies Press, 471 p.
- Davies, T.G.E.; Field, L.M.; Usherwood, P.N.R.; Williamson, M.S. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *Life*, 59(3): 151-162.
- Faran, M.E. & Linthicum, K.J. 1981. A handbook of the Amazon species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosquitoes Systematic*, 13: 1-81.
- Fonseca-González, I.; Quiñones, M.L.; McAllister, J.; Brogdon, W.G. 2009. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104(1): 18-26.
- Forattini, O.P. 1987. Comportamento exófilo de *Anopheles darlingi* Root, 1926 em região meridional do Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, 21(4): 291-304.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. São Paulo, EDUSP, 860 p.
- Gorham, J.R.; Stojanovich, C.J.; Scott, H.G. 1967. *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica Oriental*. Atlanta, Communicable Disease Center/United States Public Health Service, 64 p.
- Grieco, J.P.; Achee, N.L.; Roberts, D.R.; Andre, R.G. 2005. Comparative susceptibility of three species of *Anopheles* from Belize, Central America, to *Plasmodium falciparum*. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 21: 279-290.
- Hemingway, J. & Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 371-391.
- Hiwat, H. & Bretas, G. 2011. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasites & Vectors*, 4: 177.
- Horosko, S.; Lima, J.B.; Brandolini, M.B. 1997. Establishment of a free-mating colony of *Anopheles albitarsis* from Brazil. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 13(1): 95-96.
- IBGE. 2013. Censo demográfico 2013. Disponível em: <www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=am>. Acesso em 11 jan. 2014.
- IEPA. 2014. Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do estado do Amapá. Disponível em: <www.iepa.org.br>. Acesso em 11 jan.2014.
- Kawada, H.; Higa, Y.; Nguyen, Y.T.; Tran, S.H.; Nguyen, H.T.; Takagi, M. 2009. Nationwide investigation of the pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from used tires in Vietnam. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3(3): 1-8.
- Lima, J.B.P.; Valle, D.; Peixoto, A.A. 2004. Adaptation of a South American malaria vector to laboratory colonization suggests faster-male evolution for mating ability. *BMC Evol. Biol.*, 4: 12.
- Neves, D.P. 1988. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Atheneu, 462 p.
- Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M.V.; Brasil, P.; Ladislau, J.L.; Tauil, P.L.; Daniel-Ribeiro, C.T. 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.*, 9: 115.
- Omoto, C. 2000. Modo de ação dos inseticidas e resistência de insetos a inseticidas, p. 248. In: J.C. Guedes, I.D. Costa & E. Castiglioni (eds.), *Bases e técnicas de manejo de insetos*, Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria.
- Phillips-Howard, P.A.; Nahlen, B.L.; Kolczack, M.S.; Hightower, A.W.; Kuile, F.O.; Alai, J.A.; Gimnig, J.E.; Arudo, J.; Vulule, J.M.; Odhacha, A.; Kachur, S.P.; Schoute, E.; Rosen, D.H.; Sexton, J.D.; Oloo, A.J.; Hawley, W.A. 2003. Efficacy of permethrin-treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 23-29.
- Povoa, M.M.; Wirtz, R.A.; Lacerda, R.N.L.; Miles, M.A.; Warhurst, D. 2001. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, state of Amapá, Amazon region, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 179-184.
- Quiñones, M.L. & Suarez, A.F. 1990. Indoor resting heights of some anophelines in Colombia. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 6: 602-604.

- Quiñones, M.L.; Suarez, A.F.; Fleming, G.A. 1987. Estado de la susceptibilidad al DDT de los principales vectores de malaria en Colombia y su implicación epidemiológica. *Biomédica*, 7: 81-86.
- Rose, R.I. 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg. Infect. Diseases*, 7(1): 17-23.
- Santos, J.B.; Santos, F.; Macêdo, V. 1999. Variação da densidade anofélica com o uso de mosquiteiros impregnados com deltametrina em uma área endêmica de malária na Amazônia brasileira. *Cad. Saúde Públ. Rio de Janeiro*, 15(2): 281-292.
- Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Kerr, W.E. 1981. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus-Boa Vista. *Acta Amaz.*, 11(4): 789-797.
- Santos, R.L.; Fayal, A.S.; Aguiar, A.E.F.; Vieira, D.B.R.; Póvoa, M.M. 2007. Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia Brasileira. *Rev. Saúde Públ.*, 41(2): 276- 283.
- Schleier III, J.J. & Peterson, R.K.D. 2011. Pyrethrins and pyrethroid insecticides, p. 94-131. In: O. López, O. & J.G. Fernández-Bolaños (eds.), *Green trends in insect control*. Royal Society of Chemistry.
- SIVEP-Malaria. 2013. Notificações de casos de malária. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/>. Acesso em 24 abr. 2013.
- Suarez, A.F.; Quiñones, M.L.; Palacios, J.D. ; Carrillo, A. 1990. First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 6: 72-74.
- Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B. 1993. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira, p. 167-196. In: E.J.G. Ferreira, G.M. Santos, E.L.M. Leão & L.A. Oliveira (eds.), *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- WHO. 1975. *Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and Techniques*. Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication 13).
- WHO. 1981. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. Geneva, World Health Organization.
- WHO. 2006. *Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets*. Geneva, World Health Organization, 60 p.
- WHO. 2007. *Insecticide-treated mosquito nets: a WHO position statement*. Geneva, World Health Organization, 12 p.
- WHO. 2009. *Global malaria control and elimination: report of a technical review*. Geneva, World Health Organization.
- WHO. 2012. *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM)*. Geneva, World Health Organization, 132 p.
- WHO. 2013a. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*. Geneva, World Health Organization, 30 p.
- WHO. 2013b. *Malaria*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>. Acesso em 04 dez. 2013.
- WHOPES. *WHO recommended long-lasting insecticidal nets*. Disponível em: <http://www.who.int/whopes/Long-lasting_insecticidal_nets_06_Feb_2014.pdf?ua=1>. Acesso em 06 fev. 2014.

Available online: www.bioassay.org.br/ojs/index.php/bioassay/article/view/139