

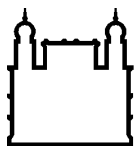
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO RESIDUAL DE INSETICIDAS PARA O CONTROLE DA  
MALÁRIA EM DIFERENTES SUPERFÍCIES, E DO *STATUS* DE  
SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE  
ANOFELINOS DO ESTADO DO AMAPÁ

ANA PAULA SALES DE ANDRADE CORRÊA

Rio de Janeiro  
Agosto de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*ANA PAULA SALES DE ANDRADE CORRÊA*

Avaliação residual de inseticidas para o controle da malária em diferentes superfícies, e do *status* de susceptibilidade/resistência de populações naturais de anofelinos do estado do Amapá

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

**Orientadores:** Dr. José Bento Pereira Lima  
Dr. Allan Kardec Ribeiro Galardo

**RIO DE JANEIRO**

Agosto de 2019

Corrêa, Ana Paula Sales de Andrade.

Avaliação residual de inseticidas para o controle da malária em diferentes superfícies, e do *status* de susceptibilidade/resistência de populações naturais de anofelinos do estado do Amapá / Ana Paula Sales de Andrade Corrêa. - Rio de Janeiro, 2019.

xxvi, 184 f.; il.

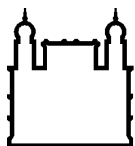
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientador: José Bento Pereira Lima.

Co-orientador: Allan Kardec Ribeiro Galardo.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Anopheles*. 2. Controle vetorial. 3. Efeito residual. 4. Inseticida. 5. Resistência. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTORA: ANA PAULA SALES DE ANDRADE CORRÊA***

**AVALIAÇÃO RESIDUAL DE INSETICIDAS PARA O CONTROLE DA MALÁRIA  
EM DIFERENTES SUPERFÍCIES, E DO *STATUS* DE  
SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE  
ANOFELINOS DO ESTADO DO AMAPÁ**

**ORIENTADORES: Dr. José Bento Pereira Lima  
Dr. Allan Kardec Ribeiro Galardo**

**Aprovada em: 02/08/2019**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis – Presidente – (IOC-FIOCRUZ)**

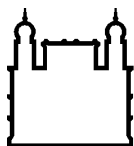
**Prof. Dr. André Machado de Siqueira – (INI-FIOCRUZ)**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Ima Aparecida Braga – (RECOLVE)**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Goreti Rosa-Freitas – (IOC-FIOCRUZ)**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina dos Reis – (IOC-FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 02 de agosto de 2019

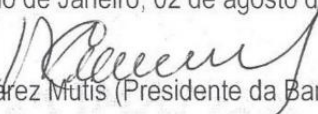


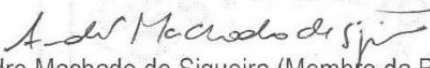
Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

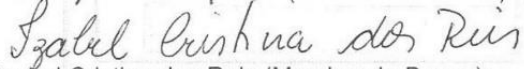
Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Ana Paula Sales de Andrade Corrêa**, sob orientação do Dr. José Bento Pereira Lima e Dr. Allan Kardec Ribeiro Galardo. Ao segundo dia do mês de agosto de dois mil e dezenove, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane - Pavilhão Leonidas Deane, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Avaliação residual de inseticidas para o controle da malária em diferentes superfícies, e do status de susceptibilidade/resistência de populações naturais de anofelinos do estado do Amapá”** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Andre Machado de Siqueira - INI/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Ima Aparecida Braga - RELCOV, Dr<sup>a</sup>. Maria Goreti Rosa Freitas - IOC/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina dos Reis - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto - UNIFAB e Dr. Hermano Gomes de Albuquerque - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 02 de agosto de 2019.

  
Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Presidente da Banca e Coordenadora do Programa):

  
Dr. Andre Machado de Siqueira (Membro da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Ima Aparecida Braga (Membro da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Maria Goreti Rosa Freitas (Membro da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina dos Reis (Membro da Banca):

Dedico este trabalho para as meninas e meninos, mulheres e homens moradores das áreas endêmicas na certeza de que ele pode contribuir para que os sonhos e esperanças em dias melhores, almejados por essa gente tão sofrida, se torne realidade.

## AGRADECIMENTOS

Sem dúvida alguma essa é uma das partes mais difíceis da tese para escrever, talvez porque a vida não se apresenta em quadros e tabelas, não se coloca em análise estatística e não é pelo valor de  $p$  que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Uma das coisas que aprendi, é que uma tese ou qualquer outro trabalho é a extensão da vida de quem a constrói. Então, só produziremos algo de valor, onde autor e obra representem os resultados, se tivermos algo de valor em nós mesmos. Por esse motivo, agradeço sincera e profundamente a todas as pessoas que muito me encorajaram e me ajudaram a produzir algo de valor em minha vida.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. José Bento Pereira Lima, do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores-LAFICAVE, por ter me deixado fazer parte do seu grupo de trabalho e ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda o trato simples, atencioso, correto e científico, mantido em nossas reuniões. Agradeço também o tema do trabalho, que sempre me causou brilho no olhar, o que fez, a maioria das vezes, conseguir ultrapassar as dificuldades surgidas.

Com a mesma estima, agradeço ao meu coorientador Dr. Allan Kardec Galardo, do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA, pela compreensão, confiança e amizade que me tem dedicado, sem nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem. Suas ideias e palavras têm sido fundamentais para a minha formação como pesquisadora e pessoa.

Agradeço ao apoio concedido pela Organização Pan-americana de Saúde e Ministério da Saúde.

À Dra. Maria Goreti Rosa Freitas, por tão gentilmente ter aceito ser a revisora da tese.

Agradeço à Coordenação de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz-IOC/FIOCRUZ- RJ, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martha Cecília Suárez Mutis, pela oportunidade de complementar o meu conhecimento, que auxiliará o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço à coordenação do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá - IEPA, pelo apoio logístico imprescindível para a execução deste trabalho.

A todos os funcionários da PGM - FIOCRUZ - RJ que muito me auxiliaram nas mais diversas necessidades ao longo dessa caminhada. Em especial à Lívia, pela presteza, dicas valiosas e dedicação, e ao Henrique, pelo carinho, energia positiva e sorrisos constantes.

A todos do LAFICAVE, na pessoa do Dr. José Bento pela oportunidade, Dra. Cynara Rodovalho e Dr. Ademir Martins Júnior pelos ensinamentos e paciência e, aos colegas Luciana Dias, Diogo Bellinato, Ramon, Dayane, Monique, Taiza pela atenção e ajuda, e em especial a Aline Loureiro e Paula Figliuolo por todo o apoio (impagável), paciência e amizade.

Agradeço imensamente a Ana Paula, Lindaura e Sandro (LAFICAVE), responsáveis pela parte burocrática, que com habilidade e competência sempre resolveram todas as demandas.

Ao Gutemberg Brito e Vinicius (IOC/FIOCRUZ), agradeço o apoio e divulgação do trabalho na fase inicial. Esse carinho foi de fundamental importância.

À equipe do laboratório de Entomologia Médica do IEPA:

- Aos companheiros de captura – Evan, Geandro, Luiz, Rosalvo (Fanta), José Júnior (JJ), João do Socorro (Jamaica), pelos momentos divertidos e de aventura e em especial ao Wellington, que se revelou um dedicado fotógrafo;
- Aos companheiros de identificação Noel e Aderbal, por toda presteza;
- Às companheiras de insetário – Fernanda, Talita, Camila, por cada gota de suor derramado;
- Aos companheiros de bioensaios – Ednaldo (Irmão) – fiel escudeiro e amigo de todas as horas, Ósita – “mestre” dos bioensaios e em especial à Luana – primeira “filha” científica, companheira de viagem e de cantoria;
- Ao companheiro Edilson (Botinho), que bravamente nos conduziu e auxiliou no pesado trabalho de campo.



A vocês o meu mais profundo agradecimento pela atenção, presteza e carinho demandados na execução de parte imprescindível deste trabalho, sem a qual seria impossível executar.

Às amigas e colegas de trabalho, Ana Cristina e Nercy Virginia pela contribuição no desenvolvimento profissional e principalmente pelo companheirismo que me permitiu dividir momentos de frustrações e alegrias.

Aos colegas de convivência no Laboratório que chegaram bem depois do início dessa empreitada, mas que se tornaram parceiros e amigos – Beatriz, Tatiane, Taires, Igor e Keison. Obrigada pelas contribuições e principalmente pela empatia com o momento.

Aos queridos amigos conquistados nos caminhos da Fiocruz:

- Josiane, Ana Beatriz, Maria Ignez, Pablo, Henrique, pela agradável convivência, descontração, e apoio mútuo, que ajudou na superação de inúmeros obstáculos, principalmente a saudade de casa. Vocês “foram além” e se tornaram um ombro amigo oferecendo um afago, sem isso não teria a menor graça e seria mais difícil, quiçá impossível;
- Myrna, Vivian, Hermano, José Joaquín, Monica, Tiara, Celeste, Jean, que foram amigos e companheiros de muitos momentos, muitas histórias de vida e de superação que ajudaram a enriquecer a minha vida.
- A querida tia Penha e suas meninas, por saciarem minha fome e me acolheram sempre com carinho.
- Aos amigos da biblioteca de Manguinhos: Paulo Roberto, David, Manoel e Angelina por auxiliarem nas pesquisas bibliográficas, diversas xerox e empréstimos de livros e teses, sempre com bom humor e dedicação.

A todos os professores, pelo aprimoramento da minha formação acadêmica, a quem homenageio em nome do Dr. Rubens Pinto e Dr. Nicolau Serra-Freire, cuja competência e paixão, renovaram meu compromisso enquanto profissional.

Ao Arilson Cardoso do Núcleo de Ordenamento Territorial – NOT do IEPA, pela dedicação na elaboração dos mapas utilizados na descrição das áreas de estudo.

Ao amigo Dr. Daniel Câmara, incansável na contribuição imprescindível das análises estatísticas. Pela parceria, incentivo e toda gentileza no tratar e nas palavras de conforto.

To the beloved teacher Ana Paula Corrêa (xará), whose involvement goes beyond English classes. Thank you for all the dedication and encouragement.

Às queridas amigas Josiane, Paloma, Luciana, Heidi e Cynthia pelos cafés, risadas e corridas que me mantiveram de pé, principalmente na reta final.

Agradeço a minha grande amiga e mais que terapeuta Hilma Simões que ao longo de tantos anos tem aliviado as minhas dores da alma. Você tem me ajudado a compreender o que a Maria Bethânia diz quando canta: “cada um sabe a dor e a delícia de ser o que é”.

Aos amigos e fisioterapeutas Gaudêncio Neto e Djan Maciel, por aliviarem as dores do meu corpo. Vocês são balsamos indispensáveis para o meu bem-estar.

Agradeço ao meu amigo e *personal trainer* Alcemy Júnior que foi muito além de fortalecer meu corpo físico, ressaltando em mim coragem e dedicação, além de compreender e respeitar meus limites físicos. Agora professor, rumo aos “Km” que iremos percorrer.

E mais uma vez, meu eterno agradecimento a minha amiga Josiane Müller, cujas palavras não exprimem todo o amor envolvido em nossa relação e nas aventuras e conquistas partilhadas. Para você minha amiga, os versos da canção: “Mande notícias do mundo de lá, diz quem fica. Me dê um abraço, venha me apertar, tô chegando. Coisas que gosto é poder partir sem ter planos. Melhor ainda é poder voltar quando quero”. Valeu a pena amiga e sempre vai valer.

E, finalmente agradeço, à minha família:

Aos meus pais, que não estariam cabendo em si de felicidade por este momento.

À minha querida irmã Ana Rosa, pelo carinho e dedicação em todos os momentos, pela paciência nas incontáveis horas de ansiedade e trabalho, e por me fazer acreditar sempre que tudo daria certo.

Ao meu irmão Lula, por me forçar a ser uma pessoa melhor.

Ao meu marido Eduardo, companheiro e parceiro de vida, meu profundo agradecimento pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência, elementos essenciais à manutenção de nosso lar. Você é a pessoa dotada da maior autoconfiança que eu conheço e que acredita na minha capacidade de ser profissional, esposa, mãe, amiga, cantora (de chuveiro) e até corredora. Te amo por essa vida e mais seis meses.

Às minhas amadas filhas cuja existência ilumina e enchem de felicidade o meu caminhar, agradeço a oportunidade de ser mãe:

- Ana Mércia, por sempre me instigar em momentos cruciais com perguntas do tipo: mas você tem necessidade de fazer isso?
- Ana Luiza, pela mansidão e espírito livre que me incentiva a novas conquistas e pelos desenhos maravilhosos que ilustraram minha tese e apresentação;
- Ana Alice, que tão pequena enfrentou e compreendeu as minhas inúmeras ausências e que com a maturidade e a inocência dos seus 10 anos, em meus momentos de culpa me fala: tudo bem mãe, eu te desculpo, já está acabando.

Agradeço à minha grande família com respectivos afilhados, agregados e apadrinhados, pelo amor, harmonia e alegria:

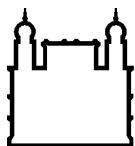
- Aos meus afilhados/filhos Jones e Pedro e Gabi, por todo o carinho que sempre me dedicam;
- Ao meu “primo” Nelson, que muitas vezes socorreu meu cansaço com uma cerveja bem gelada e a melhor pipoca de todas;
- À Josefa e Rosirene, auxiliares na administração do meu lar, pela dedicação e cuidados, principalmente para com as minhas filhas durante as ausências necessárias para a execução deste trabalho.

À Deus, que me proporciona paz de espírito e perseverança para continuar diante de tantos desafios. Obrigada por todas as chances de “viver de novo”.

Enfim, posso dizer que fui feliz durante meu doutorado, por tudo que aprendi e pelas pessoas que participaram dessa etapa da minha vida. Peço desculpas, se por falta de memória, esqueci de mencionar alguém. A todos, os meus mais profundos agradecimentos.

Sentimos que, mesmo que todas as questões científicas possíveis tenham obtido resposta, nossos problemas de vida não terão sido sequer tocados.

Wittgenstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### AVALIAÇÃO RESIDUAL DE INSETICIDAS PARA O CONTROLE DA MALÁRIA EM DIFERENTES SUPERFÍCIES, E DO STATUS DE SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE ANOFELINOS DO ESTADO DO AMAPÁ

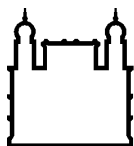
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Ana Paula Sales de Andrade Corrêa

A malária permanece como uma das principais doenças parasitárias do mundo e no Brasil tem alta prevalência na região Amazônica. A borrifração residual intradomiciliar – BRI é uma das principais ferramentas para o controle dos anofelinos. É importante conhecer a eficácia residual dos inseticidas, a suscetibilidade e os mecanismos envolvidos na resistência dos anofelinos. O objetivo deste estudo foi avaliar a residualidade de inseticidas, investigar o perfil de suscetibilidade/resistência a piretroide, e explorar a diversidade genética da mutação *Kdr* em populações de anofelinos do estado do Amapá. Para a avaliação residual foi utilizado bioensaios de cone da OMS em três condições: casa teste (superfícies de madeira com e sem pintura - MCP, MSP; alvenaria com e sem reboco - ACR e ASR), painéis em laboratório e diretamente no campo. A suscetibilidade foi avaliada por meio de bioensaios de tubo com papel impregnado usando deltametrina e o mecanismo de resistência por análise molecular. Os resultados demonstraram que para todas as condições ocorreu variação na residualidade dos inseticidas nas superfícies. Na condição de simulado de campo o piretroide deltametrina WG apresentou taxa de mortalidade  $\geq 80\%$  em até 240 dias após a borrifração em superfícies de madeira e o etofenprox PM permaneceu ativo por 120 dias na MSP. Na comparação entre as condições de painel, simulado de campo e campo, o deltametrina WG nos painéis, apresentou residualidade  $\geq 80\%$  por 180 dias nas superfícies de MSP e ASR. O etofenprox PM apresentou residualidade apenas em MSP nas três condições. A residualidade da deltametrina SC-PE foi avaliada nas paredes internas da “casa de teste” em MCP, MSP, ACR e ASR e em ACR e MCP das paredes externas; na parede interna de ACR o inseticida foi eficaz ( $\geq 80\%$  - 8 meses). No laboratório, a deltametrina SC-PE foi avaliada em superfícies de madeira e alvenaria com residualidade  $\geq 80\%$  durante 5, 10 e 12 meses em ASR, ACR e MSP. No teste de suscetibilidade, as populações de *An. darlingi* foram suscetíveis e a população de *An. marajoara* apresentou uma resistência de baixa intensidade na dose 5x maior que a Dose Diagnóstica. Por fim, não foram encontradas mutações no gene *Kdr* em relação à resistência a piretroides nas populações de *An. darlingi*. Concluiu-se que o simulado de campo (casa teste) é uma valiosa ferramenta para avaliar a eficácia residual de inseticidas nas superfícies comumente encontradas nas casas de áreas endêmicas, podendo assim contribuir com o planejamento das ações de controle vetorial dos anofelinos na região Amazônica.

Palavras-chave: *Anopheles*, controle vetorial, efeito residual, inseticida, resistência.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### RESIDUAL EVALUATION OF INSECTICIDES FOR MALARIA CONTROL ON DIFFERENT SURFACES, AND SUSCEPTIBILITY/RESISTANCE STATUS OF NATURAL POPULATIONS OF ANOPHELINES IN THE STATE OF AMAPÁ

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Ana Paula Sales de Andrade Corrêa

Malaria remains the most important parasitic disease globally and in Brazil it has a high prevalence in the Amazon region. Indoor residual spraying (IRS) is one of the main methods that have been used to anophelines control. It is important to know the insecticides residual efficacy, susceptibility and the elements involved in the resistance of the anophelines. The objective of this study was to evaluate the residuality of insecticides, investigate the susceptibility/resistance profile to a pyrethroid and to explore the genetic diversity of the *kdr* gene in anopheline populations in the State of Amapa, Brazil. World Health Organization cone bioassays were used for residual evaluation in three different conditions: test house (wood surfaces painted and unpainted – PW, UW; plastered and unplastered cement - PC and UC), laboratory panels and directly in the field. The susceptibility was evaluated through tube bioassay with impregnated papers using deltamethrin and resistance mechanism by molecular analysis. Results showed insecticides residuality variation on the surfaces for all conditions tested. In simulated field condition the pyrethroid deltamethrin WG obtained mortality rate  $\geq 80\%$  within up to 240 days after spraying on wood surfaces, and etofenprox WP remained active for 120 days in UW. In a comparison between panel conditions, field and semi-field simulation, deltamethrin WG showed a residuality  $\geq 80\%$  for 180 days on the surfaces of UW and UC panels. Etofenprox WP showed residuality only in UW for all three conditions. In the susceptibility test, the *An. darlingi* population was susceptible and the population of *An. marajoara* presented a low intensity resistance at a dose 5x higher than the Diagnostic Dose. Finally, *kdr* gene mutations resistance to insecticides of the pyrethroid class were not found in the evaluated populations of *An. darlingi*. The residuality of deltamethrin SC-PE was evaluated in the interior walls of the “test house” on PW, UW, PC and UC and on PC and PW of the outside walls; on PC surface of the interior wall was the insecticide effective ( $\geq 80\%$  - 8 months). In laboratory, deltamethrin SC-PE was evaluated in wood and cement surfaces with residuals  $\geq 80\%$  during 5, 10 and 12 months in UC, PC and UW. Finally, no mutations were found in the *kdr* gene related to pyrethroid resistance in *An. darlingi* populations. In conclusion, semi-field simulation (test house) is a valuable tool to assess the residual efficacy of insecticides on surfaces commonly found in residences of endemic areas, thus contributing in action planning for vector control of anopheles in the Amazonian region.

Keywords: *Anopheles*, vector control, residual effect, insecticide, resistance.

# ÍNDICE

RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Malária.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Breve histórico.....	3
1.1.2 Malária no mundo, nas Américas e no Brasil.....	4
<b>1.2 Os vetores da malária.....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Anopheles darlingi .....	16
1.2.2 Anopheles marajoara.....	17
<b>1.3 Medidas de controle da malária .....</b>	<b>19</b>
1.3.1 Diagnóstico precoce e tratamento oportuno (adequado e imediato) .....	20
1.3.2 O papel do controle de vetores na malária .....	21
<b>1.4 Inseticidas.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5 Resistência aos inseticidas .....</b>	<b>26</b>
<b>1.6 Justificativa .....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Caracterização da área de estudo.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Amostras.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Inseticidas.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4 Bioensaios de parede – testes de eficácia residual .....</b>	<b>43</b>
3.4.1 “Casa Teste” .....	43
3.4.2 Bioensaios em simulado de campo – casa teste .....	47
3.4.3 Bioensaios nos painéis em laboratório .....	50
3.4.4 Bioensaios em campo.....	54
<b>3.5 Definição do <i>status</i> de suscetibilidade/resistência a piretroides.....</b>	<b>59</b>
3.5.1 Bioensaios com papel impregnado.....	59
3.5.2 Extração de DNA .....	62
3.5.3 Genotipagem Kdr do sítio 1014 .....	62
<b>3.6 Análises estatísticas.....</b>	<b>65</b>
3.6.1 Provas biológicas de parede.....	65
3.6.2 Suscetibilidade/resistência.....	66
<b>3.7 Considerações éticas .....</b>	<b>66</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Provas biológicas de parede: Simulado de campo - casa teste.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Provas biológicas de parede: laboratório, simulado de campo e diretamente no campo.....</b>	<b>78</b>
<b>4.3 Provas biológicas: painel, simulado de campo (paredes internas e externas da casa teste).....</b>	<b>86</b>
<b>4.4 <i>Status</i> de susceptibilidade/resistência.....</b>	<b>90</b>

	4.4.1 Bioensaios de tubo com papel impregnado .....	90
	4.4.2 Genotipagem da clássica mutação Kdr Leu1014Phe .....	99
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>138</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>157</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ciclo de vida do parasita da malária envolvendo dois hospedeiros (Adaptado do CDC).....	3
Figura 1.2 – Distribuição da malária no mundo.....	6
Figura 1.3 – Distribuição dos casos de malária notificados na Amazônia Legal brasileira por espécie e ano. ....	9
Figura 1.4 – Números de casos de malária com provável infecção na Amazônia Legal brasileira e diferença percentual por ano (2016 a 2018). ....	10
Figura 1.5 – Distribuição dos casos de malária notificados no estado do Amapá por espécie e ano. ....	11
Figura 1.6 – Diferença percentual de casos de malária por categoria de local provável de infecção no estado do Amapá. ....	12
Figura 1.7 – Risco de adoecer por malária no estado do Amapá- IPA, nos anos de 2016, 2017 e 2018.....	12
Figura 1.8 – Mapa da distribuição global das espécies de anofelinos. Fonte: Kiszewski et al. (2004).....	14
Figura 1.9 – <i>Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi</i> (Root, 1926). ....	16
Figura 1.10 – Características de criadouros de <i>Anopheles darlingi</i> . ....	17
Figura 1.11 – <i>Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara</i> (Galvão e Damasceno, 1942). ....	18
Figura 1.12 – Características de criadouros de <i>Anopheles marajoara</i> .....	19
Figura 1.13 – Representação do <i>status</i> de suscetibilidade a inseticidas em anofelinos para todas as classes de inseticida no período de 2005 a 2019. ....	27
Figura 3.1 – Representação espacial das áreas de estudo: municípios de Macapá, Mazagão e Santana – Amapá, Brasil. ....	35
Figura 3.2 – Captura noturna de anofelinos em curral no município de Mazagão – Amapá, Brasil. ....	37
Figura 3.3 – Gaiolas de papelão utilizadas para transporte de anofelinos do local da captura e acondicionamento no insetário do Laboratório de Entomologia Médica do IEPA localizada em Macapá – Amapá, Brasil. ....	38
Figura 3.4 – Postura de ovos de <i>Anopheles</i> : A- adição de fêmeas para oviposição. B- pote para postura e eclosão de ovos no insetário do Laboratório de Entomologia Médica- IEPA localizada em Macapá- Amapá, Brasil.....	40

Figura 3.5 – Criação de larvas de <i>Anopheles</i> : disposição das bandejas com larvas no insetário do Laboratório de Entomologia Médica– IEPA. ....	41
Figura 3.6 – Casa teste: A - visão externa frontal e lateral da superfície de alvenaria com reboco - ACR pintada de tinta acrílica; B - visão interna das superfícies lateral de alvenaria sem reboco - ASR e ACR divididas em faixas para aplicação dos inseticidas, visão da parede dos fundos (controle) das superfícies de madeira com pintura - MCP e madeira sem pintura - MSP, teto com telhas de fibrocimento e piso em cimento queimado. Localizada no município de Macapá-Amapá, Brasil. ....	45
Figura 3.7 – Representações da casa teste construída em Macapá-Amapá, Brasil: A - planta baixa, planos frontal e lateral das superfícies de alvenaria com reboco - ACR e alvenaria sem reboco - ASR. B - planos dos fundos e lateral das superfícies de madeira com pintura - MCP e madeira sem pintura - MSP.....	46
Figura 3.8 – Borrifação residual intradomiciliar da casa teste: A - bomba utilizada para borrifação e B - aplicação do inseticida (borrifação) no município de Macapá- Amapá, Brasil. ....	48
Figura 3.9 – Representação dos cones em paredes da casa teste localizada no município de Macapá – Amapá, Brasil. ....	49
Figura 3.10 – Representação dos painéis utilizados nos bioensaios para verificar a residualidade dos inseticidas: painéis tratados com inseticida e painel controle, borrifado com água; disposição dos cones plásticos nos painéis. ....	52
Figura 3.11 – Representação da borrifação de painéis para bioensaio de parede: A - painéis de madeira sem pintura; B - abastecimento da bomba com inseticida e C - borrifação dos painéis.....	54
Figura 3.12 – Habitações com paredes de madeira sem pintura - MSP e alvenaria sem reboco - ASR no distrito do Carvão no município de Mazagão – Amapá, Brasil. ....	55
Figura 3.13 – Habitações com paredes de madeira sem pintura - MSP e alvenaria sem reboco - ASR no assentamento do Piquiazal no município de Mazagão – Amapá, Brasil. ....	56
Figura 3.14 – Borrifação residual intradomiciliar – BRI: A – residência de alvenaria sem reboco – ASR; B – residência de madeira sem pintura – MSP. Aplicação dos inseticidas realizada por técnicos do Departamento de	

Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Mazagão – Amapá, Brasil. .....	57
Figura 3.15 – Bioensaios de parede diretamente no campo em residência com parede de alvenaria sem reboco – ASR no município de Mazagão – Amapá, Brasil. ....	58
Figura 3.16 – Procedimento de impregnação de papel com inseticida: A – suporte em acrílico; B – impregnação com pipeta multicanal de deltametrina 0,05%. Realizado no LAFICAVE- FIOCRUZ. ....	60
Figura 3.17 – Itens do kit da OMS para teste com papel impregnado: 1-papel impregnado; 2- tubo para controle e para descanso dos mosquitos; 3- conector de fixação entre os tubos e passagem dos mosquitos; 4- tubo para papel impregnado; 5 e 6 – argola de fixação dos papéis. Utilização do kit no bioensaio: 7 – inclusão dos mosquitos no tubo; 8 – junção dos tubos; 9 – tubo contendo papel impregnado e mosquitos expostos e 10 – tubo de descanso contendo papel filtro, algodão com solução açucarada e mosquitos. ....	60
Figura 3.18 – Bioensaio com papel impregnado: A – kit tipo OMS; B – realização de bioensaio utilizando deltametrina 0,05% e anofelinos no Laboratório de Entomologia Médica em Macapá – Amapá, Brasil. ....	61
Figura 3.19 – Esquema da PCR alelo-específica representando os primers específicos e a diferença em pares de base do produto gerado. Retirado de (Martins & Valle, 2012). ....	63
Figura 3.20 – Exemplo de uma fotografia de gel de eletroforese com produtos de AS- PCR (Loureiro, 2018) para a variação Leu1014Phe do <i>Nav</i> de <i>Anopheles darlingi</i> . Gel de poliacrilamida 10%, onde estão representados o marcador de peso molecular DNA <i>Ladder O’GeneRuler DNA Ladder, Ultra Low Range/Fermentas</i> , 150ng (1), os controles positivos 1014 Leu/Leu (2), F/F (3) e Leu/Phe (4), cujos alelos Leu1014 <sup>+</sup> e 1014Phe <sup>kdR</sup> correspondem a aproximadamente 106 e 126 pb, respectivamente. Nos poços 58 estão representadas amostras, todas homozigotas para o alelo selvagem. ....	64
Figura 4.1 – Percentual de mortalidade dos mosquitos <i>Anopheles marajoara</i> expostos a três inseticidas piretroides por meio de bioensaios de parede, após borrifação residual intradomiciliar-BRI em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: outubro de 2014 a abril de 2015. ....	71

- Figura 4.2 – Percentual de mortalidade de mosquitos *Anopheles marajoara* expostos a piretroide, carbamato e organofosforado por meio de bioensaios de parede após borrifação residual intradomiciliar-BRI em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016.....75
- Figura 4.3 – Percentual de mortalidade dos mosquitos *Anopheles marajoara* expostos ao inseticidas etofenprox PM, em duas superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo por meio de bioensaios de parede após borrifação residual intradomiciliar-BRI no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: março a setembro de 2017. Grupo exposto linha contínua e grupo controle linha tracejada.....80
- Figura 4.4 – Percentual de mortalidade dos mosquitos *Anopheles marajoara* expostos ao inseticidas deltametrina WG, em duas superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo por meio de bioensaios de parede após borrifação residual intradomiciliar-BRI no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: abril a outubro de 2018. Grupo exposto linha contínua e grupo controle linha tracejada.....85
- Figura 4.5 – Percentual de mortalidade dos mosquitos expostos ao inseticidas deltametrina SC-PE, em painéis e simulado de campo (paredes internas e externas da casa teste) no período de março de 2018 a março de 2019 em Macapá – Amapá, Brasil. ....88
- Figura 4.6 – Bioensaio do tipo Tempo de Queda com o piretroide deltametrina a uma concentração de 0,05% e 0,25% na população de *Anopheles marajoara* do município de Mazagão - Amapá, Brasil. São apresentadas as médias, acompanhadas de erro padrão para as mortalidades observadas ao longo do tempo de exposição ao inseticida.....92
- Figura 4.7 – Bioensaio do tipo Tempo Letal com o piretroide deltametrina a uma concentração de 0,05% nas populações de *Anopheles darlingi* dos municípios de Macapá, Mazagão e Santana-Amapá, Brasil. São apresentadas as médias, acompanhadas de erro padrão para as mortalidades observadas ao longo do tempo de exposição ao inseticida. ....97
- Figura 4.8 – Fotografia representativa de gel de eletroforese revelando os produtos da AS-PCR em *Anopheles darlingi*. No poço (1) está representado o marcador de peso molecular DNA Ladder O'GeneRuler DNA Ladder, Ultra

Low Range/Fermentas, 150 ng; nos poços (2-12) estão representadas as amostras homozigotas para o alelo selvagem (1014Leu); nos poços 13 ao 15 estão representados os controles positivos correspondentes aos genótipos 1014Leu/Leu, 1014Phe/Phe e 1014Leu/Phe respectivamente, e no poço 16 está o controle negativo..... 100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Média (Erro Padrão) das taxas de mortalidade de <i>Anopheles marajoara</i> a partir do primeiro dia após exposição a seis formulações de inseticidas aplicados em quatro tipos de superfícies em simulado de campo (casa teste), no município de Macapá-Amapá, Brasil. ....	68
Tabela 4.2 – Análise do efeito <i>knockdown</i> pelo teste de cone para os piretroides alfacipermetrina SC, etofenprox PM, lambdacyalotrina PM e deltametrina WG, e da taxa de mortalidade de anofelinos expostos à seis formulações de inseticidas em duas etapas do estudo no período de outubro de 2014 a março de 2016 em Macapá-Amapá, Brasil. ....	69
Tabela 4.3 – Taxas de mortalidade de <i>Anopheles marajoara</i> expostos a alfacipermetrina SC, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: outubro de 2014 a abril de 2015. ....	72
Tabela 4.4 – Taxas de mortalidade de <i>Anopheles marajoara</i> expostos a etofenprox PM, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste), entre outubro de 2014 e abril de 2015 no município de Macapá-Amapá, Brasil. ....	73
Tabela 4.5 – Taxas de mortalidade de <i>Anopheles marajoara</i> expostos a lambdacialotrina PM, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: outubro de 2014 a abril de 2015. ....	74
Tabela 4.6 – Taxas de mortalidade de <i>Anopheles marajoara</i> expostos ao bendiocarb PM, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá- Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016. ....	76
Tabela 4.7 – Taxas de mortalidade mensais de espécimes de <i>Anopheles marajoara</i> expostos a deltametrina WG, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016. ....	77
Tabela 4.8 – Taxas de mortalidade mensais de espécimes de <i>Anopheles marajoara</i> expostos a pirimiphos-methyl CS, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016. ....	77

Tabela 4.9 – Análise do efeito <i>knockdown</i> e da taxa de mortalidade pelo teste de cone para anofelinos expostos à duas formulações de inseticidas (etofenprox PM e deltametrina WG) no período de março de 2017 a outubro de 2018 em Macapá-Amapá, Brasil. ....	79
Tabela 4.10 – Resultados do modelo de regressão logística para duas formulações de inseticidas para medir o impacto do Grupo (controle ou exposto), Condição (painel, simulado de campo e campo), Superfície (alvenaria com reboco e Madeira sem pintura), Mês (de 24 horas até 6 meses após -aplicação) e a interação de três vias entre Condição, Superfície e Mês. Entradas em negrito indicam significância estatística em 5%. ....	81
Tabela 4.11 – Taxas de mortalidade para <i>Anopheles marajoara</i> exposto a etofenprox PM, em diferentes superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: março a setembro de 2017.....	82
Tabela 4.12 – Taxas de mortalidade para <i>Anopheles marajoara</i> exposto a deltametrina WG, em diferentes superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: abril a outubro de 2018.....	84
Tabela 4.13 – Análise do efeito <i>knockdown</i> e da taxa de mortalidade pelo teste de cone para anofelinos expostos ao inseticida deltametrina SC-PE em painéis e simulado de campo (paredes internas e externas da casa teste) no período de março de 2018 a março de 2019 em Macapá – Amapá, Brasil. ....	87
Tabela 4.14 – Resultados do modelo de regressão logística para deltametrina SC-PE para medir o impacto do grupo (exposto ou controle), condição experimental (painel e simulado de campo) e superfície (alvenaria sem reboco e madeira sem pintura) e a interação bidirecional entre condição experimental e superfície. Entradas em negrito indicam significância estatística em 5%. ....	89
Tabela 4.15 – Resultados do modelo de regressão logística para deltametrina SC-PE para medir o impacto do Grupo (controle ou exposto), Condição – simulado de campo (paredes internas e externas) e tipo de superfície (alvenaria sem reboco em madeira sem pintura) e a interação bidirecional entre Condição – simulado de campo e Superfície. Entradas em negrito indicam significância estatística em 5%. ....	90

Tabela 4.16 – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de <i>Anopheles marajoara</i> do município de Mazagão – Amapá, Brasil. Período: 10 a 18 de abril de 2019.....	91
Tabela 4.17– Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para intensidade de resistência utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,25% para população de <i>Anopheles marajoara</i> do município de Mazagão – Amapá, Brasil. Período: 23 a 25 de setembro de 2019.....	91
Tabela 4.18 – Tempo de Queda para a espécie <i>Anopheles marajoara</i> com inseticida deltametrina a 0,05% e 0,25% em bioensaios de tubo (papel impregnado) realizado em Macapá – Amapá, Brasil. ....	93
Tabela 4.19 – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de <i>Anopheles darlingi</i> do município de Macapá – Amapá, Brasil. Período: 12 a 18 de julho de 2018.....	94
Tabela 4.20 – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de <i>Anopheles darlingi</i> do município de Mazagão – Amapá, Brasil. Período: 21 a 28 de agosto de 2018. ....	95
Tabela 4.21 – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de <i>Anopheles darlingi</i> do município de Santana – Amapá, Brasil. Período: 31 de agosto a 04 de setembro de 2018. ....	96
Tabela 4.22 – Tempo de Queda para a espécies <i>Anopheles darlingi</i> com inseticida deltametrina 0,05% em bioensaios de tubo (papel impregnado) realizado em Macapá – Amapá, Brasil. ....	98
Tabela 4.23 – Genotipagem do sítio 1014 do canal de sódio regulado por voltagem ( $N_{av}$ ) em três populações de <i>Anopheles darlingi</i> do estado do Amapá para variação Leu1014Phe.....	99



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 – Principais vetores da malária nas Américas. Fonte: Adaptado de WHO 2019. ....	15
Quadro 1.2 – Métodos para detectar resistência a inseticidas. ....	28
Quadro 3.1 – Inseticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde - OMS para borrifação residual intradomiciliar - BRI no controle dos vetores da malária, das formulações avaliadas no simulado de campo em casa teste, Macapá-AP, Brasil.....	42
Quadro 3.2 – Inseticida, tipos de superfícies e quantidades de painéis utilizados nos bioensaios em laboratório. ....	51
Quadro 3.3 – Inseticidas utilizados nos bioensaios de parede: teste de residualidade. ....	53

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

CDC Centers for Disease Control and Prevention

OMS Organização Mundial de Saúde

PNCM Programa Nacional de Controle da Malária

BRI Borrifação Residual Intradomiciliar

WHOPES World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme

WHO World Health Organization

AChE Acetilcolinesterase

GABA Ácido Gama-Aminobutírico

IEPA Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá

LAFICAVE Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores

ACR Alvenaria com reboco

ASR Alvenaria sem reboco

MCP Madeira com pintura

MSP Madeira sem pintura

CS Cápsula em Suspensão

SC Suspensão Concentrada

SC-PE Suspensão Concentrada reforçada com polímero

WG Grânulos dispersíveis em água (do inglês water dispersible granules)

PM Pó molhável

MoA Modos de Ação

# 1 INTRODUÇÃO

“Convicções são inimigos da verdade mais perigosos que as mentiras”

Friedrich Nietzsche

## 1.1 Malária

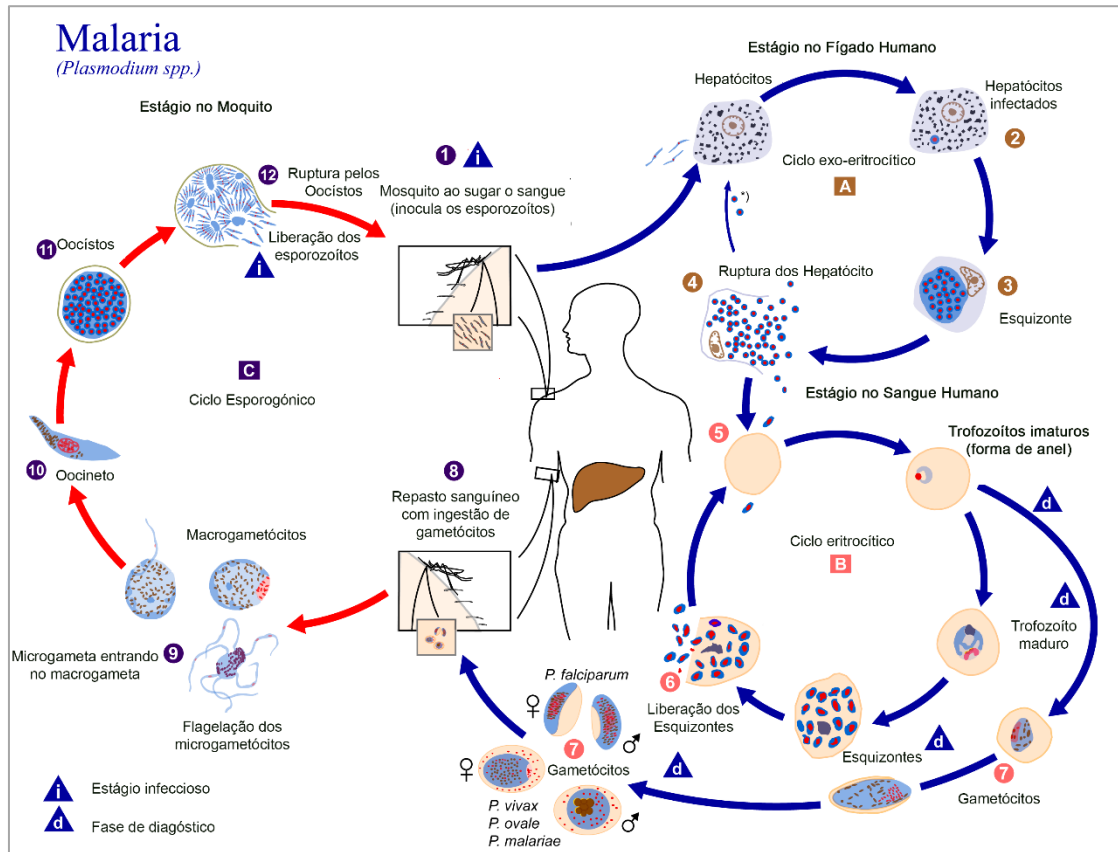
A malária é uma doença evitável e tratável que compõe um quadro diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais, atingindo mais de um bilhão de pessoas em 149 países (WHO 2019b). Dentre as “doenças infecciosas relacionadas à pobreza”, encontra-se a malária, que na maior parte dos países, onde é endêmica, afeta de forma desproporcional as pessoas pobres e desfavorecidas que têm limitado acesso às unidades de saúde, e vivem em contato próximo com vetores (WHO 2015a; Brasil 2017).

Conhecida como paludismo, impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna e maligna, a malária é uma doença parasitária potencialmente fatal, na sua maioria febril aguda, de cunho sistêmico e não contagiosa, produzida no homem por protozoários do gênero *Plasmodium* (Suarez-Mutis et al. 2013; Brasil 2017). A doença tem o processo de transmissão pessoa a pessoa, pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada por uma das cinco espécies de plasmódios que atacam de forma diferente o organismo, determinando assim distintas formas de enfermidade: *Plasmodium falciparum* Welch, 1897; *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti 1890; *Plasmodium malariae* Laveran, 1881, *Plasmodium ovale* Stephens 1922 (Suarez-Mutis et al. 2013; Brasil 2017) e também pelo *Plasmodium knowlesi* Sinton & Mulligan 1933, plasmódio de macacos capaz de produzir doença ao ser transmitido naturalmente ao homem em alguns países do continente asiático (Zhu et al. 2006; Cox-Singh et al. 2008; Ng et al. 2008; Lee et al. 2009; Putaporntip et al. 2009). No Brasil, há principalmente três espécies associadas à malária em seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* e as espécies *P. vivax* e *P. falciparum* são as mais comuns, sendo esta última a responsável pelas formas graves da doença – malária cerebral ou anemia grave (Brasil 2017). Em 2015 foi descrito a infecção natural do *Plasmodium simium* Fonseca, 1951 em macacos-prego da Mata Atlântica brasileira com a possibilidade de infectar eventualmente o homem, contribuindo para

a manutenção da transmissão nessa região (Alvarenga et al. 2015; Brasil et al. 2017; Grigg & Snounou 2017; Alvarenga et al. 2018).

O homem é o principal reservatório com importância epidemiológica para a malária e a transmissão do parasita acontece por um complexo ciclo de vida, demonstrado na Figura 1.1 elaborado pelo CDC: *Centers of Diseases Control and Prevention* (CDC 2019). O ciclo conhecido como esquizogônico ou assexuado envolve um hospedeiro intermediário, vertebrado (humano ou outro primata não humano), já o ciclo esporogônico ou sexuado, envolve um vetor invertebrado (mosquito do gênero *Anopheles*) considerado hospedeiro definitivo (Rey 2008).

A infecção inicia-se quando os parasitos (esporozoítos) são inoculados pela picada do vetor, os quais irão invadir as células do fígado, os hepatócitos. Nessas células multiplicam-se e dão origem a milhares de novos parasitos (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, caindo na circulação sanguínea, vão invadir as hemácias, dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária. O desenvolvimento do parasito nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos se desenvolvem rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito. São, por isso, denominados hipnozoítos que são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação (geralmente dentro de seis meses). Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem a hemácia e invadem outras, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem e, quando ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasito (Brasil 2010). O ciclo do parasito dentro do mosquito tem duração variada conforme as espécies envolvidas, com duração média de 12 a 18 dias, sendo, em geral, mais longo para *P. falciparum* do que para *P. vivax* (Brasil 2017).



**Figura 1.1** – Ciclo de vida do parasita da malária envolvendo dois hospedeiros (Adaptado do CDC).

O quadro clínico típico é caracterizado por febres intermitentes, precedida de calafrios, seguida de sudorese profusa, fraqueza, cefaleia e mialgias que ocorrem em padrões cíclicos. O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, dependendo da espécie de plasmódio infectante, quantidade de parasitos circulantes, tempo de doença e nível de imunidade adquirida pelo paciente. No entanto, gestantes, crianças menores de 5 anos, pessoas soropositivas (HIV), populações móveis, viajantes e os primoinfectados estão sujeitos a desenvolverem os casos graves que podem ser letais, principalmente nas infecções por *P. falciparum* (Brasil 2010, 2017). Indivíduos que tiveram vários episódios de malária podem atingir um estado de imunidade parcial, apresentando poucos ou mesmo nenhum sintoma no caso de uma nova infecção.

### 1.1.1 Breve histórico

A malária teve sua origem provavelmente na África, de onde se espalhou pelas áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. Conhecida desde a antiguidade, a malária foi citada pela primeira vez por Hipócrates na era pré-cristã, sendo ele o

descritor das características de ocorrência sazonal e de febre com padrão paroxístico e intermitente (Coura 2015).

A malária existiu nos tempos pré-históricos, no Egito, pois múmias foram encontradas com esplenomegalia, e sumerianos e egípcios entre 3.500 e 4.000 anos fizeram vários relatos de febres intermitentes com esplenomegalia (Ebbell 1937; Sarton 1959). Na Grécia os primeiros relatos sobre a malária datam de aproximadamente 500 anos antes de Cristo e coincidiram com a atividade pioneira do preparo da terra para a agricultura (Sarton 1959), sendo descrita por médicos gregos da época, onde o trabalho de Hipócrates não deixa dúvida em suas formas terçã benigna e maligna e quartã. Em 1880, o médico Charles Louis Alphonse Laveran fez a maior descoberta da história da doença, com a descrição do parasito, posteriormente complementada pelos italianos Golgi, Machiafara, Celli, Grassi, Feletti, Bastianelli e Sanfelice, com o esclarecimento do ciclo assexuado (Pessoa & Martins 1982).

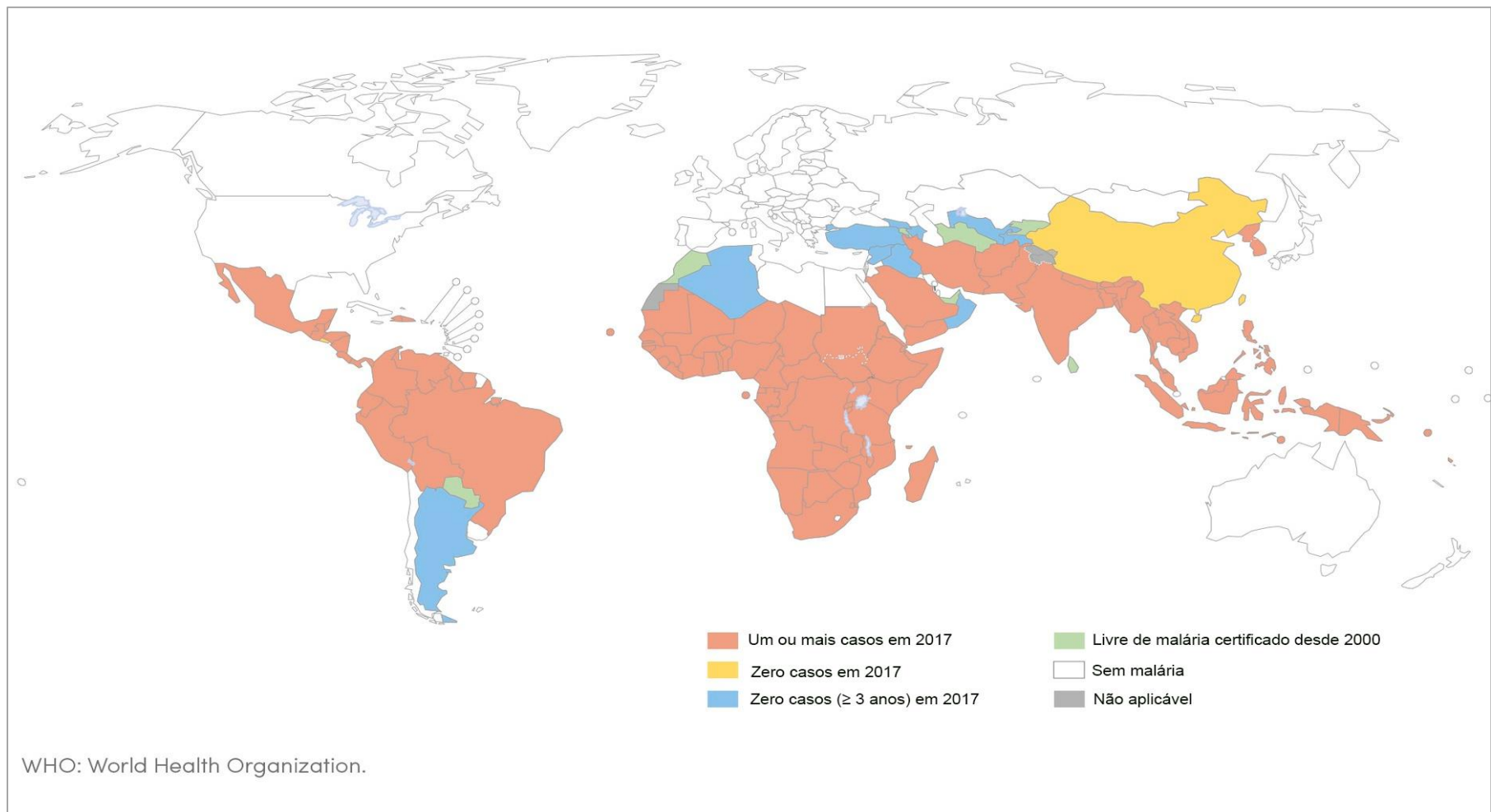
Manson sugeriu a existência do ciclo esporogônico e a transmissão por mosquitos (1894), e Grassi, Bastianelli e Bignami demonstraram o desenvolvimento completo das três espécies de plasmódio e seu ciclo sexuado no mosquito entre 1898 e 1899 (Neves 2016). Manson também teve importante participação em algumas experiências como a demonstração das condições climáticas que afetam indiretamente no desenvolvimento da malária (Bruce-Chwatt 1988). Carlos Chagas demonstrou pela primeira vez, a transmissão intradomiciliar da malária realizada por fêmeas dos anofelinos e não pelos machos (Chagas 1906; Tauil et al. 1985; Coura 2015).

### **1.1.2 Malária no mundo, nas Américas e no Brasil**

Existe uma iniciativa da Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO 2012) de estratégia técnica mundial para a eliminação da malária, e apesar de décadas de pesquisas, a doença se destaca como um grave problema de saúde pública (Figura 1.2). O Relatório Mundial de Malária de 2018, baseado em dados de 87 países em áreas com transmissão contínua da doença, destacou que no período de 2015-2017 não houve nenhum progresso significativo na redução de casos globais de malária. Estima-se que houve 219 milhões de casos e 435 mil mortes relacionadas em 2017, sendo o grupo de crianças menores de 5 anos o mais vulnerável e afetado, em áreas com alta transmissão de malária como na África Subsaariana (WHO 2018b).

Na região das Américas, um aumento foi observado em 2015, 2016 e, mais recentemente, em 2017, onde cinco países relataram incremento nos casos de malária: Brasil, Equador, México, Nicarágua e Venezuela (PAHO/WHO 2018). Além disso, Cuba e Costa Rica relataram casos e Honduras relatou malária em uma área onde os casos não haviam sido detectados recentemente.

No Brasil, a maioria das notificações de malária se concentra na região Amazônica (99% dos casos), nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (PAHO/WHO 2018). Fora da região Amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados dos estados pertencentes à área endêmica brasileira, de outros países amazônicos, do continente africano, ou do Paraguai. Entretanto, existe transmissão residual de malária no Piauí, no Paraná e em áreas de Mata Atlântica nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Nestas regiões, apesar das poucas notificações, a doença não pode ser negligenciada, pois se observa uma letalidade mais elevada que na região Amazônica (Brasil 2017).



**Figura 1.2** – Distribuição da malária no mundo.

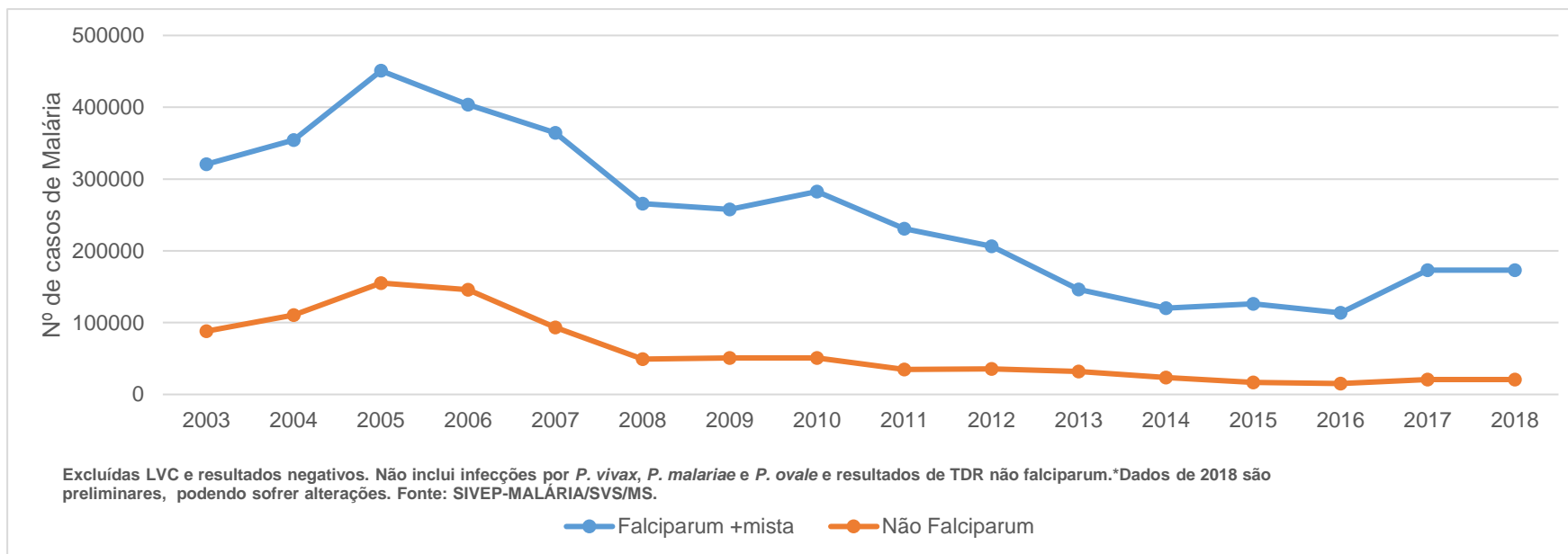


A incidência da malária na Amazônia brasileira encontrava-se em processo de efetivo declínio a partir de 2005, como já apontados em estudos sobre a situação epidemiológica da doença na região (Lapouble et al. 2015). O Brasil atingiu a meta para a malária dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM), que estipulava a redução de 75% no número de casos no país entre 2000 e 2015. Os resultados epidemiológicos do Brasil mostraram que os casos de malária apresentaram uma diminuição progressiva, e em 2016, foi registrado o menor número de casos dos últimos 37 anos (Brasil 2018) (Figura 1.3). Essa redução pode ser atribuída a diversos fatores, considerando-se que desde sua criação, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) investiu na elaboração de diretrizes técnicas e políticas de saúde baseadas em evidências. O processo de descentralização das ações de vigilância epidemiológica juntamente com essas diretrizes, produziram bons resultados para o Sistema Único de Saúde (Lapouble et al. 2015). Portanto, a consequência do maior impacto nos indicadores malariométricos deveu-se a: novos esquemas de tratamento, uso de mosquiteiro impregnado com inseticida de longa duração (MILD), supervisão dos postos de diagnóstico, controle de qualidade e monitoramento do desempenho do diagnóstico, testes de diagnóstico rápido em áreas de difícil acesso, sistema de detecção e alerta de epidemias (Lapouble et al. 2015).

Como evidência, em 2003 o Ministério da Saúde e o Ministério do Desenvolvimento Agrário, pela portaria interministerial buscaram evitar que projetos de colonização da Amazônia fossem inviabilizados pela migração de pessoas para áreas endêmicas de malária (Brasil 2003a). Da mesma forma que pela portaria 47 de 2006, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) estabeleceu que todo assentamento de reforma agrária e empreendimento ambiental na região amazônica deveria ter um plano de controle da malária antes da instalação, sendo necessário portanto de licenciamento ambiental com Avaliação do Potencial Malarígeno e o Atestado de Condição Sanitária (Brasil 2006). Além disso, vale ressaltar as diretrizes para o desenvolvimento do Manejo Integrado de Vetores (MIV) como estratégia para alcançar maior impacto na redução de transmissão e prevenção da malária e outras doenças (OPS/OMS 2008), a criação do Projeto de Expansão do Acesso às Medidas de Prevenção e Controle da Malária para Populações Vulneráveis da Amazônia brasileira em

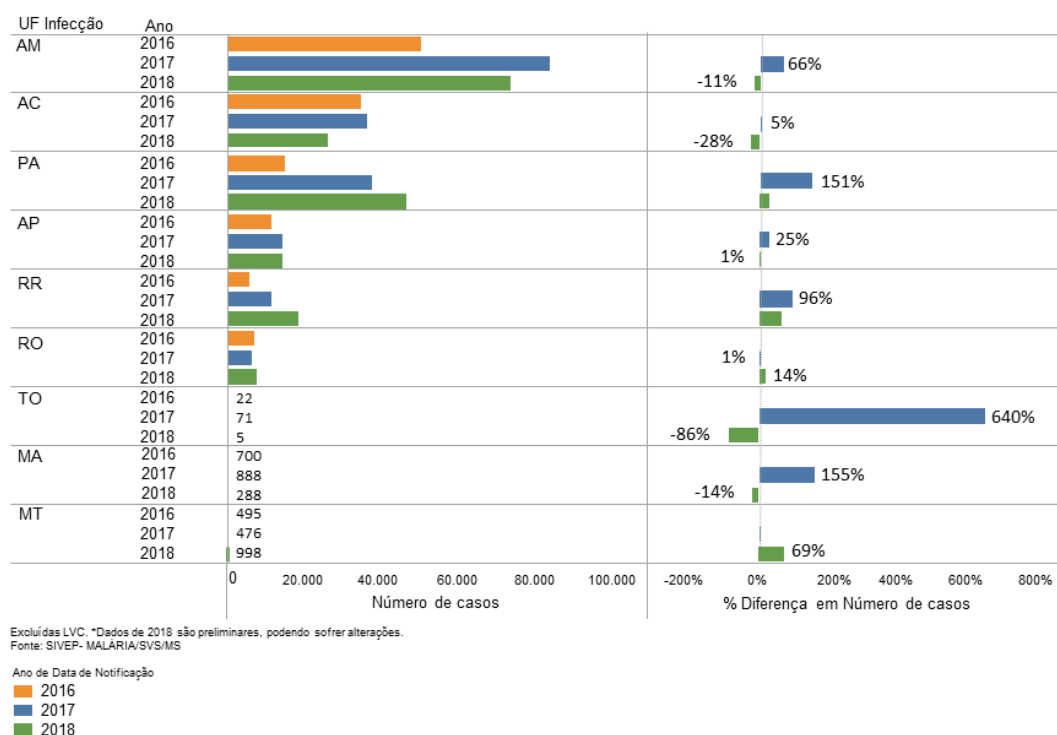
2009 (financiado por recursos do Fundo Global de Combate a Aids, tuberculose e malária) e Projeto de Apoiadores Municipais para o Controle da Malária, em 2012 (Lapouble et al. 2015).

No entanto, a partir de 2016 esse panorama começou a mudar e é possível observar o aumento no número de casos de malária, especialmente causada pelo *P. vivax* (Figura 1.3). Entre janeiro e dezembro de 2018, o Brasil notificou 186.791 casos de malária nesta região, revelando um aumento considerável quando comparado ao ano de 2017 que teve 174.522 casos (PAHO/WHO 2018). Para o ano de 2018, os estados que relataram o maior número de casos foram Amazonas, Pará e Acre (SIVEP Malária 2019), o que reflete possível fragilidade no programa de controle à malária (Figura 1.4).



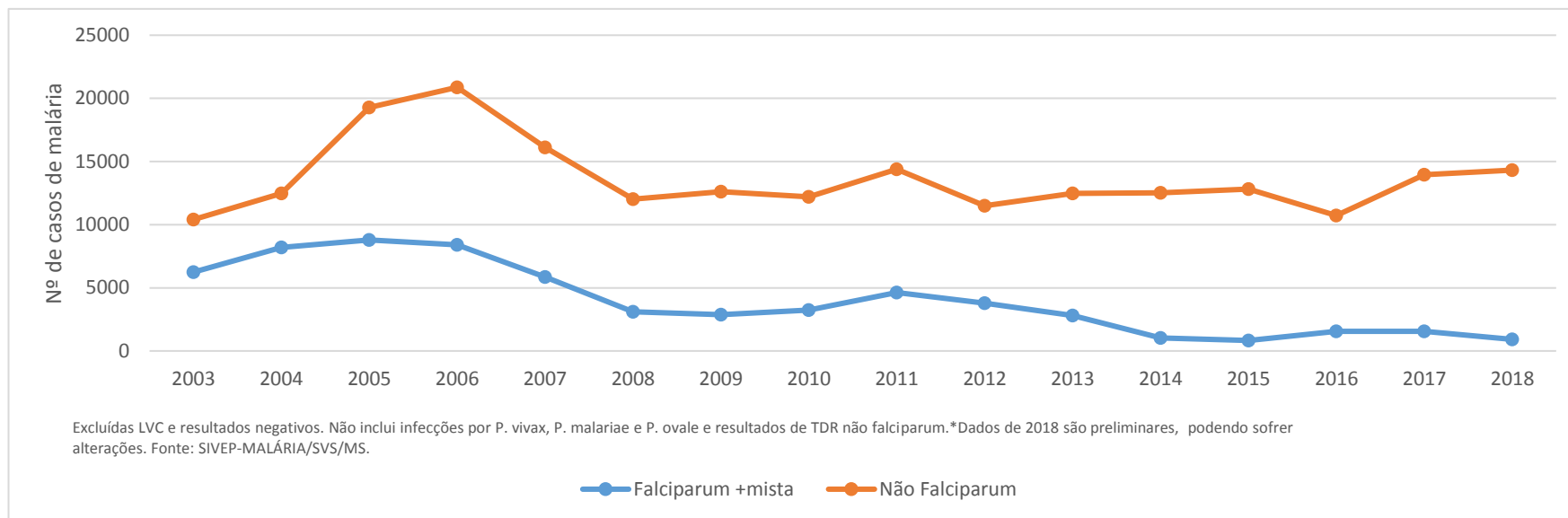
**Figura 1.3** – Distribuição dos casos de malária notificados na Amazônia Legal brasileira por espécie e ano.

Embora a malária esteja aumentando em todo o mundo (sem explicação definitiva), a hipótese dessa ocorrência no Brasil, pode estar relacionada a perda da importância da malária em todos os níveis da administração pública - federal, estadual e municipal. Como a doença vinha caindo, parecia estar sob controle e isso teria feito o poder público baixar a guarda. Além disso, enquanto a malária caía, o Brasil foi assolado por surtos de doenças infecciosas típicos de zonas urbanas, como Dengue, Zika e Chikungunya, que mobilizaram a opinião pública, contribuíram para a mudança de foco e para a fragilidade quanto as medidas de controle com a descontinuidade das ações (Tauil 2017).



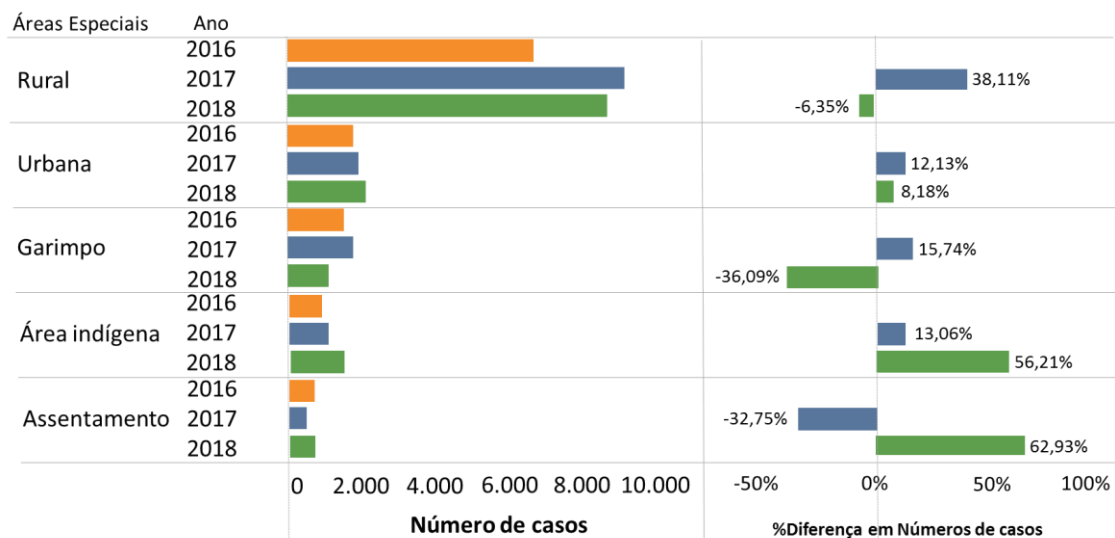
**Figura 1.4** – Números de casos de malária com provável infecção na Amazônia Legal brasileira e diferença percentual por ano (2016 a 2018).

No estado do Amapá, não obstante do que vem ocorrendo nas Américas, o número de casos vinha reduzindo progressivamente ao longo da última década, porém em 2017 houve um incremento no número de casos positivos em relação a 2016 principalmente de malária causada por *P. vivax*, padrão esse que foi mantido em 2018 (Figura 1.5).



**Figura 1.5** – Distribuição dos casos de malária notificados no estado do Amapá por espécie e ano.

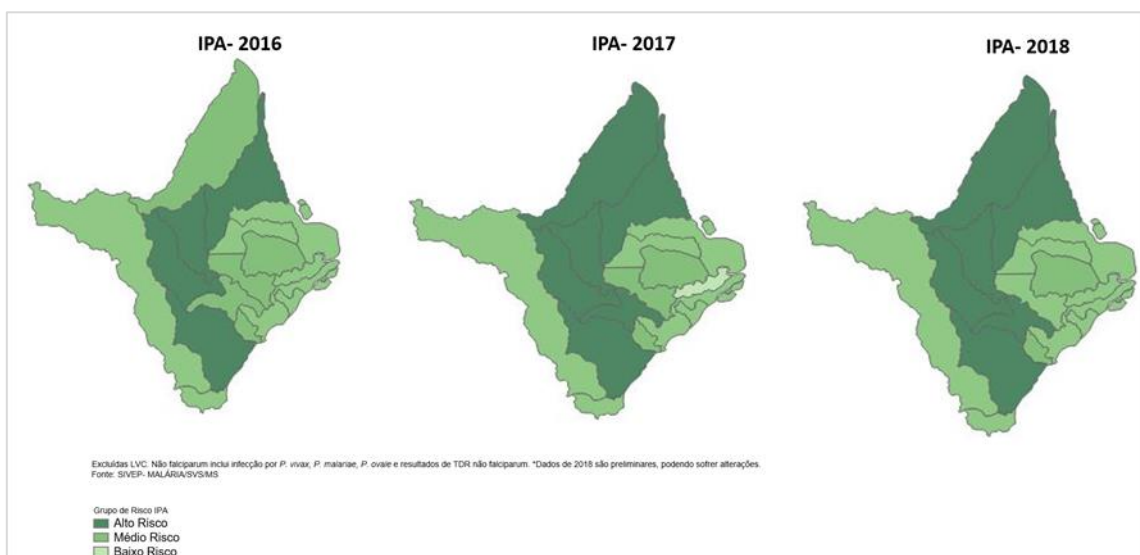
Além disso, considerando-se os casos de malária por categoria de local provável de infecção nos anos de 2016, 2017 e 2018, houve um aumento em todas as categorias em pelo menos um dos anos (Figura 1.6). Tal fator contribuiu também para que houvesse um incremento nos municípios com risco de adoecer de malária, analisados pelo índice parasitário anual (IPA), elevando de quatro para seis os municípios com alto risco de transmissão (Figura 1.7).



Excluídas LVC e notificações com categoria de local provável de infecção Nulo e "Não classificado".  
 \*Dados de 2018 são preliminares, podendo sofrer alterações.  
 Fonte: SIVEP-MALÁRIA/SVS-MS.

Ano de Data de Notificação  
 2016  
 2017  
 2018

**Figura 1.6** – Diferença percentual de casos de malária por categoria de local provável de infecção no estado do Amapá.



**Figura 1.7** – Risco de adoecer por malária no estado do Amapá- IPA, nos anos de 2016, 2017 e 2018.

## 1.2 Os vetores da malária

A malária é transmitida por artrópodes da Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae e subfamília *Anophelinae*, do gênero *Anopheles*. Existem mais de 400 espécies diferentes de mosquitos *Anopheles*, dos quais cerca de 40 são vetores de grande importância distribuídos por todo o mundo (Hay et al. 2010; Sinka et al. 2012) (Figura 1.8). A OMS apresenta uma lista das principais espécies de vetores, destacada no Quadro 1.1 da região das Américas, juntamente com uma breve descrição das principais características ecológicas e comportamentais relevantes para o controle (WHO 2019a).

O principal vetor no Brasil é o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (Root, 1926). No entanto, *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* s.l (Arribáizaga, 1878) e *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* (Curry, 1932), além de outras espécies do subgênero *Nyssorhynchus*, como *Anopheles deaneorum* (Rosa-Freitas 1989), *Anopheles oswaldoi* (Peryassui 1926), *Anopheles triannulatus* (Neiva e Pinto 1922), *Anopheles brasiliensis* (Chagas 1907) e, *Anopheles marajoara* (Galvão e Damasceno, 1942), também são consideradas importantes (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Sendo necessário o conhecimento da bioecologia de espécies anofélicas locais para garantir o sucesso das medidas de controle em cada área malarígena. Todavia, estes mosquitos que são mais abundantes nos horários crepusculares, ao entardecer e ao amanhecer, também são encontrados picando durante todo o período noturno, porém em menor quantidade (WHO 2019a).

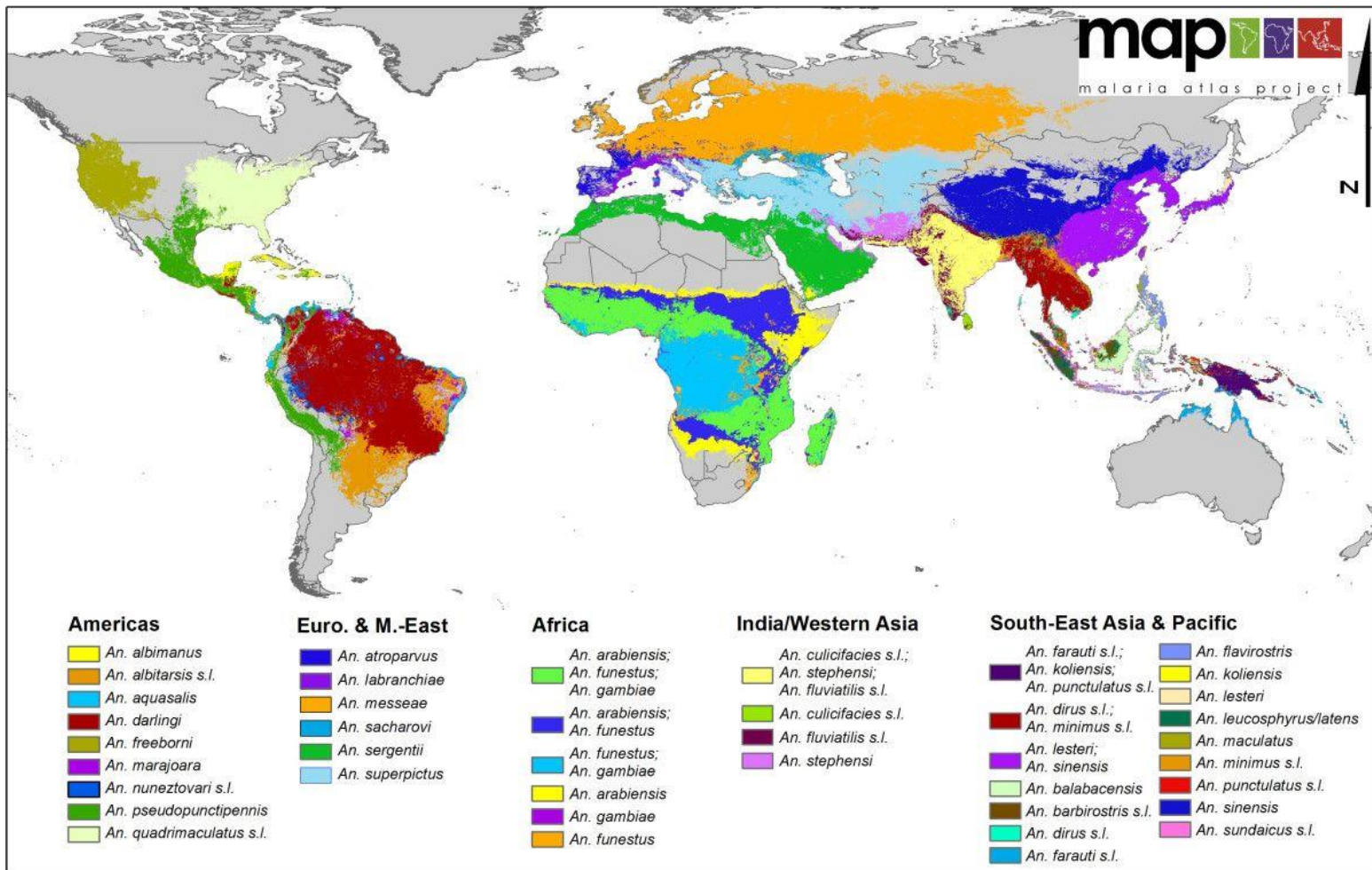


Figura 1.8 – Mapa da distribuição global das espécies de anofelinos. Fonte: Kiszewski et al. (2004).



**Quadro 1.1 – Principais vetores da malária nas Américas.** Fonte: Adaptado de WHO 2019.

Espécies	Zona ecológica	Habitats aquáticos	Comportamento de picada			Comportamento em repouso	Observações
			Antropofilia/ Zoofilia	Exofagia /Endofagia	Pico de repasto sanguíneo		
<i>An. albimanus</i>	Costeira e franja de montanha	Água aberta, iluminada pelo sol, incl. campo de arroz. Fresco ou salobro	pode ser zoofílico ou antropofílico	Predominantemente ao ar livre	Tarde e noite	Predominantemente ao ar livre. Endofílico no México, América Central	
<i>An. albitarsis s.l.</i>	Franja de montanha	Iluminado pelo sol, claro, água doce, incl. lagoas, lagos, campo de arroz Habitats ensolarados contendo emergentes vegetação, tanto salobra como fresca, incl. piscinas fluviais, mangues, pântanos de grama, lagoas e valas	zoofílico e antropofílico	Intradomicílio e ao ar livre	Tarde e noite	Predominantemente ao ar livre	
<i>An. aquasalis</i>	Costeiro		zoofílico e antropofílico	Intradomicílio e ao ar livre	Crepúsculo vespertino	Predominantemente ao ar livre	
<i>An. braziliensis</i>	Acima de 600m						
<i>An. darlingi</i>	Savana, planícies, vales, planície floresta e floresta franja	Corpos d'água naturais, incl. lagoas lagos e particularmente de fluxo lento riachos ou rios com sombra, claro água e submerso associado vegetação, como raízes de bambu	antropofílico	Intradomicílio e ao ar livre	À noite toda	Predominantemente ao ar livre	Muito adaptável ao comportamento humano
<i>An. freeborni</i>		Água de infiltração clara, piscinas à beira da estrada, campos de arroz (margens) e similares habitats. Preferem piscinas iluminadas pelo sol, embora larvas sejam ocasionalmente encontradas em piscinas sombreadas	zoofílico	Predominantemente ao ar livre			
<i>An. marajoara</i>	Espécies da planície, associado com zonas úmidas, florestas secundárias e intervenção humanos	Água iluminada pelo sol e clara ou lamacenta, incl. escavações de ouro	zoofílico e antropofílico	Intradomicílio e ao ar livre	Crepúsculo vespertino	Exclusivamente exofílico (?)	Membro do complexo <i>Albitarsis</i>
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	Borda de montanha	Iluminado pelo sol e sombreado, incl. água fresca, límpida, parada ou fluvial, com vegetação flutuante ou emergente: lagoas, lagos, rios de fluxo lento, lagoas de peixes, minas de ouro, poças de chuva e piscinas temporárias ou permanentes	zoofílico e antropofílico	Predominantemente ao ar livre	18:00–20:00 ( <i>nuneztovari</i> A); 22:00–02:00 ( <i>nuneztovari</i> B/C)	Ao ar livre	
<i>An. pseudopunctipennis s.l.</i>	Montanhas	Exposto ao sol, raso, claro, riachos de água doce ou piscinas fluviais com algas filamentosas abundantes (incl. salobra)	zoofílico e antropofílico	Intradomicílio ao ar livre	A noite toda	Predominantemente ao ar livre	
<i>An. quadrimaculatus subgroup</i>	Planícies costeiras e vales fluviais	Campos de arroz, primeira inundação	zoofílico	Predominantemente ao ar livre	A noite toda, os picos ao entardecer e alvorecer	Ao ar livre	<i>An. quadrimaculatus</i> (sp. A), <i>An. smaragdinus</i> (sp. B) e <i>An. diluvialis</i> (sp. C)

### 1.2.1 *Anopheles darlingi*

O *Anopheles darlingi* (Figura 1.9) é considerado um dos mais eficientes vetores de malária humana na região neotropical (Deane 1989; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Sinka et al. 2010). Encontrado predominantemente na América do Sul, onde é o principal vetor e está associado a dinâmica de transmissão da malária das regiões de floresta tropical. No Brasil está presente em todo território nacional, com exceção das áreas secas do nordeste brasileiro, abaixo da foz do Rio Iguaçu e em áreas de elevada altitude (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Emerson et al. 2015).



**Figura 1.9** – *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (Root, 1926).

O *An. darlingi* é altamente susceptível aos plasmódios, capaz de transmiti-los dentro e fora das casas, mesmo quando sua densidade está baixa (Sinka et al. 2010). No Brasil, o *An. darlingi* se beneficia das alterações antrópicas no ambiente silvestre, como a substituição da floresta por plantações, pastagens ou garimpos. Estas alterações antrópicas afastam os anofelinos de hábitos mais silvestres e propiciam ambiente muito favorável ao *An. darlingi*, acarretando o aumento de sua densidade (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Vittor et al. 2009), exigindo estratégias de controle específicas para reduzir as populações dessa espécie (Tadei et al. 2017).

As larvas de *An. darlingi* são encontradas com mais frequência em fragmentos e detritos flutuantes ao longo das margens dos rios de fluxo lento (Manguin et al. 1996), uma vez que os habitats larvais da espécie são normalmente os corpos de água naturais, como lagoas, lagos e particularmente correntes de fluxo lento ou rios

com águas claras, sombreadas e vegetação submersa associada (Manguin et al. 1996; Brochero et al. 2005; Achee et al. 2006; Nagm et al. 2007) (Figura 1.10). No entanto, larvas de *An. darlingi* já foram encontradas em locais não característicos como em águas turvas e poluídas, em águas ligeiramente salobras, em abrigos abandonados, minas de ouro e em barragens e viveiros de peixe (Manguin et al. 1996; Moreno et al. 2000; Silva-Vasconcelos et al. 2002; Arcos et al. 2018) reforçando adaptações dessa espécie às áreas com alterações antrópicas (Brochero et al. 2005).



**Figura 1.10** – Características de criadouros de *Anopheles darlingi*.

### **1.2.2 *Anopheles marajoara***

O *An. marajoara* (Figura 1.11), compõe as espécies do complexo *An. albitarsis* s.l, que tem uma vasta distribuição na região neotropical e é amplamente distribuído geograficamente no Brasil (Rosa-Freitas et al. 1990; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Conn & Mirabello 2007). Especificamente exemplares de *An. marajoara* são encontrados na região norte: Amazonas, Pará, Rondônia e Amapá (Póvoa et al. 2001; Conn et al. 2002; Galardo et al. 2007).



**Figura 1.11** – *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* (Galvão e Damasceno, 1942).

Geralmente, as formas imaturas de *An. marajoara* são encontradas em locais iluminados pelo sol com água límpida e parada, no entanto, já foram encontradas larvas em águas lamacentas como tanques de peixe, poças em campos agrícolas e garimpo (Moreno et al. 2000; Brochero et al. 2005), demonstrando sua adaptação a criadouros temporários ou criados pelo homem, favorecendo seu desenvolvimento (Figura 1.12) (Conn et al. 2002), o que sugere que seja dominante em relação ao *An. darlingi* nesses ambientes (Lima et al. 2017).

Anteriormente apontado como vetor secundário, o *An. marajoara* em estudos prévios no Amapá, foi encontrado em alta densidade em diversas localidades (Conn et al. 2002; Galardo et al. 2009; Barbosa et al. 2014) e infectados por *Plasmodium* sendo, portanto, incriminado como espécie dominante (Conn et al. 2002; Galardo et al. 2007; Galardo 2010). De maneira geral o *An. marajoara* é descrito como um vetor antropofílico e zoofílico, endofágico e exofágico, mas quase que exclusivamente exofílico (Rubio-Palis & Curtis 1992; Lourenco-de-Oliveira & Luz 1996; Conn et al. 2002; Brochero et al. 2005; Zimmerman et al. 2006; Moreno et al. 2007; Sinka et al. 2010).



**Figura 1.12** – Características de criadouros de *Anopheles marajoara*.

### **1.3 Medidas de controle da malária**

Apesar de existirem evidências claras em apoio às medidas de controle, as doenças transmitidas por vetores ainda respondem por cerca de 17% da carga global estimada de doenças transmissíveis, com mortalidade de 700 mil pessoas por ano (WHO 2019a).

As ferramentas estratégicas para o controle da malária enquadram-se dentro do pacote de intervenções recomendado pela OMS, adotado pelo PNCM que propõe reduzir a letalidade e a gravidade dos casos, a incidência da doença por meio da eliminação da transmissão do *P. falciparum* em áreas urbanas e a manutenção da ausência da doença em locais onde a transmissão já foi interrompida. Em consequência da ausência de vacina e do risco de seleção de parasitas resistentes aos fármacos disponíveis, o diagnóstico precoce e tratamento oportuno, o controle de vetores, a proteção individual e a participação da comunidade são os pilares das estratégias da OMS (IRAC 2011; WHO 2018b, 2019a).

Não obstante a importância de todas as estratégias propostas, o diagnóstico precoce e tratamento oportuno, assim como o controle vetorial são componentes

essenciais, devendo ser implementado com base nos dados epidemiológicos e entomológicos locais.

### **1.3.1 Diagnóstico precoce e tratamento oportuno (adequado e imediato)**

O controle da malária, ao contrário da maioria das outras doenças transmitidas por vetores, registrou um aumento significativo dos recursos financeiros desde o ano 2000, levando a uma redução significativa da carga global. A partir deste período, a região das Américas vem diminuindo a morbidade por malária em 60%, onde o Brasil refletiu esse panorama, apresentando redução que pode ser observada desde a instituição do controle integrado no país (Brasil 2003b). É fato que, o diagnóstico oportuno, seguido imediatamente de um tratamento adequado, é a forma mais efetiva para interromper a cadeia de transmissão e conseqüentemente reduzir a gravidade e a letalidade da malária (PAHO/WHO 2013). O diagnóstico correto da infecção só é possível pela identificação do parasito, ou de antígenos relacionados, no sangue periférico do paciente, pelos métodos diagnósticos especificados de: gota espessa (padrão ouro); esfregaço delgado (possui baixa sensibilidade); testes rápidos para a detecção de componentes antigênicos de plasmódio. Em parasitemia superior a 100 parasitos/ $\mu\text{L}$ , podem apresentar sensibilidade de 95% ou mais quando comparados à gota espessa. Por não avaliarem a densidade parasitária nem a presença de outros hemoparasitos, os testes rápidos não devem ser usados para controle de cura devido à possível persistência de partes do parasito, após o tratamento, levando a resultado falso-positivo. Diagnóstico por técnicas moleculares, sendo o *Nested* PCR (reação da polimerase em cadeia) ou PCR convencional, e o PCR em tempo real são as técnicas moleculares mais utilizadas para o diagnóstico da malária. No entanto, custo elevado, a falta de infraestrutura e a falta de mão de obra especializada restringem o uso de técnicas moleculares aos laboratórios de referência (Brasil 2017).

Dentro deste contexto, o início do tratamento antimalárico em um intervalo inferior a 48 horas após os primeiros sintomas evita a progressão para uma doença grave associada à hospitalização ou ao óbito podendo ainda reduzir o número de indivíduos que podem contribuir para a transmissão da malária (Oliveira-Ferreira et al. 2010).

O tratamento com medicamentos é espécie-específico e tem como principais objetivos: reduzir a morbidade e a mortalidade, devendo ser realizado rapidamente após o diagnóstico; garantir a cura completa da infecção, prevenindo a progressão da doença não complicada para forma grave e potencialmente fatal, no caso do

*P. falciparum*; reduzir o reservatório do parasito humano, diminuindo a transmissão da doença; e, evitar o surgimento e a disseminação da resistência aos antimaláricos. O surgimento e a disseminação de parasitos resistentes a múltiplos antimaláricos, representam desafios adicionais no controle da doença, estando associados ao aumento da morbidade e da mortalidade nas áreas endêmicas (WHO 2018b).

O tratamento antimalárico indicado depende de alguns fatores, como a espécie do protozoário infectante; diferentes fases do ciclo do parasita, idade do paciente; condições associadas, tais como gravidez e outros problemas de saúde; além da gravidade da doença. O tratamento antimalárico é feito em regime ambulatorial, somente os casos graves deverão ser hospitalizados de imediato (Brasil 2010).

A escolha do esquema de tratamento antimalárico é baseada na eficácia terapêutica da combinação medicamentosa (WHO 2015b). Em forma de comprimidos com múltiplas drogas em várias combinações para *P. falciparum* e comprimidos com única droga para *P. vivax*, apesar do tratamento usar associação de medicamentos. Os antimaláricos agem de forma específica para impedir o desenvolvimento do parasito no hospedeiro, e essas drogas são fornecidas gratuitamente em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil 2010). Os antimaláricos disponíveis compreendem quinolinas, aminoálcoois, sulfonamidas e sulfonas, biguanidas, diaminopirimidinas, lactonas sesquiterpênicas (artemisinina e seus derivados semissintéticos), naftoquinonas e antibióticos (Brasil 2010).

No Brasil, a primeira opção de tratamento para a malária falciparum é a combinação de Coartem® (principal apresentação) contendo 20mg de arteméter e 120mg de lumefantrina. Assim o tratamento diário de um adulto hígido compreende 160mg de arteméter e 960mg de lumefantrina por três dias, associada a primaquina em dose única (45mg) para evitar a transmissão. No caso da malária vivax não complicada, a cloroquina é ainda o medicamento de escolha, na dosagem de 1500mg durante três dias; sendo administrado 600mg no primeiro dia e 450mg no segundo e terceiro dia. Este medicamento é associado com a primaquina na dosagem de 210mg durante sete dias, onde pode ser administrado 15mg diários por 14 dias ou 30mg diários por 07 dias para evitar as recaídas tardias da doença (MS 2010).

### **1.3.2 O papel do controle de vetores na malária**

O controle de vetores é uma medida eficaz para diminuir transmissão da malária, assim, intervenções contínuas são necessárias, onde uma gestão integrada de controle de vetores adote decisões racionais para uso otimizado dos recursos com

o objetivo de melhorar a eficácia, a relação custo-benefício, a integridade ecológica e a sustentabilidade das atividades de controle contra doenças transmitidas por vetores (WHO 2019a), de modo que sejam apropriadas ao cenário epidemiológico e adequadas à realidade de cada região (Tauil & Lima 1992; Braga & Valle 2007a; WHO 2015a).

As formas de controle de mosquitos vetores são didaticamente classificadas como: mecânicas (eliminação de criadouros), biológicas (uso de predadores ou parasitas) ou químicas (aplicação de inseticidas sintéticos) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). No entanto, as medidas de controle dirigidas aos mosquitos adultos - mosquiteiros tratados com inseticida e borrifação residual intradomiciliar (BRI) (WHO 2013b, 2015c) - são mais aplicáveis geograficamente do que medidas específicas dirigidas às larvas, considerando que muitos vetores da malária se alimentam dentro de casa à noite, e podem descansar sobre superfícies em ambientes fechados após o repasto sanguíneo, enquanto os habitats larvais variam entre as espécies de anofelinos.

A cobertura universal com controle efetivo de vetores usando mosquiteiros ou BRI é recomendada para as populações em risco de malária nos diferentes contextos epidemiológicos e ecológicos. As intervenções de controle da malária evitaram um total estimado de 663 milhões de casos na África, onde os mosquiteiros foram os que mais contribuíram seguidos da BRI (WHO 2017).

- Mosquiteiros tratados com inseticida

A OMS recomenda mosquiteiros tratados com inseticida como uma medida na proteção de populações em risco de malária, inclusive em áreas onde a malária foi eliminada ou a transmissão foi interrompida, mas o risco de reintrodução permanece. Um mosquiteiro tratado com inseticida repele, incapacita ou mata os mosquitos que entram em contato com o inseticida (WHO 2019a). Atualmente a OMS recomenda o uso dos seguintes mosquiteiros impregnados com substância inseticida entre os polímeros que formam suas fibras:

- Mosquiteiro impregnado com inseticida de longa duração (MILD) - tratado com piretroides pré-qualificados pela OMS, que deve manter sua atividade biológica efetiva por pelo menos 20 lavagens em condições de laboratório e em média três anos de uso em condições de campo (WHO 2005, 2019a).

- Mosquiteiro piretroide - PBO - um mosquiteiro que inclui tanto um inseticida piretroide como o butóxido de piperonilo sinérgico. Até o momento, as redes



piretroides PBO não atingiram os limites exigidos para se qualificar como mosquiteiros inseticidas de longa duração (WHO 2019a).

- Borrifação Residual Intradomiciliar (BRI)

A BRI é o método de controle de vetores de malária mais utilizado. Sua aplicação foi completamente padronizada e existem especificações claras para equipamentos e inseticidas adequados, assim como estão disponíveis diretrizes de campo sobre técnicas e questões operacionais (WHO 2013a). A BRI é amplamente utilizada em áreas de transmissão sazonal, incluindo áreas predispostas a epidemias, e cada vez mais em áreas mais endêmicas da malária. A BRI é apropriada em contextos epidemiológicos, onde os vetores permanecem principalmente em ambientes fechados e em países onde as capacidades logísticas necessárias podem ser implantadas (Malaria 2010; Karunamoorthi 2011).

Direcionado a mosquitos adultos, a BRI consiste na borrifação de superfícies (paredes) internas das habitações com inseticida residual para matar ou repelir mosquitos endofílicos, com um produto pré-qualificado pela OMS (WHO 2007, 2019a). Uma vez aplicado, o inseticida formará uma película de pequenos cristais na superfície, matando o vetor quando ele estiver na parede antes ou depois de um repasto sanguíneo (WHO 2013a; Baia-da-Silva et al. 2019).

Em termos de impacto imediato, a BRI continua sendo a intervenção de controle vetorial mais poderosa para reduzir e/ou interromper a transmissão da malária, no entanto a eficiência da BRI ocorre a partir de um alto nível de cobertura de todas as superfícies prováveis de repouso do vetor, associada a uma dose efetiva de inseticida. É um método de proteção que exige aceitação da população uma vez que requer mais de uma borrifação por ano, além da necessidade de preservação razoável (não remoção do inseticida) das superfícies no período entre os intervalos dos ciclos de borrifação (WHO 2006b).

A seleção do inseticida usado para a BRI deve levar em conta o *status* de suscetibilidade de vetores locais e a duração do efeito residual em relação ao período de transmissão da malária (WHO 2006b). O conhecimento sobre a persistência dos inseticidas é uma informação fundamental para definir o intervalo mínimo de sua aplicação nas habitações em áreas de alta incidência, influenciando a capacidade logística e operacional na execução dos ciclos de aplicação dos produtos (Santos et al. 2007; Galardo & Galardo 2009; Tangena et al. 2013a; Oxborough et al. 2014a; Oxborough et al. 2014b).

De acordo com as recomendações das diretrizes para testar inseticidas (mosquitos adultos) para BRI (WHO 2006a), as avaliações devem ocorrer em fases distintas: condição controlada de laboratório (fase I); cabanas experimentais em pequena escala (fase II) e cabanas experimentais em larga escala (fase III). Historicamente a utilização de cabanas experimentais, teve início na década de 40 para capturar mosquitos. Trabalhos posteriores adaptaram modelos para estudos incluindo avaliação de BRI e MILD, repelentes, atrativos sintéticos (Muirhead-Thomson 1950; Busvine 1951; Hocking et al. 1960; Rapley 1961; Haddow 2009), podendo inclusive ser transportável, a exemplo da cabana experimental modificada de Ifakara (Okumu et al. 2012) que abrange os méritos comprovados das cabanas anteriores. No entanto, ressaltamos a carência de estudos dessa natureza na região Amazônica brasileira, que apresenta registro da maioria dos casos de malária relatados (WHO 2019a).

#### **1.4 Inseticidas**

O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por longos períodos foi um dos avanços mais importantes no controle de insetos no século XX. Historicamente, quatro classes de inseticidas, todos neurotóxicos, são utilizados em saúde pública: organoclorados (OC), piretroides (PI), carbamatos (CA), organofosforados (OP) (Braga & Valle 2007a) e mais recente os neonicotinoides (NN) (WHOPES 2018). No Brasil o MS trabalha apenas com inseticidas recomendados pelaOMS, regulamentados pela *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES).

O uso de inseticidas para o controle da malária na Amazônia iniciou na década de 1940, por meio de uma campanha nacional para a erradicação da doença com o uso expressivo do organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT) de forma organizada e sistêmica, quando dois terços da população brasileira viviam em áreas endêmicas (Deane 1988; Loiola et al. 2002).

Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono hidrogênio e cloro, a exemplo do DDT (diclorodifeniltricloroetano), amplamente utilizado no século passado. No entanto, devido a sua persistência no ambiente e acúmulo em tecidos, seu uso foi proibido em diversos países, incluindo o Brasil. Porém, essa proibição para utilização em Saúde Pública vem sendo reavaliada há algum tempo, em decorrência da detecção de resistência aos inseticidas da classe piretroide (WHO 2014).

Os organofosforados (malathion, temephos e fenitrothion) foram desenvolvidos na década de 1940 e vem sendo utilizados desde então como inseticidas, herbicidas e reguladores de crescimento vegetal. Os organofosforados incluem todos os inseticidas que têm fósforo na sua composição. Na década de 1970, os organoclorados foram substituídos por organofosforados (Carneiro et al. 2015), mas, embora sejam biodegradáveis e não cumulativos, apresentam instabilidade química e alta toxicidade em vertebrados. Todavia, sua persistência no ambiente é curta, fazendo com que haja necessidade de aplicações mais frequentes. Entretanto, por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos, apresentam vantagens em relação aos organoclorados (Braga & Valle 2007a).

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico e apresentam uma ação letal rápida; no entanto, bem como organofosforados, sua persistência no ambiente é curta, tornando necessárias aplicações mais frequentes (Braga & Valle 2007b).

Os piretroides tiveram sua origem do piretro extraído de crisântemos, hoje são produzidos a partir de moléculas sintéticas. Exibem alta toxicidade aos insetos e baixa toxicidade para os humanos. Os piretroides são de fácil degradação no ambiente e não se acumulam no ecossistema. A adoção de piretroides na luta contra os vetores de malária no Brasil teve início em meados da década de 1990, com utilização de cipermetrina na formulação de pó molhável (Santos et al. 2007). Inseticidas piretroides vem sendo amplamente utilizados, tanto por programas governamentais como em aplicações domésticas (Macoris et al. 2018), agem rapidamente sobre o sistema nervoso dos insetos, resultando em convulsões e paralisia (e, eventualmente a morte), esse resultado é conhecido como efeito *knockdown* (Braga & Valle 2007a).

Quanto ao modo de ação, os carbamatos e organofosforados atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso central responsáveis por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina, o que resulta na permanência do impulso nervoso levando o inseto à morte (Moreira et al. 2013). A AChE é fosforilada pelo inseticida e fica inativada, resultando no acúmulo de acetilcolina nas sinapses e impedindo que o impulso nervoso seja interrompido, sendo o sistema nervoso central continuamente estimulado (Braga & Valle 2007a).

Por sua vez, os organoclorados e piretroides agem interferindo na transmissão dos impulsos nervosos, agindo como antagonistas do Ácido gama-aminobutírico (GABA) nos receptores gabaérgicos, impedindo a entrada de íons cloro para o meio intracelular e com isso provocando a emissão de impulsos espontâneos que levam a

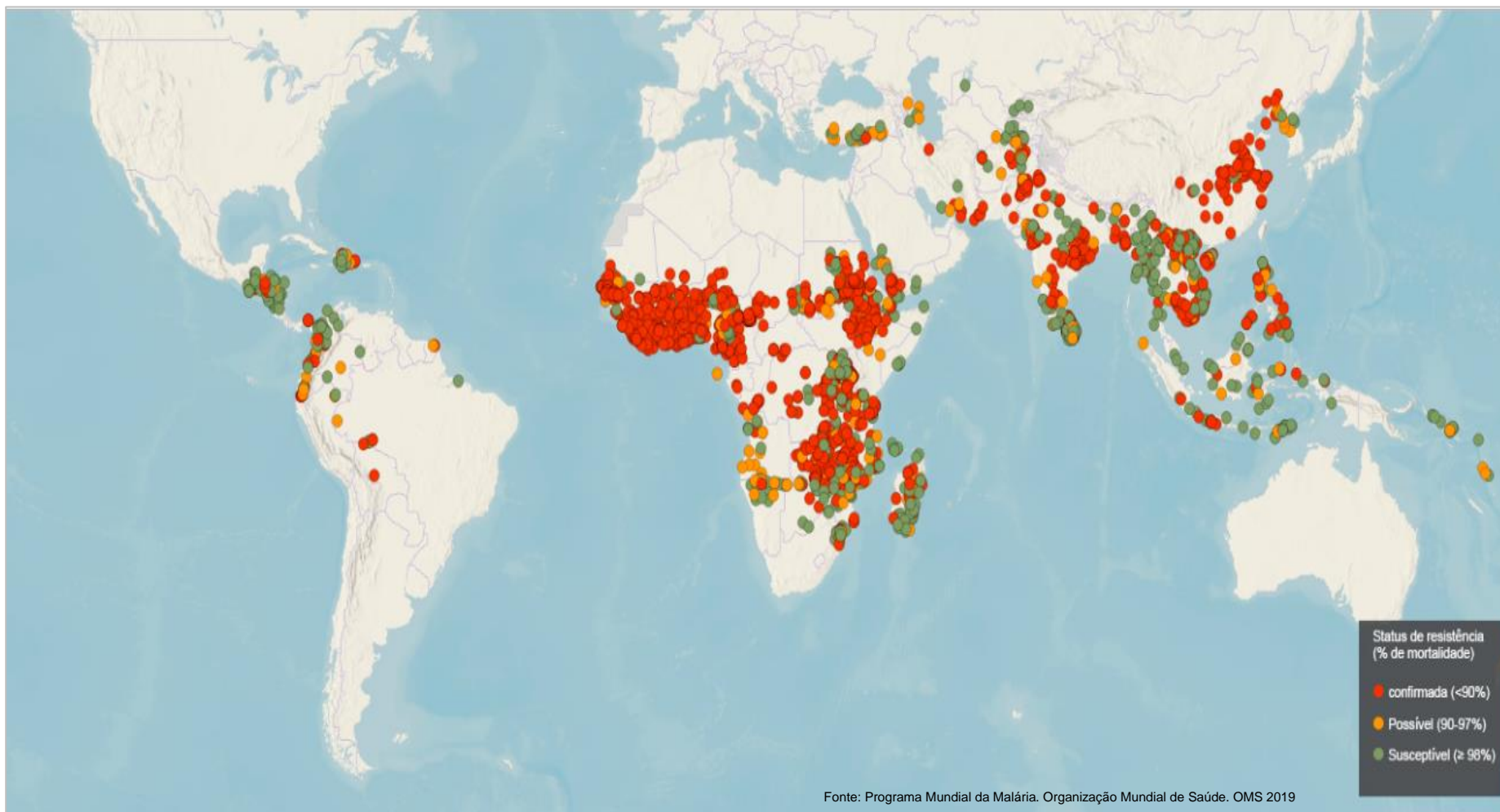
contração muscular, convulsão, paralisia e morte. Os piretroides também têm como alvo o canal de sódio regulado por voltagem -  $Na_v$ , presente nas células do sistema nervoso central e periférico (neurônios, miócitos, células endócrinas e ovários), alterando a cinética de propagação de impulsos nervosos, causando o efeito *knockdown* (Schleier III & Peterson 2011; Moreira et al. 2013). Por definição, efeito *knockdown* é a perda da coordenação e paralisia provocada pelo inseticida, frequentemente acompanhada por espasmos e tremores (WHO 2016). Além disso, os piretroides podem apresentar efeito repelente, espantando os insetos ao invés de eliminá-los.

O uso criterioso de inseticidas químicos é necessário, para evitar a contaminação do meio ambiente e a seleção de populações de vetores resistentes a estes produtos (IRAC 2011; WIN 2018).

## **1.5 Resistência aos inseticidas**

A resistência aos inseticidas é tida como a propriedade dos mosquitos para sobreviver à exposição a uma dose padrão de inseticida. O surgimento de resistência a inseticidas em uma população de vetores é um fenômeno evolucionário e pode ser o resultado de adaptação fisiológica em que o inseticida é metabolizado, não potenciado ou menos absorvido do que por mosquitos suscetíveis, ou mesmo comportamental (exofilia em vez de endofilia) (WHO 2019a).

Muitas espécies de vetores de importância médica (incluindo anofelinos) já desenvolveram resistência a um ou mais inseticidas (Figura 1.13) (Coleman et al. 2017). A partir de 2010, um total de 68 países tem reportado resistência a pelo menos uma classe de inseticidas. Destes, 57 registraram resistência a duas ou mais classes. O aumento da frequência de insetos resistentes pode ser inicialmente detectado por meio de ensaios biológicos que medem a mortalidade de insetos em resposta a um inseticida em particular, ou por meio de testes genéticos que detectam mecanismos de resistência em insetos individuais (WHO 2019c).



Os métodos para monitorar a resistência dependem de bioensaios (com vantagens e desvantagens), usando concentrações fixas de inseticidas e tempos de exposição, e os dados são relatados como porcentagem de mortalidade e/ou efeito *knockdown* (Quadro 1.2). Os ensaios biológicos (quadro) podem ser do tipo qualitativo, onde se avalia a taxa de mortalidade da população exposta a uma ‘dose diagnóstica’, geralmente definida pela 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 avaliada pode ser definida como susceptível ou resistente, considerando o nível de mortalidade no ensaio de dose-diagnóstica (DD), ou ter o nível de resistência estimado, quando avaliada em ensaio dose-dependente. A partir de onde são calculadas as razões de resistência (RR) da população (WHO 2006a).

**Quadro 1.2** – Métodos para detectar resistência a inseticidas.

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Bioensaios utilizando doses diagnósticas de inseticida definidas pela OMS</b>	Padronizado, simples de executar, detecta resistência independentemente do mecanismo	Falta sensibilidade e não fornece informações sobre o nível e o tipo de resistência (exceto quando usado com sinergistas), para ser feito com mosquitos vivos
<b>Bioensaios de resposta à dose</b>	Fornecer dados sobre o nível de resistência na população, independentemente do mecanismo	Exigir muitos mosquitos vivos, e dados de diferentes grupos não são facilmente comparáveis
<b>Ensaio bioquímico para detectar atividade de enzimas associadas à resistência a inseticidas</b>	Fornecer informações sobre mecanismos específicos responsáveis pela resistência	Requer cadeia de frio. Não disponível para todos os mecanismos de resistência, questões de sensibilidade e especificidade para alguns ensaios (por exemplo, GST)
<b>Ensaio molecular para detectar alelos resistentes</b>	Muito sensível. Pode detectar alelos recessivos e, portanto, fornece um "aviso antecipado" de resistência futura.	Requer equipamento especializado e dispendioso. Disponível apenas para um número limitado de mecanismos de resistência.
Fonte: Adaptado de Vincent Corbel & Raphael N'Guessan 2013		

Especificamente para os piretroides pode-se avaliar a resistência ao efeito *knockdown* por meio da observação da queda dos insetos expostos a uma única dose do inseticida, ao longo de intervalos de tempo. Os resultados dessa observação geram uma curva *knockdown versus* tempo, portanto também uma análise quantitativa (WHO 1981a, 2016).

A carência de informação sobre resistência na região das Américas comparado a África e Ásia, ocorre em função da dificuldade da colonização de anofelinos neotropicais em laboratório, que resulta em poucos estudos com ensaios biológicos. Contudo, na América Latina, a resistência a inseticidas foi encontrada no Peru, Equador, República Dominicana, Panamá, México, Honduras e Guatemala em populações de *An. albimanus* (Penilla et al. 1998; Vargas et al. 2006; Dzul et al. 2007; Penilla et al. 2007; Caceres et al. 2011; Quinones et al. 2015; WHO 2018a; Mackenzie-Impoinvil et al. 2019). Além disso, a resistência aos piretroides foi relatada em populações de *An. darlingi* do Brasil, Bolívia, Peru e Colômbia (Fonseca-Gonzalez et al. 2009; WHO 2018a). Parte dos trabalhos mostraram susceptibilidade aos inseticidas hoje utilizados (Santacoloma et al. 2012; Silva et al. 2014; Galardo et al. 2015).

A resistência é um processo complexo e dinâmico e depende de muitos fatores que podem ser agrupados em quatro categorias distintas: resistência metabólica (alterações da atividade de enzimas de detoxificação), taxa de penetração preservada (diminuição da taxa de penetração do inseticida pela cutícula do mosquito), insensibilidade do sítio alvo (por meio de mutações que alteram a conformação do local onde atua o químico, impedindo a ligação com o seu alvo) (Ranson et al. 2000b; Braga & Valle 2007a; Martins & Valle 2012) e alteração comportamental (redução da permanência de mosquitos no interior de habitações humanas comumente tratadas com inseticida nas paredes) (Hemingway et al. 2004; IRAC 2011; Coleman et al. 2017). Portanto, é fundamental que as estratégias de manejo de resistência incluam a utilização de diferentes inseticidas no espaço e no tempo (rotações e mosaicos), misturas de inseticidas e restrições ao uso em períodos e locais específicos de risco (Curtis 1985; Hougard et al. 2003; Nauen 2007; Sharp et al. 2007).

A rotação é uma estratégia baseada na rotatividade de duas ou mais classes de inseticida ao longo do tempo com diferentes Modos de Ação (MoA). Essa abordagem pressupõe que, se a resistência a cada inseticida é rara, então a resistência múltipla será extremamente rara. Já o mosaico de grande escala, parte de aplicações de inseticidas com diferentes MoA (separados espacialmente) contra o mesma população de mosquitos, com por exemplo: dois inseticidas com MoA

diferentes em diferentes habitações dentro da mesma localidade. Assim, é provável que os mosquitos entrem em contato com um segundo inseticida durante suas vidas se eles sobreviverem da exposição ao primeiro. Isso reduz a pressão de seleção ao inseticida. A mistura consiste em uma única formulação contendo dois ou mais inseticidas, ou diferentes formulações de inseticidas sendo aplicadas no mesmo equipamento de borrifação; ou ainda mosquiteiros tratados com dois ou mais inseticidas com diferentes MoA. Esta estratégia pode incluir também a combinação de um mosquiteiro com a BRI na mesma habitação. Esta abordagem assume que se um mosquito sobrevive a um inseticida MoA, será morto pelo outro, e que se a resistência a um é rara, a resistência a ambos serão extremamente raros.(IRAC 2019).

O sucesso de quaisquer estratégias de gerenciamento de resistência requer o conhecimento do modo de ação, propriedades químicas e eficácia residual dos inseticidas disponíveis, sendo imprescindível o uso apropriado e criterioso dos inseticidas atuais (Corbel & N'Guessan 2013).



## 1.6 Justificativa

A estratégia técnica mundial da OMS constitui um quadro para a elaboração de programas adequados e destinados a acelerar o progresso na eliminação da malária. Este fato reforça a oportunidade e os grandes desafios existentes no contexto, onde o desenvolvimento e a adoção de soluções inovadoras no incremento de produtos e na prestação de serviços para o sucesso da estratégia são prementes. Independente da regionalização das ações de controle nos países endêmicos, os programas nacionais de controle da malária terão de garantir que todas as pessoas que vivem em zonas de alto risco estejam protegidas pela distribuição, uso e substituição adequada de Mosquiteiro impregnado com inseticida de longa duração (MILD) e/ou da aplicação da Borrifação Residual Intradomiciliar (BRI), sendo importante um constante monitoramento para minimizar a propagação da resistência aos inseticidas. Para progredir, os métodos existentes terão que ser implantados de forma mais eficaz. Em muitos países, a exemplo do Brasil, a malária ocorre principalmente nos setores rurais mais pobres da sociedade, e mesmo métodos de controle relativamente simples raramente são aplicados adequadamente.

Nesse contexto, a recomendação da OMS é o uso de inseticidas para BRI com formulações que variam o tempo de efeito residual entre dois e seis meses, sem discriminar, no entanto, o tipo de superfície aplicado. Isso reflete em uma carência de orientação formal sobre a duração dos ciclos de aplicação dos inseticidas que, somada às diferentes respostas em relação a tipos de superfícies, condições ambientais e climáticas onde eles são utilizados, podem comprometer a eficiência das ações. Tal variação do tempo dificulta o planejamento das atividades de campo, incluindo a quantidade de produto a ser comprada e a necessidade de definir melhor os ciclos. Além disso, compreender o *status* de susceptibilidade/resistência de populações naturais de *Anopheles* e os mecanismos moleculares de resistência é de grande valor para o controle efetivo de vetores da malária.

A necessidade do uso de inseticida no programa da malária é indiscutível, sendo imprescindível o conhecimento das classes e formulações utilizadas, sua persistência nas superfícies aplicadas, assim como o *status* de suscetibilidade das populações a que se destinam controlar. Diante disso, a OPAS por meio de Carta Acordo com o MS, solicitou a avaliação residual em diferentes superfícies de seis inseticidas dentre as classes do piretroides, carbamato e organofosforado.

Assim, a construção de uma “casa-teste” para provas biológicas de parede (bioensaios) em simulado de campo vem nesse estudo, preencher essa lacuna, com o propósito inovador de que os resultados encontrados possam diminuir a distância entre os obtidos nos bioensaios realizados em laboratório e a realidade da difícil execução em campo, passando a ser usado como padrão para testes de residualidade de inseticidas.

Além disso, o estudo pretende esclarecer o *status* de suscetibilidade a inseticidas por meio de bioensaios utilizando amostras de populações de anofelinos provenientes de localidades de áreas endêmicas do estado do Amapá. Dessa forma espera-se contribuir com informações relevantes que ajudem no planejamento e otimização das ações de controle de vetores de malária, de forma racional e econômica, que possam garantir proteção à saúde das populações das áreas de risco.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito residual de inseticidas utilizados no controle de malária e verificar o *status* de susceptibilidade/resistência a inseticidas em populações de *Anopheles* de localidades do estado do Amapá.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito residual de seis formulações de inseticidas (alfacipermetrina SC, lambdacialotrina PM, etofenprox PM, deltametrina WG, bendiocarb PM e pirimiphos-methyl CS) utilizados pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) em paredes de quatro superfícies diferentes em simulado de campo (casa teste);
- Comparar o efeito residual de duas formulações de inseticidas (etofenprox PM, deltametrina WG) em painéis de laboratório, simulado de campo (casa teste), e em casas localizadas em área endêmica nas superfícies de madeira sem pintura-MSP e alvenaria sem reboco-ASR;
- Verificar o efeito residual da formulação de deltametrina SC-PE nos painéis em laboratório em MSP, madeira com pintura-MCP, ASR e alvenaria com reboco-ACR, e no simulado de campo (casa teste) nas mesmas superfícies dos painéis, incluindo as superfícies externas de MCP e ACR.
- Investigar o *status* de susceptibilidade/resistência de populações naturais de anofelinos de três municípios do estado do Amapá, por meio de bioensaios com piretroide e, genotipar a clássica mutação *Kdr* Leu1014Phe em populações de *An. darlingi*.

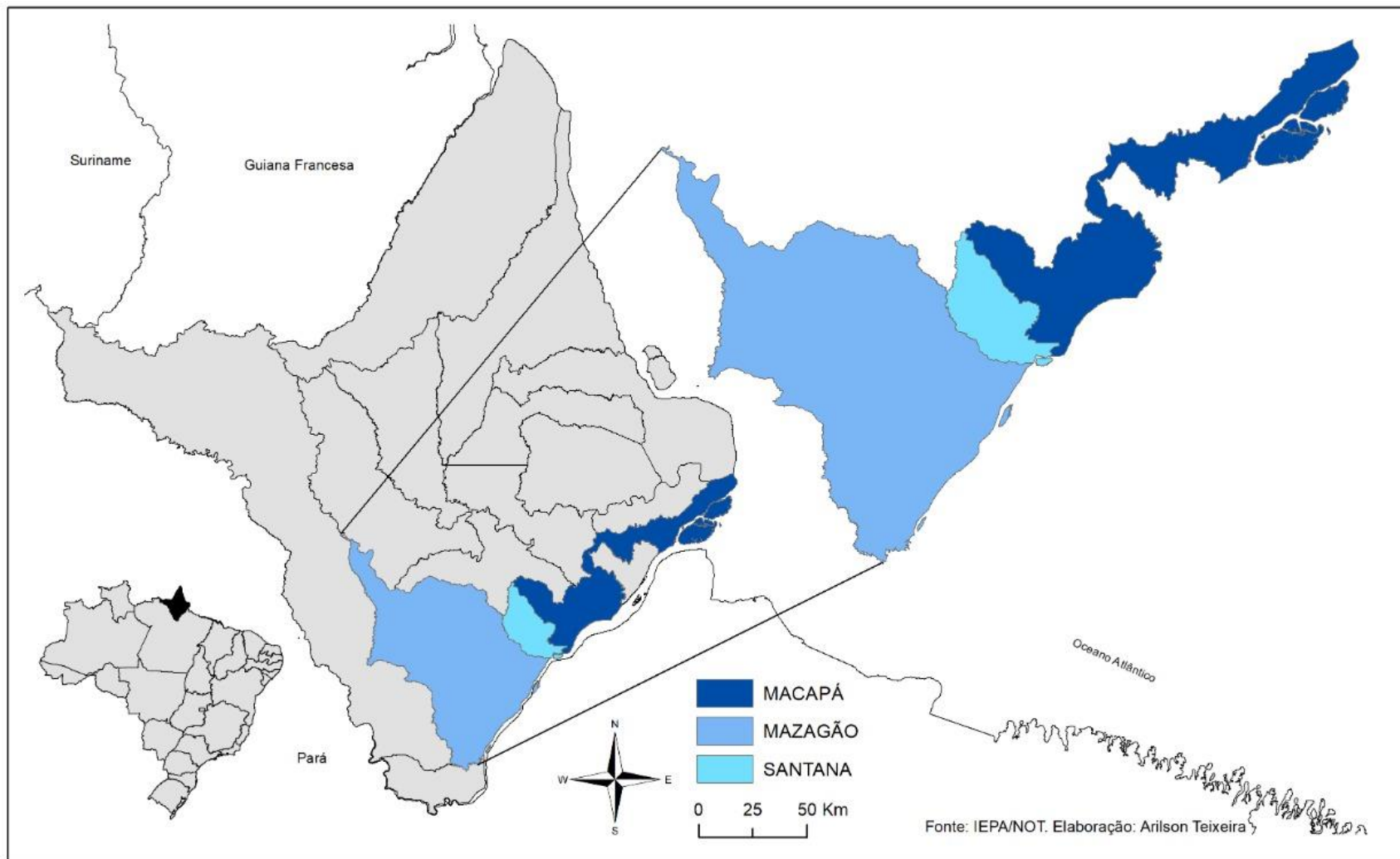
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

“Tudo deve ser feito tão simples quanto possível, mas não mais simples que isso”  
Albert Einstein

#### 3.1 Caracterização da área de estudo

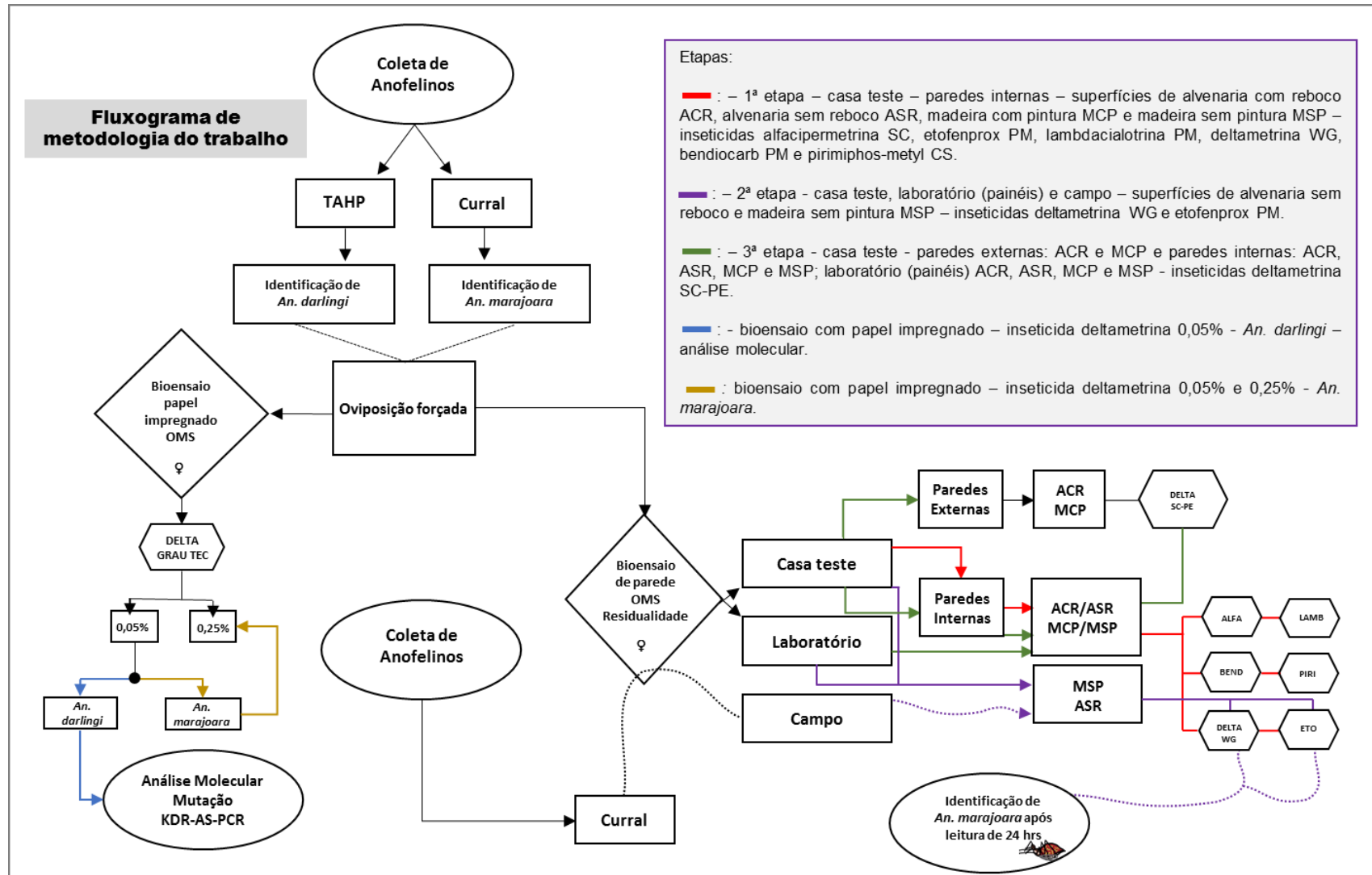
O estudo foi realizado com populações do gênero *Anopheles* em três municípios do estado do Amapá: Macapá, Mazagão e Santana. O estado do Amapá (142.828,521 km<sup>2</sup>) está situado a nordeste da Região Norte, com uma população estimada de 829.494 habitantes (5,81 hab/km<sup>2</sup>) em 2018. O estado do Amapá, em sua totalidade, é influenciado pelo clima equatorial úmido, com quantidade de calor e umidade que favorece a propagação da biodiversidade. As temperaturas médias anuais variam de 20°C a 36°C e a umidade anual gira em torno de 85%. O clima local apresenta duas estações bem definidas, denominadas de verão – julho a dezembro e inverno - janeiro a junho. Os índices pluviométricos anuais apresentam média superior a 2.500mm (IBGE 2018).

A capital Macapá (Figura 3.1) (Latitude: 00°02'18.84" N e Longitude: 51°03'59.10" O), situa-se no sudeste do estado e é a única capital brasileira que não possui interligação por rodovia a outras capitais, sendo também a única cortada pela linha do Equador e que se localiza no litoral do rio Amazonas. O município de Mazagão (Latitude: 00°06'54" S e Longitude: 51°17'20" O), situa-se ao Sul do estado do Amapá, à margem direita do rio Vila Nova, com a sede do município a cerca de 35 km de Macapá (IBGE 2018). O município de Santana (Latitude: 00°02'06" S e Longitude 51°10'30" O) tem uma conurbação com a capital do estado formando a Região Metropolitana de Macapá. É o segundo município mais populoso do estado, com cerca de 120 mil habitantes e é conhecida por Cidade-Porto do Amapá por sediar o principal porto do estado do Amapá. Seus limites são Macapá (a nordeste), a foz do rio Amazonas (a sudeste) e Mazagão (a sudoeste) (IBGE 2018).



**Figura 3.1** – Representação espacial das áreas de estudo: municípios de Macapá, Mazagão e Santana – Amapá, Brasil.

No intuito de facilitar a compreensão da metodologia as etapas foram expostas no fluxograma abaixo:



Legenda: ○ - início e fim do processo; ◇ bioensaios; ⬡ inseticidas; □ etapas do fluxograma

### 3.2 Amostras

As amostras para a realização dos bioensaios foram obtidas a partir de capturas de mosquitos adultos fêmeas do gênero *Anopheles*.

Para as provas biológicas de parede, dos painéis em laboratório, simulados de campo (casa teste) e diretamente em campo, as coletas ocorreram mensalmente durante todo o período dos bioensaios, entre às 18:00h e 21:00h em uma fazenda de bubalinos (Latitude: 00°08'42.8" S e Longitude: 051°18'03.6" W) no município de Mazagão. A localidade foi escolhida em virtude do conhecimento prévio sobre a alta densidade de anofelinos na região, principalmente do complexo albitarsis e especificamente da espécie *An. marajoara* (Conn et al. 2002; Fontoura et al. 2014). Em cada captura participaram quatro ou cinco coletores (técnicos do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA), e cada coletor capturava aproximadamente 300 mosquitos durante o período. As fêmeas alimentadas foram coletadas por aspiração diretamente das paredes dos currais (Figura 3.2) com o auxílio de capturadores de sucção manuais (capturador de Castro) (WHO 1975).



**Figura 3.2** – Captura noturna de anofelinos em curral no município de Mazagão – Amapá, Brasil.

Os espécimes capturados foram transferidos para gaiolas de papelão teladas, medindo 17cm x 18cm nas quais foram colocados cerca de 300 adultos (Figura 3.3) e posteriormente transportados para o Laboratório de Entomologia Médica- IEPA, onde foram alimentadas com solução de sacarose a 10% (*erlenmeyer* com rolo de algodão revestido com gaze) e acondicionadas no insetário para identificação no dia seguinte.

A identificação até a espécie *An. marajoara* foi feita utilizando-se a chave dicotômica de Gorham et al. (1973), com auxílio de microscópio estereoscópico. As demais espécies de anofelinos capturados foram descartadas, utilizando-se somente *An. marajoara*.



**Figura 3.3** – Gaiolas de papelão utilizadas para transporte de anofelinos do local da captura e acondicionamento no insetário do Laboratório de Entomologia Médica do IEPA localizada em Macapá – Amapá, Brasil.

Para a realização das provas biológicas com papel impregnado com inseticida e ensaios moleculares para a detecção da mutação *Kdr* as coletas ocorreram com utilização da técnica de Atração por Humano Protegido (AHP), onde o coletor, expõe suas pernas protegidas por meias grossas na cor preta e coleta os anofelinos no momento que pousam em suas pernas utilizando um aspirador de sucção manual (capturador de Castro), antes que realizem o repasto sanguíneo (Lima et al. 2014; Lima et al. 2017). As coletas de seis horas foram realizadas em áreas endêmicas para malária a partir das 18:00h no peridomicílio de habitações próximas de potenciais criadouros (margens de rios, lagos e tanques para criação de peixes) nos municípios de Macapá (Latitude: 00°08'01.7" N e Longitude: 051°11'07.1" W), Mazagão (Latitude: 00°07'02.4" S e Longitude: 051°18'05.1" W) e Santana (Latitude: 00°05'28.803" N e Longitude 051°12'37.203" W).

As fêmeas capturadas colocadas em gaiolas de papelão teladas foram transportadas para o insetário do Laboratório de Entomologia Médica- IEPA, para identificação até a espécie *An. darlingi* de acordo com a chave dicotômica de Gorham et al. (1973), com auxílio de microscópio estereoscópico.



- Obtenção da geração F1

A manutenção dos mosquitos no insetário do Laboratório de Entomologia-IEPA, seguiu de acordo com adaptações feitas ao protocolo de Horosko et al. (1997).

Para a postura dos ovos utilizou-se potes transparentes plásticos com capacidade para 500mL (aproximadamente 8cm de altura X 11cm de diâmetro), forrados internamente (nas laterais), com tiras de papel filtro (Figura 3.4). Foi adicionado água de criadouro até metade dos potes, tendo-se o cuidado de umedecer o papel-filtro. A água de criadouro foi proveniente de tanques de piscicultura localizados no município de Macapá (Latitude: 00°01'78.9" S e Longitude: 051°11'88.8" W), posteriormente armazenada em depósitos de 50L contendo bomba de aquário instalada para auxiliar na oxigenação da água.

No insetário os potes foram preparados com a água, cobertos com filó, contendo um pequeno furo central e fechados com algodão, para a introdução dos mosquitos com auxílio de capturador de Castro. A oviposição se fez com as fêmeas alimentadas, após um período de 72h do repasto sanguíneo. Em cada pote etiquetado com a descrição da espécie, local de captura e data da oviposição, foi colocado de 10 a 15 fêmeas de *Anopheles* e algodão sobre o filó com solução de sacarose à 10% por um período de dois dias. Depois da postura dos ovos, as fêmeas vivas foram retiradas dos potes e colocadas em gaiola para nova alimentação sanguínea e as mortas descartadas. Assim que houve a eclosão das larvas, o conteúdo de cada pote foi transferido para bacias plásticas igualmente identificadas. As tiras de papel filtro foram mantidas sob a possibilidade da existência de ovos ainda não eclodidos, além de servirem como primeira alimentação para as larvas.



**Figura 3.4** – Postura de ovos de *Anopheles*: A- adição de fêmeas para oviposição. B- pote para postura e eclosão de ovos no insetário do Laboratório de Entomologia Médica- IEPA localizada em Macapá-Amapá, Brasil.

Para criação foram mantidas em média 100 larvas em uma bacia medindo 33cm X 24cm contendo um litro de água de criadouro. A alimentação das larvas foi feita com ração para peixe da marca Tetramim (tropical *Flakes*) em flocos triturada em peneiras de inox, acondicionada em *ependorf* e armazenados no freezer (temperatura inferior a 5°C). A ração foi polvilhada manualmente uma ou duas vezes ao dia, de acordo com a necessidade.

As bacias contendo as larvas (Figura 3.5) foram mantidas em estantes de madeira ou de ferro forradas com isopor (para evitar grandes variações da temperatura da água). A temperatura e umidade relativa do ar foram controladas e mantidas entre  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 70-80% de URA. Quando da necessidade da obtenção dos adultos de forma mais rápida, reduziu-se a densidade de larvas por bacias, manteve-se a temperatura mais elevada (não ultrapassando 28°C) e aumentou-se a oferta de alimento, sem prejudicar a oxigenação da água até que as larvas atingissem a fase de pupa.



**Figura 3.5** – Criação de larvas de *Anopheles*: disposição das bandejas com larvas no insetário do Laboratório de Entomologia Médica– IEPA.

As pupas foram coletadas diariamente e transferidas para copos plásticos com capacidade para 50mL com auxílio de pipetas *pasteur* (150 pupas por copo). Os copos foram inseridos nas gaiolas que continham *erlenmeyer* com solução de sacarose a 10% (no máximo 300 pupas por gaiola coletadas em até três dias), que foram mantidas até a emergência dos adultos. Cada gaiola foi identificada com data de abertura além das mesmas especificações da bacia de onde as pupas foram retiradas, sendo inspecionadas diariamente, para retiradas dos copos dos quais os adultos emergiram. A alimentação foi ofertada continuamente, com troca dos *erlenmeyer* duas vezes na semana. A criação dos mosquitos foi realizada com temperatura e umidade relativa do ar controlada e mantida a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para avaliar a diversidade genética, por meio da análise molecular dos genes relacionado à resistência em amostragem de anofelinos, todo o material foi preservado em sílica para posterior análises moleculares e transportado para o Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores- LAFICAVE dentro das regras de segurança vigentes.

### 3.3 Inseticidas

Foram avaliadas seis formulações de inseticidas, sendo a primeira análise com três piretroides e a segunda análise com um piretroide, um carbamato e um organofosforado. Não houve um critério específico na escolha da ordem de aplicação dos inseticidas, e como tinham quatro inseticidas da classe dos piretroides, optou-se por iniciar os bioensaios com três destes.

Os produtos químicos foram utilizados nas concentrações máximas para cada formulação de acordo com recomendação da WHOPES (FAO/WHO 2016; WHOPES 2018) e incluíram: 1) alfacipermetrina - ALFATEK<sup>®</sup> 200 SC, pulverizados na concentração de 0,03g. i.a./m<sup>2</sup> (grama do ingrediente ativo), lambdacialotrina - ICON<sup>®</sup> 10 PM pulverizados na concentração de 0,03g. i.a./m<sup>2</sup> e etofenprox - VECTRON<sup>®</sup> 20 PM, pulverizado a 0,3g.i.a./m<sup>2</sup>. 2) deltametrina – DELTAGARD<sup>®</sup> 250 WG a 0,025g.i.a./m<sup>2</sup>, bendiocarb - FICAM<sup>®</sup> VC – PM a 0,4g.i.a./m<sup>2</sup>, pirimiphos-methyl – amostra experimental (Syngenta, Suíça) CS a 1g.i.a./m<sup>2</sup> e deltametrina K-Othrin Polyzone<sup>®</sup> 62,5 SC-PE (Bayer CropScience) a 0,025g.i.a./m<sup>2</sup>. Os compostos possuem aprovação total ou provisória da OMS e representam uma diversidade de inseticidas utilizados no controle vetorial (Quadro 3.1).

**Quadro 3.1** – Inseticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde - OMS para borrifação residual intradomiciliar - BRI no controle dos vetores da malária, das formulações avaliadas no simulado de campo em casa teste, Macapá-AP, Brasil.

Inseticida	Classe	Dosagem (g.i.a./m <sup>2</sup> )	Modo de ação	Residualidade (meses)
Alfacipermetrina SC	Piretroide	0,02 – 0,03	Contato	4 – 6
Etofenprox PM	Piretroide	0,1 – 0,3	Contato	3 – 6
Lambidacialotrina PM	Piretroide	0,02 – 0,03	Contato	3 – 6
Deltametrina 250 WG	Piretroide	0,02 – 0,025	Contato	3 – 6
Bendiocarb PM	Carbamato	0,1 – 0,4	Contato/ no ar	2 – 6
Pirimiphos-methyl CS	Organofosforado	1	Contato/ no ar	4 – 6
Deltametrina SC-PE	Piretroide	0,02 – 0,025	Contato	6

Fonte: WHOPES, 2018

### 3.4 Bioensaios de parede – testes de eficácia residual

Os bioensaios foram divididos em duas etapas:

1ª - avaliação dos inseticidas em simulado de campo;

2ª - comparação da residualidade dos inseticidas em painéis em laboratório, simulado de campo e diretamente no campo.

Foi necessário a construção de um ambiente que representasse as habitações mais comuns encontradas na região Amazônica em áreas endêmicas para malária. A edificação foi denominada de “casa teste”.

#### 3.4.1 “Casa Teste”

A escolha das superfícies para as paredes da casa teste foi baseada na observação direta das características típicas das casas na região amazônica. Portanto, considerando-se que as áreas onde a malária é endêmica são geralmente rurais (por exemplo, assentamentos, aldeias e distritos) ou de floresta, as moradias nesses locais costumam apresentar materiais de construção como madeira (abundante na região), tijolos e cimento, juntamente com telhados de palha, telhas cerâmicas ou cimento.

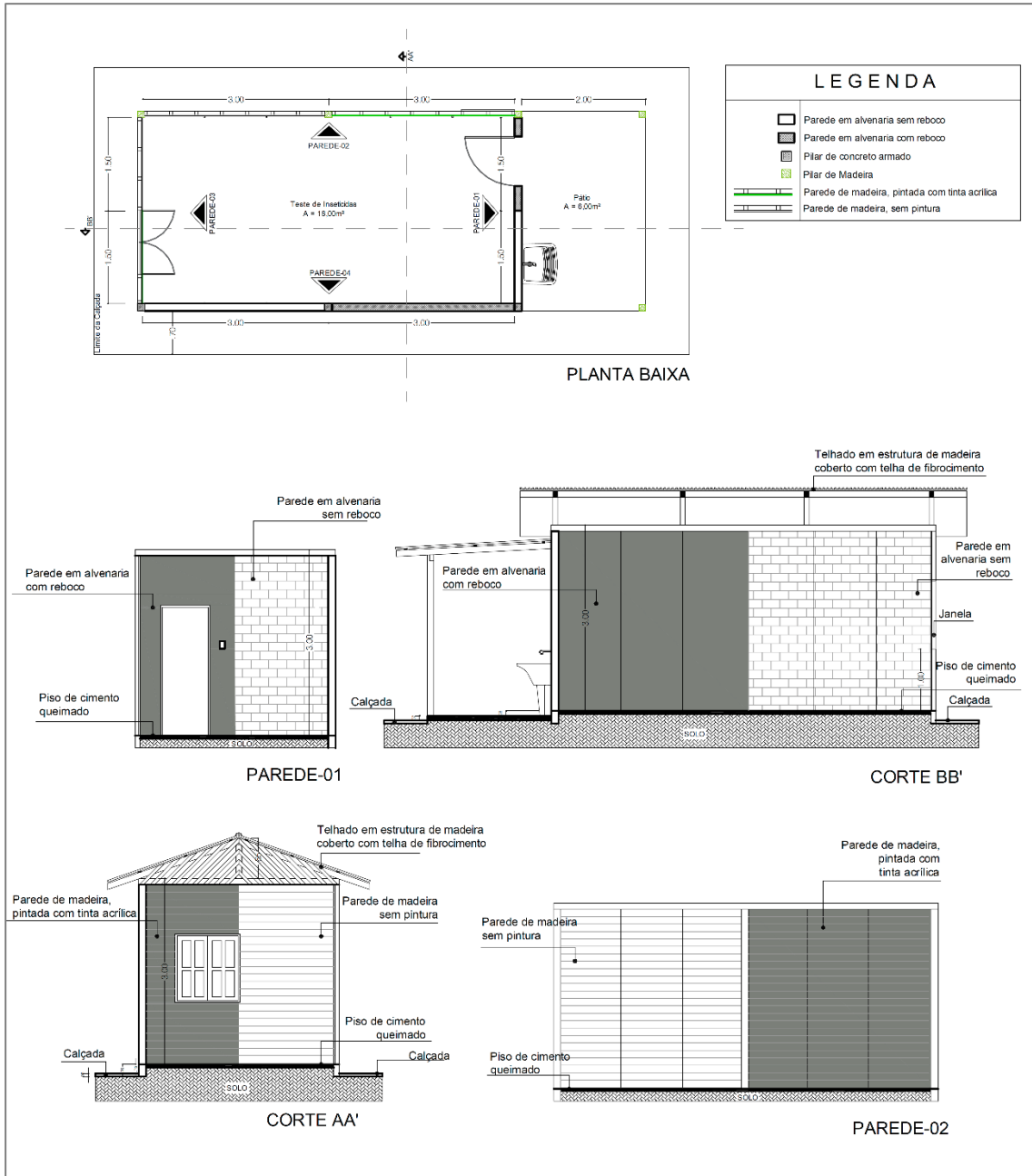
Dessa forma, uma casa teste foi construída na área externa do Laboratório de Entomologia Médica- IEPA (Latitude: 00°03'86.0" S e Longitude: 051°09'37.8" W) com as seguintes características: cômodo único, possuindo internamente três metros de largura, seis metros de comprimento; três metros de pé direito; cobertura de telha de fibrocimento; sem forro; piso queimado, com uma janela medindo (1m x 0,74m) e uma porta de madeira medindo (0,85m x 2,10m). Externamente possui um calçamento de 0,70m de largura que a circunda e ainda um pátio frontal de dois metros mantendo as características de piso e cobertura. A casa é uma edificação mista, tem a estrutura em esteios de madeira de lei, com alicerce de alvenaria (tijolos e alvenaria) (Figura 3.6).

A parede frontal e uma parede lateral foram construídas em alvenaria, a outra parede lateral e o fundo da casa foram construídos em madeira. Cada parede lateral foi dividida em duas partes, na parede de alvenaria, uma parte ficou de tijolo aparente e a outra recebeu reboco, formando as superfícies de alvenaria sem reboco (ASR) e alvenaria com reboco (ACR). Na parede de madeira, uma parte recebeu tinta acrílica branca e a outra não, formando as superfícies de madeira sem pintura (MSP) e madeira com pintura (MCP). A parede frontal em alvenaria, foi dividida em duas partes ASR e ACR perfazendo as superfícies utilizados como controle. O mesmo

procedimento foi realizado na parede do fundo em madeira, onde as superfícies MSP e MCP serviram de controle. Cada superfície das paredes laterais foi dividida em três faixas de um metro de largura e cada faixa recebeu um inseticida (Figura 3.7). Esta casa teste possibilitou a realização e avaliação de todos os inseticidas.



**Figura 3.6** – Casa teste: A - visão externa frontal e lateral da superfície de alvenaria com reboco - ACR pintada de tinta acrílica; B - visão interna das superfícies lateral de alvenaria sem reboco - ASR e ACR divididas em faixas para aplicação dos inseticidas, visão da parede dos fundos (controle) das superfícies de madeira com pintura - MCP e madeira sem pintura - MSP, teto com telhas de fibrocimento e piso em cimento queimado. Localizada no município de Macapá-Amapá, Brasil.



**Figura 3.7** – Representações da casa teste construída em Macapá-Amapá, Brasil: A - planta baixa, planos frontal e lateral das superfícies de alvenaria com reboco - ACR e alvenaria sem reboco - ASR. B - planos dos fundos e lateral das superfícies de madeira com pintura - MCP e madeira sem pintura - MSP.



### **3.4.2 Bioensaios em simulado de campo – casa teste**

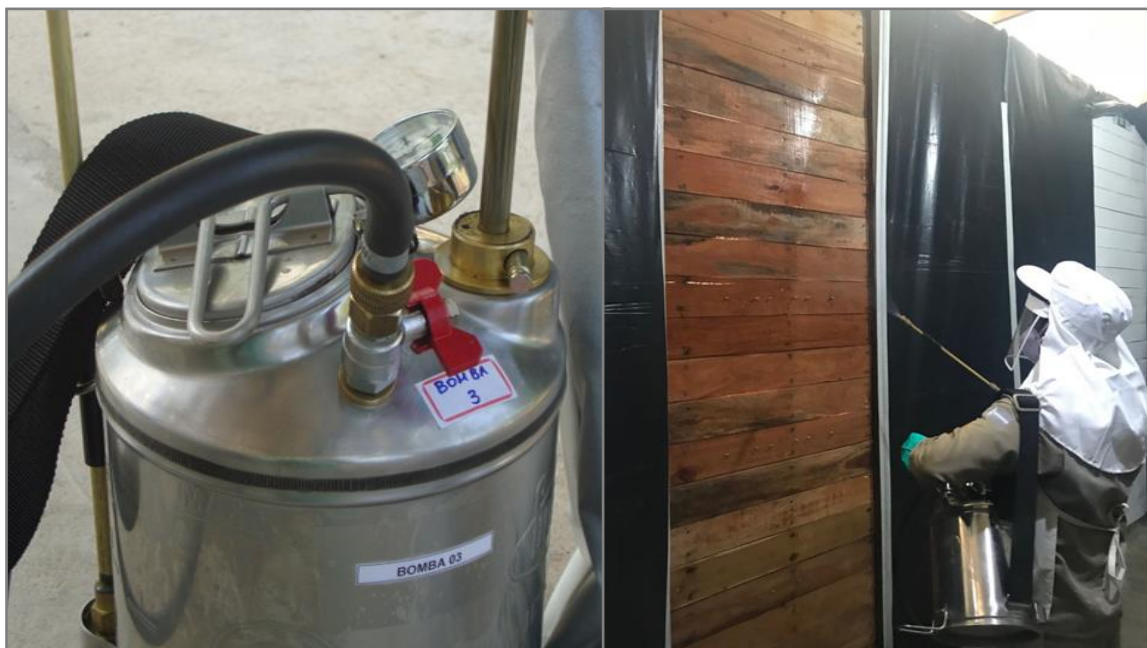
Os bioensaios para avaliação da eficácia residual em simulado de campo na casa teste foram realizados com a aplicação de seis inseticidas e ocorreram no período de outubro de 2014 a março de 2016, na área externa do Laboratório de Entomologia Médica- IEPA, em duas etapas:

1ª Etapa: ocorreu entre outubro de 2014 e abril de 2015, onde foram testados três inseticidas da classe dos piretroides - alfacipermetrina SC, etofenprox PM, lambidacialotrina PM.

2ª Etapa: ocorreu entre maio de 2015 e março de 2016 onde foram testados os inseticidas deltametrina WG (piretroide), bendiocarb PM (carbamato) e pirimiphos-metyl CS (organofosforado).

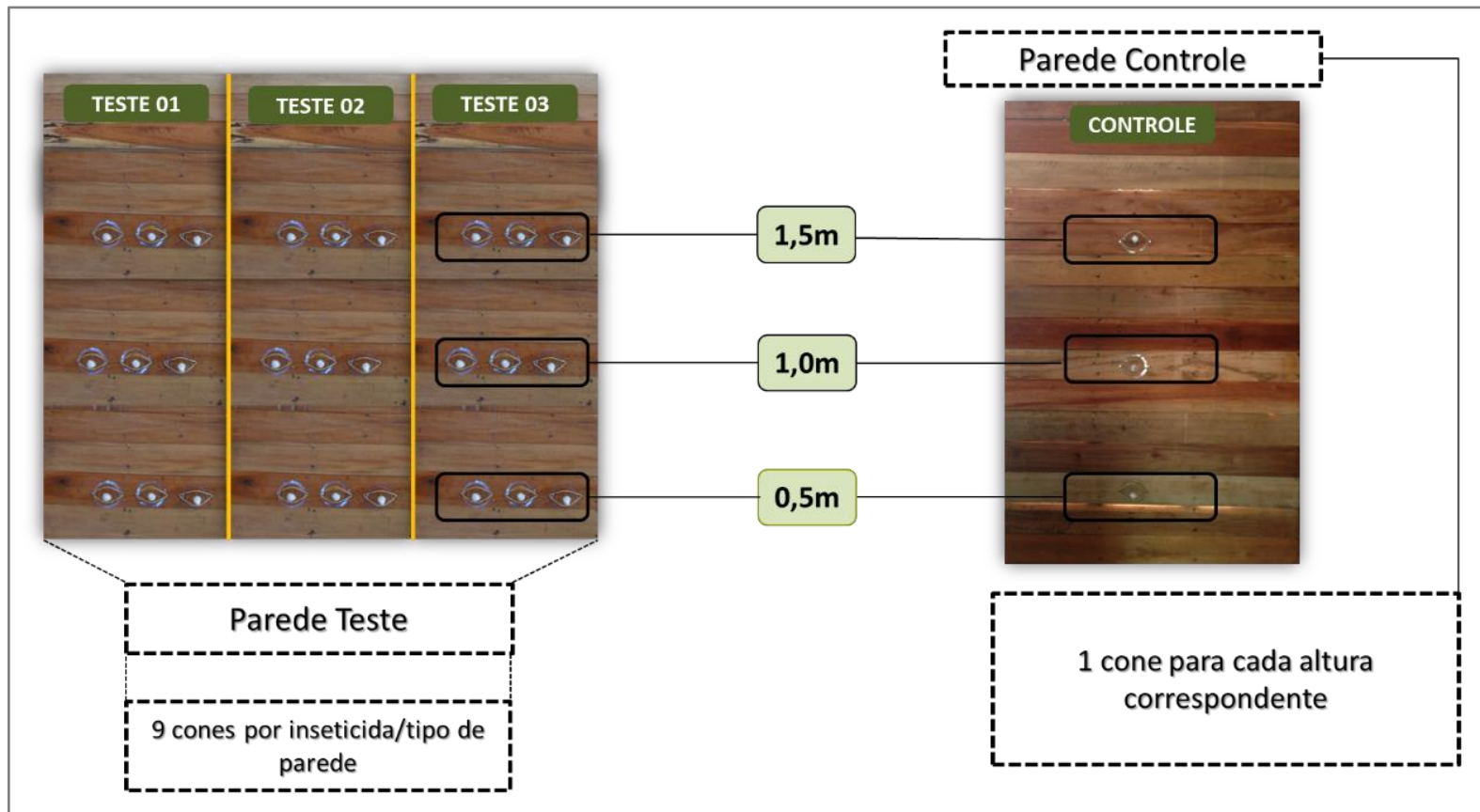
Entre uma etapa e outra foi realizada a limpeza da casa teste, que teve suas paredes lavadas com sabão neutro e uma lavadora de alta pressão para a total remoção dos resíduos dos inseticidas aplicados. Após a lavagem das paredes a taxa de mortalidade foi analisada com a realização de bioensaios de parede, seguindo a metodologia recomendada, esperando-se 0% de mortalidade. Após essa observação, todas as superfícies internas da casa teste foram liberadas para novas aplicações de inseticidas.

Nas duas etapas aplicou-se os inseticidas diluídos em água nas paredes internas da casa teste com exceção das faixas de controle, utilizando-se uma bomba do tipo Hudson X-Pert bico 8002-E, a aplicação foi realizada por técnico capacitado da Coordenadoria de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde do Estado do Amapá-CVS/SESA. Todas as borrifações foram supervisionadas e os procedimentos seguiram as orientações da OMS, com especificações de pressurização de 25-55 (psi), distância de 45cm da ponta do bico para a superfície borrifada, e largura da faixa borrifada de 75cm (WHO 2006a, 2007, 2015c) (Figura 3.8).



**Figura 3.8** – Borrifação residual intradomiciliar da casa teste: A - bomba utilizada para borrifação e B - aplicação do inseticida (borrifação) no município de Macapá- Amapá, Brasil.

Durante a realização dos bioensaios, cada faixa por tipo de superfície testada recebeu nove cones plásticos, sendo distribuídos três nas alturas correspondentes a 0,5; 1,0 e 1,5 metros a partir do solo. Utilizou-se nas paredes controle um cone para cada uma das alturas (Figura 3.9). Todos os cones receberam aproximadamente 15 mosquitos (WHO 1981b, 2006a). Após 30 minutos de exposição às paredes tratadas e ao controle, os mosquitos foram transferidos dos cones para copos entomológicos limpos, onde realizou-se a primeira leitura. Posteriormente, os mosquitos foram levados para o laboratório de Entomologia Médica do IEPA, localizado a aproximadamente 50m da casa teste e armazenados em câmara úmida, com temperatura entre 25 e 27°C e umidade relativa entre 70 a 80%. Os mosquitos foram alimentados com algodão embebidos com solução de sacarose a 10%.



**Figura 3.9** – Representação dos cones em paredes da casa teste localizada no município de Macapá – Amapá, Brasil.

A taxa de mortalidade foi calculada 24 horas após o término do teste, considerando-se vivos os mosquitos capazes de voar após leve agito no copo entomológico, independente do grau de dano sofrido. Pela fórmula de *Abbott*:

$$\frac{\% \text{ de mortalidade nos expostos} - \% \text{ de mortalidade nos controles}}{100 - \% \text{ de mortalidade nos controles}} \times 100$$

Realizou-se a correção para taxas de mortalidade entre 5% e 20% do grupo controle, não havendo correção para taxa de mortalidade inferior a 5%, e repetição do bioensaio para taxas igual ou superior a 20% (Abbott 1925). Todas as informações foram registradas em um Boletim para Provas Biológicas de Parede (APÊNDICE A).

O primeiro bioensaio foi realizado um dia após a aplicação dos inseticidas e, os seguintes, com intervalo de 30 dias aproximadamente. Para efeito de análise, foram estabelecidas como satisfatórias, taxas de mortalidade superiores ou iguais a 80% no grupo de expostos (WHO 2006a). Os bioensaios foram mantidos até que a taxa de mortalidade fosse inferior a 80% por dois meses consecutivos, ou por até 240 dias após a borrifação das superfícies.

Ao final desses testes, foram selecionados dois inseticidas (etofenprox PM e deltametrina WG) conforme os quesitos: residualidade; toxicidade durante os bioensaios e histórico de resistência no país, e foram selecionadas duas superfícies (Madeira sem Pintura - MSP e Alvenaria sem Reboco - ASR) onde o etofenprox PM e o deltametrina WG foram posteriormente testados em simulado de campo (casa teste), de acordo com a metodologia descrita acima, e, nos painéis em laboratório e em situação de campo, como descrito a seguir.

Além desses inseticidas, a formulação deltametrina SC-PE foi testada. Desta forma, outra série de experimentos foi realizada nos painéis em laboratório e na casa teste nas quatro superfícies internas (MSP, MCP, ASR e ACR), e nas superfícies externas de MCP e ACR.

### **3.4.3 Bioensaios nos painéis em laboratório**

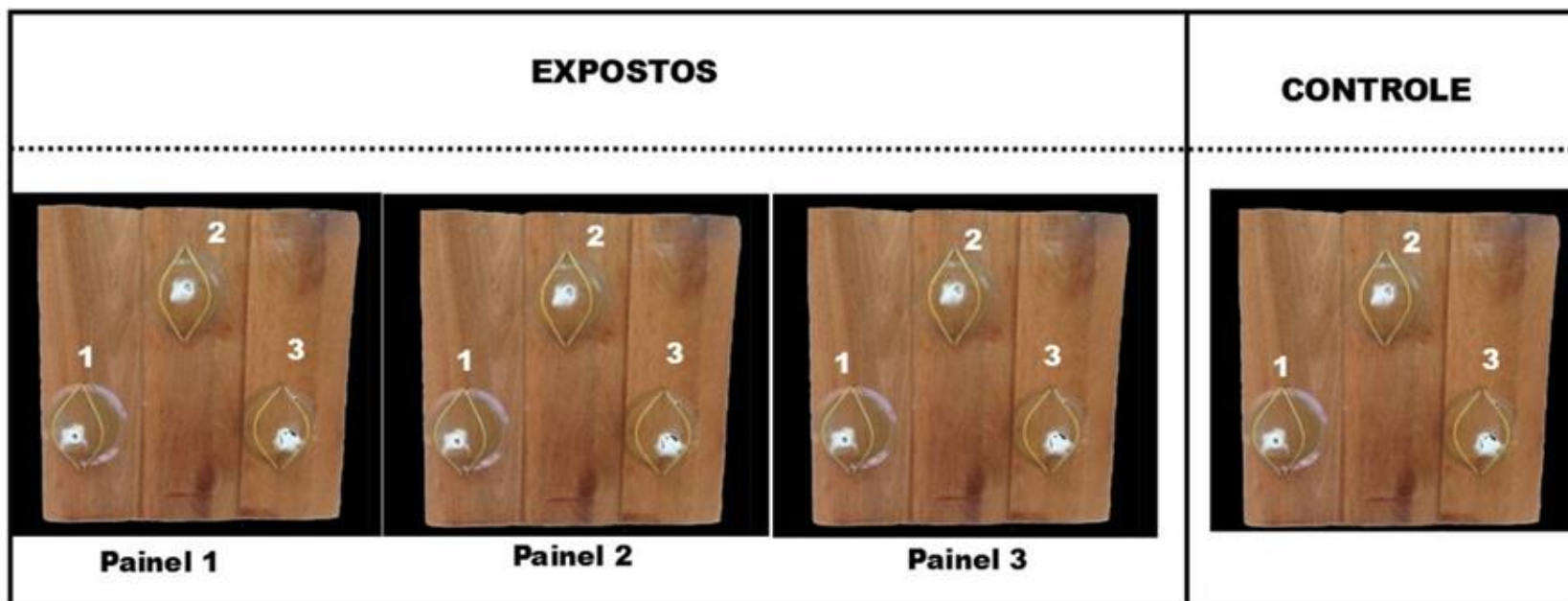
Os bioensaios para avaliação da eficácia residual nos painéis em laboratório ocorreram em sala restrita e reservada no Laboratório de Entomologia do IEPA nos períodos entre março e setembro de 2017 para o etofenprox PM, de abril a outubro de 2018 para o deltametrina WG e no período entre março de 2018 a março de 2019 para o deltametrina SC-PE, seguindo-se as recomendações da OMS (WHO 1981b).

Os painéis quadrados com dimensão de 0,50cm foram construídos nas dependências do IEPA, com as superfícies de MSP, MCP, ASR e ACR. Os inseticidas utilizados foram os piretroides etofenprox PM, deltametrina WG e deltametrina SC-PE. Um total de cinco painéis foram construídos para cada tipo de superfície, onde em quatro foram aplicados o inseticida e em um apenas água servindo de controle (Quadro 3.2).

Para a avaliação de eficácia residual foram utilizados três painéis expostos ao inseticida para cada tipo de superfície e um painel controle (o quarto painel exposto aos inseticidas ficou como reserva para uma eventual necessidade de uso, garantindo assim a continuidade do experimento). Diretamente sobre cada painel foram fixados três cones plástico com ligas elásticas (Figura 3.10).

**Quadro 3.2** – Inseticida, tipos de superfícies e quantidades de painéis utilizados nos bioensaios em laboratório.

Inseticidas	Superfícies	Painéis	
		Expostos	Controle
Etofenprox PM	ASR	04	01
	MSP	04	01
Deltametrina WG	ASR	04	01
	MSP	04	01
Deltametrina SC-PE	MSP	04	01
	MCP	04	01
	ASR	04	01
	ACR	04	01



**Figura 3.10** – Representação dos painéis utilizados nos bioensaios para verificar a residualidade dos inseticidas: painéis tratados com inseticida e painel controle, borrifado com água; disposição dos cones plásticos nos painéis.

As doses de inseticida foram preparadas no Laboratório de Entomologia Médica do IEPA com o auxílio de proveta graduada nas concentrações demonstradas no quadro abaixo, de acordo com recomendação da WHOPES (2018) (Quadro 3.3).

**Quadro 3.3** – Inseticidas utilizados nos bioensaios de parede: teste de residualidade.

Inseticida	Classe	Dosagem (g.i.a./m <sup>2</sup> )	Modo de ação	Residualidade (meses)
Etofenprox PM	Piretroide	0,1 - 0,3	Contato	3 - 6
Deltametrina 250 WG	Piretroide	0,02 – 0,025	Contato	3 - 6
Deltametrina SC-PE	Piretroide	0,02 – 0,025	Contato	6

Fonte: WHOPES, 2018

A aplicação dos inseticidas nos painéis ocorreu na área externa do Laboratório de Entomologia Médica do IEPA, utilizando-se para esta atividade o mesmo equipamento usado nas operações de campo pelos serviços municipal e estadual de controle da malária, bomba do tipo Hudson X-Pert bico 8002-E, realizada por técnico capacitado da Coordenadoria de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde do Estado do Amapá- CVS/SESA. As borrifações de acordo com as orientações da OMS seguiram as especificações de pressurização de 25-55 (psi), distância de 45cm da ponta do bico para a superfície borrifada (OMS 2002; WHO 2006a, 2015c) sob supervisão, expondo assim os painéis com superfície de MSP e ASR aos inseticidas etofenprox PM e deltametrina WG e os painéis com superfícies de MSP, MCP, ASR e ACR ao inseticida deltametrina SC-PE (Figura 3.11).

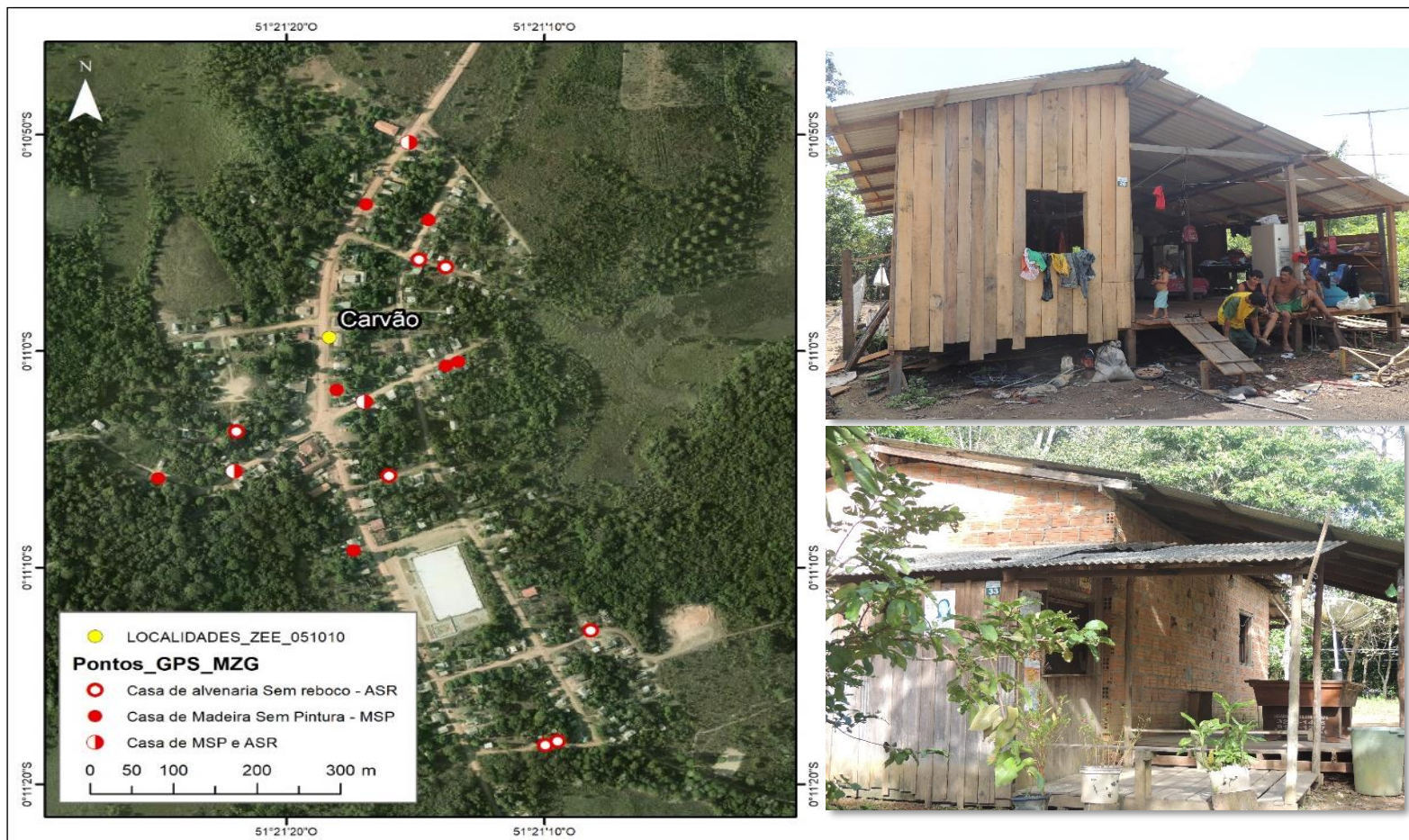


**Figura 3.11** – Representação da borrifação de painéis para bioensaio de parede: A - painéis de madeira sem pintura; B - abastecimento da bomba com inseticida e C - borrifação dos painéis.

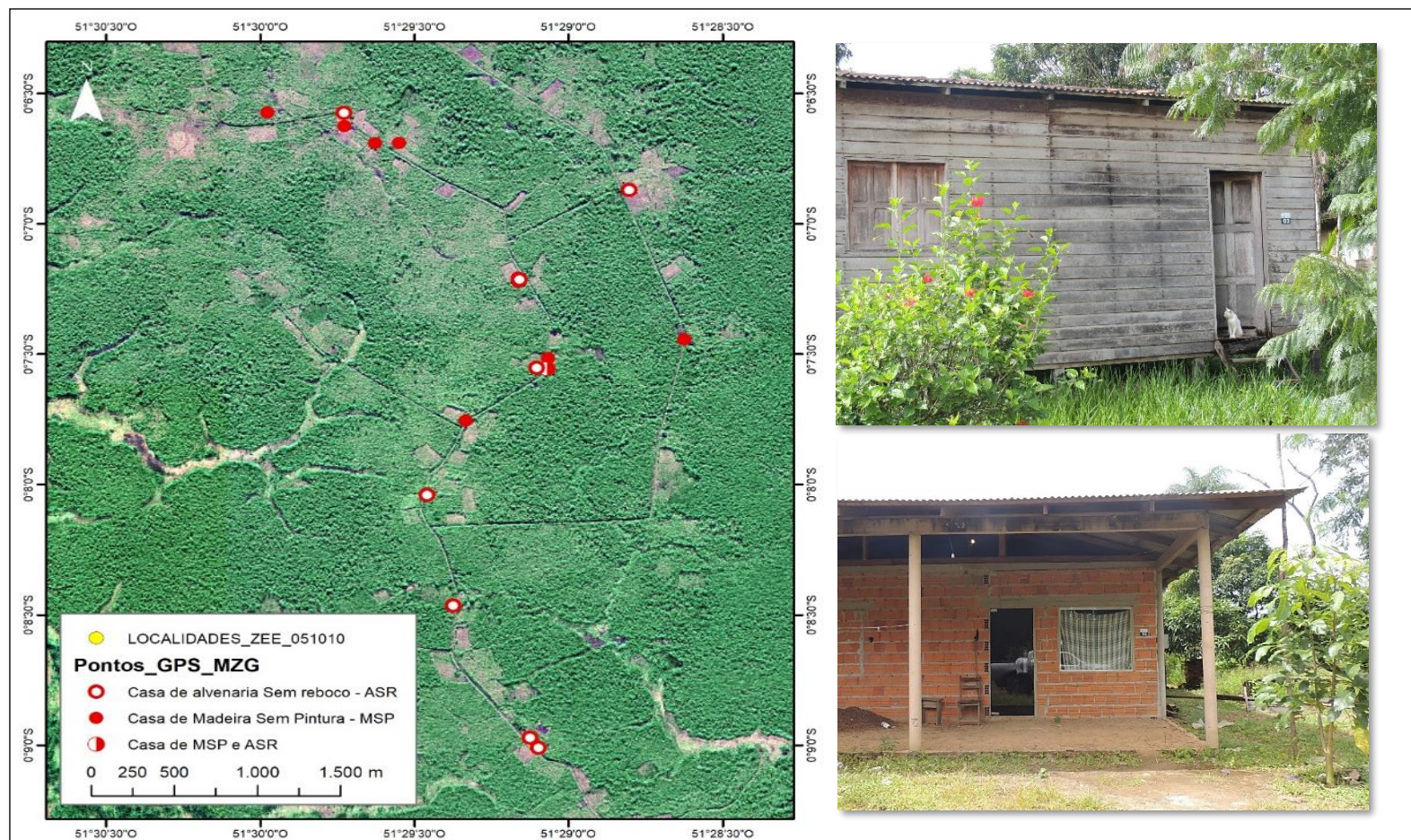
#### **3.4.4 Bioensaios em campo**

Para os bioensaios em situação de campo foram utilizadas residências construídas em MSP e ASR no município de Mazagão. Especificamente no distrito do Carvão (Figura 3.12), no período de março a setembro de 2017, e no assentamento do Piquiazal (Figura 3.13), no período de abril a outubro de 2018 (ambas em área endêmica para malária).





**Figura 3.12** – Habitações com paredes de madeira sem pintura - MSP e alvenaria sem reboco - ASR no distrito do Carvão no município de Mazagão – Amapá, Brasil.



**Figura 3.13** – Habitações com paredes de madeira sem pintura - MSP e alvenaria sem reboco - ASR no assentamento do Piquiazal no município de Mazagão – Amapá, Brasil.

A aplicação dos inseticidas etofenprox PM e deltametrina WG foi realizada nas paredes internas das residências, com bomba do tipo Hudson X-Pert bico 8002-E, por técnicos capacitados do Departamento de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Mazagão, no Distrito do Carvão e no Assentamento do Piquiazal. A atividade ocorreu de acordo com as orientações da OMS (WHO 1981b) sob supervisão (Figura 3.14). As especificações de pressurização de 25-55 (psi), distância de 45cm da ponta do bico para a superfície borrifada, e largura da faixa borrifada de 75cm foram seguidas (OMS 2002; WHO 2006a, 2015c).



**Figura 3.14** – Borrifação residual intradomiciliar – BRI: A – residência de alvenaria sem reboco – ASR; B – residência de madeira sem pintura – MSP. Aplicação dos inseticidas realizada por técnicos do Departamento de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Mazagão – Amapá, Brasil.

Para estes bioensaios 40 unidades residenciais (casas) receberam BRI, sendo 20 casas no Distrito do Carvão (10 em MSP e 10 em ASR) borrifadas com etofenprox PM e, 20 casas no Assentamento do Piquiazal (10 em MSP e 10 em ASR) borrifadas com deltametrina WG, totalizando assim, 20 residências por inseticida. A escolha destas unidades foi realizada de forma randomizada sem reposição, onde a avaliação ocorreu mensalmente em triplicata, ou seja, em três residências tratadas por tipo de inseticida e superfície, totalizando assim 12 avaliações mensais. Os bioensaios foram realizados em uma das paredes de cada residência, com a disposição de três cones plásticos sendo um em cada altura diferente (0,5; 1,0 e 1,5m) a partir do solo, com média de 15 mosquitos cada. Em uma das paredes de cada residência, o bioensaio

ocorreu com o cone colocado sobre um papel limpo, para evitar o contato dos mosquitos com o inseticida, caracterizando o controle (Figura 3.15).



**Figura 3.15** – Bioensaios de parede diretamente no campo em residência com parede de alvenaria sem reboco – ASR no município de Mazagão – Amapá, Brasil.

Após 30 minutos de exposição nas paredes tratadas, os mosquitos foram transferidos dos cones para copos entomológicos limpos, quando foi registrado o número de caídos. Posteriormente, os mosquitos foram armazenados em câmara úmida, com temperatura entre 25 e 27°C e a umidade relativa entre 70 a 80% e alimentados com solução de sacarose a 10%. A taxa de mortalidade foi registrada após 24 horas do término do teste, e foram considerados vivos os mosquitos capazes de voar após suave agito no copo entomológico, independente do grau de dano sofrido. Pela fórmula de *Abbott*, realizou-se a correção da taxa de mortalidade entre 5% e 20% do grupo controle. Não havendo correção para taxa de mortalidade inferior a 5%, e ocorrendo a repetição do bioensaio para taxa de mortalidade igual ou superior a 20% (Abbott 1925).

As fêmeas de mosquito do gênero *Anopheles* utilizados nos ensaios foram capturados na noite anterior, de acordo com o descrito anteriormente no município de Mazagão. O primeiro bioensaio ocorreu um dia após a aplicação dos inseticidas respectivamente para cada localidade, e os bioensaios seguintes mantiveram um intervalo de aproximadamente 30 dias. Para efeito de análise foram estabelecidas como satisfatórias taxas de mortalidade superiores ou igual a 80% no grupo de expostos. Os bioensaios foram mantidos por seis meses, tempo máximo de residualidade determinado pelo WHOPES (2018).

### **3.5 Definição do *status* de suscetibilidade/resistência a piretroides**

#### **3.5.1 Bioensaios com papel impregnado**

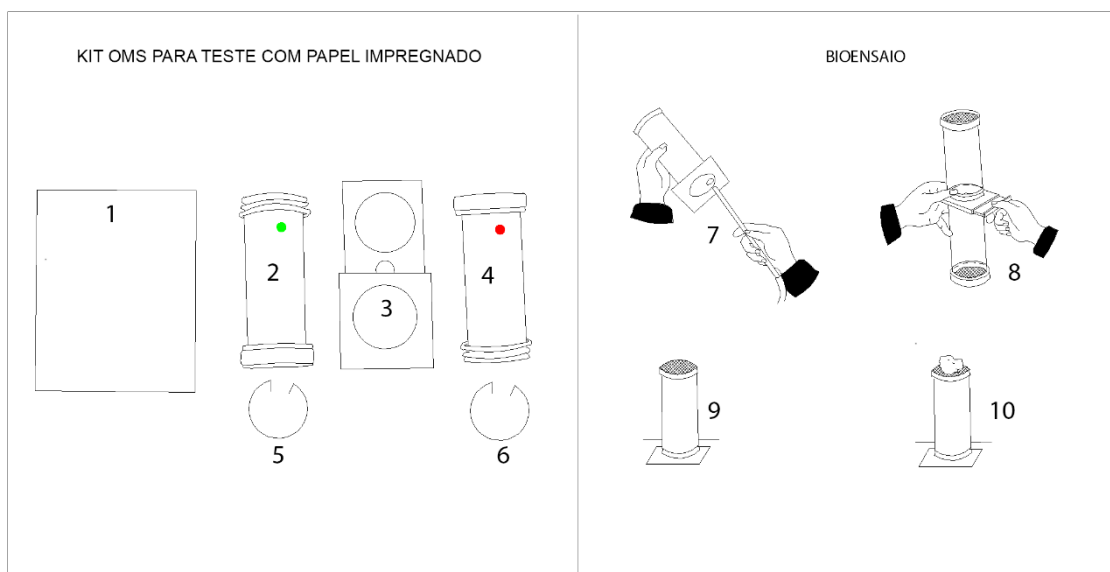
Os papéis utilizados neste bioensaio foram previamente impregnados (Figura 3.16) no LAFICAVE, conforme adaptação (utilização do aparato de suporte em acrílico e uso de pipeta multicanal) à metodologia da WHO (1998). Para as impregnações foram utilizados papéis filtro *Whatman* N° 1, nas dimensões 12cm x 15cm (180cm<sup>2</sup>). Em cada papel foram adicionados um total de 960µL de solução de inseticida com concentração determinada. A solução foi preparada com diluição do inseticida em acetona e óleo silicone (Dow Corning® 556), utilizando o piretroide deltametrina Pestanal® (Sigma-Aldrich – 99,9%i.a.) em uma concentração diagnóstica de 0,05% recomendada pela WHO (2016).

Para definição do *status* de suscetibilidade/resistência foram realizados ensaios de tubo com papel impregnado utilizando fêmeas de *An. darlingi* (1 a 5 dias de emergidas e não alimentadas com sangue) provenientes de três localidades: Macapá, Santana e Mazagão e de *An. marajoara* do município de Mazagão. Os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica do IEPA.



**Figura 3.16** – Procedimento de impregnação de papel com inseticida: A – suporte em acrílico; B – impregnação com pipeta multicanal de deltametrina 0,05%. Realizado no LAFICAVE- FIOCRUZ.

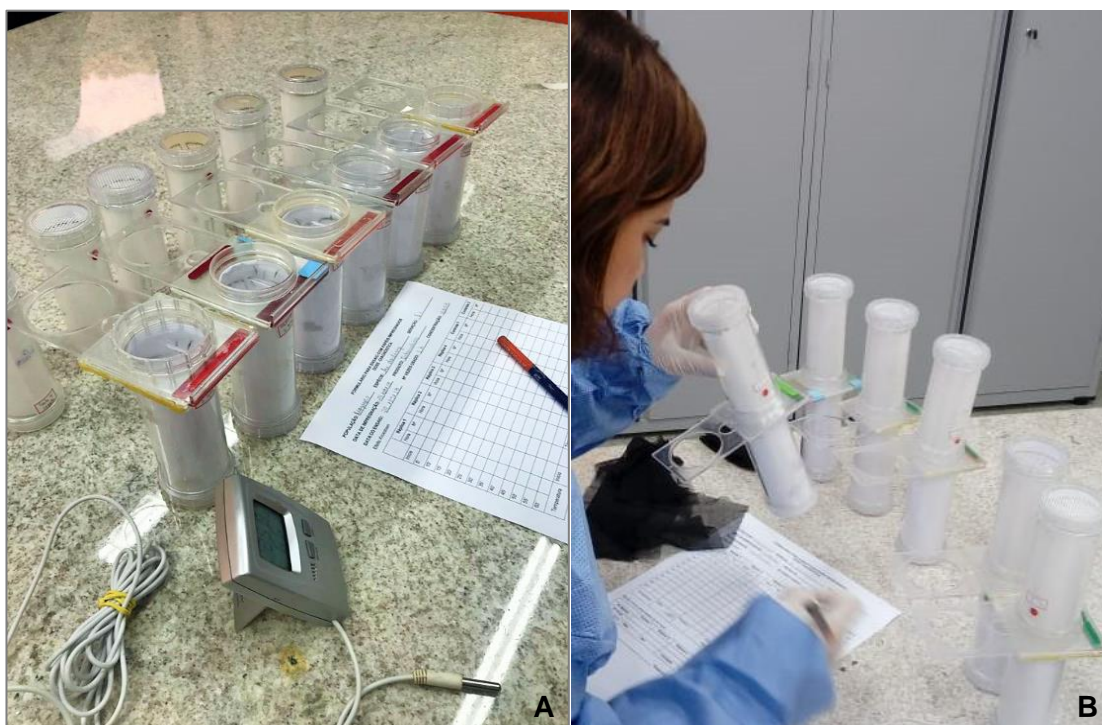
Na composição do kit (cada kit é formado por: dois tubos de acrílico, sendo um para descanso e outro para expor os mosquitos ao inseticida; encaixe pra unir os tubos e passagem dos mosquitos; grampos para fixar e papel filtro) um dos lados, com indicação verde, deve conter papel filtro não impregnado (tubo de descanso). O outro lado com indicação vermelha, contém o papel filtro impregnado com inseticida, na concentração que foi testada. Para os tubos de controle e descanso utilizou-se a indicação verde. Os tubos de descanso continham papel filtro e o os tubos dos controles continham papel impregnado apenas com solvente (Figura 3.17).



**Figura 3.17** – Itens do kit da OMS para teste com papel impregnado: 1-papel impregnado; 2- tubo para controle e para descanso dos mosquitos; 3- conector de fixação entre os tubos e passagem dos mosquitos; 4- tubo para papel impregnado; 5 e 6 – argola de fixação dos papéis. Utilização do kit no bioensaio: 7 – inclusão dos mosquitos no tubo; 8 – junção dos tubos; 9 – tubo contendo papel impregnado e mosquitos expostos e 10 – tubo de descanso contendo papel filtro, algodão com solução açucarada e mosquitos.

Com as populações de cada localidade foram realizados três ensaios em dias diferentes, usando papéis com deltametrina na concentração de 0,05%. Para cada ensaio foram expostas aproximadamente 120 fêmeas de anofelinos, sendo 20 por tubo distribuídas em quatro réplicas e dois tubos controle contendo papel impregnado apenas com o solvente.

Para o bioensaio do tipo Tempo de Queda (tempo da queda por tempo de exposição em dose pré-determinada), após uma hora de exposição ao inseticida, registra-se em formulário específico (APÊNDICE – B), o número de caídos (*knockdown*) a cada cinco minutos (Figura 3.18). As fêmeas dos anofelinos foram transferidas para tubos de descanso, onde foram deixados em câmara úmida com temperatura e umidade controladas ( $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 10\%$  URA) por 24 horas para a quantificação da mortalidade. Os tubos de descanso foram revestidos somente com papel filtro não impregnado e foi oferecida solução de sacarose à 10% para as fêmeas. Nos ensaios com deltametrina 0,05%, os indivíduos mortos (caídos ou moribundos) foram quantificados para a averiguação do efeito *knockdown*, após uma hora de exposição ao inseticida. Tanto os papéis filtro impregnados com inseticida e os papéis filtro controle foram envolvidos em papel alumínio e guardados a  $4 - 10^{\circ}\text{C}$  em geladeira até próxima utilização.



**Figura 3.18** – Bioensaio com papel impregnado: A – kit tipo OMS; B – realização de bioensaio utilizando deltametrina 0,05% e anofelinos no Laboratório de Entomologia Médica em Macapá – Amapá, Brasil.

### **3.5.2 Extração de DNA**

A extração do DNA genômico individual foi feita segundo protocolo estabelecido por Martins et al. (2007), com poucas modificações. Apenas as fêmeas de *An. darlingi* provenientes dos bioensaios com papel impregnado foram transferidas para tubos de polipropileno de 1,5mL contendo 3 *beads* de zircônia/sílica com o tamanho de 2,3mm e solução TNES (250mM de Tris pH 7,5, 2M de NaCl, 100mM de EDTA e 2,5% de SDS) e agitadas para maceração no “*bead biter*” (Biospec) por dois minutos. Posteriormente, foi adicionado 2μL de proteinase K (20mg/mL) e deixado em banho-maria a 56°C *overnight*. Após centrifugação por 1 minuto a precipitação de proteína foi feita em NaCl a 5M agitado rapidamente por 20 segundos e centrifugado por seis minutos a 15.000g.

O sobrenadante foi transferido para novos tubos identificados para posterior lavagem com 300μL de isopropanol a 100%, agitando por inversão seguida de centrifugação a 15.000g por 5 minutos. Em seguida foi feita a lavagem com 300μL de etanol 70%, centrifugado a 15.000g por seis minutos e descartado todo o sobrenadante. O etanol restante foi retirado por meio de secagem a 60°C por 10 minutos e o DNA eluído em 50μL de tampão TE 0.1X. Ao final destas etapas, as amostras foram aquecidas a 96°C aproximadamente por 10 minutos para inativação da proteinase K.

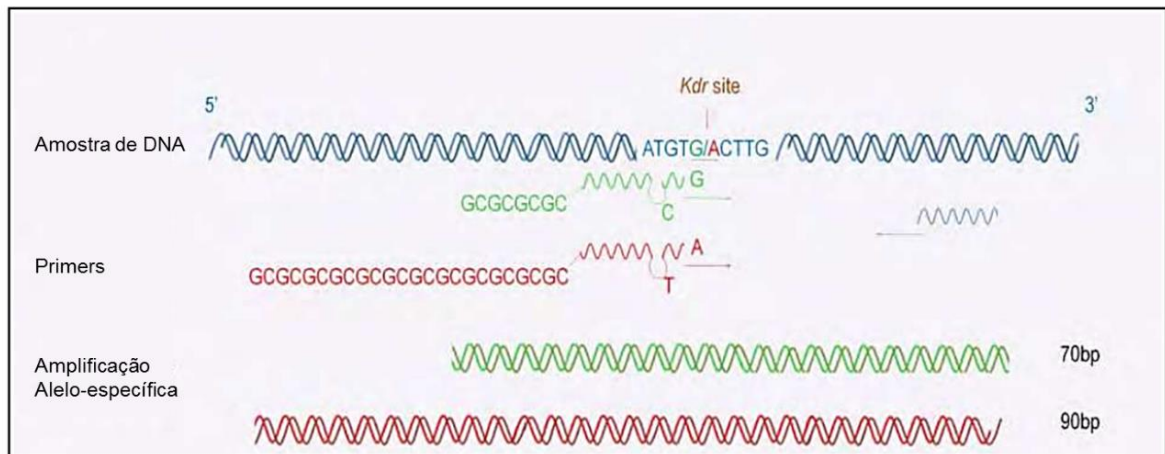
As mensurações de quantidade e pureza do DNA foram feitas a partir do espectrofotômetro *NanoDrop One* (*ThermoFisher*).

Uma vez feita a quantificação, as amostras foram diluídas em água Milli-Q autoclavada para a obtenção de amostras com uma concentração final de 20ng/μL de solução. Posteriormente, tanto as amostras puras (DNA estoque) quanto às diluídas foram mantidas em freezer a -20°C.

### **3.5.3 Genotipagem *Kdr* do sítio 1014**

Para a genotipagem individual da mutação *Kdr* clássica no sítio 1014 (substituição de uma leucina por uma fenilalanina, Leu1014Phe), utilizamos a ferramenta AS-PCR (*Allele-Specific PCR*) que permite diferenciar o alelo mutante (1014Phe) do alelo selvagem (1014Leu) por meio da diferença de tamanho do produto do PCR via eletroforese (Figura 3.19).





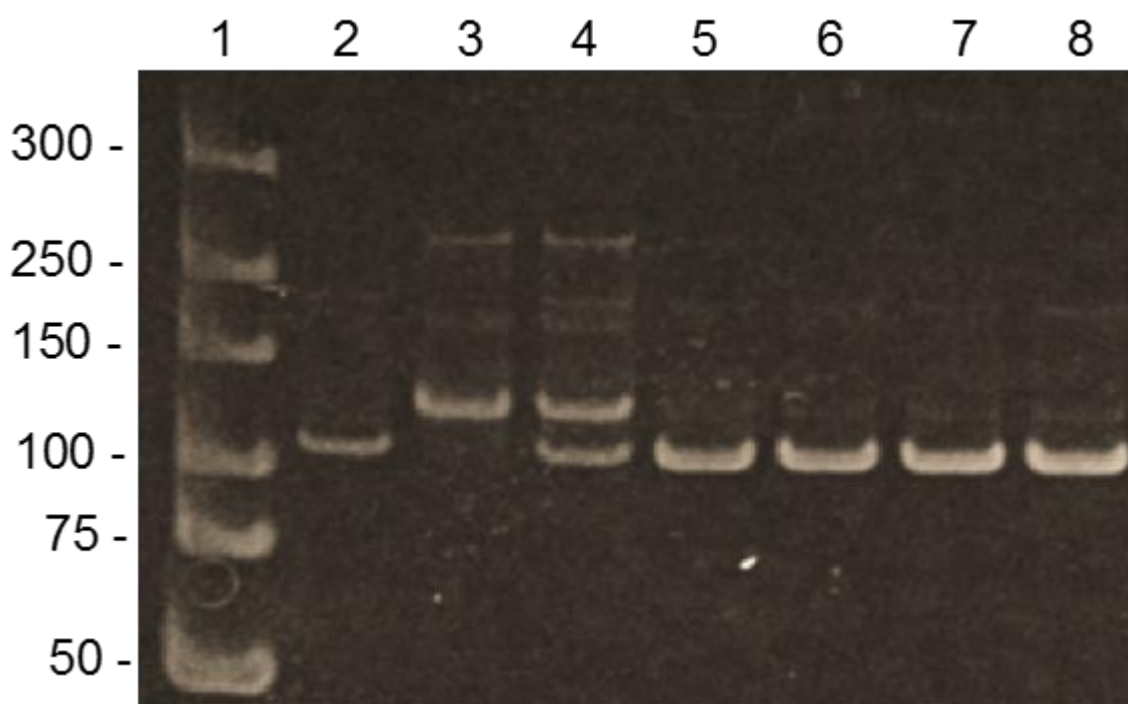
**Figura 3.19** – Esquema da PCR alelo-específica representando os primers específicos e a diferença em pares de base do produto gerado. Retirado de (Martins & Valle, 2012).

Dois *primers* específicos foram utilizados para cada sítio polimórfico e um *primer* no sentido reverso comum a ambos. A diferença entre o tamanho dos produtos foi conseguida pela adição de uma calda GC à 5' dos *primers* específicos, distintos em 20 nucleotídeos. A especificidade para o polimorfismo de base única (SNP) é conseguida na extremidade 3', reforçada por uma transição no terceiro nucleotídeo a 3', que aumenta a força da ligação desta extremidade, conforme detalhado por Wang et al. (2005).

Uma primeira reação foi realizada para a amplificação da região IIS6 do *Nav*, utilizando-se 1µL do DNA diluído a 20 ng/µL, 1 X do kit Go Taq 2x polimerase (Promega), 0,3µM dos primers 42f 5'-CGTGT TTTATGCGGAGAATG-3' e 422r 5'-CACGGACGCAATTTGACTTGT-3' e água mili-Q para o volume final de 12µL de reação. As reações foram submetidas ao termociclador com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C de anelamento e 72°C de extensão por 1 minuto. O produto desta reação foi submetido a eletroforese por 1 hora a 170 volts em gel de poliacrilamida 10% para avaliar se ocorreu amplificação conforme esperado. Posteriormente corado em Nancy-520 DNA Gel *Stain intercalante* de DNA (Sigma-Aldrich®) para visualização de bandas através de luz azul.

Confirmada amplificação de tamanho esperado, o produto da reação do IIS6 do *Nav* foi diluído 200X em água mili-Q e submetida à reação de genotipagem via AS-PCR. Posteriormente 1µL dessa diluição foi usado como DNA molde, onde novamente foi utilizado o kit *Go Taq 2x* polimerase (Promega), 0,5µM do *primer* comum (5'-GCG GGC CTG TAG TTA TAG GAA ACG TA-3'), 0,5µM do *primer* f\_Phe (5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCC TGT AGT TAT AGG AAA CATT-3') e 0,25µM

do *primer* f\_Leu (5'- GCG GGC CTG TAG TTA TAG GAA ACG TA-3') para o volume final de 12,5µL. Em todas as reações foram utilizados controles positivos homozigotos (1014Leu/Leu, 1014Phe/Phe) e heterozigoto (1014Leu/Phe). Estes controles consistem em plasmídeos sintéticos contendo a região IIS6 do *Na<sub>v</sub>* de *An. darlingi*. As reações foram levadas ao termociclador numa fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, e em seguida 32 ciclos à 94°C por 30 segundos, 60°C de anelamento por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão da polimerase a 72°C por 7 minutos. Os produtos destas reações foram submetidos à eletroforese e corados para visualização de bandas como mencionado anteriormente. O tamanho dos produtos em pares de base foi orientado pelo marcador DNA *Ladder Ultra Low Range* (Fermentas) (Figura 3.20).



**Figura 3.20** – Exemplo de uma fotografia de gel de eletroforese com produtos de AS-PCR (Loureiro, 2018) para a variação Leu1014Phe do *Na<sub>v</sub>* de *Anopheles darlingi*. Gel de poliacrilamida 10%, onde estão representados o marcador de peso molecular DNA *Ladder O'GeneRuler DNA Ladder, Ultra Low Range/Fermentas*, 150ng (1), os controles positivos 1014 Leu/Leu (2), F/F (3) e Leu/Phe (4), cujos alelos Leu1014<sup>+</sup> e 1014Phe<sup>kd<sup>r</sup></sup> correspondem a aproximadamente 106 e 126 pb, respectivamente. Nos poços 5-8 estão representadas amostras, todas homozigotas para o alelo selvagem.

## 3.6 Análises estatísticas

### 3.6.1 Provas biológicas de parede

- **Simulado de campo (casa teste)** - Todas as análises da etapa desenvolvida foram feitas usando R (R Core Team 2016) e RStudio (RStudio Team 2014), com nível de significância de 5%. Utilizou-se uma série de modelos de regressão logística para estimar o efeito residual de seis diferentes formulações de inseticidas sobre a mortalidade de *An. marajoara* após um dia (24 horas) de exposição em quatro tipos de superfície até 240 dias após a aplicação inicial do inseticida. Um modelo separado foi feito para cada uma das seis formulações inseticidas utilizadas: alfacipermetrina SC, etofenprox PM e lambidacialotrina PM, deltametrina WG, bendiocarb PM e pirimiphos-methyl CS. Os modelos testaram o tipo de superfície, mês após a exposição inicial e sua interação como efeitos fixos. A mortalidade foi calculada como a proporção de sobreviventes *An. marajoara* após um dia (24 horas) de exposição. Quando foram encontrados efeitos significativos, foram efetuadas análises de seguimento para comparações por pares utilizando o método de Bonferroni no pacote lsmmeans (Lenth 2016).
- **Painel, Simulado de campo (casa teste) e Campo** – Todas as análises foram feitas usando R (R Core Team 2016) e RStudio (RStudio Team 2016), com um nível de significância de 5%. Um modelo de regressão logística foi usado para estimar o efeito residual de duas formulações diferentes de inseticidas na mortalidade de *An. marajoara* após 24 horas de exposição em dois tipos de superfície por 180 dias contínuos após a aplicação inicial de inseticida. Um modelo separado foi feito para cada formulação de inseticida utilizada: etofenprox WP e deltametrina WG. Os modelos testaram os grupos (controle ou grupo de tratamento), condição (painel, simulado de campo e campo), tipo de superfície (ASR e MSP), mês após a exposição inicial (de t = 0 meses a t = 7 meses) e uma interação de três vias entre situação, tipo de superfície e mês após a exposição inicial. A mortalidade foi calculada com a proporção de sobreviventes *An. marajoara* após 24 horas de exposição. Quando efeitos significativos foram encontrados, análises de acompanhamento foram feitas para comparações pareadas usando o método de Bonferroni no pacote lsmmeans (Lenth 2016).

- **Painel e Simulado de campo (casa teste) - exterior e interior** - Todas as análises foram feitas usando R (R Core Team 2016) e RStudio (RStudio Team 2016), com um nível de significância de 5%. Utilizamos modelos de regressão logística para estimar o efeito residual de deltametrina SC-PE na mortalidade de *An. marajoara* após 24 horas de exposição. Dois modelos logísticos diferentes foram utilizados: no primeiro, foi comparado o efeito deltametrina SC-PE em dois grupos diferentes (controle ou exposto), em quatro tipos de superfície diferentes (ACR, ASR, MCP e MSP) sob duas condições experimentais diferentes (painel ou simulado de campo). Também incluímos um efeito de interação entre tipo de superfície e condição experimental. Na segunda análise, comparamos o efeito da deltametrina SC-PE em dois grupos diferentes (controle ou exposto), em dois tipos diferentes de superfície (ACR e MCP) em duas condições ambientais diferentes em condições de simulado de campo (no interior ou exterior da casa teste). Também incluímos no segundo modelo um efeito de interação entre tipo de superfície e condição ambiental. A mortalidade foi calculada com a proporção de sobreviventes de *An. marajoara* após 24 horas de exposição. Quando efeitos significativos foram encontrados, análises de acompanhamento foram feitas para comparações pareadas usando o método de Bonferroni no pacote lsmmeans (Lenth 2016).

### **3.6.2 Suscetibilidade/resistência**

Os tempos de queda foram estimados a partir de transformação log x *Probit* seguida de regressão linear utilizando o software desenvolvido por Raymond (1985).

## **3.7 Considerações éticas**

A aprovação ética deste estudo foi obtida no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá- IEPA em 18 de novembro de 2014 (consentimento: 910.453) em colaboração com a LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ (ANEXO A e B).

## 4 RESULTADOS

“Quem é tão firme que não pode ser  
seduzido?”

William Shakespeare

### 4.1 Provas biológicas de parede: Simulado de campo - casa teste

A avaliação do efeito dos inseticidas foi realizada considerando a aplicação de diferentes formulações em diferentes superfícies: ACR, ASR, MCP e MSP (Tabela 4.1).

No período entre outubro de 2014 a março de 2016 foram realizados bioensaios de cone em parede com seis formulações de inseticidas, em duas etapas distintas, totalizando a exposição de 15.918 espécimes de anofelinos com uma média de 13 mosquitos por cone em cada bioensaio (Tabela 4.2).

Na primeira etapa, utilizando apenas inseticidas da classe dos piretroides, realizada entre outubro de 2014 a abril de 2015, foram expostos 5.571 espécimes de anofelinos, com uma média de 12 mosquitos por cone em cada bioensaio (Tabela 4.2). Os resultados mostram uma taxa de mortalidade para alfacipermetrina SC (70,5%); etofenprox PM (79,3%) e lambidacialotrina PM (77,3%). Dentre os inseticidas, o etofenprox PM apresentou a taxa de mortalidade mais próxima a 80%.

**Tabela 4.1 – Média (Erro Padrão) das taxas de mortalidade de *Anopheles marajoara* a partir do primeiro dia após exposição a seis formulações de inseticidas aplicados em quatro tipos de superfícies em simulado de campo (casa teste), no município de Macapá-Amapá, Brasil.**

Inseticida	Superfície	Dias após aplicação do inseticida								
		1	30	60	90	120	150	180	210	240
<b>Alfacipermetrina SC</b>	ACR	0.99 (0.02)	0.77 (0.06)	0.22 (0.05)	-	-	-	-	-	-
	ASR	0.97 (0.03)	0.51 (0.04)	0.49 (0.08)	-	-	-	-	-	-
	MCP	1.00 (-)	1.00 (-)	0.99 (0.02)	0.78 (0.04)	0.81 (0.04)	0.49 (0.07)	0.25 (0.06)	-	-
	MSP	0.82 (0.05)	0.92 (0.03)	0.47 (0.14)	0.43 (0.12)	-	-	-	-	-
<b>Etofenprox PM</b>	ACR	1.00 (-)	0.93 (0.03)	0.87 (0.05)	0.40 (0.07)	0.54 (0.08)	-	-	-	-
	ASR	0.97 (0.02)	0.67 (0.11)	0.54 (0.07)	-	-	-	-	-	-
	MCP	1.00 (-)	1.00 (-)	0.85 (0.04)	0.82 (0.05)	0.58 (0.10)	0.30 (0.08)	-	-	-
	MSP	1.00 (-)	0.97 (0.02)	0.98 (0.03)	0.97 (0.02)	0.86 (0.06)	0.68 (0.08)	0.33 (0.08)	-	-
<b>Lambidacialotrina PM</b>	ACR	0.88 (0.04)	0.79 (0.06)	0.03 (0.02)	-	-	-	-	-	-
	ASR	0.98 (0.02)	0.74 (0.05)	0.60 (0.11)	-	-	-	-	-	-
	MCP	1.00 (-)	0.98 (0.02)	0.62 (0.11)	0.43 (0.07)	-	-	-	-	-
	MSP	0.96 (0.02)	0.96 (0.03)	0.73 (0.05)	0.63 (0.10)	-	-	-	-	-
<b>Deltametrina WG</b>	ACR	1.00 (-)	1.00 (-)	0.90 (0.06)	0.87 (0.04)	0.74 (0.07)	0.68 (0.08)	-	-	-
	ASR	1.00 (-)	0.99 (0.02)	0.85 (0.06)	0.73 (0.13)	0.66 (0.07)	-	-	-	-
	MCP	1.00 (-)	1.00	0.98 (0.03)	0.97 (0.03)	0.95 (0.02)	0.94 (0.02)	0.85 (0.05)	0.82 (0.04)	0.83 (0.06)
	MSP	1.00 (-)	0.98 (0.02)	0.58 (0.08)	0.94 (0.03)	0.94 (0.03)	0.94 (0.03)	0.92 (0.04)	0.98 (0.02)	1.00 (-)
<b>Bendiocarb PM</b>	ACR	1.00 (-)	0.11 (0.03)	0.03 (0.02)	-	-	-	-	-	-
	ASR	1.00 (-)	0.05 (0.03)	0.06 (0.02)	-	-	-	-	-	-
	MCP	1.00 (-)	1.00 (-)	1.00 (-)	1.00 (-)	0.53 (0.13)	0.60 (0.12)	-	-	-
	MSP	1.00 (-)	1.00 (-)	1.00 (-)	1.00 (-)	0.46 (0.12)	0.65 (0.14)	-	-	-
<b>Pirimiphos-methyl CS</b>	ACR	1.00 (-)	0.98 (0.03)	1.00 (-)	0.92 (0.06)	0.69 (0.11)	0.95 (0.04)	0.65 (0.09)	1.00 (-)	0.90 (0.06)
	ASR	1.00 (-)	0.97 (0.02)	1.00 (-)	0.98 (0.02)	1.00 (-)	0.98 (0.02)	0.97 (0.04)	0.92 (0.03)	0.98 (0.03)
	MCP	1.00 (-)	1.00 (-)	1.00 (-)	0.98 (0.03)	1.00 (-)	1.00 (-)	1.00 (-)	0.98 (0.02)	0.79 (0.10)
	MSP	1.00 (-)	1.00 (-)	0.94 (0.04)	0.79 (0.08)	0.84 (0.05)	0.87 (0.05)	0.73 (0.10)	0.66 (0.07)	-

Alvenaria Com Reboco (ACR), Alvenaria Sem Reboco (ASR), Madeira Com Pintura (MCP), Madeira Sem Pintura (MSP)

**Tabela 4.2** – Análise do efeito *knockdown* pelo teste de cone para os piretroides alfacipermetrina SC, etofenprox PM, lambdacyalotrina PM e deltametrina WG, e da taxa de mortalidade de anofelinos expostos à seis formulações de inseticidas em duas etapas do estudo no período de outubro de 2014 a março de 2016 em Macapá-Amapá, Brasil.

Etapa	Inseticidas	Cones	Mosquitos Expostos	$\bar{X}$	Mosquitos Caídos após 30'	$\bar{X}$	Efeito <i>knockdown</i> (%)	Mosquitos Mortos	$\bar{X}$	Mortalidade (%)
1 <sup>a</sup>	Alfa	162	1951	12,04	1200	7,41	61,51 (89-25)	1375	8,49	70,48 (95-24)
	Etof	189	2116	11,20	1598	8,46	75,52 (98-65)	1677	8,87	79,25 (99-34)
	Lamb	126	1504	11,94	1126	8,94	74,87 (86-54)	1162	9,22	77,26 (95-50)
2 <sup>a</sup>	Delta	261	3437	13,17	2704	10,36	78,67 (91-58)	3053	11,70	88,83 (100-82)
	Bend	162	2301	14,20	1569	9,69		1573	9,71	68,36 (100-50)
	Pirimet	315	4609	14,63	1793	5,69		4268	13,55	92,60 (100-84)
<b>Total</b>		<b>1215</b>	<b>15918</b>	<b>13,10</b>	<b>9990</b>	<b>8,22</b>		<b>13108</b>	<b>10,79</b>	

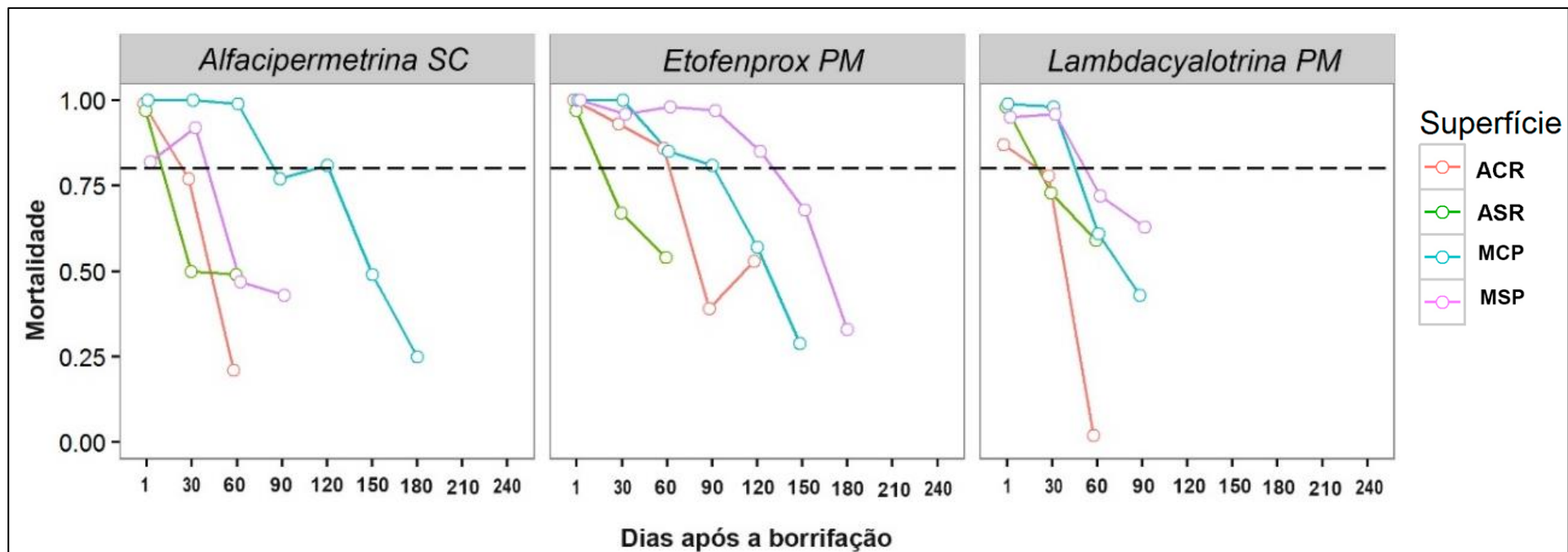
Alfacipermetrina SC, Etofenprox PM e Lambdacyalotrina PM, Deltametrina WG, Bendiocarb PM e Pirimiphos-Metyl CS

Na segunda etapa do estudo, realizada entre maio de 2015 a março de 2016, foram expostos 10.347 espécimes de anofelinos, com uma média de 14 mosquitos por cone em cada bioensaio. A taxa de mortalidade do piretroide deltametrina WG foi de 88,8%, do carbamato bendiocarb PM foi de 68,4% e do organofosforado pirimiphos-methyl CS foi de 92,6%. Dentre os três inseticidas o pirimiphos-methyl CS apresentou a maior taxa de mortalidade (Tabela 4.2).

Os resultados dos bioensaios com os piretroides após um dia da borrifação apresentaram mortalidade superior a 80% em todas as superfícies. A eficácia da borrifação apresentou a taxa de mortalidade de 100% para o alfacipermetrina SC, em MCP e para o etofenprox PM em superfícies de madeira. Estes inseticidas exibiram taxa de mortalidade  $\geq 80\%$  por 120 dias após a borrifação em pelo menos uma das superfícies (Tabela 4.1).

Na comparação do efeito residual dos piretroides (Figura 4.1), o etofenprox PM apresentou residualidade de 90 dias em MCP e 120 dias em MSP (taxa de mortalidade  $\geq 80\%$ ). Não foi observado para esse inseticida o efeito residual nas superfícies de alvenaria. O alfacipermetrina SC apresentou residualidade de 120 dias para a superfície de MCP, o que não foi observado para as demais superfícies (residual de 30 dias). O lambidacialotrina PM apresentou o menor efeito residual dentre os inseticidas testados com duração máxima de 30 dias, em superfícies de madeira, sendo que em superfície de alvenaria, a taxa de mortalidade  $\geq 80\%$  foi apenas no primeiro dia após borrifação.





**Figura 4.1** – Percentual de mortalidade dos mosquitos *Anopheles marajoara* expostos a três inseticidas piretroides por meio de bioensaios de parede, após borrifação residual intradomiciliar-BRI em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: outubro de 2014 a abril de 2015.

A avaliação da eficácia residual do alfacipermetrina SC nas superfícies mostrou maior taxa de mortalidade em superfícies de madeira quando comparado com superfícies de alvenaria (Figura 4.1). Os modelos logísticos e comparações de grupos mostraram um padrão variado para as paredes de alvenaria e a parede de MSP que apresentaram diferença significativa do efeito residual de 30-60 dias após a aplicação do inseticida. A diferença significativa para a superfície de MCP foi observada 150 dias após a aplicação do inseticida. Dentre as superfícies avaliadas MCP apresentou maior residualidade (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** – Taxas de mortalidade de *Anopheles marajoara* expostos a alfacipermetrina SC, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: outubro de 2014 a abril de 2015.

Dias após borrifação	Alfacipermetrina SC			
	ACR	ASR	MCP	MSP
1	0.98 [0.77, 1.26]	0.97 [0.73, 1.28]	1.00 [0.78, 1.28]	0.83 [0.64, 1.08]
30	0.77 [0.57, 1.04]	<b>0.51 [0.36, 0.71]</b>	1.00 [0.81, 1.24]	0.91 [0.73, 1.14]
60	<b>0.21 [0.13, 0.35]</b>	0.50 [0.36, 0.70]	0.99 [0.73, 1.34]	<b>0.45 [0.31, 0.66]</b>
90	-	-	0.77 [0.57, 1.05]	0.42 [0.28, 0.61]
120	-	-	0.81 [0.59, 1.10]	-
150	-	-	<b>0.49 [0.34, 0.70]</b>	-
180	-	-	0.24 [0.15, 0.38]	-
210	-	-	-	-
240	-	-	-	-

*Odds Ratio* [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito).

Alvenaria com reboco (ACR), alvenaria sem reboco (ASR), madeira com pintura (MCP), madeira sem pintura (MSP)

Para o etofenprox PM (Figura 4.1) foi observado efeito residual pelo período de 30 e 60 dias nas superfícies de alvenaria (mortalidade  $\geq 80\%$ ). Para as superfícies de madeira, o efeito residual foi maior, com período de 90 e 120 dias após borrifação (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4** – Taxas de mortalidade de *Anopheles marajoara* expostos a etofenprox PM, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste), entre outubro de 2014 e abril de 2015 no município de Macapá-Amapá, Brasil.

Dias após borrifação	Etofenprox PM			
	ACR	ASR	MCP	MSP
1	1.00 [0.79, 1.26]	0.97 [0.77, 1.23]	1.00 [0.79, 1.27]	1.00 [0.80, 1.25]
30	0.92 [0.70, 1.22]	<b>0.66 [0.48, 0.91]</b>	1.00 [0.73, 1.37]	0.96 [0.72, 1.28]
60	0.86 [0.64, 1.17]	0.53 [0.37, 0.77]	0.85 [0.62, 1.15]	0.98 [0.73, 1.31]
90	<b>0.40 [0.27, 0.59]</b>	-	0.81 [0.59, 1.12]	0.97 [0.72, 1.30]
120	0.52 [0.36, 0.73]	-	<b>0.57 [0.40, 0.82]</b>	0.86 [0.64, 1.16]
150	-	-	0.29 [0.19, 0.45]	<b>0.68 [0.49, 0.94]</b>
180	-	-	-	0.34 [0.23, 0.50]
210	-	-	-	-
240	-	-	-	-

*Odds Ratio* [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito).  
Alvenaria com reboco (ACR), alvenaria sem reboco (ASR), madeira com pintura (MCP), madeira sem pintura (MSP)

O lambidacialotrina PM (Figura 4.1) apresentou um efeito residual por 30 dias (mortalidade  $\geq 80\%$ ) após borrifação em todas as superfícies. Dentre os piretroides avaliados obteve a menor residualidade. As taxas de mortalidade desta formulação diminuíram mais rapidamente para as paredes de alvenaria do que para as paredes de madeira (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5** – Taxas de mortalidade de *Anopheles marajoara* expostos a lambdacialotrina PM, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: outubro de 2014 a abril de 2015.

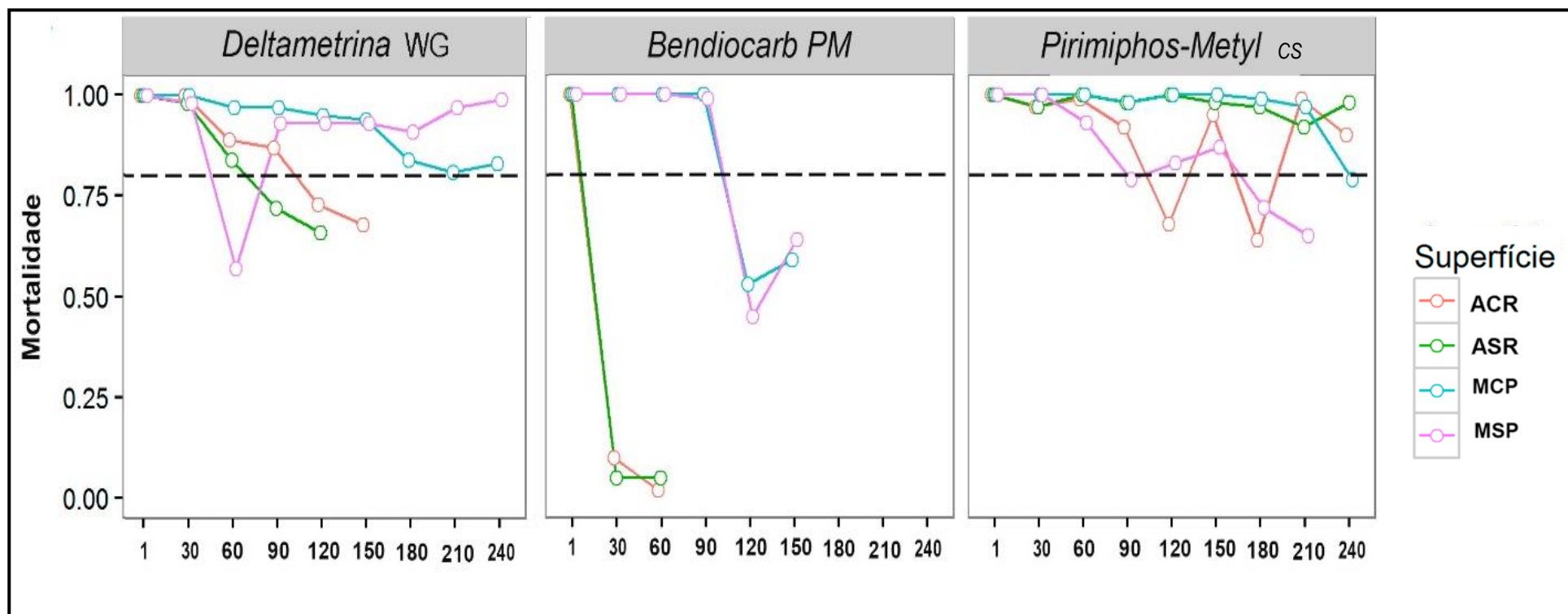
Dias após borrifação	Lambidacialotrina PM			
	ACR	ASR	MCP	MSP
1	0.88 [0.70, 1.11]	0.98 [0.77, 1.24]	0.99 [0.79, 1.25]	0.96 [0.77, 1.19]
30	0.78 [0.57, 1.05]	0.73 [0.53, 1.00]	0.98 [0.72, 1.32]	0.96 [0.72, 1.28]
60	<b>0.02 [0.01, 0.09]</b>	<b>0.58 [0.39, 0.86]</b>	<b>0.65 [0.46, 0.91]</b>	<b>0.72 [0.53, 0.98]</b>
90	-	-	0.42 [0.29, 0.62]	0.62 [0.44, 0.87]
120	-	-	-	-
150	-	-	-	-
180	-	-	-	-
210	-	-	-	-
240	-	-	-	-

*Odds Ratio* [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito)

Alvenaria com reboco (ACR), alvenaria sem reboco (ASR), madeira com pintura (MCP), madeira sem pintura (MSP)

A mortalidade após 24 horas da borrifação com os inseticidas deltametrina WG, bendiocarb PM e pirimiphos-methyl CS foi de 100% em todas as superfícies (Figura 4.2). Este resultado demonstra eficácia da borrifação.

Os inseticidas exibiram alta atividade residual (mortalidade  $\geq 80\%$ ), por até 210 dias após a borrifação em pelo menos uma das superfícies, com exceção do bendiocarb PM. O bendiocarb PM apresentou a menor residualidade (Figura 4.2), com persistência superior a 80% por 90 dias somente as superfícies de madeira. A mesma persistência não foi observada para as superfícies alvenaria, cuja taxa de mortalidade foi superior a 80% somente no primeiro dia de exposição após a aplicação do produto. As análises estatísticas mostraram diferença significativa para as superfícies de alvenaria nos bioensaios de 30 dias e para as superfícies de madeira nos bioensaios de 60 dias, delimitando o término das análises para essas superfícies (Tabela 4.6).



**Figura 4.2** – Percentual de mortalidade de mosquitos *Anopheles marajoara* expostos a piretroide, carbamato e organofosforado por meio de bioensaios de parede após borrifação residual intradomiciliar-BRI em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016.

**Tabela 4.6** – Taxas de mortalidade de *Anopheles marajoara* expostos ao bendiocarb PM, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá- Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016.

Dias após borrifação	Bendicarb PM			
	ACR	ASR	MCP	MSP
1	1.00 [0.77, 1.31]	1.00 [0.76, 1.31]	1.00 [0.78, 1.27]	1.00 [0.77, 1.29]
30	<b>0.11 [0.06, 0.19]</b>	<b>0.05 [0.02, 0.11]</b>	1.00 [0.78, 1.28]	1.00 [0.76, 1.31]
60	0.02 [0.01, 0.07]	0.05 [0.02, 0.11]	1.00 [0.81, 1.24]	1.00 [0.79, 1.27]
90	-	-	1.00 [0.76, 1.32]	0.99 [0.76, 1.29]
120	-	-	<b>0.53 [0.40, 0.69]</b>	<b>0.47 [0.36, 0.63]</b>
150	-	-	0.61 [0.46, 0.80]	0.66 [0.51, 0.87]
180	-	-	-	-
210	-	-	-	-
240	-	-	-	-

*Odds Ratio* [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito)

Alvenaria com reboco (ACR), alvenaria sem reboco (ASR), madeira com pintura (MCP), madeira sem pintura (MSP)

O deltametrina WG apresentou efeito residual com taxas de mortalidade superior a 80% por 240 dias nas superfícies de madeira (Figura 4.2). Foi registrado uma taxa de mortalidade inferior a 80% aos 60 dias na superfície de MSP. O inseticida apresentou persistência aos 60 e 90 dias para as superfícies de ASR e ACR. As análises estatísticas mostraram diferença significativa para as superfícies de ASR e ACR nos bioensaios de 90 e 120 dias, delimitando o término das análises para essas superfícies (Tabela 4.7).

O pirimiphos-methyl CS foi a única formulação que manteve taxas de mortalidade acima de 80% em todas as superfícies testadas por pelo menos 150 dias (Figura 4.2). Nas alvenarias a residualidade do inseticida foi de 240 dias após aplicação sem diferença significativa da mortalidade. Na superfície de MCP a residualidade foi de 210 dias. As análises estatísticas mostraram diferença significativa para as superfícies de madeira: MSP aos 180 dias; e MCP aos 240 dias, delimitando o término das análises para essas superfícies (Tabela 4.8).

**Tabela 4.7** – Taxas de mortalidade mensais de espécimes de *Anopheles marajoara* expostos a deltametrina WG, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016.

Dias após borrifação	Deltametrina WG			
	ACR	ASR	MCP	MSP
1	1.00 [0.74, 1.35]	1.00 [0.75, 1.33]	1.00 [0.74, 1.36]	1.00 [0.74, 1.35]
30	1.00 [0.77, 1.30]	0.98 [0.77, 1.26]	1.00 [0.77, 1.30]	0.97 [0.76, 1.26]
60	0.90 [0.70, 1.17]	0.84 [0.65, 1.09]	0.97 [0.75, 1.26]	0.59 [0.45, 0.78]
90	0.87 [0.66, 1.15]	<b>0.72 [0.53, 0.98]</b>	0.97 [0.74, 1.27]	0.94 [0.70, 1.25]
120	<b>0.72 [0.56, 0.94]</b>	0.66 [0.50, 0.88]	0.95 [0.75, 1.21]	0.94 [0.73, 1.20]
150	0.68 [0.52, 0.88]	-	0.94 [0.74, 1.19]	0.93 [0.73, 1.19]
180	-	-	0.84 [0.64, 1.11]	0.92 [0.70, 1.20]
210	-	-	0.82 [0.61, 1.10]	0.97 [0.75, 1.26]
240	-	-	0.83 [0.65, 1.06]	0.99 [0.79, 1.25]

Odds Ratio [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito)

Alvenaria com reboco (ACR), alvenaria sem reboco (ASR), madeira com pintura (MCP), madeira sem pintura (MSP)

**Tabela 4.8** – Taxas de mortalidade mensais de espécimes de *Anopheles marajoara* expostos a pirimiphos-methyl CS, em diferentes superfícies em simulado de campo (casa teste) no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: maio de 2015 a março de 2016.

Dias após borrifação	Pirimiphos-methyl CS			
	ACR	ASR	MCP	MSP
1	1.00 [0.78, 1.27]	1.00 [0.78, 1.29]	1.00 [0.78, 1.28]	1.00 [0.78, 1.28]
30	0.97 [0.76, 1.24]	0.97 [0.75, 1.25]	1.00 [0.76, 1.32]	1.00 [0.76, 1.32]
60	0.99 [0.79, 1.24]	1.00 [0.80, 1.25]	1.00 [0.80, 1.25]	0.94 [0.75, 1.17]
90	0.91 [0.72, 1.16]	0.98 [0.77, 1.24]	0.98 [0.78, 1.24]	0.79 [0.62, 1.02]
120	0.70 [0.51, 0.95]	1.00 [0.78, 1.28]	1.00 [0.79, 1.26]	0.84 [0.65, 1.08]
150	0.95 [0.74, 1.22]	0.98 [0.77, 1.24]	1.00 [0.78, 1.28]	0.87 [0.68, 1.12]
180	0.64 [0.49, 0.84]	0.97 [0.77, 1.23]	0.99 [0.78, 1.26]	<b>0.74 [0.57, 0.96]</b>
210	0.99 [0.77, 1.28]	0.92 [0.72, 1.17]	0.97 [0.75, 1.26]	0.65 [0.49, 0.86]
240	0.90 [0.70, 1.16]	0.98 [0.76, 1.25]	<b>0.78 [0.62, 0.98]</b>	-

Odds Ratio [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito)

Alvenaria com reboco (ACR), alvenaria sem reboco (ASR), madeira com pintura (MCP), madeira sem pintura (MSP)

## 4.2 Provas biológicas de parede: laboratório, simulado de campo e diretamente no campo

Os inseticidas etofenprox PM e deltametrina WG foram testados em superfícies de ASR e MSP, por um período de 180 dias. Foram expostos um total de 12.653 espécimes de anofelinos com uma média de 16 espécimes por cone em cada bioensaio (Tabela 4.9).

Nos bioensaios com inseticida etofenprox PM (Figura 4.3), realizados entre março e setembro de 2017 no distrito do Carvão, foram expostos 5.880 espécimes de anofelinos, com uma média de 16 mosquitos por cone em cada bioensaio (Tabela 4.9). Os resultados mostram uma taxa de mortalidade nos painéis de laboratório de 71,5%, no simulado de campo (casa teste) de 67,4% e diretamente no campo de 60,9%. A taxa geral de mortalidade foi menor que 80% nas três condições, embora a condição de laboratório tenha apresentado a taxa mais elevada.

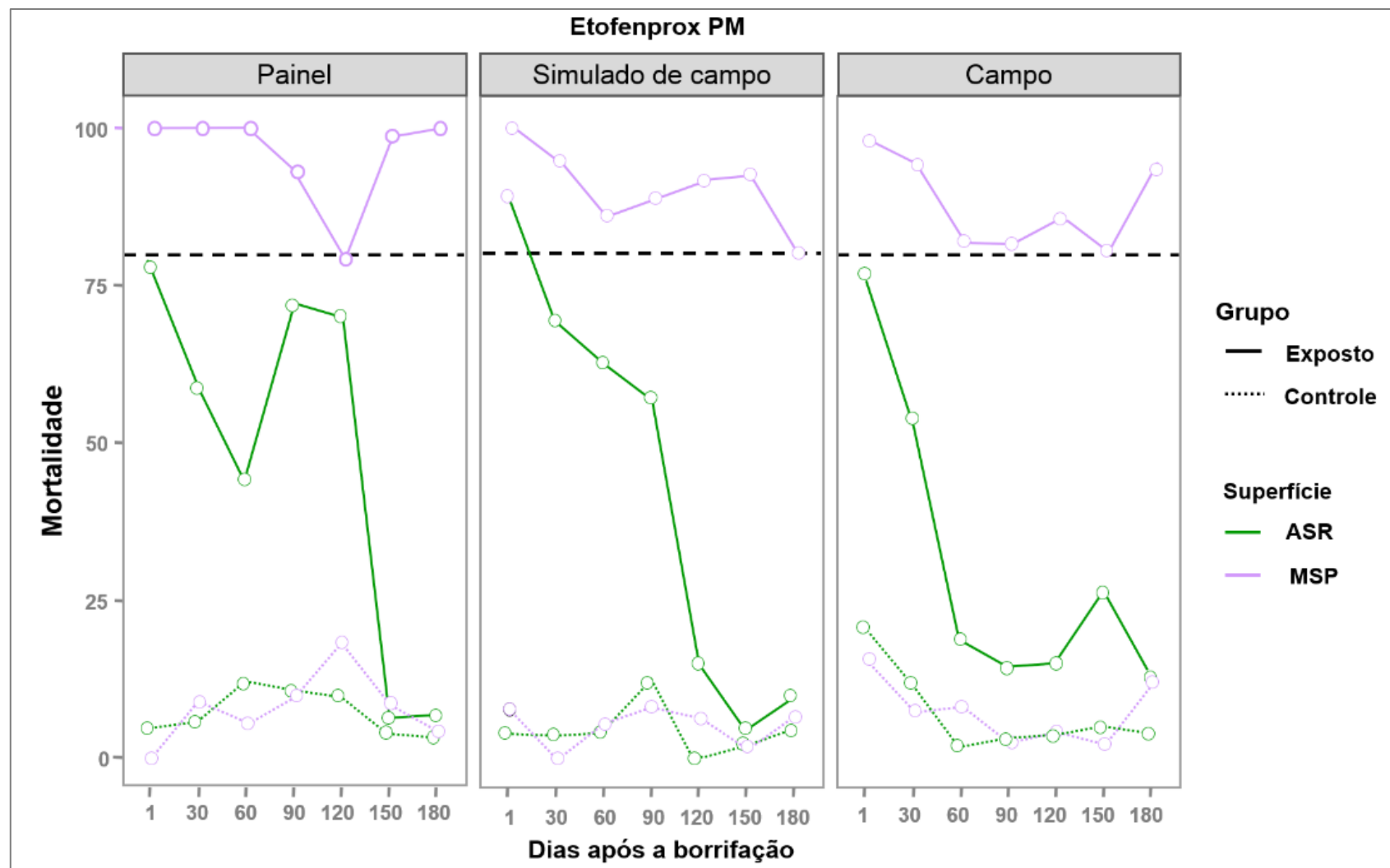
Os resultados do modelo para etofenprox PM mostraram que todas as variáveis foram estatisticamente significativas, incluindo o termo de interação de três vias (Tabela 4.10). Quando comparado com a condição do painel, as condições de simulado de campo e diretamente no campo tiveram taxas de mortalidade significativamente maiores até o quarto mês após a borrifação.

O simulado de campo apresentou mortalidade significativamente maior que a condição do painel também no quinto mês após a borrifação (Tabela S1). *Odds-ratio* para todas as condições no grupo exposto incluiu o limiar de mortalidade de 80%. No grupo exposto para a superfície de ASR, a razão de chances incluiu o limiar de mortalidade de 80% apenas no terceiro e quarto mês para a condição do painel, apenas até o primeiro mês na condição simulado de campo e somente no primeiro mês e, 24 horas para a condição de campo (Tabela 4.11).



**Tabela 4.9** – Análise do efeito *knockdown* e da taxa de mortalidade pelo teste de cone para anofelinos expostos à duas formulações de inseticidas (etofenprox PM e deltametrina WG) no período de março de 2017 a outubro de 2018 em Macapá-Amapá, Brasil.

Inseticida	Condição Bioensaios	cone	Mosquitos expostos	$\bar{X}$	Mosquitos caídos após 30'	$\bar{X}$	Efeito <i>knockdown</i>	Mosquitos mortos	$\bar{X}$	Mortalidade (%)
<b>Etofenprox PM</b>	Painel	126	1974	15,67	1431	11,36	72,49	1412	11,21	71,53
	Casa teste	126	1974	15,67	1329	10,55	67,33	1331	10,56	67,43
	Campo	126	1932	15,33	1143	9,07	59,16	1177	9,34	60,92
<b>Total parcial</b>		<b>378</b>	<b>5880</b>	<b>15,56</b>	<b>3903</b>	<b>10,33</b>	<b>66,38</b>	<b>3920</b>	<b>10,37</b>	<b>66,67</b>
<b>Deltametrina WG</b>	Painel	126	2177	17,28	1951	15,48	89,62	2034	16,14	93,43
	Casa teste	126	2368	18,79	1594	12,65	67,31	1803	14,31	76,14
	Campo	126	2228	17,68	1604	12,73	71,99	1700	13,49	76,30
<b>Total parcial</b>		<b>378</b>	<b>6773</b>	<b>17,92</b>	<b>5149</b>	<b>13,62</b>	<b>76,02</b>	<b>5537</b>	<b>14,65</b>	<b>81,75</b>
<b>Total</b>		<b>756</b>	<b>12653</b>	<b>16,74</b>	<b>9052</b>	<b>11,97</b>	<b>71,54</b>	<b>9457</b>	<b>12,51</b>	<b>74,74</b>



**Figura 4.3** – Percentual de mortalidade dos mosquitos *Anopheles marajoara* expostos ao inseticidas etofenprox PM, em duas superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo por meio de bioensaios de parede após borrifação residual intradomiciliar-BRI no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: março a setembro de 2017. Grupo exposto linha contínua e grupo controle linha tracejada.

**Tabela 4.10** – Resultados do modelo de regressão logística para duas formulações de inseticidas para medir o impacto do Grupo (controle ou exposto), Condição (painel, simulado de campo e campo), Superfície (alvenaria com reboco e Madeira sem pintura), Mês (de 24 horas até 6 meses após - aplicação) e a interação de três vias entre Condição, Superfície e Mês. Entradas em negrito indicam significância estatística em 5%.

Efeito	Etofenprox PM			Deltametrina WG		
	DF	Chisq	<i>P-valor</i>	DF	Chisq	<i>P-valor</i>
Intercepção	1	<b>4.2827</b>	<b>&lt; 0.05</b>	1	0.0005	0.982
Grupo	1	<b>600.5625</b>	<b>&lt; 0.001</b>	1	<b>860.0414</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Condição	2	0.4652	0.7925	2	0.0456	0.9775
Superfície	1	1.4667	0.2259	1	0.0309	0.8605
Mês	6	<b>101.1426</b>	<b>&lt; 0.001</b>	6	4.7423	0.5773
Condição :superfície	2	0.1205	0.9415	2	3.4134	0.1815
Condição: mês	12	<b>120.4538</b>	<b>&lt; 0.001</b>	12	9.216	0.6844
Superfície: mês	6	<b>86.4894</b>	<b>&lt; 0.001</b>	6	3.1073	0.7953
Condição: superfície: mês	12	<b>88.94</b>	<b>&lt; 0.001</b>	12	11.865	0.4566

**Tabela 4.11** – Taxas de mortalidade para *Anopheles marajoara* exposto a etofenprox PM, em diferentes superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: março a setembro de 2017.

Inseticida	Superfície	Grupo	Condição	Dias após borrifação						
				1	30	60	90	120	150	180
Etofenprox PM	ASR	Exposto	Painel	0.77 [0.6, 0.99]	0.59 [0.45, 0.76]	0.48 [0.36, 0.65]	0.74 [0.58, 0.94]	0.71 [0.55, 0.92]	<b>0.08 [0.04, 0.14]</b>	0.08 [0.05, 0.14]
			Simulado	0.86 [0.68, 1.1]	0.68 [0.54, 0.86]	0.61 [0.47, 0.78]	0.61 [0.47, 0.79]	<b>0.15 [0.09, 0.23]</b>	0.05 [0.03, 0.11]	0.11 [0.06, 0.19]
			Campo	0.84 [0.66, 1.07]	0.58 [0.44, 0.75]	<b>0.19 [0.13, 0.28]</b>	0.15 [0.09, 0.25]	0.16 [0.1, 0.25]	0.27 [0.18, 0.39]	0.13 [0.08, 0.21]
		Controle	Painel	0.08 [0.06, 0.11]	0.06 [0.04, 0.08]	0.05 [0.04, 0.07]	0.08 [0.06, 0.1]	0.07 [0.05, 0.1]	<b>0.01 [0, 0.02]</b>	0.01 [0, 0.01]
			Simulado	0.09 [0.07, 0.12]	0.07 [0.05, 0.09]	0.06 [0.05, 0.09]	0.06 [0.05, 0.09]	<b>0.02 [0.01, 0.02]</b>	0.01 [0, 0.01]	0.01 [0.01, 0.02]
			Campo	0.09 [0.06, 0.12]	0.06 [0.04, 0.08]	<b>0.02 [0.01, 0.03]</b>	0.02 [0.01, 0.03]	0.02 [0.01, 0.03]	0.03 [0.02, 0.04]	0.01 [0.01, 0.02]
	MSP	Exposto	Painel	0.95 [0.75, 1.2]	0.99 [0.79, 1.24]	0.98 [0.78, 1.23]	0.94 [0.75, 1.18]	0.85 [0.66, 1.08]	0.98 [0.78, 1.22]	0.97 [0.77, 1.22]
			Simulado	0.99 [0.78, 1.24]	0.9 [0.72, 1.12]	0.85 [0.67, 1.08]	0.88 [0.7, 1.11]	0.9 [0.71, 1.14]	0.89 [0.71, 1.12]	0.8 [0.63, 1.03]
			Campo	1.02 [0.82, 1.26]	0.94 [0.75, 1.17]	0.81 [0.64, 1.03]	0.79 [0.6, 1.04]	0.85 [0.68, 1.07]	0.78 [0.6, 1.01]	0.95 [0.76, 1.19]
		Controle	Painel	0.1 [0.07, 0.13]	0.1 [0.08, 0.14]	0.1 [0.08, 0.13]	0.1 [0.07, 0.13]	0.09 [0.06, 0.12]	0.1 [0.08, 0.13]	0.1 [0.07, 0.13]
			Simulado	0.1 [0.08, 0.14]	0.09 [0.07, 0.12]	0.09 [0.07, 0.12]	0.09 [0.07, 0.12]	0.09 [0.07, 0.12]	0.09 [0.07, 0.12]	0.08 [0.06, 0.11]
			Campo	0.1 [0.08, 0.14]	0.1 [0.07, 0.13]	0.08 [0.06, 0.11]	0.08 [0.06, 0.11]	0.09 [0.07, 0.12]	0.08 [0.06, 0.11]	0.1 [0.07, 0.13]

*Odds Ratio* [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito) em comparações pareadas com mês anterior usando o método de Bonferroni Alvenaria sem reboco (ASR) e madeira sem pintura (MSP)

Nos bioensaios com inseticida deltametrina WG, realizados entre abril a outubro de 2018 no assentamento do Piquiazal, foram expostos 6.773 espécimes, com uma média de 18 mosquitos por cone em cada bioensaio (Tabela 4.9). Os resultados mostram uma taxa de mortalidade nos painéis de laboratório de 93,4%, no simulado de campo (casa teste) de 76,1% e diretamente no campo de 76,3%. A taxa geral de mortalidade foi superior a 80% apenas na condição de laboratório.

Os resultados do modelo para deltametrina WG foram melhores no painel do que nas condições de simulado de campo e campo (Figura 4.4). As paredes de alvenaria e madeira apresentaram taxas de mortalidade superiores a 80% na condição de painel, exceto no quinto mês na parede de ASR, que apresentou uma taxa de mortalidade de 79,3%. Na condição simulado de campo, as taxas de mortalidade foram superiores a 80% na parede de ASR apenas no primeiro dia e 30 dias após a borrifação, enquanto a MSP apresentou um pico de mortalidade de 83,3% no bioensaio de 30 dias após borrifação. Em condições de campo, as taxas de mortalidade para a parede ASR foram superiores a 80% até 60 dias após borrifação. A parede de MSP apresentou três picos: no primeiro dia (100%) e nos bioensaios de 60 dias (86,3%) e 90 dias (93,4%) após borrifação (Figura 4.4). Os resultados do modelo para o deltametrina WG mostraram que somente a variável Grupo foi estatisticamente significativa (Tabela 4.10), com as taxas de mortalidade no grupo Controle significativamente menores do que no grupo exposto (Tabela S1).

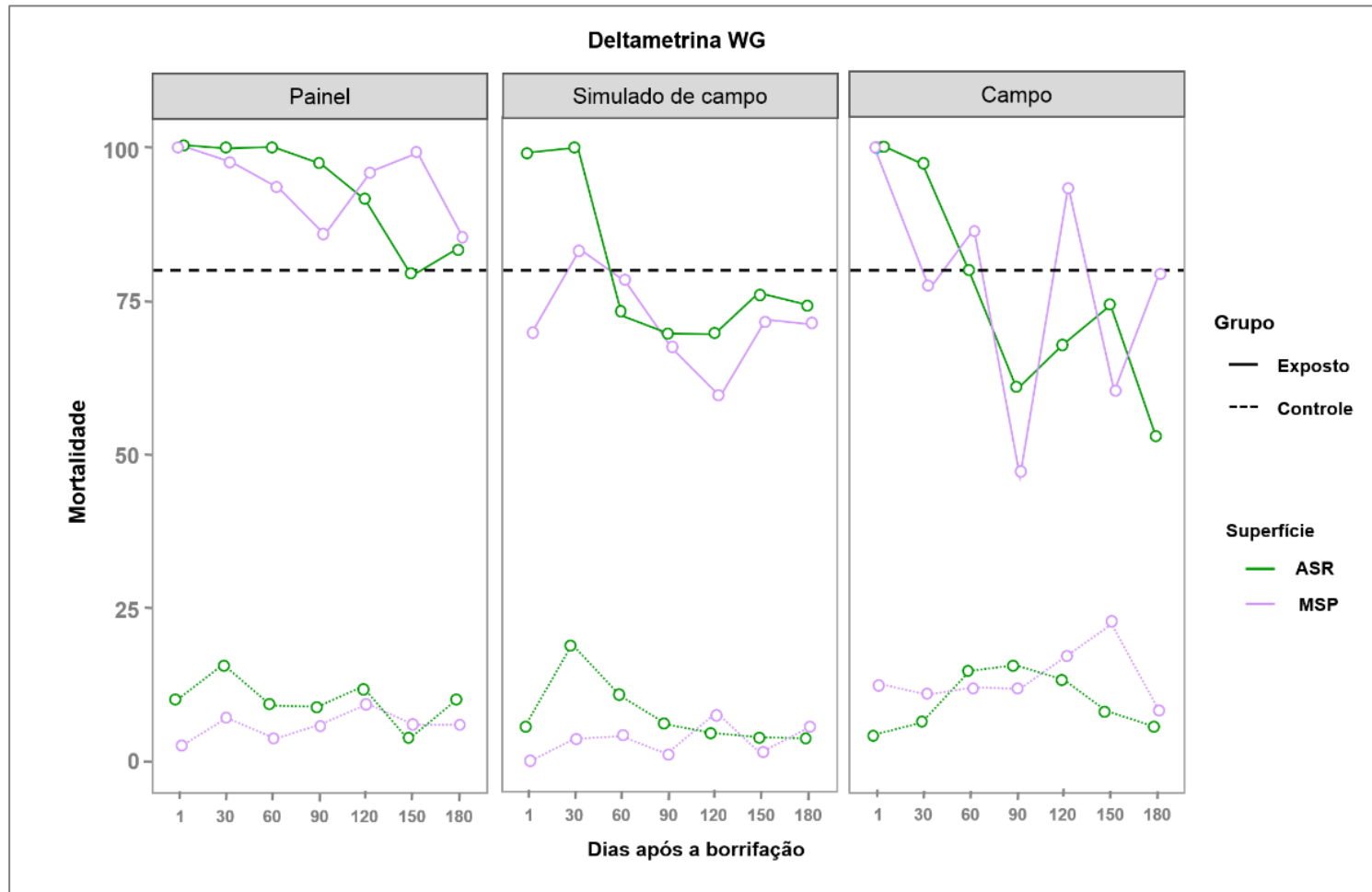
*Odds-ratio* para todas as condições no grupo exposto incluiu o limiar de mortalidade de 80%. No grupo exposto e controle para a superfície de MSP, a diferença significativa foi nos bioensaios de 90 e 120 dias após borrifação na condição de campo (Tabela 4.12).

**Tabela 4.12** – Taxas de mortalidade para *Anopheles marajoara* exposto a deltametrina WG, em diferentes superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: abril a outubro de 2018.

Inseticida	Superfície	Grupo	Condição	Dias após borrifação						
				1	30	60	90	120	150	180
Deltametrina WG	ASR	Exposto	Painel	1 [0.77, 1.29]	1.03 [0.84, 1.27]	0.99 [0.79, 1.25]	0.96 [0.78, 1.19]	0.93 [0.75, 1.16]	0.78 [0.62, 0.98]	0.84 [0.67, 1.06]
			Simulado	0.96 [0.77, 1.21]	1.05 [0.85, 1.29]	0.77 [0.62, 0.96]	0.69 [0.56, 0.86]	0.71 [0.59, 0.87]	0.76 [0.6, 0.95]	0.73 [0.58, 0.92]
			Campo	0.97 [0.78, 1.2]	0.96 [0.77, 1.19]	0.82 [0.66, 1.03]	0.64 [0.5, 0.81]	0.71 [0.56, 0.9]	0.75 [0.6, 0.93]	0.54 [0.42, 0.7]
		Controle	Painel	0.1 [0.08, 0.14]	0.11 [0.08, 0.14]	0.1 [0.08, 0.13]	0.1 [0.08, 0.13]	0.1 [0.07, 0.12]	0.08 [0.06, 0.1]	0.09 [0.07, 0.11]
			Simulado	0.1 [0.08, 0.13]	0.11 [0.08, 0.14]	0.08 [0.06, 0.1]	0.07 [0.05, 0.09]	0.07 [0.06, 0.09]	0.08 [0.06, 0.1]	0.07 [0.06, 0.1]
			Campo	0.1 [0.08, 0.13]	0.1 [0.08, 0.13]	0.08 [0.06, 0.11]	0.07 [0.05, 0.09]	0.07 [0.05, 0.1]	0.08 [0.06, 0.1]	0.06 [0.04, 0.07]
	MSP	Exposto	Painel	0.97 [0.77, 1.22]	0.96 [0.78, 1.19]	0.91 [0.73, 1.13]	0.85 [0.67, 1.06]	0.96 [0.79, 1.16]	0.97 [0.78, 1.21]	0.84 [0.67, 1.04]
			Simulado	0.66 [0.51, 0.86]	0.8 [0.63, 1.01]	0.77 [0.61, 0.97]	0.66 [0.53, 0.82]	0.63 [0.51, 0.78]	0.69 [0.54, 0.89]	0.7 [0.56, 0.89]
			Campo	1.01 [0.81, 1.26]	0.78 [0.62, 0.99]	0.88 [0.7, 1.1]	<b>0.5 [0.38, 0.66]</b>	<b>0.99 [0.79, 1.23]</b>	0.67 [0.53, 0.85]	0.79 [0.63, 0.99]
		Controle	Painel	0.1 [0.08, 0.13]	0.1 [0.08, 0.13]	0.09 [0.07, 0.12]	0.09 [0.07, 0.11]	0.1 [0.08, 0.12]	0.1 [0.08, 0.13]	0.09 [0.07, 0.11]
			Simulado	0.07 [0.05, 0.09]	0.08 [0.06, 0.11]	0.08 [0.06, 0.1]	0.07 [0.05, 0.09]	0.06 [0.05, 0.08]	0.07 [0.05, 0.09]	0.07 [0.05, 0.09]
			Campo	0.1 [0.08, 0.13]	0.08 [0.06, 0.11]	0.09 [0.07, 0.12]	<b>0.05 [0.04, 0.07]</b>	<b>0.1 [0.08, 0.13]</b>	0.07 [0.05, 0.09]	0.08 [0.06, 0.11]

*Odds Ratio* [Intervalo de confiança de 95%]. Mortalidade com significância ao nível de 5% (negrito) em comparações pareadas com mês anterior usando o método de Bonferroni

AIVENARIA SEM REBOCO (ASR) E MADEIRA SEM PINTURA (MSP)



**Figura 4.4** – Percentual de mortalidade dos mosquitos *Anopheles marajoara* expostos ao inseticidas deltametrina WG, em duas superfícies em painel, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo por meio de bioensaios de parede após borrifração residual intradomiciliar-BRI no município de Macapá-Amapá, Brasil. Período: abril a outubro de 2018. Grupo exposto linha contínua e grupo controle linha tracejada.

### **4.3 Provas biológicas: painel, simulado de campo (paredes internas e externas da casa teste)**

A residualidade do inseticida deltametrina SC-PE foi avaliada por um período de até um ano (Tabela 4.13).

No laboratório foram expostos um total de 6.240 espécimes de anofelinos, com uma média de 17 mosquitos por cone em cada bioensaio nas superfícies de ACR, ASR, MCP e MSP. A taxa de mortalidade foi de 89,1% com residualidade de até 12 meses.

Nos painéis as taxas de mortalidade entre as superfícies foram maiores em MSP e ACR. Em superfície de MSP a residualidade foi por 12 meses com taxas superiores a 80% variando de 80,7% a 100%. Na ACR a residualidade foi de 10 meses já que no 11º e 12º mês do experimento as taxas diminuíram para níveis inferiores a 80% (79,7% e 78,8%). A residualidade na MCP foi de três meses e na ASR de cinco meses (Figura 4.5).

Para o simulado de campo na casa teste foram expostos 7.049 espécimes de anofelinos, com uma média de 17 mosquitos por cone em cada bioensaio, avaliando as paredes internas a taxa de mortalidade foi de 79,9% com residualidade igual a 10 meses (Tabela 4.13).

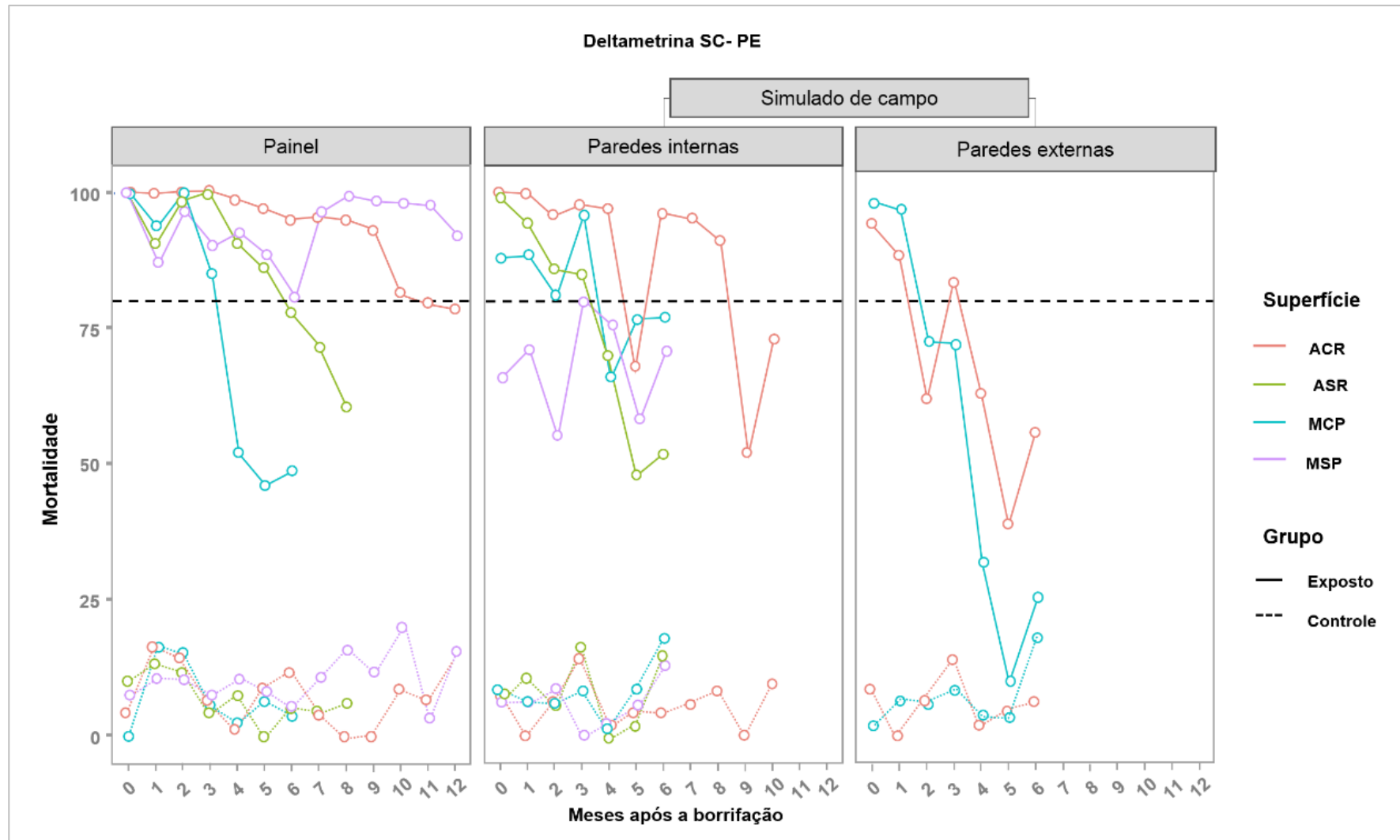
No simulado de campo a taxa de mortalidade entre as paredes internas foi maior em ACR. Na ACR a residualidade foi de oito meses com taxa de mortalidade superior a 80% variando de 91,2% a 100%. Para as paredes de ASR e MCP residualidade foi de três meses (Tabela 4.13).

Nos bioensaios realizados na parede de MSP a taxa de mortalidade foi superior a 80% apenas no terceiro mês de análise (Figura 4.5). Essa superfície foi testada por seis meses e a borrifação foi realizada sob supervisão no mesmo dia que as demais superfícies.



**Tabela 4.13** – Análise do efeito *knockdown* e da taxa de mortalidade pelo teste de cone para anofelinos expostos ao inseticida deltametrina SC-PE em painéis e simulado de campo (paredes internas e externas da casa teste) no período de março de 2018 a março de 2019 em Macapá – Amapá, Brasil.

Inseticida	Bioensaios	Condição casa	Cones	Mosq. expostos	$\bar{x}$	Mosq. caídos após 30'	$\bar{x}$	Efeito <i>knockdown</i>	Mosq. mortos	$\bar{x}$	Mortalidade (%)
Deltametrina SC-PE	Painel	-	378	6.240	16,51	4.954	13,11	79,39	5.560	14,71	89,10
		Interno	288	4.900	17,01	3.215	11,16	65,61	3.915	13,59	79,90
	Casa-Teste	Externo	126	2.149	17,06	1.216	9,65	56,58	1.381	10,96	64,26
		Geral	414	7.049	17,03	4.431	10,70	62,86	5.296	12,79	75,13
<b>Total</b>	-	-	<b>792</b>	<b>13.289</b>	<b>16,78</b>	<b>9.385</b>	<b>11,85</b>	<b>70,62</b>	<b>10.856</b>	<b>13,71</b>	<b>81,69</b>



**Figura 4.5** – Percentual de mortalidade dos mosquitos expostos ao inseticidas deltametrina SC-PE, em painéis e simulado de campo (paredes internas e externas da casa teste) no período de março de 2018 a março de 2019 em Macapá – Amapá, Brasil.

No simulado de campo a taxa de mortalidade entre as paredes externas foi maior em ACR. Na ACR a residualidade foi de três meses com taxa de mortalidade 88,5% para o primeiro mês, 62,4% para o segundo mês e 83,8% para o terceiro mês. Nos bioensaios realizados na parede de MCP a taxa de mortalidade foi superior a 80% até o primeiro mês de análise (Figura 4.5).

Nos bioensaios realizados em painéis e simulado de campo as taxas de mortalidade foram maiores nos grupos expostos do que nos controles que mantiveram limite de mortalidade inferior a 20%.

Na comparação da residualidade entre painel e simulado de campo, os resultados do modelo mostraram que o grupo, o tipo de superfície e a interação entre a condição (painel e simulado de campo) e o tipo de superfície foram estatisticamente significativas (Tabela 4.14). As taxas de mortalidade foram significativamente maiores em todas as superfícies para o grupo exposto quando comparado ao grupo controle. Foram encontradas diferenças significativas nas taxas de mortalidade apenas na superfície de MSP quando comparamos as condições painel e simulado de campo no grupo expostos ( $p < 0,001$ ) e no grupo controle ( $p < 0,001$ ).

Na comparação da residualidade no simulado de campo entre as paredes internas e externas, os resultados do modelo mostraram que o grupo, condição – simulado de campo (paredes internas e externas) e o tipo de superfície apresentaram diferença estatística (Tabela 4.15). As taxas de mortalidade foram significativamente maiores no grupo exposto, na condição interna e na parede de ACR. Foi encontrado diferenças significativas nas taxas de mortalidade em ambos os tipos de superfície quando comparamos as condições internas e externas no grupo exposto e controle para a superfície de ACR ( $p < 0,01$ ) e para a superfície de MCP ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 4.14** – Resultados do modelo de regressão logística para deltametrina SC-PE para medir o impacto do grupo (exposto ou controle), condição experimental (painel e simulado de campo) e superfície (alvenaria sem reboco e madeira sem pintura) e a interação bidirecional entre condição experimental e superfície. Entradas em negrito indicam significância estatística em 5%.

Efeito	Deltametrina SC – PE		
	DF	Chisq	P-valor
Intercepção	<b>1</b>	<b>5.6563</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Grupo	<b>1</b>	<b>1449.4771</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Condição	1	2.0159	0.155662
Superfície	<b>3</b>	<b>18.3017</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Condição: superfície	<b>3</b>	<b>25.1832</b>	<b>&lt; 0.001</b>

**Tabela 4.15** – Resultados do modelo de regressão logística para deltametrina SC-PE para medir o impacto do Grupo (controle ou exposto), Condição – simulado de campo (paredes internas e externas) e tipo de superfície (alvenaria sem reboco em madeira sem pintura) e a interação bidirecional entre Condição – simulado de campo e Superfície. Entradas em negrito indicam significância estatística em 5%.

Efeito	DF	Deltametrina SC - PE	
		Chisq	P-valor
Intercepção	<b>1</b>	<b>56.6878</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Grupo	<b>1</b>	<b>691.3995</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Condição (internas e externas)	<b>1</b>	<b>12.9701</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Superfície	<b>1</b>	<b>6.2632</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Condição (internas e externas): superfície	1	1.0119	0.314447

#### 4.4 Status de susceptibilidade/resistência

##### 4.4.1 Bioensaios de tubo com papel impregnado

Os resultados das análises dos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando concentração de 0,05% e do inseticida deltametrina, realizadas com a população de *An. marajoara* do município de Mazagão apresentou efeito *Knockdown* de 100% ao final da exposição de uma hora. A taxa de mortalidade 24 horas após a exposição foi de 91,1% (teve uma recuperação de 8,9%) (Tabela 4.16). Para os parâmetros da OMS, esta população apresentou perda de suscetibilidade.

Considerando-se esse resultado, foram realizados bioensaios de tubo (papel impregnado) para detecção da intensidade de resistência, utilizando uma concentração de 0,25% do inseticida deltametrina em população de *An. marajoara* do município de Mazagão, cuja avaliação é feita de acordo com o percentual de mortalidade, que apresentou efeito *knockdown* de 100% ao final da exposição de uma hora. Uma vez que o resultado obtido foi de mortalidade superior a 98% (100%) na dose 5x maior que a Dose Diagnóstica (Tabela 4.17), para os parâmetros da OMS essa população tem uma resistência de baixa intensidade (WHO 2016).

**Tabela 4.16** – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de *Anopheles marajoara* do município de Mazagão – Amapá, Brasil. Período: 10 a 18 de abril de 2019.

Tempo minutos	Mosquitos expostos	Mosquitos caídos	Efeito <i>knockdown</i> %	Mosquitos mortos	Mortalidade %
0'	281	0	0,0		
5'	281	21	7,5		
10'	281	73	26,0		
15'	281	148	52,7		
20'	281	217	77,2		
25'	281	241	85,8		
30'	281	263	93,6		
35'	281	268	95,4		
40'	281	276	98,2		
45'	281	281	<b>100,0</b>		
50'	281	281	<b>100,0</b>		
55'	281	281	<b>100,0</b>		
60'	281	281	<b>100,0</b>		
<b>1.440' (24h)</b>	<b>281</b>			<b>256</b>	<b>91,1</b>

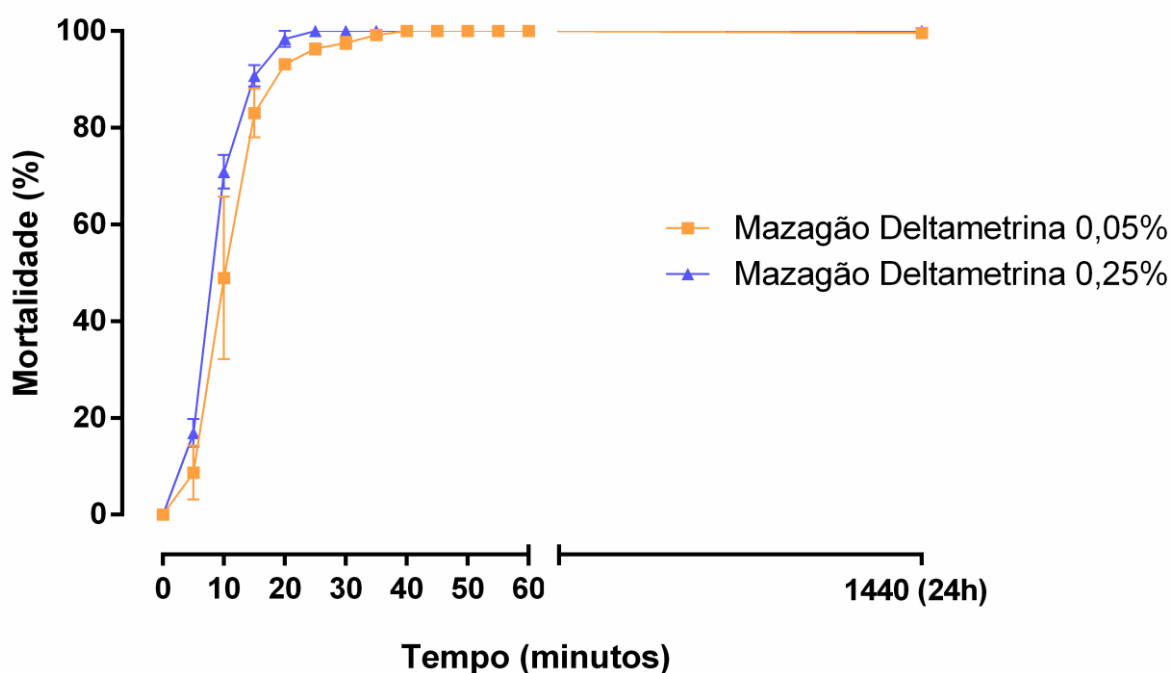
\*Parâmetros OMS (≥98% suscetível; 90-97% possível resistência; < 90% resistência)

**Tabela 4.17**– Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para intensidade de resistência utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,25% para população de *Anopheles marajoara* do município de Mazagão – Amapá, Brasil. Período: 23 a 25 de setembro de 2019.

Tempo minutos	Mosquitos expostos	Mosquitos caídos	Efeito <i>knockdown</i> %	Mosquitos mortos	Mortalidade %
0'	274	0	0,0		
5'	274	45	16,4		
10'	274	194	70,8		
15'	274	249	90,9		
20'	274	270	98,5		
25'	274	274	100,0		
30'	274	274	100,0		
35'	274	274	100,0		
40'	274	274	100,0		
45'	274	274	100,0		
50'	274	274	100,0		
55'	274	274	100,0		
60'	274	274	100,0		
<b>1.440' (24h)</b>	<b>274</b>			<b>274</b>	<b>100,0%</b>

\*Parâmetros OMS (≥98% suscetível; 90-97% possível resistência; < 90% resistência)

A população de *An. marajoara* do município de Mazagão foi utilizada como padrão de referência para suscetibilidade entre as populações avaliadas. A partir dos resultados desta análise as taxas de mortalidade de *An. marajoara* foram determinadas dentro do ensaio de Tempo de Queda (KdT) (Figura 4.6). Para esta população o efeito *knockdown* ficou distribuído entre o intervalo (KdT) de 5 a 45 minutos de exposição ao produto com concentração 0,05% e 5 a 20 minutos para a concentração 0,025% onde este último tempo apresentou 100% de mosquitos caídos.



**Figura 4.6** – Bioensaio do tipo Tempo de Queda com o piretroide deltametrina a uma concentração de 0,05% e 0,25% na população de *Anopheles marajoara* do município de Mazagão - Amapá, Brasil. São apresentadas as médias, acompanhadas de erro padrão para as mortalidades observadas ao longo do tempo de exposição ao inseticida.

Na Tabela 4.18 podemos observar os parâmetros de mortalidade para a população de *An. marajoara* do município de Mazagão, onde os  $KdT_{50}$  é de 15,35 e o  $KdT_{95}$  é de 35,10, para a concentração de 0,05% e de  $KdT_{50}$  é de 7,84 e o  $KdT_{95}$  é de 16,69 para a concentração de 0,25%, demonstrando que quanto maior o KdT de uma população, mais espécimes sobrevivem à dose diagnóstica.

**Tabela 4.18** – Tempo de Queda para a espécie *Anopheles marajoara* com inseticida deltametrina a 0,05% e 0,25% em bioensaios de tubo (papel impregnado) realizado em Macapá – Amapá, Brasil.

Espécie	População	Inseticida deltametrina	Nº mosquitos	Parâmetros de Mortalidade*				
				KdT50	IC95%	KdT95	IC95%	Slope
<i>An. marajoara</i>	Mazagão	0,05%	281	15,35	14,59 – 16,08	35,10	32,98 – 37,75	4,6
		0,25%	274	7,84	7,45 – 8,21	16,69	15,60 – 18,06	5,01

\*Tempo letal para 50% (KdT<sub>50</sub>) e 95% (KdT<sub>95</sub>) para a população (intervalo de confiança de 95%). A regressão linear é uma estimativa da heterogeneidade das populações

Os resultados das análises dos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando uma concentração de 0,05% do inseticida deltametrina, realizadas com a população de *An. darlingi* do município de Macapá apresentou taxa de mortalidade de 100% após 24 horas da exposição ao papel impregnado (Tabela 4.19). Para os parâmetros da OMS, esta população apresentou suscetibilidade.

**Tabela 4.19** – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de *Anopheles darlingi* do município de Macapá – Amapá, Brasil. Período: 12 a 18 de julho de 2018.

Tempo minutos	Mosquitos expostos	Mosquitos caídos	<i>knockdown</i> %	Mosquitos mortos	Mortalidade %
0'	249	0	0,0		
5'	249	39	15,7		
10'	249	124	49,8		
15'	249	184	73,9		
20'	249	220	88,4		
25'	249	235	94,4		
30'	249	243	97,6		
35'	249	247	99,2		
40'	249	249	100,0		
45'	249	249	100,0		
50'	249	249	100,0		
55'	249	249	100,0		
60'	249	249	100,0		
<b>1.440 (24h)</b>	<b>249</b>			<b>249</b>	<b>100,0</b>

**\*Parâmetros OMS** (≥98% suscetível; 90-97% possível resistência; < 90% resistência)



Os resultados das análises dos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando uma concentração de 0,05% do inseticida deltametrina, realizadas com a população de *An. darlingi* do município de Mazagão apresentou efeito *knockdown* de 100% ao final da exposição de uma hora. A taxa de mortalidade 24 horas após a exposição foi de 99,6% (teve uma recuperação de 0,4%) (Tabela 4.20). Para os parâmetros da OMS, esta população apresentou suscetibilidade.

**Tabela 4.20** – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de *Anopheles darlingi* do município de Mazagão – Amapá, Brasil. Período: 21 a 28 de agosto de 2018.

Tempo minutos	Mosquitos expostos	Mosquitos caídos	<i>knockdown</i> %	Mosquitos mortos	Mortalidade %
0'	249	0	0,0		
5'	249	22	8,8		
10'	249	123	49,4		
15'	249	207	83,1		
20'	249	232	93,2		
25'	249	240	96,4		
30'	249	243	97,6		
35'	249	247	99,2		
40'	249	249	100,0		
45'	249	249	100,0		
50'	249	249	100,0		
55'	249	249	100,0		
60'	249	249	100,0		
<b>1.440 (24h)</b>	<b>249</b>			<b>248</b>	<b>99,6</b>

\*Parâmetros OMS (≥98% suscetível; 90-97% possível resistência; < 90% resistência)

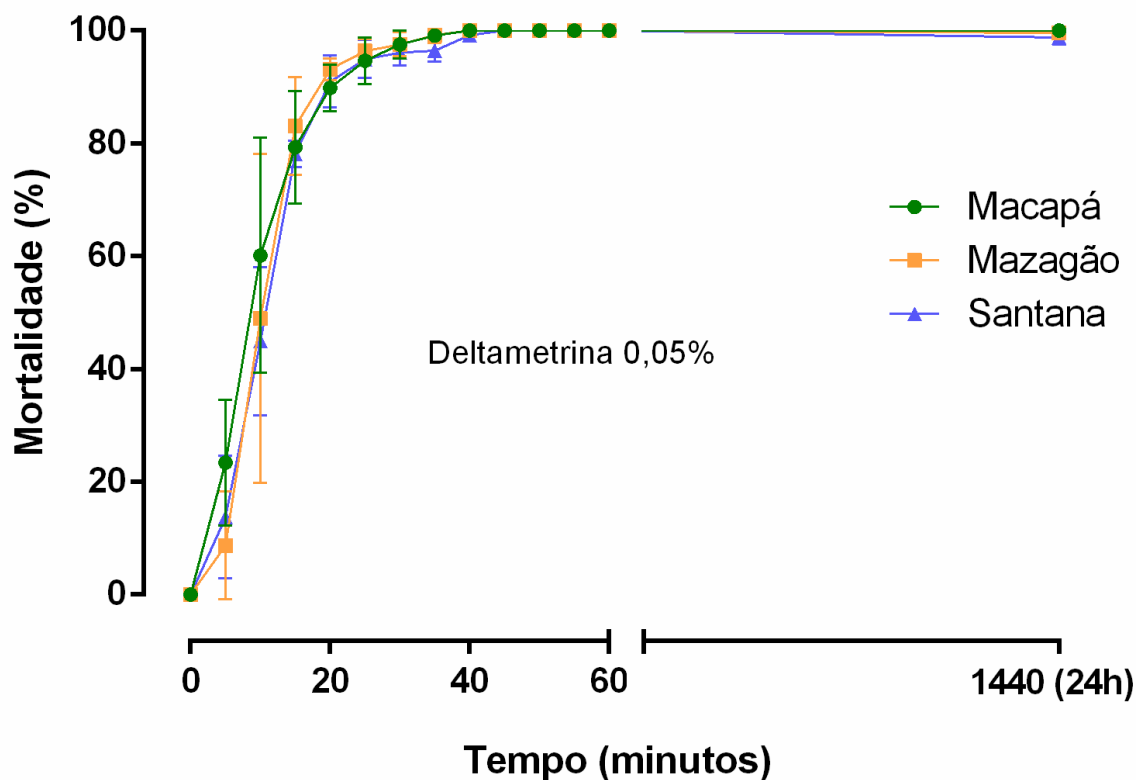
Os resultados das análises dos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando uma concentração de 0,05% do inseticida deltametrina, realizadas com a população de *An. darlingi* do município de Santana apresentou efeito *knockdown* de 100% ao final da exposição de uma hora. A taxa de mortalidade 24 horas após a exposição foi de 98,8% (teve uma recuperação de 1,2%) (Tabela 4.21). Para os parâmetros da OMS, esta população apresentou suscetibilidade.

**Tabela 4.21** – Análises da taxa de mortalidade pelos bioensaios de tubo (papel impregnado) para Tempo de Queda utilizando o inseticida deltametrina na concentração 0,05% para população de *Anopheles darlingi* do município de Santana – Amapá, Brasil. Período: 31 de agosto a 04 de setembro de 2018.

Tempo minutos	Mosquitos expostos	Mosquitos caídos	<i>knockdown</i> %	Mosquitos mortos	Mortalidade %
0'	251	0	0,0		
5'	251	34	13,5		
10'	251	112	44,6		
15'	251	196	78,1		
20'	251	228	90,8		
25'	251	238	94,8		
30'	251	241	96,0		
35'	251	242	96,4		
40'	251	249	99,2		
45'	251	251	100,0		
50'	251	251	100,0		
55'	251	251	100,0		
60'	251	251	100,0		
<b>1.440 (24h)</b>	<b>251</b>			<b>248</b>	<b>98,8</b>

**\*Parâmetros OMS** (≥98% suscetível; 90-97% possível resistência; < 90% resistência)

As taxas de mortalidade de *An. darlingi* dos municípios de Macapá, Mazagão e Santana foram determinadas dentro do ensaio de Tempo de Queda (KdT) (Figura 4.7). Para estas populações o efeito *knockdown* ficou distribuído entre o intervalo (KdT) de 5 a 40 min de exposição ao produto, onde este último tempo apresenta 100% de caídos.



**Figura 4.7** – Bioensaio do tipo Tempo Letal com o piretroide deltametrina a uma concentração de 0,05% nas populações de *Anopheles darlingi* dos municípios de Macapá, Mazagão e Santana-Amapá, Brasil. São apresentadas as médias, acompanhadas de erro padrão para as mortalidades observadas ao longo do tempo de exposição ao inseticida.

Na Tabela 4.22 podemos observar os parâmetros de mortalidade para a população de *An. darlingi* do município de Macapá onde o KdT<sub>50</sub> foi de 10,93 e o KdT<sub>95</sub> foi de 26,04; Mazagão onde o KdT<sub>50</sub> foi de 10,57 e o KdT<sub>95</sub> foi de 23,52 e Santana onde o KdT<sub>50</sub> foi de 11,13 e o KdT<sub>95</sub> foi de 26,92. Demonstrando que quanto maior o KdT de uma população, mais espécimes sobrevivem à dose diagnóstica.

Tabela 4.22 – Tempo de Queda para a espécie *Anopheles darlingi* com inseticida deltametrina 0,05% em bioensaios de tubo (papel impregnado) realizado em Macapá – Amapá, Brasil.

Espécie	População	Nº mosquitos	Parâmetros de Mortalidade*				
			KdT50	IC95%	KdT95	IC95%	Slope
<i>An. darlingi</i>	Macapá	249	10,93	10,27 – 11,56	26,04	24,37 – 28,12	4,36
	Mazagão	249	10,57	9,76 – 11,29	23,52	22,00 – 25,58	4,74
	Santana	251	11,13	9,81 – 12,58	26,92	23,47 – 31,05	4,30

\*Tempo letal para 50% (KdT<sub>50</sub>) e 95% (KdT<sub>95</sub>) para a população (intervalo de confiança de 95%). A regressão linear é uma estimativa da heterogeneidade das populações

#### 4.4.2 Genotipagem da clássica mutação *Kdr* Leu1014Phe

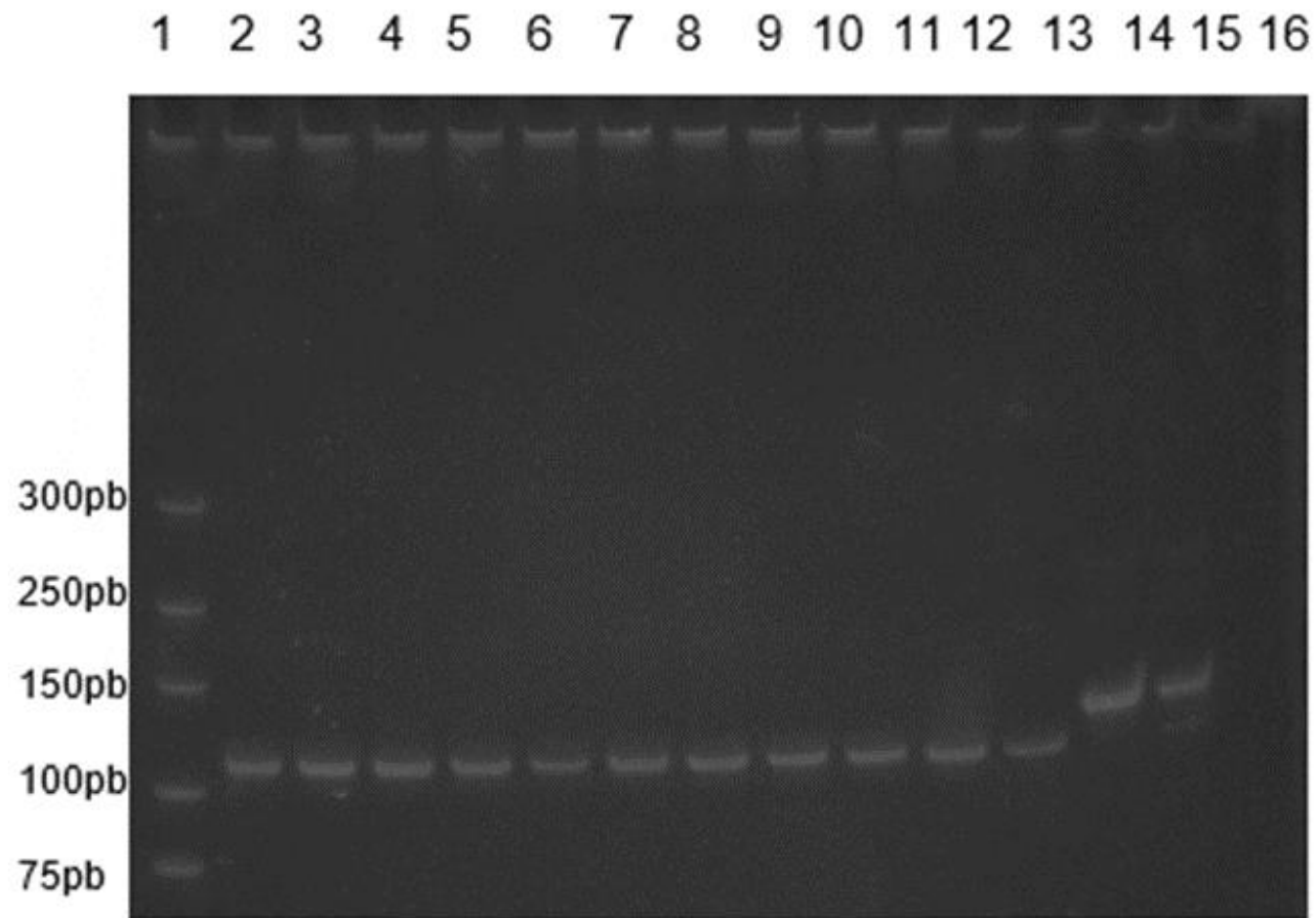
Foi extraído DNA genômico de 626 espécimes adultos de *An. darlingi*, coletados fora dos domicílios nos municípios de Macapá (220), Mazagão (218) e Santana (188) (Tabela 4.23). Destas amostras foram realizados ensaios moleculares para diagnóstico da mutação *Kdr* do sítio Leu1014Phe. Primeiramente foi amplificada a região IIS6 do *Nav* e, em seguida, a AS-PCR para cada indivíduo.

A amplificação da região IIS6 do *Nav* revelou bandas com aproximadamente 400 pb e, então o produto da PCR obtido, foi diluído 200 vezes e aplicado AS-PCR para a genotipagem das possíveis variações do sítio 1014 em *An. darlingi* (Leu ou Phe). Foram obtidos os genótipos de 99% das amostras Leu/Leu com o tamanho do produto esperado (106pb), sendo todos diagnosticados como homozigotos recessivos (Figura 4.8) para o sítio 1014 e apenas 1% com genótipo indefinido. Portanto, em nenhuma das amostras genotipadas foi detectada a clássica mutação *Kdr* Leu1014Phe.

Tabela 4.23 – Genotipagem do sítio 1014 do canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*) em três populações de *Anopheles darlingi* do estado do Amapá para variação Leu1014Phe.

População	n	Leu/Leu	Phe/Phe	Leu/Phe	Ind*.
<b>MCP</b>	220	211	0	0	9
<b>STN</b>	188	188	0	0	0
<b>MZG</b>	218	218	0	0	0
<b>Total</b>	<b>626</b>	<b>617</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9</b>

\*Ind = genotipagem indeterminada



**Figura 4.8** – Fotografia representativa de gel de eletroforese revelando os produtos da AS-PCR em *Anopheles darlingi*. No poço (1) está representado o marcador de peso molecular DNA Ladder O'GeneRuler DNA Ladder, Ultra Low Range/Fermentas, 150 ng; nos poços (2-12) estão representadas as amostras homocigotas para o alelo selvagem (1014Leu); nos poços 13 ao 15 estão representados os controles positivos correspondentes aos genótipos 1014Leu/Leu, 1014Phe/Phe e 1014Leu/Phe respectivamente, e no poço 16 está o controle negativo.

## 5 DISCUSSÃO

“Devemos estar dispostos a nos livrar da vida que planejamos para poder viver a vida que nos espera”

Joseph Campbell

Diante da visão de um mundo livre do sofrimento humano em decorrência de doenças transmitidas por vetores, a Organização Mundial de Saúde visa reduzir o fardo e a ameaça dessas doenças por meio de um controle vetorial eficaz, localmente adaptado e sustentável (WHO 2017).

De acordo com o último relatório mundial da malária, após mais de uma década de avanços constantes no combate à doença, o progresso estacionou, dificultando o alcance dos objetivos fundamentais propostos na assembleia da “*Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*” (WHO 2018b). Na região das Américas houve um proeminente aumento na incidência de casos entre os anos de 2015 a 2017 em nove países, no Brasil, especificamente na região Amazônica (PAHO/WHO 2018).

Uma ação urgente é necessária para resgatar o direcionamento global de resposta à malária, cujo desafio está nas mãos dos países mais afetados. Assim, a campanha “Zero malária começa comigo” (UNOPS 2019) lançada no dia mundial da malária de 2019, da OMS em parceria com outras organizações, pretende manter a malária no topo da agenda política, mobilizar recursos, e capacitar as comunidades para se apropriarem da prevenção e tratamento adequado.

Dentro deste cenário, uma importante estratégia é o controle dos vetores por meio do uso de inseticidas químicos. Entre as classes recomendados pela OMS para borrifação residual intradomiciliar (BRI) e impregnação dos mosquiteiros tratados com inseticida, o grupo dos piretroides tem se destacado por sua segurança para o meio ambiente, sendo priorizado por muitos programas de controle da malária nos últimos anos (WHO 2006c; WHOPES 2014; WHO 2015a).

A primeira consideração na escolha do inseticida a ser usado para o BRI é a sua eficiência quanto a mortalidade dos vetores e sua segurança para os habitantes, trabalhadores, animais e meio ambiente. Assim como a suscetibilidade das espécies-alvo ao inseticida, a duração do efeito residual do produto, se torna fundamental neste contexto. O inseticida deve permanecer eficaz na superfície em que for aplicado tempo suficiente para cobrir o período de transmissão da malária. No entanto, sabe-se que a efetividade da BRI depende desses e de outros fatores, como o hábito de repouso do vetor, qualidade, cobertura, e efeito residual do inseticida borrifado (WHO

1993, 1995). Além disso, a BRI exige uma relativa administração quanto ao planejamento, logística, infraestrutura e habilidade necessárias da equipe técnica. A falta de comprometimento e financiamento dos governos para sustentar esses esforços a longo prazo refletem negativamente no sucesso da BRI.

Os inseticidas recomendados pela OMS possuem residualidade que varia entre dois à seis meses (Najera & Zaim 2001; WHO 2015c; WHOPES 2015). Além disso, a efetividade da BRI pode ser alcançada quando borrifada sobre o tipo certo de superfície, o que de acordo com a OMS, os inseticidas de formulação pó molhável (PM) e granulados dispersáveis em água (WG) são mais adequados para superfícies muito porosas, como o barro, enquanto que suspensão encapsulada (CS) ou concentrado emulsionável (CE) são mais efetivos nas alvenarias e madeira com ou sem pintura, mas especialmente naquelas com tintas à base de óleo (WHO 1997).

A complexidade do monitoramento do controle vetorial com BRI em situações de campo (Dengela et al. 2018) pode ser superada com informações obtidas de bioensaios realizados em condições simuladas em campo. É fundamental a utilização de uma casa para testes de inseticida com a finalidade de diminuir a diferença entre os resultados de bioensaios em condição de laboratório e a realidade do que ocorre em campo nas habitações das áreas endêmicas. O presente estudo demonstrou a ocorrência de uma ampla variação e desvios das faixas de residualidade da WHOPES para todos os inseticidas em simulado de campo na casa teste, aplicados em quatro diferentes superfícies.

A pesquisa evidenciou que das formulações em pó molhável e granulados dispersáveis em água, o etofenprox PM, bendiocarb PM e deltametrina WG, apresentaram maior residualidade em superfícies de madeira, fato não observado no lambidacialotrina PM, cuja efetividade foi menor em todas as superfícies. Para a formulação de suspensão concentrada, o alfacipermetrina SC apresentou eficiência apenas na madeira com pintura, já o pirimiphos-methyl CS demonstrou ser eficiente nas superfícies de madeira e de alvenaria, dentro do espaço temporal apresentado pelo WHOPES (2018).

Com base na recomendação do WHOPES, os inseticidas devem causar  $\geq 80\%$  da mortalidade dos mosquitos na observação após 24 horas da exposição, nas superfícies da parede borrifadas para serem considerados efetivos, sendo esse o parâmetro adotado para as análises neste trabalho. Ao avaliarmos a efetividade dos sete inseticidas utilizados no período de estudo, sem no entanto discriminarmos cada tipo de superfície, foi possível observar que apenas o deltametrina WG e o pirimiphos-



methyl CS atenderam a recomendação da OMS quanto à residualidade, uma vez que mantiveram a taxa de mortalidade esperada por um período de até 240 dias, compreendida no intervalo de três a seis meses e de quatro a seis meses respectivamente (WHOPES 2018). Para os demais inseticidas testados, a taxa de mortalidade foi inferior a 80% e não atingiu o período mínimo de residualidade, embora o etofenprox PM tenha tido o melhor desempenho. Os resultados reforçam a necessidade de atenção para fatores como o período de transmissão da malária nas regiões onde ocorrerá a BRI, a fim de que a escolha dos inseticidas seja adequada.

Ao considerar as superfícies testadas, notou-se que a eficiência dos inseticidas variou sobre os diferentes tipos de superfície corroborando as características dos mesmos de acordo com a OMS (WHO 1997), podendo-se observar que todos os inseticidas tiveram uma maior residualidade nas superfícies de madeira, principalmente nas de MCP. Por sua vez, nas superfícies de alvenaria, com exceção do pirimiphos-methyl CS, o efeito residual foi menor. É importante salientar que um dos principais motivos para a redução da atividade dos piretroides está relacionada a sua absorção por superfícies porosas, o que pode justificar a degradação mais rápida dos inseticidas dessa classe (Santos et al. 2007).

Evidência adicional de ampla variação na efetividade do inseticida ao longo do tempo está disponível na literatura (Santos et al. 2007; Tseng et al. 2008; Uragayala et al. 2015; Dengela et al. 2018). Especificamente para cada formulação, foi observado que alfacipermetrina SC apresentou um melhor desempenho nas superfícies de madeira comparado com as de alvenaria, no entanto, a única superfície que alcançou o período mínimo com efeito residual de mortalidade média  $\geq 80\%$  por até 120 dias (quatro meses), foi a superfície de MCP, ficando as demais superfícies, abaixo do recomendado pela OMS. Um resultado semelhante foi encontrado na República Democrática de São Tomé e Príncipe, sugerindo a BRI em três ciclos anuais (Tseng et al. 2008) para abranger o período de transmissão da malária.

No trabalho de Santos et al. (2007) realizado no Brasil em condições de campo, a cipermetrina PM mostrou um efeito residual variando entre 30 e 90 dias nas três superfícies testadas: madeira, alvenaria com e sem reboco, com uma taxa de mortalidade de 70% considerada para o estudo. A variação entre as superfícies testadas e seu curto efeito residual comprometem a utilização deste inseticida pelos programas de controle da malária. Os resultados deste estudo divergem do realizado por Uragayala et al. (2015) em situação de campo, onde para as formulações de WG-SB e PM de alfacipermetrina em superfícies de barro e alvenaria, o efeito residual

variou de 11 a 16 semanas. Da mesma forma, os dados de Dengela et al. (2018) sobre a residualidade em países africanos mostrou desempenho satisfatório de alfacipermetrina PM, variando de 4 a 10 meses, em superfícies de barro, madeira, alvenaria e outros materiais encontrados nas residências borrifadas em condições operacionais dos programas de BRI.

Embora poucos estudos operacionais de campo tenham sido conduzidos com etofenprox, alguns estudos laboratoriais e de simulado de campo foram realizados (Nalim et al. 1997; Santos et al. 2007; Sreehari et al. 2009; Chanda et al. 2013b). A residualidade da formulação de etofenprox PM, de acordo com as diretrizes do WHOPES, varia de três a seis meses. No Brasil, a recomendação para BRI com este inseticida foi estabelecida com um intervalo de quatro meses, com base em bioensaios de laboratório realizados com painéis de MSP (Brasil 2014). Nossos resultados em simulado de campo apresentaram a mesma efetividade residual para essa superfície, porém Santos et al. (2007), utilizando este inseticida em condição de campo, observaram residualidade de até três meses para as superfícies de madeira e ASR, mas na superfície ACR a efetividade foi menor, corroborando os resultados encontrados neste estudo. Os resultados encontrados por Sreehari et al. (2009) em uma aldeia, mostrou mortalidade acima de 80% por três meses nas superfícies de alvenaria.

Nalim et al. (1997) conduziram um ensaio avaliando etofenprox onde o teste mostrou que o inseticida permaneceu efetivo por até quatro meses em superfícies de madeira e por cinco meses em bambu. Chanda et al. (2013b) demonstram resultado similar de residualidade por mais de cinco meses nas paredes revestidas com alvenaria. O etofenprox PM é o inseticida recomendado atualmente pelo MS para o controle de anofelinos no Brasil, uma vez que o inseticida tem uma toxicidade muito baixa em mamíferos e tem elevado fator de segurança (WHO 1999), que pode ser usado como uma alternativa mais segura para BRI no controle de populações suscetíveis a piretroides.

O piretroide lambidacialotrina na formulação pó molhável não obteve um resultado satisfatório neste simulado de campo, ficando apenas nas superfícies de MSP e MCP com mortalidade média  $\geq 80\%$  nos primeiros 30 dias, resultado inferior ao preconizado pela OMS, inviabilizando qualquer programação para os ciclos de borrifação, uma vez que de acordo com esse resultado, não oferece a proteção mínima necessária para o período de transmissão da malária na região Amazônica. A

análise anterior para a formulação de PM demonstrou uma curta residualidade nas superfícies de alvenaria e madeira sob avaliação no Brasil (Santos et al. 2007).

Da mesma forma, Rowland et al. (2013) em trabalhos realizados em Benin-África com lambdacialotrina CS em cabanas de alvenaria, relataram que para esta formulação a taxa de mortalidade caiu para menos de 20% dentro de um mês, corroborando o resultado encontrado, e demonstrando ineficiência do produto. Por sua vez, para Tchicaya et al. (2014) a mesma formulação de lambdacialotrina CS persistiu por 25 semanas em superfícies de alvenaria e barro, observados em estudos realizados em Bouaké, no centro da Costa do Marfim-África. Outros estudos em países africanos mostraram residualidade satisfatória, conforme o período recomendado pelo WHOPES em superfícies de madeira (Mulambalah et al. 2010) e alvenaria (Chanda et al. 2013b; Khosravani et al. 2017).

Dentre os piretroides avaliados o deltametrina WG apresentou o melhor desempenho, mantendo efeito residual com mortalidade  $\geq 80\%$  dos mosquitos por um período igual e ou superior a 90 dias em todas as superfícies testadas. Para Santos et al. (2007) a formulação de deltametrina SC apresentou desempenho semelhante em superfícies de madeira e alvenaria sem reboco por três meses em situação de campo no município de Belém do Pará. Este resultado assemelha-se a resultados encontrados no Irã em bioensaios realizados com a formulação PM em superfícies de alvenaria e gesso onde o efeito residual foi eficiente por no máximo três meses para ambas as superfícies (Vatandoost et al. 2009; Azizi et al. 2014; Khosravani et al. 2017). Vatandoost et al. (2009) e Rohani et al. (2007) com a formulação de deltametrina WG alcançaram quatro meses em gesso e madeira, e quatro meses e meio na alvenaria em condições de laboratório.

Raeisi et al. (2010) em experimentos com deltametrina WG no Irã, encontraram baixa residualidade para as superfícies de madeira (dois meses) e alvenaria (um mês). Em contrapartida, Etang et al. (2011) em Camarões, Chanda et al. (2013a) em Zâmbia e Dunford et al. (2018) na Flórida relataram resultados similares de eficiência com bioensaios para a mesma formulação por um período igual ou superior a cinco meses, em superfícies de alvenaria. O efeito residual da deltametrina demonstrou variabilidade em diferentes superfícies e formulações, ficando, entretanto, na maioria dos estudos dentro do estabelecido pela OMS (2015d).

Foi observado que alguns fatores afetam o tempo residual e a persistência dos inseticidas, por exemplo, a atividade dos piretroides pode ser comprometida pela rápida degradação em superfícies porosas com alta absorção. A baixa efetividade dos

piretroides nas superfícies de alvenaria comparada com a de madeira, encontrada no presente estudo, confirma observações prévias, mas diverge daquelas encontradas por Etang et al. (2011) e Dunford et al. (2018).

O uso constante de piretroides levou a um aumento na população de mosquitos resistentes. Embora tenhamos escassez de registros no Brasil (Silva et al. 2014; Galardo et al. 2015), isso é uma realidade nos países africanos (Winkler et al. 2012; Wondji et al. 2012; Rowland et al. 2013; Oxborough 2016), reforçando a importância do uso de produtos substitutos em esquemas de rotação de BRI (WHO 2015a).

O bendiocarb é um inseticida da classe dos carbamatos recomendado pela OMS e pode ser uma alternativa para substituir os piretroides. Apresenta residualidade que varia de dois a seis meses (WHOPES 2018). Porém, apesar dos carbamatos apresentarem uma ação letal rápida, sua persistência no ambiente é curta, tornando necessárias aplicações mais frequentes (Braga & Valle 2007b).

Para a formulação PM no estudo em simulado de campo, observamos que o bendiocarb mostrou ser eficiente para ciclos de borrifação com três meses de intervalo apenas em superfícies de madeira, no entanto, nas superfícies de alvenaria, não atingiu 30 dias com mortalidade  $\geq 80\%$ .

A formulação PM alcançou efetividade em diferentes superfícies nos trabalhos de Tangena et al. (2013a) que descreveram a persistência durante cinco meses em habitações com superfícies de barro e MCP, contrapondo os resultados deste estudo. Da mesma forma, Randriamaherijaona et al. (2017) no ensaio experimental em cabanas comparando a residualidade do bendiocarb aplicado em cinco superfícies (alvenaria, madeira, estanho, barro e materiais vegetativos) encontraram efetividade de até 80% por cinco meses após o tratamento. Por sua vez, para Kirunda et al. (2017) em situação de campo avaliando paredes de barro e pau-a-pique, tijolo liso e alvenaria com reboco pintada, as taxas de mortalidade foram de 100% até os seis meses (alvenaria pintada), 100% até quatro meses (tijolos), enquanto as superfícies das paredes de barro e pau-a-pique produziram uma taxa de mortalidade de 98% até 3 meses após a borrifação.

Os resultados encontrados neste trabalho, estão de acordo com alguns estudos que refletiram um curto efeito residual. Nos experimentos de Akogbéto et al. (2010) o bendiocarb decaiu em menos de quatro meses, mostrando curto efeito residual em paredes de alvenaria em condição de cabana experimental (simulado de campo). Da mesma forma, avaliação em cabana experimental realizada por Agossa et al. (2014) a taxa de mortalidade ficou entre dois e três meses. Thawer et al. (2015) realizaram

uma avaliação usando kits de quantificação de inseticidas para investigar a qualidade de borrifação e taxa de decaimento do bendiocarb CS em diferentes superfícies de parede em Kagera na Tanzânia, constatando que apesar de cobertura adequada da borrifação, o efeito residual desta formulação foi observado por três meses.

Na busca por inseticidas de longa duração, a tecnologia de microencapsulação de pirimiphos-methyl trouxe um ganho significativo ao atual contexto de resistência aos piretroides. Assim, a formulação de suspensão encapsulada CS minimiza a limitação de baixa residualidade encontrada nas formulações de concentrado emulsionável EC e PM, prolongando sua persistência (WHOPES 2018). No experimento de Aïkpon et al. (2014) para formulação de emulsão concentrada EC em situação de campo, o efeito residual foi de dois a três meses.

De acordo com os resultados o organofosforado pirimiphos-methyl CS demonstrou o melhor desempenho entre os seis inseticidas avaliados inicialmente. Diferente dos demais, o pirimiphos-methyl CS apresentou pouca variação e bom desempenho em relação às superfícies testadas inclusive nas superfícies de alvenaria. A residualidade foi de 240 dias (oito meses) em superfícies de alvenaria, 210 dias (sete meses) em MCP e 150 dias (cinco meses) em MSP. Este achado corrobora o estudo realizado por Chanda et al. (2015), cujo resultado foi similar em residências de alvenaria na África, apresentando residualidade superior a seis meses. Da mesma forma Rowland et al. (2013) ressaltam a eficiência da formulação CS, onde a suspensão encapsulada minimiza a degradação do produto, que por sua vez tem a persistência prolongada (Tangena et al. 2013b; Agossa et al. 2014; Tchicaya et al. 2014; Haji et al. 2015).

A diversidade das superfícies encontradas nas habitações das áreas endêmicas para malária, acaba sendo um dos fatores limitantes para o estabelecimento dos ciclos para BRI dos inseticidas recomendados pela OMS, uma vez que ocorre uma variabilidade quanto a persistência das formulações em relação ao tipo de superfície aplicada. Outro fator importante para o emprego de um inseticida, é a aceitabilidade por parte da população exposta. Produtos que exalam um forte odor, provocam prurido ou mancham as paredes da casa podem acarretar recusa por parte do morador e conseqüentemente desproteção da área estabelecida.

A importância da definição mais precisa do efeito residual dos inseticidas está na necessidade da programação dos ciclos de forma que a população humana permaneça protegida até que nova borrifação seja realizada. Idealmente os bioensaios de parede (WHO 2006a) devem ser conduzidos em habitações humanas

(situação de campo), a fim de abranger os fatores bióticos e abióticos que acabam sendo limitantes para o sucesso das intervenções (Kim et al. 2012). Aspectos da geografia, entomologia, comportamento humano e aceitação comunitária podem interferir na efetividade da BRI. Variabilidade de habitações e a não padronização dos bioensaios podem dificultar ou impedir a realização dos mesmos em situação de campo, levando a confundir ou camuflar os efeitos reais da intervenção a ser investigada (Okumu et al. 2012).

Após a avaliação dos sete inseticidas em simulado de campo na casa teste, realizamos a segunda etapa do estudo para a comparação do efeito residual agora nas condições de painel, casa teste e diretamente no campo, no intuito de identificar se os bioensaios em simulado de campo retratam melhor o que acontece em condições de campo, minimizando com isso os possíveis equívocos quanto a definição dos ciclos de borrifação.

Apesar dos inseticidas aprovados pela OMS incluírem organoclorados, organofosforados e carbamatos, a maior classe atualmente utilizada é a dos piretroides, uma vez que tendem a ter baixa toxicidade em mamíferos, fornecem efeito *knockdown* rápido (vê-se o efeito) e são relativamente baratos em comparação com as outras classes. Além disso, normalmente sua aplicação são mais aceitáveis pelos proprietários das residências (Komalamisra et al. 2009).

Dentre os inseticidas avaliados, os que mais se destacaram foram o pirimiphos-methyl CS, deltametrina WG e etofenprox PM. No entanto, o organofosforado pirimiphos-methyl CS, durante a realização dos bioensaios apresentou forte odor levando a interrupção do teste antes que sua taxa de mortalidade fosse inferior a 80% por dois meses consecutivos. Tchicaya et al. (2014) relatam odor característico desta formulação considerado desagradável, por sua vez, na análise de Tangena et al. (2013a) o odor percebido pelos residentes foi aceitável devido à redução dos mosquitos e consequentemente do incômodo advindo dos mesmos.

É importante ressaltar, que em locais onde ainda não exista a resistência aos piretroides, cabe uma ponderação em relação à utilização do pirimiphos-methyl CS, considerando uma possível recusa e, por conseguinte a descontinuidade das ações. Assim, para o segundo momento foram utilizados os inseticidas etofenprox PM e deltametrina WG. Em relação as superfícies, os resultados demonstraram que em MSP e ASR o efeito residual foi menor, além disso, frente ao fato de que as áreas endêmicas para malária são geralmente rurais (por exemplo, assentamentos, vilarejos e distritos) ou florestas, as habitações nesses locais geralmente apresentam materiais

de construção como madeira (abundante na região), tijolos e alvenaria, cobertas com palha, telhas de cerâmica ou fibrocimento. Esta variação nas superfícies de construção das casas na região de estudo justificou a escolha das superfícies para a avaliação comparativa.

O etofenprox PM foi avaliado no Distrito do Carvão e o deltametrina WG no assentamento do Piquiazal, ambos no município de Mazagão durante seis meses (180 dias), onde foram borrifadas 10 casas de MSP e 10 casas de ASR em cada localidade. Reforçando que na recomendação do WHOPES os inseticidas devem alcançar taxa de mortalidade dos mosquitos  $\geq 80\%$  após 24 horas da exposição nas superfícies das paredes borrifadas para serem considerados eficazes. No geral, ao avaliarmos do etofenprox PM foi possível observar que a taxa de mortalidade no período foi inferior a 80% para as três condições dos bioensaios (painel, simulado de campo e campo). Porém, nas análises por tipo de superfície a MSP alcançou um melhor resultado, com mortalidade acima de 80% durante os 180 dias (seis meses).

Esse resultado atende, portanto, as especificações do WHOPES (2018) e foi superior ao obtido no simulado de campo da etapa anterior, onde o efeito residual em MSP foi no máximo de 120 dias (quatro meses), da mesma forma em que foi superior nos painéis em laboratório (Brasil 2014). No entanto, em relação a superfície de ASR, os resultados obtidos nas três condições demonstraram a não efetividade do etofenprox PM que alcançou mortalidade superior a 80% apenas no bioensaio de 24 horas após borrifação em simulado de campo.

Divergindo dos resultados desta pesquisa, de acordo com os estudos realizados em situação de campo por Santos et al. (2007) em superfícies de madeira e ASR e por Sreehari et al. (2009) em superfícies de alvenaria usando etofenprox PM, a residualidade máxima alcançada foi de três meses, além disso, Chanda et al. (2013b) descreveram residualidade por mais de cinco meses em superfícies de alvenaria.

De acordo com a análise estatística, os modelos para etofenprox PM mostraram que todas as variáveis foram significativas mostrando a diferença em relação à efetividade do inseticida em condições de: painel em laboratório, simulado de campo (casa teste) e diretamente no campo. Os resultados evidenciaram que os bioensaios em painel de laboratório tendem a ser mais eficazes, uma vez que não sofre influência de fatores ambientais. Por sua vez, os bioensaios diretamente no campo apresentaram a menor taxa de mortalidade no período, ficando o simulado de campo com taxa de mortalidade intermediária entre as condições anteriores,

demonstrando com isso ser uma importante ferramenta para retratar a realidade de campo.

O inseticida deltametrina na formulação WG teve seu melhor desempenho na condição de painel de laboratório, com taxa geral de mortalidade acima de 80% no período do estudo, inclusive quando foi analisado o efeito residual nas superfícies de ASR e MSP. Embora as variáveis analisadas não tenham apresentado diferença significativa foi observado uma grande variação no comportamento mensal da taxa de mortalidade, nas condições de simulado de campo e diretamente no campo. Isto reflete a possível interferência dos fatores ambientais quanto à eficácia do produto que deve ser levado em conta no ato de definição do intervalo entre os ciclos de borrifação.

Na etapa anterior do estudo, o deltametrina WG em simulado de campo apresentou bom desempenho em três das superfícies estudadas: ASR (90 dias); MCP e MSP (240 dias), atendendo as especificações do WHOPES (2018). Nesta análise a superfície de ASR apresentou efetividade apenas no bioensaio de 24 horas e 30 dias após a borrifação, e a de MSP apenas em 30 dias. De acordo com Rohani et al. (2007) o deltametrina tanto na formulação WG como em PM em condições de laboratório (painéis) aplicados em superfície de bambu apresentaram um efeito residual prolongado, chegando a 11 meses nas superfícies rugosas e lisas para ambas as formulações e sete meses em superfície lisa para a formulação PM. Por sua vez, Vatandoost et al. (2009) também em condições de laboratório observaram para a formulação WG residualidade de 4 meses em superfícies de gesso, e madeira, e 4,5 meses em superfícies de alvenaria, resultado também encontrado por Ibrahim et al. (2017) nas superfícies de alvenaria, madeira e barro por 4 meses. Azizi et al. (2014) e Khosravani et al. (2017) com deltametrina PM em estudos realizados no Irã, encontraram residualidade de três meses em superfícies de gesso e alvenaria.

Neste experimento o resultado em condição de laboratório (painel) em superfície de MSP foi de seis meses com taxa de mortalidade acima de 80%, por outro lado, a superfície de ASR não apresentou residualidade em nenhum momento da realização dos bioensaios, portanto não corroborando com outros autores (Vatandoost et al. 2009; Azizi et al. 2014; Ibrahim et al. 2017).

Em condições de simulado de campo (casa teste) este estudo obteve um efeito residual prolongado de seis meses nas superfícies de MSP, mas na superfície de ASR, apenas no primeiro bioensaio 24 horas após a borrifação. Nikpour et al. (2017) descreveram nessa condição residualidade de 2,5 meses para gesso e alvenaria e 2



meses para madeira e Dunford et al. (2018) observaram residualidade de 5 meses para alvenaria e ausência de efetividade para madeira, ambos usando a deltametrina WG corroborando os resultados encontrados neste estudo.

O deltametrina WG em condição de campo demonstrou residualidade de seis meses em MSP mas não foi efetivo em ASR, no entanto, Ngufor et al. (2017) em superfícies de alvenaria, barro e madeira prensada encontraram residualidade de 4-6; 11 e 10-12 meses respectivamente. Ainda para a formulação WG, a ineficácia foi descrita por Raeisi et al. (2010) que observaram efeito residual de um mês para alvenaria e dois meses para madeira. A formulação SC de deltametrina testada por Santos et al. (2007) teve efeito residual de três meses. Estudos com deltametrina na Ásia, Irã e África observaram diferenças significativas na eficácia e duração em superfícies de porosidade variada e para diferentes formulações (Rohani et al. 2007; Raeisi et al. 2010; Etang et al. 2011).

Para o contínuo sucesso dos programas de BRI é importante desenvolver novas formulações de inseticidas de longa duração (Zaim & Guillet 2002). A exemplo deste fato já existem formulações criadas para maximizar eficácia biológica e reduzir os efeitos nocivos (Tsuji 2001). Como mencionado anteriormente, a tecnologia de encapsulamento tem sido usada para prolongar o desempenho residual dos inseticidas de recomendação da OMS para BRI.

Neste estudo, uma formulação de deltametrina SC-PE, suspensão concentrada, reforçada com polímero de (SC-PE) foi avaliada em condição de laboratório (painel) e simulado de campo (casa teste) em diferentes superfícies. Nos painéis o inseticida apresentou efeito estendido (esperado) por 12 meses na superfície de MSP e 11 meses em ACR. Nas superfícies de ASR a residualidade foi de cinco meses e para MCP apenas de três meses. Esse resultado supera o encontrado na mesma condição na avaliação com deltametrina WG que foi de seis meses para MCP e ineficaz na superfície de ASR.

Para avaliação em condição de simulado de campo, o deltametrina SC-PE apresentou efetividade por 8 meses na superfície de ACR e de três meses nas superfícies de ASR e MCP. Já a interação na superfície de MSP foi intrigante, uma vez que não foi observada residualidade do inseticida durante todo o período avaliado (seis meses). Embora não haja explicação específica para esta observação, não é de esperar que seja um problema no ato da borrifação, uma vez que todas as superfícies foram borrifadas pelo mesmo técnico, no mesmo dia sob as mesmas condições. Além disso, as superfícies de MCP e ASR também apresentaram baixa residualidade para

uma formulação com efetividade esperada de no mínimo seis meses (WHOPES 2018). O resultado desse estudo corrobora o encontrado por Dunford et al. (2018) que observaram efeito residual por um ano em superfícies de alvenaria e metal, no entanto, contradiz o resultado de seis meses em superfícies de madeira na avaliação dos autores.

O estudo com deltametrina WG em simulado de campo neste trabalho mostrou residualidade de seis meses em superfície de madeira, porém não foi efetivo em superfície alvenaria. Dunford et al. (2018) observaram resultados opostos: permanência de seis meses em superfície de alvenaria e pouca residualidade em superfície de madeira.

Ao relacionar a residualidade das formulações de deltametrina WG com deltametrina SC-PE realizado em estudo experimental (simulado de campo) na Tanzânia por Oxborough et al. (2014b), onde foi possível inferir que a formulação SC-PE teve uma residualidade de 11 meses, o que superou a obtida pela formulação WG de 8 meses em superfícies de concreto.

No intuito de avaliar a capacidade de estender a efetividade em várias superfícies conferida a tecnologia de suspensão concentrada (polímero), foram testadas em simulado de campo (casa teste) as superfícies externas de MCP e ACR. No entanto, os resultados demonstraram um decaimento do efeito residual após os 30 dias da borrifação. Este fato reforça a interferência dos fatores ambientais como a exposição ao sol e a chuva das paredes avaliadas, mesmo para a formulação de deltametrina SC-PE.

Tendo em vista aspectos observados a respeito do período que um inseticida permanece eficaz, ou seja, de sua persistência, é imprescindível a reflexão de que: a quantidade de vezes que uma classe de inseticida é usada é um dos fatores importantes que influenciam a seleção da resistência. A cada uso do inseticida, uma vantagem é dada aos insetos resistentes dentro de uma população. Sendo relevante atentar que, os produtos que produzem um efeito residual persistente proporcionam pressão de seleção contínua de maneira semelhante a vários tratamentos com BRI. O que eleva a importância do monitoramento da resistência dos vetores aos inseticidas. Este fato retrata por exemplo, que a aplicação repetida de DDT em BRI contribuiu para aumentar o número de espécies de vetores de malária resistentes a este inseticida em vários ambientes geográficos (Brogdon & McAllister 1998a). Após a introdução de inseticidas orgânicos sintéticos na década de 1940, como o DDT, não

demorou muito para que os primeiros casos de resistência fossem detectados e em 1947, a resistência ao DDT foi confirmada em moscas domésticas (IRAC 2019).

Existem poucos trabalhos que descrevem o *status* de suscetibilidade das populações de anofelinos neotropicais em relação aos inseticidas utilizados. De acordo com Santos et al. (2007), isso ocorre principalmente devido à dificuldade de colonização destas espécies em laboratório, comprometendo a padronização e execução dos bioensaios e a comparação dos resultados. Colônias de *An. aquasalis* e *An. albiparvus* s.s. são mantidas no LAFICAVE (Horosko et al. 1997; Lima et al. 2004) e de *An. darlingi* (Araujo et al. 2019) na Fundação Oswaldo Cruz.

Os testes de susceptibilidade ou ensaios biológicos detectam a resistência baseados nos registros das taxas de mortalidade dos insetos expostos a diferentes concentrações de inseticidas. Estes ensaios identificam mudanças na susceptibilidade de determinadas populações aos produtos, porém não determinam os mecanismos envolvidos (KABULA et al., 2012; AÏZOUN, 2103).

O uso de papéis impregnados com inseticida para a avaliação do *status* de susceptibilidade de populações de anofelinos é descrito na literatura e grande parte dos trabalhos concentram-se no continente africano (Dhiman et al. 2016; Gorouhi et al. 2016; Randriamaherijaona et al. 2016; Boussougou-Sambe et al. 2018). A carência de informações sobre suscetibilidade dos anofelinos pode dificultar a estratégia global para o controle da malária, uma vez que contribui para a exposição da população ao risco de contrair a doença, por ineficácia do inseticida WHO (WHO 2015a).

Os papéis impregnados são fornecidos pela OMS e utilizados nos bioensaios. Esta metodologia apresenta implicações para sua execução, como a aquisição devido ao custo elevado dos kits; os papéis impregnados não são disponibilizados para todos os inseticidas; e as doses diagnósticas utilizadas não são aplicáveis para todas as espécies de vetores. Como alternativa, pode-se utilizar para avaliação de mosquitos adultos a metodologia das garrafas impregnadas, desenvolvida pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

De acordo com Brogdon and McAllister (1998b) e Zamora Perea et al. (2009), os ensaios com garrafa apresentam algumas vantagens como a preparação no laboratório, avaliação simultânea de várias doses e inseticidas, obtenção de resultados em tempo menor que três horas, a utilização de garrafas de vidro de fácil aquisição. Apesar desses fatores, a limitação frente a ausência de uma cepa referência em susceptibilidade para anofelinos brasileiros acrescida da dificuldade em

manter as colônias de *Anopheles* em laboratório afetam negativamente o avanço de técnicas para avaliação do perfil de resistência das populações de campo no Brasil.

Assim, para este trabalho foram utilizados *An. marajoara* como padrão de comparação com *An. darlingi* nas avaliações de resistência/susceptibilidade de populações de campo com ensaios do tipo tempo de queda - KdT. Yadouleton et al. (2010) e Kabula et al. (2012) apresentaram avaliação de tempo letal utilizando concentrações padronizadas fornecidas pela OMS para cada tipo de inseticida. As taxas de mortalidade foram avaliadas em intervalos aproximados de 10 minutos durante 60 minutos de exposição ao produto. Neste estudo o *status* de suscetibilidade para *An. marajoara* foi de possível resistência (taxa de mortalidade 90-97%). Embora tenha obtido queda de 100% no final dos 60 minutos de exposição ao deltametrina a 0,05%, a população de *An. marajoara* proveniente de Mazagão apresentou recuperação de 9% das fêmeas após 24 horas da exposição, sugerindo possível efeito de seleção dos inseticidas sobre os alelos de resistência específicos.

Para todas as populações de *An. darlingi* o *status* obtido foi de suscetibilidade (taxa de mortalidade  $\geq 98\%$ ). Este resultado corrobora o encontrado por Galardo et al. (2015) em ensaios com garrafas impregnadas com inseticida realizados com populações de anofelinos do Amapá, onde afirma que nenhuma resistência foi registrada para *An. darlingi*, mas *An. marajoara* requer atenção. Em uma adaptação de bioensaio simplificado para avaliação do *status* de suscetibilidade (*An. darlingi* e *An. marajoara*) usando larvas e o inseticida deltametrina, Silva et al. (2014) observaram perda de suscetibilidade nas populações de duas das localidades avaliadas. No entanto, isso não foi observado nas populações de Macapá.

Braga (2014) realizou a padronização dos ensaios do tipo dose resposta e ensaios de tempo letal com um tempo de exposição de 120 minutos. Este trabalho foi realizado para adequação do método da OMS para a avaliação do *status* de susceptibilidade/resistência de populações de anofelinos neotropicais a inseticidas químicos. Foi avaliado os inseticidas deltametrina (piretróide) e malathion (organofosforado) utilizando as espécies mantidas no LAFICAVE (*An. aquasalis*, *An. albitarsis*) e *An. marajoara*. Os resultados encontraram diferença quanto a tolerância dos compostos usados sugerindo que a população de *An. aquasalis* pode ser utilizada como padrão de comparação nas avaliações de populações de campo para esses bioensaios.

Frisa-se que, ensaios para detectar mutações genéticas responsáveis pelo fenótipo de resistência em insetos individuais podem fornecer um alerta precoce do

surgimento de resistência não detectada por bioensaios capazes de registrar apenas a resposta da população. Em face dessa contingência, a primeira mutação identificada em *Anopheles* spp. relacionada com o fenótipo *Kdr*, foi a substituição de leucina por fenilalanina (Leu1014Phe) e, em seguida, de leucina por serina (Leu1014Ser) no mesmo sítio (Martinez-Torres et al. 1998; Ranson et al. 2000a). Em consequência as mutações relacionadas à resistência têm sido bastante investigadas em diversas espécies de anofelinos, encontrando-se inclusive outros sítios do *Nav* com mutações que podem estar relacionados ao fenótipo *Kdr*.

A mutação *Kdr* foi verificada pela primeira vez em *An. gambiae* s.s., o principal vetor de plasmódio afro-tropical. Mutações no sítio 1014 foram observadas em 13 diferentes espécies de anofelinos no mundo (Silva 2014). Na América até o momento foi encontrada esta mutação em *Anopheles albimanus* no México, Nicarágua e Costa Rica (Lol et al. 2013). Os resultados encontrados neste trabalho não evidenciaram mutação *Kdr* em populações de três municípios do estado do Amapá (Macapá, Mazagão e Santana). Da mesma forma, a presença da mutação *Kdr* no sítio 1014 de *An. darlingi* oriunda de populações brasileiras foi avaliada por Silva (2014), cujos resultados também foram negativos para populações dos municípios de Macapá (AP), Manaus, São Gabriel da Cachoeira, Coari e Iranduba (AM) e Rio Branco (AC). Loureiro (2018) relatou que as populações de *An. darlingi* do Rio Unini e Rio Jaú do estado do Amazonas não tiveram variações para a mutação *Kdr* no sítio 1014. Lol et al. (2019) relataram a ausência de Mutações *Kdr* em *An. darlingi* e outras espécies vetores da malária na América Latina.

Vale ressaltar que até o presente momento não foram detectadas mutações *Kdr* em *An. darlingi*. A mutação clássica Leu1014Phe foi registrada nas espécies neotropicais *An. albitarsis* s.s. do sul do Brasil (Braga 2017), e em *An. albimanus* na América do Norte e Central (Lol et al. 2013; Lol et al. 2019). No entanto, de acordo com o Relatório global de resistência a inseticida em vetores da malária: 2010–2016 (WHO 2018a), a resistência a piretroides tem sido relatada em populações de *An. darlingi* do Brasil, Bolívia, Peru e Colômbia, embora que, com exceção do Peru (resistência metabólica) não se conheça o mecanismo de resistência para os outros países.

Em face a essa realidade entende-se que a presença de um único indivíduo com um alelo conhecido por conferir resistência deve ser motivo de preocupação, uma vez que, a resistência pode se espalhar rapidamente em uma população. Por outro lado, um resultado negativo de um ensaio molecular não pode ser interpretado como

uma ausência de resistência em uma população. Por isso, os ensaios moleculares devem ser vistos como um complemento em vez de um substituto para bioensaios.

Há que se considerar, portanto, que, programas efetivos de controle de vetores podem contribuir de maneira significativa para o avanço do desenvolvimento humano e econômico. Além dos benefícios diretos à saúde, as reduções nas doenças transmitidas por vetores permitem maior produtividade e crescimento, reduzem a pobreza das famílias, aumentam a equidade e fortalecem os sistemas de saúde. Portanto, o controle da malária não deve ser uma campanha; e sim uma política que requer a adoção de medidas praticáveis, cuja continuidade é imprescindível.

## 6 PERSPECTIVAS

O panorama atual do controle da malária na Amazônia brasileira, embora seja promissor para a eliminação por *P. falciparum*, carece da utilização de novas abordagens voltadas à eliminação da transmissão nos municípios, onde a doença persiste.

Os indicadores sugeridos neste estudo forneceram importantes informações para subsidiar o planejamento e direcionamento das ações de prevenção e controle da malária, e poderão auxiliar as opções analíticas quanto a seleção de classes e formulações de inseticidas, bem como a definição dos ciclos de borrifação para as superfícies comumente encontradas nas habitações da região. No entanto, a escolha do inseticida de ação residual usado em BRI deve sempre se basear em dados locais recentes sobre a suscetibilidade dos vetores em questão. Além disso, é necessário o contínuo monitoramento da possível resistência das espécies aos inseticidas, bem como da identificação dos mecanismos responsáveis pela resistência.

Aos pesquisadores cabe o encargo de buscar meios e ferramentas mais acessíveis aos gestores e técnicos do serviço de saúde. Como perspectiva propõe-se estender a avaliação da residualidade de inseticidas em simulado de campo na casa teste e ampliar a pesquisa sobre o *status* de suscetibilidade/resistência dos anofelinos neotropicais em municípios endêmicos da região Amazônica brasileira.

## 7 CONCLUSÕES

“Não duvidemos jamais que um pequeno grupo de indivíduos conscientes e engajados possa mudar o mundo. Foi exatamente dessa forma que isso sempre aconteceu”  
Margaret Mead

Este estudo gerou informações relevantes sobre a residualidade dos inseticidas avaliados, capazes de contribuir com o Ministério da Saúde, para o planejamento e escolha da classe e formulação do inseticida residual a ser utilizado pelo PNCM em BRI. Além disso, fica claro que é imprescindível considerar o custo-benefício da casa teste como padrão para avaliação de residualidade dos inseticidas para o controle dos vetores da malária e o fortalecimento da rede de monitoramento para resistência de anofelinos, visando a proteção das populações em área de risco.

Assim, conclui-se que:

- O efeito residual dos inseticidas não foi uniforme, embora a qualidade das borrifações tenha sido garantida pela adequada utilização de equipamento e técnica de aplicação;
- Entre os inseticidas da classe dos piretroides avaliados os que apresentaram melhor desempenho foram deltametrina WG e etofenprox PM, ambos recomendados pela OMS. Desse modo, deltametrina WG e etofenprox PM podem ser considerados seguros e eficazes para utilização em paredes de madeira e de alvenaria não rebocada, quando aplicados em ciclos trimestrais;
- Pirimiphos-methyl CS mostrou-se efetivo em todas as superfícies podendo ser utilizado em ciclos com intervalo de cinco meses, mas com ressalva em relação ao odor devido à baixa aceitação pelos moradores;
- Lambidacialotrina PM, alfacipermetrina SC e bendiocarb PM apresentaram residualidade inferior à dos demais inseticidas estudados, podendo implicar em ciclos de borrifação curtos, desfavorecendo sua utilização pelos programas de controle de vetores;
- O deltametrina SC-PE alcançou o efeito residual preconizado pelo WHOPES na condição de painel, apenas para as superfícies de MSP e ACR; e no simulado de campo, foi observado residualidade satisfatória apenas na superfície de ACR na condição interna da casa teste;
- Os dados sugerem durações variáveis de ciclos de borrifação para cada produto, de acordo com o tipo de superfícies das paredes, destacando a importância de testar produtos candidatos no contexto local antes de usá-los em larga escala;



- Além dos fatores climáticos e da variedade de superfícies, a ocupação das habitações pode interferir no efeito dos inseticidas, sendo necessário estudos em situação de campo para melhor avaliação;
- Concluiu-se que o simulado de campo (casa teste) é uma valiosa ferramenta para associar o efeito residual de inseticidas às superfícies comumente encontradas nas casas de áreas endêmicas;
- Não foram encontradas resistência para *An. darlingi*, mas *An. marajoara* requer atenção;
- Não foram encontradas mutações classicamente associadas à resistência a piretroides ao sítio 1014 nas populações de anofelinos estudadas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott WS 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J Econ Entomol*, 18, 265-267.
- Achee NL, Grieco JP, Masuoka P, Andre RG, Roberts DR, Thomas J, Briceno I, King R, Rejmankova E 2006. Use of remote sensing and geographic information systems to predict locations of *Anopheles darlingi*-positive breeding sites within the Sibun River in Belize, Central America. *J Med Entomol*, 43, 382-392.
- Agossa FR, Aikpon R, Azondekon R, Govoetchan R, Padonnou GG, Oussou O, Oke-Agbo F, Akogbeto MC 2014. Efficacy of various insecticides recommended for indoor residual spraying: pirimiphos methyl, potential alternative to bendiocarb for pyrethroid resistance management in Benin, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 108, 84-91.
- Aikpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Okè M, Oussou O, Oké-Agbo F 2014. Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC indoor residual spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa. *Parasit Vectors*, 7.
- Akogbéto MC, Padonou GG, Gbénou D, Irish S, Yadouleton A 2010. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J*, 9, 204.
- Alvarenga DA, de Pina-Costa A, de Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Suarez-Mutis MC, Lourenco-de-Oliveira R, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CF 2015. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malar J*, 14, 81.
- Alvarenga DAM, Culleton R, de Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C, Jr., Silva S, Nunes AJD, de Souza JC, Jr., Hirano ZMB, Moreira SB, Pissinatti A, de Abreu FVS, Lisboa Areas AL, Lourenco-de-Oliveira R, Zalis MG, Ferreira-da-Cruz MF, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CFA 2018. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci Rep*, 8, 86.
- Araujo MdS, Andrade AO, Santos NACd, Pereira DB, Costa GdS, Paulo PFMd, Rios CT, Moreno M, Pereira-da-Silva LH, Medeiros JFd 2019. Brazil's first free-mating laboratory colony of *Nyssorhynchus darlingi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52.
- Arcos AN, Ferreira FAdS, Cunha HBd, Tadei WP 2018. Characterization of artificial larval habitats of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in the Brazilian Central Amazon. *Rev Bras Entomol*, 62, 267-274.

- Azizi K, Djaefar M, Moemenbellah-Fard, Khosravani-Shiri M, Fakoorziba MR, Soltani A 2014. Lethal and residual effects of Lambdacyhalothrin, Deltamethrin and Cyfluthrin insecticides on adult mosquitoes of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) on different surfaces. *J Health Sci Surveillance Sys*, 2, 30-35.
- Baia-da-Silva DC, Brito-Sousa JD, Rodovalho SR, Peterka C, Moresco G, Lapouble OMM, Melo GCd, Sampaio VdS, Alecrim MdGC, Pimenta P, Lima JBP, Lacerda MVGd, Monteiro WM 2019. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 52.
- Barbosa LM, Souto RN, Ferreira RM, Scarpassa VM 2014. Composition, abundance and aspects of temporal variation in the distribution of *Anopheles* species in an area of Eastern Amazonia. *Rev Soc Bras Med Trop*, 47, 313-320.
- Boussougou-Sambe ST, Eyisap WE, Tasse GCT, Mandeng SE, Mbakop LR, Enyong P, Etang J, Fokam EB, Awono-Ambene PH 2018. Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* (s.l.) in South-West Cameroon four years after long-lasting insecticidal net mass distribution. *Parasit Vectors*, 11, 391.
- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiol Serv Saúde*, 16, 279-293.
- 2007b. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, 16, 295-302.
- Braga TA 2014. *Adequação de método OMS para a avaliação do status de susceptibilidade e resistência de populações de anofelinos neotropicais a inseticidas químicos*. Licenciado em Ciências Biológicas Monografia, Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Gonçalo.
- 2017. *Estudo do perfil de resistência a inseticidas e seus mecanismos em Anopheles albiparvus s.s. Arribáizaga, 1878 e Anopheles aquasalis Curry, 1932 mantidos em laboratório e capturados no campo e Anopheles albiparvus s.s. capturados no campo*. Mestrado em Biologia Parasitária Dissertação.
- Portaria Interministerial 2 021 de 21 de outubro de 2003 Ministério da Saúde, Ministério do Desenvolvimento Agrário; 2003a. Available from: <http://www.normasbrasil.com.br>.
- Brasil 2003b. *Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM*. Ministério da Saúde Brasília, 132 pp.
- Portaria 47 de 29 de dezembro de 2006: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2006. Available from: <https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro9893/documento%201.pdf>.

- 2010. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. Ministério da Saúde Brasília, 36 pp.
- 2014. *Uso do Etofenprox PM 20% para Borrifação Residual Intradomiciliar no controle da malária*. Ministério da Saúde Brasília.
- 2017. *Guia de Vigilância em Saúde: volume único*. 2 ed., Ministério da saúde Brasília, 705 pp.
- 2018. *Uma análise da situação de saúde e os desafios para o alcance dos objetivos de desenvolvimento sustentável [recurso eletrônico]* Ministério da Saúde; Brasília, 425 pp.

Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, de Alvarenga DAM, da Silva Santelli ACF, Albuquerque HG, Cravo P, Santos de Abreu FV, Peterka CL, Zanini GM, Suárez Mutis MC, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, de Brito CFA, de Fátima Ferreira-da-Cruz M, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT 2017. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*, 5, e1038-e1046.

Brochero HL, Rey G, Buitrago LS, Olano VA 2005. Biting activity and breeding sites of *Anopheles* species in the municipality Villavicencio, Meta, Colombia. *J Am Mosq Control Assoc*, 21, 182-186.

Brogdon WG, McAllister JC 1998a. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis*, 4, 605.

— 1998b. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc*, 14, 159-164.

Bruce-Chwatt LJ 1988. History of Malaria from Prehistory to Eradication. In *Malaria: Principles and Practice of Malariology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 1-59.

Busvine J 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*, 168, 193 - 195.

Caceres L, Rovira J, Garcia A, Torres R 2011. Determination of the resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in Panamanian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes]. *Biomedica*, 31, 419-427.

Carneiro FF, Augusto LGS, Rigotto RM, Friedrich K, Búrigo AC 2015. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde* Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 624 pp.

Centers of Diseases Control and Prevention. Malaria: Biology - Lifecycle 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.

- Chagas C 1906. *Profilaxia do impaludismo* Tipografia Besnard Frères, Rio de Janeiro.
- Chanda E, Chanda J, Kandyata A, Phiri FN, Muzia L, Haque U, Baboo KS 2013a. Efficacy of ACTELLIC 300 CS, Pirimiphos Methyl, for Indoor Residual Spraying in Areas of High Vector Resistance to Pyrethroids and Carbamates in Zambia. *J Med Entomol*, 50, 1275-1281.
- Chanda E, Kandyata A, Chanda J, Phiri FN, Muzia L, Kamuliwo M 2013b. The Efficacy of Vectron 20 WP, Etofenprox, for Indoor Residual Spraying in Areas of High Vector Resistance to Pyrethroids and Organochlorines in Zambia. *ISRN preventive medicine*, 2013, 371934.
- Chanda E, Mzilahowa T, Chipwanya J, Mulenga S, Ali D, Troell P 2015. Preventing malaria transmission by indoor residual spraying in Malawi: grappling with the challenge of uncertain sustainability. *Malar J*, 14.
- Coleman M, Hemingway J, Gleave KA, Wiebe A, Gething PW, Moyes CL 2017. Developing global maps of insecticide resistance risk to improve vector control. *Malar J*, 16, 86.
- Conn J, Mirabello L 2007. *The biogeography and population genetics of neotropical vector species*. Vol. 99, 245-256 pp.
- Conn JE, Wilkerson RC, Segura MNO, de Souza RT, Schlichting CD, Wirtz RA, Póvoa MM 2002. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *Am J Trop Med Hyg*, 66, 18-22.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. 20 ed., Fiocruz, Rio de Janeiro, 228 pp.
- Corbel V, N'Guessan R 2013. Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. In S Manguin, *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*.
- Coura JR 2015. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Vol. 1, Guanabara Koogan, 1173 pp.
- Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.*, 46, 165-171.
- Curtis C 1985. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance. *Bull Entomol Res*, 75, 259-266.
- Deane LM 1988. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 38, 223-230.

- Deane LM 1989. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84, 149-156.
- Dengela D, Seyoum A, Lucas B, Johns B, George K, Belemvire A, Caranci A, Norris LC, Fornadel CM 2018. Multi-country assessment of residual bio-efficacy of insecticides used for indoor residual spraying in malaria control on different surface types: results from program monitoring in 17 PMI/USAID-supported IRS countries. *Parasit Vectors*, 11, 71.
- Dhiman S, Yadav K, Rabha B, Goswami D, Hazarika S, Tyagi V 2016. Evaluation of Insecticides Susceptibility and Malaria Vector Potential of *Anopheles annularis* s.l. and *Anopheles vagus* in Assam, India. *PLOS One*, 11, e0151786.
- Dunford JC, Estep AS, Waits CM, Richardson AG, Hoel DF, Horn K, Walker TW, Blersch JS, Kerce JD, Wirtz RA 2018. Evaluation of the long-term efficacy of K-Othrine PolyZone on three surfaces against laboratory reared *Anopheles gambiae* in semi-field conditions. *Malar J*, 17, 94.
- Dzul FA, Patricia Penilla R, Rodriguez AD 2007. Susceptibility and insecticide resistance mechanisms in *Anopheles albimanus* from the southern Yucatan Peninsula, Mexico. *Salud Publica Mex.*, 49, 302-311.
- Ebbell B 1937. *The Papyrus Ebers: the greatest Egyptian medical document*. Levin & Munksgaard.
- Emerson KJ, Conn JE, Bergo ES, Randel MA, Sallum MAM 2015. Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) clusters by major biogeographical region. *PLOS One*, 10, e0130773.
- Etang J, Nwane P, Mbida JA, Piameu M, Manga B, Souop D, Awono-Ambene P 2011. Variations of insecticide residual bio-efficacy on different types of walls: results from a community-based trial in south Cameroon. *Malar J*, 10, 333.
- FAO/WHO 2016. *Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides*. 1 ed. Vol. WHO/HTM/NTD/WHOPEP/2016.4, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Roma, 292 pp.
- Fonseca-Gonzalez I, Quinones ML, McAllister J, Brogdon WG 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, 18-26.
- Fontoura NG, Araki AS, Van Der Maas Azevedo R, Galardo AK, Peixoto AA, Lima JB 2014. Hybrid sterility in crosses between two Brazilian sibling species of the *Anopheles albitalarsis* complex. *Parasit Vectors*, 7, 559.
- Galardo AK, Zimmerman RH, Lounibos LP, Young LJ, Galardo CD, Arruda M, D'Almeida Couto AA 2009. Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and

their association with rainfall and malaria along the Matapi River, Amapá, [corrected] Brazil. *Med Vet Entomol*, 23, 335-349.

Galardo AKR 2010. *A importância dos Anopheles darlingi Root, 1926 e Anopheles marajoara Galvão e Damasceno, 1942 na transmissão de malária no município de Macapá/Ap - Brasil*. Tese, Universidade Federal do Pará, Belém-Pará, 147 pp.

Galardo AKR, ARRUDA M, COUTO AARDA, WIRTZ R, LOUNIBOS LP, ZIMMERMAN RH 2007. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 76, 461-469.

Galardo AKR, Galardo CD 2009. *Relatório técnico sobre o Estudo da Eficácia de Redes Impregnadas com Inseticidas e do uso de Fendona® em borrifações domiciliares para o controle de Anopheles sp. em bioensaios de campo e laboratório no estado do Amapá - Brasil*. Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, Macapá, 29 pp.

Galardo AKR, Póvoa MM, Sucupira IMC, Galardo CD, Santos RLC 2015. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*, 48, 765-769.

Gorham J, Stojanovich C, Scott H 1973. Illustrated key to the anopheline mosquitoes of western South America. *Mosq Syst*, 5, 97-156.

Gorouhi MA, Vatandoost H, Oshaghi MA, Raeisi A, Enayati AA, Mirhendi H, Hanafi-Bojd AA, Abai MR, Salim-Abadi Y, Rafi F 2016. Current Susceptibility Status of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) to Different Imagicides in a Malarious Area, Southeastern of Iran. *J Arthropod-Borne Dis*, 10, 493-500.

Grigg MJ, Snounou G 2017. *Plasmodium simium*: a Brazilian focus of anthropozoonotic vivax malaria? *Lancet Glob Health*, 5, e961-e962.

Haddow AJ 2009. The Mosquito Fauna and Climate of native Huts at Kisumu, Kenya. *Bull Entomol Res*, 33, 91-142.

Haji K, Thawer N, Khatib B, Mcha J, Rashid A, Ali A, Jones C, Bagi J, Magesa S, Ramsan M, Garimo I, Greer G, Reithinger R, Ngondi J 2015. Efficacy, persistence and vector susceptibility to pirimiphos-methyl (Actellic® 300CS) insecticide for indoor residual spraying in Zanzibar. *Parasit Vectors*, 8, 628.

Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC, Benz D, Gething PW, Howes RE, Patil AP, Temperley WH, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T, Elyazar IRF, Harbach RE, Hemingway J, Manguin S, Mbogo CM, Rubio-Palis Y, Godfray HCJ 2010. Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human malaria. *PLoS Med*, 7, e1000209-e1000209.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 34, 653-665.

- Hocking KS, Armstrong JA, Downing FS 1960. Gamma-BHC/cereclor-a new, long-acting lindane formulation for malaria control. *Bull World Health Organ*, 22, 757-765.
- Horosko S, 3rd, Lima JB, Brandolini MB 1997. Establishment of a free-mating colony of *Anopheles albitarsis* from Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*, 13, 95-96.
- Hougard J-M, Corbel V, N'guessan R, Darriet F, Chandre F, Akogbeto M, Baldet T, Guillet P, Carnevale P, Traoré-Lamizana M 2003. Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull Entomol Res*, 93, 491-498.
- Istituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE Cidades 2018. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat>.
- Ibrahim KT, Popoola KO, Akure KO 2017. Laboratory Evaluation of Residual Efficacy of Actellic 300 CS (Pirimiphos-Methyl) and K-Othrine WG 250 (Deltamethrin) on Different Indoor Surfaces. *Int J Insect Sci*, 9, 1179543317732989.
- IRAC 2011. *Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): Prevention and management of insecticide resistance in vectors of public health importance*. 2nd ed.
- Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): Resistance Management for Sustainable Agriculture and Improved Public Health 2019. Available from: <https://www.irac-online.org/about/resistance/>.
- Kabula B, Tungu P, Matowo J, Kitau J, Mweya C, Emidi B, Masue D, Sindato C, Malima R, Minja J, Msangi S, Njau R, Mosha F, Magesa S, Kisinza W 2012. Susceptibility status of malaria vectors to insecticides commonly used for malaria control in Tanzania. *Trop Med Int Health*, 17, 742-750.
- Karunamoorthi K 2011. Vector control: a cornerstone in the malaria elimination campaign. *Clin Microbiol Infect*, 17, 1608-1616.
- Khosravani M, Rafatpanah A, Amiri S, Zare A 2017. The Field Practices of Lambda-cyhalothrin and Deltamethrin Insecticides Against Adult Mosquitoes of *Anopheles stephensi* as the Main Vector of Malaria: Residual Effects. *Zahedan J Res Med Sci*, 19, e7629.
- Kim D, Fedak K, Kramer R 2012. Reduction of Malaria Prevalence by Indoor Residual Spraying: A Meta-Regression Analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 87, 117-124.
- Kirunda J, Okello-Onen J, Opiyo EA, Rwakimari JB, de Alwis R, Okia M, Ambayo D, Abola B, Hoel DF 2017. Assessment of Ficam VC (Bendiocarb) Residual Activity on Different Wall Surfaces for Control of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) in Northern Uganda. *J Med Entomol*, 54, 1006-1012.



- Komalamisra N, Srisawat R, Apiwathanasorn C, Samung Y, Kaisri P 2009. Residual effect of 10% bifenthrin wp on mosquitoes, and community acceptance, in eastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 40, 1221-1225.
- Lapouble OMM, Santelli ACF, Muniz-Junqueira MI 2015. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. *Rev Panam Salud Publ*, 38, 300-306.
- Lee K-S, Cox-Singh J, Brooke G, Matusop A, Singh B 2009. *Plasmodium knowlesi* from archival blood films: Further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *Int J Parasitol*, 39, 1125-1128.
- Lenth RV 2016. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *J Stat Softw*, 69, 1-33.
- Lima JB, Rosa-Freitas MG, Rodovalho CM, Santos F, Lourenco-de-Oliveira R 2014. Is there an efficient trap or collection method for sampling *Anopheles darlingi* and other malaria vectors that can describe the essential parameters affecting transmission dynamics as effectively as human landing catches? - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109, 685-705.
- Lima JB, Valle D, Peixoto AA 2004. Adaptation of a South American malaria vector to laboratory colonization suggests faster-male evolution for mating ability. *BMC Evol Biol*, 4, 1.
- Lima JBP, Galardo AKR, Bastos LS, da Silva Lima AW, Rosa-Freitas MG 2017. MosqTent: An individual portable protective double-chamber mosquito trap for anthropophilic mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005245.
- Loiola CCP, Silva CJMd, Tauil PL 2002. Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. *Pan Am J Public Health*, 11, 235-243.
- Lol JC, Castañeda D, Mackenzie-Impoivil L, Romero CG, Lenhart A, Padilla NR 2019. Development of molecular assays to detect target-site mechanisms associated with insecticide resistance in malaria vectors from Latin America. *Malar J*, 18, 202.
- Lol JC, Castellanos ME, Liebman KA, Lenhart A, Pennington PM, Padilla NR 2013. Molecular evidence for historical presence of *knock-down* resistance in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America. *Parasit Vectors*, 6, 268.
- Loureiro AC 2018. *Diversidade em genes relacionados à resistência a inseticidas e ritmos biológicos em Anopheles darlingi Root 1926*. Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, 116 pp.

- Lourenco-de-Oliveira R, Luz SL 1996. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon--II. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91, 687-694.
- Mackenzie-Impoinvil L, Weedall GD, Lol JC, Pinto J, Vizcaino L, Dzuris N, Riveron J, Padilla N, Wondji C, Lenhart A 2019. Contrasting patterns of gene expression indicate differing pyrethroid resistance mechanisms across the range of the New World malaria vector *Anopheles albimanus*. *PLOS One*, 14, e0210586.
- Macoris MdL, Martins AJ, Andrighetti MTM, Lima JBP, Valle D 2018. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 12, e0006390.
- Malaria RB 2010. World malaria day 2010: Africa update. *Here*. accessed 21st April.
- Manguin S, Roberts DR, Andre RG, Rejmankova E, Hakre S 1996. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. *J Med Entomol*, 33, 205-211.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 7.
- Martins AJ, Valle D 2012. The pyrethroid *knockdown* resistance. In *Insecticides-Basic and Other Applications*, InTech.
- Martins J, Solomon S, Mikheyev A, Mueller U, Ortiz A, Bacci Jr M 2007. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Mol Biol*, 16, 777-784.
- Moreira MF, Mansur JF, Figueira-Mansur J 2013. Resistência e Inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. In ISV Junior, *Temas Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular*, p. 582.
- Moreno J, Rubio-Palis Y, Acevedo P 2000. Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica del estado Bolívar, Venezuela. *Bol Malariol San Amb*, 40, 21-30.
- Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V 2007. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. *Med Vet Entomol*, 21, 339-349.
- Muirhead-Thomson RC 1950. DDT and gammexane as residual insecticides against *Anopheles gambiae* in African houses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 43, 401-412.

- Mulambalah CS, Siamba DN, Ngeiywa MM, Vulule JM 2010. Evaluation of Lambda-Cyhalothrin persistence on different indoor surfaces in a malaria epidemic-prone area in Kenya *Res J Biol Sci*, 5, 258-263.
- Nagm L, Luitgards-Moura JF, Neucamp Cde S, Monteiro-de-Barros FS, Honorio NA, Tsouris P, Rosa-Freitas MG 2007. Affinity and diversity indices for anopheline immature forms. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 49, 309-316.
- Najera J, Zaim M 2001. Malaria vector control–insecticides for indoor residual spraying. *WHO Dengue Bulletin*, 25, 126-127.
- Nalim S, Barodji, Widiarti, Widiyastuti U 1997. A field trial with etofenprox (OMS 3002) as a residual insecticide against malaria vectors, in Tanjung Bunga district, east Flores, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 28, 851-856.
- Nauen R 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci*, 63, 628-633.
- Neves DP 2016. *Parasitologia humana*. 13 ed., Atheneu, São Paulo.
- Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Lee PJ, Ng LC, Pei SW, Tu TM, Loh JP, Leo YS 2008. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg Infect Diseases*, 14, 814-816.
- Ngufor C, Fongnikin A, Rowland M, N'Guessan R 2017. Indoor residual spraying with a mixture of clothianidin (a neonicotinoid insecticide) and deltamethrin provides improved control and long residual activity against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* sl in Southern Benin. *PLoS One*, 12, e0189575.
- Nikpour F, Vatandoost H, Hanafi-Bojd AA, Raeisi A, Ranjbar M, Enayati AA, Abai MR, Shayeghi M, Mojahedi AR, Pourreza A 2017. Evaluation of Deltamethrin in Combination of Piperonyl Butoxide (PBO) against Pyrethroid Resistant, Malaria Vector, *Anopheles stephensi* in IRS Implementation: an Experimental Semi-Filed Trial in Iran. *J Arthropod-Borne Dis*, 11, 469-481.
- Okumu FO, Moore J, Mbeyela E, Sherlock M, Sangusangu R, Ligamba G, Russell T, Moore SJ 2012. A Modified Experimental Hut Design for Studying Responses of Disease-Transmitting Mosquitoes to Indoor Interventions: The Ifakara Experimental Huts. *PLoS One*, 7, e30967.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*, 9, 115.
- OMS 2002. Manual para borrifação de inseticida de efeito residual para controle de vetores. In Organização Mundial de Saúde, Genebra, p. 51.
- El control integrado de vectores: una respuesta integral a las enfermedades de transmisión vectorial, Washington, D.C.2008. Available from: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=download&alia](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alia)

s=101-48a-reuniao-do-conselho-diretivo-60-a-sessao-do-comite-regional-da-opas-oms-1&category\_slug=dengue-964&Itemid=965.

- Oxborough R, Kitau J, Jones R, Feston E, Matowo J, Mosha F, Rowland M 2014a. Long-lasting control of *Anopheles arabiensis* by a single spray application of micro-encapsulated pirimiphos-methyl (Actellic(R) 300 CS). *Malar J*, 13, 37.
- Oxborough RM 2016. Trends in US President's Malaria Initiative-funded indoor residual spray coverage and insecticide choice in sub-Saharan Africa (2008–2015): urgent need for affordable, long-lasting insecticides. *Malar J*, 15, 146.
- Oxborough RM, Kitau J, Jones R, Mosha FW, Rowland MW 2014b. Experimental hut and bioassay evaluation of the residual activity of a polymer-enhanced suspension concentrate (SC-PE) formulation of deltamethrin for IRS use in the control of *Anopheles arabiensis*. *Parasit Vectors*, 7, 454.
- Situación de la Malaria en la Región de las Américas, 2000-2012, Washington, D.C.2013. Available from: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/2012-cha-situacion-malaria-americas.pdf>.
- Epidemiological Alert: Increase of malaria in the Americas, Washington, D.C.: World Health Organization; 2018 [updated 30 January 2018].
- Penilla RP, Rodríguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI, Rodríguez MH 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Med Vet Entomol*, 12, 217-233.
- Penilla RP, Rodríguez AD, Hemingway J, Trejo A, Lopez AD, Rodríguez MH 2007. Cytochrome P450-based resistance mechanism and pyrethroid resistance in the field *Anopheles albimanus* resistance management trial. *Pest Biochem Physiol*, 89, 111-117.
- Pessoa SB, Martins AV 1982. Parasitologia Médica, 11ª edição. In, Editora Guanabara Koogan SA Rio de Janeiro.
- Póvoa M, Wirtz R, Lacerda R, Miles M, 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.
- Putaporntip C, Hongsrimumang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongwutiwes S 2009. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *J Infect Dis*, 199, 1143-1150.
- Quinones ML, Norris DE, Conn JE, Moreno M, Burkot TR, Bugoro H, Keven JB, Cooper R, Yan G, Rosas A, Palomino M, Donnelly MJ, Mawejje HD, Eapen A, Montgomery J, Coulibaly MB, Beier JC, Kumar A 2015. Insecticide Resistance in Areas Under Investigation by the International Centers of Excellence for Malaria

Research: A Challenge for Malaria Control and Elimination. *Am J Trop Med Hyg*, 93, 69-78.

R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016. Available from: <https://www.R-project.org/>.

Raeisi A, Abai M, Akbarzadeh K, Nateghpour M, Sartipi M, Hassanzehi A, Shahbakhsh N, Faraji L, Nikpour F, Mashayekhi M 2010. Residual Effects of Deltamethrin WG 25% as a New Formulation on Different Surfaces against *Anopheles stephensi*, in Southeastern Iran. *Iran J Arthropod Borne Dis*, 4, 60-65.

Randriamaherijaona S, Nepomichene T, Assoukpa J, Madec Y, Boyer S 2017. Efficacy of Bendiocarb Used for Indoor Residual Spraying for Malaria Control in Madagascar: Results With Local *Anopheles* Species (Diptera: Culicidae) From Experimental Hut Trials. *J Med Entomol*, 54, 1031-1036.

Randriamaherijaona S, Velonirina HJ, Boyer S 2016. Susceptibility status of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) commonly used as biological materials for evaluations of malaria vector control tools in Madagascar. *Malaria J*, 15, 338.

Ranson H, Jansen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH 2000a. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*, 9.

Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH 2000b. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*, 9, 491-497.

Rapley RE 1961. Notes on the construction of experimental huts. *Bull World Health Organ*, 24, 659-663.

Rey L 2008. *Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitarias do Homem nos Trópicos Ocidentais*. 4 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Rohani A, Saadiyah I, Walgun A, Lee HL 2007. Laboratory study on the effect of deltamethrin WG and WP formulations against *Anopheles maculatus* Theobald (Diptera: Culicidae) on rough and smooth surfaces of bamboo wall. *Trop Biomed*, 24, 77-82.

Rosa-Freitas MG, Deane LM, Momen H 1990. A morphological, isoenzymatic and behavioural study of ten populations of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 (Diptera: Culicidae) including from the type-locality-Baradero, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85, 275-289.

Rowland M, Boko P, Odjo A, Asidi A, Akogbeto M, N'Guessan R 2013. A new long-lasting indoor residual formulation of the organophosphate insecticide pirimiphos

methyl for prolonged control of pyrethroid-resistant mosquitoes: an experimental hut trial in Benin. *PLoS One*, 8, e69516.

RStudio Team 2014. *R: a language and environment for computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Rubio-Palis Y, Curtis CF 1992. Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. *Med Vet Entomol*, 6, 325-334.

Santacoloma L, Tibaduiza T, Gutiérrez M, Brochero H 2012. Sensibilidad de *Anopheles darlingi* Root 1840 a insecticidas, en dos localidades de los departamentos de Santander y Caquetá, Colombia. *Biomédica*, 32.

Santos RLC, Fayal AS, Aguiar AEF, Vieira DBR, Póvoa MM 2007. Avaliação do efeito residual de piretroides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. *Rev Saúde Pública*, 41, 276-283.

Sarton G 1959. *A History of Science*. Harvard University Press, Cambridge.

Schleier III JJ, Peterson RKD 2011. Pyrethrins and pyrethroid insecticides. In *Green Trends in Insect Control*, The Royal Society of Chemistry, p. 94-131.

Sharp BL, Ridl FC, Govender D, Kuklinski J, Kleinschmidt I 2007. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malaria J*, 6, 52.

Silva-Vasconcelos Ad, Kató MYN, Mourão EN, Souza RTLd, Lacerda RNdL, Sibajev A, Tsouris P, Póvoa MM, Momen H, Rosa-Freitas MG 2002. Biting Indices, Host-seeking Activity and Natural Infection Rates of Anopheline Species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97, 151-161.

Silva APB 2014. *Variabilidade do domínio IIS6 do gene do canal de sódio, associada à resistência aos inseticidas piretróides, em populações de Anopheles darlingi e Anopheles marajoara da Amazônia brasileira*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 117 pp.

Silva APB, Alves WS, Martins AJ, Tadei WP, Santos Jmm 2014. Adaptação de um bioensaio simplificado para avaliação do status de susceptibilidade em larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao piretroide Deltametrina. *BioAssay*, 9.

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*, 5.

Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors*, 3, 72.

- Sreehari U, Mittal P, Razdan R, Dash A, Ansari M 2009. Impact of etofenprox (Vectron (R) 20 WP) indoor residual spray on malaria transmission. *Indian J Med Res*, 129, 593.
- Suarez-Mutis MC, Martinez-Espinosa FE, Albuquerque BC, Coura JR 2013. Malária. In *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 885-910.
- Tadei WP, Rodrigues IB, Rafael MS, Sampaio RTM, Mesquita HG, Pinheiro VCS, Zequi JAC, Roque RA, dos Santos JMM 2017. Adaptive processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. *Hydrobiologia*, 789, 179-196.
- Tangena J-AA, Adiamoh M, D'Alessandro U, Jarju L, Jawara M, Jeffries D, Malik N, Nwakanma D, Kaur H, Takken W, Lindsay SW, Pinder M 2013a. Alternative treatments for indoor residual spraying for malaria control in a village with pyrethroid- and DDT-resistant vectors in the Gambia. *PLoS ONE*, 8, e74351.
- Tangena JA, Adiamoh M, D'Alessandro U, Jarju L, Jawara M, Jeffries D 2013b. Alternative treatments for indoor residual spraying for malaria control in a village with pyrethroid- and DDT-resistant vectors in the Gambia. *PLoS One*, 8, e74351.
- Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C 1985. A malária no Brasil. *Cad Saúde Pública*, 1, 71-111.
- Tauil PL, Lima JTF 1992. Critical analysis of malaria control measures in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87, 337-339.
- Tchicaya E, Nsanzabana C, Smith T, Donze J, de Hipsi M, Tano Y, Muller P, Briet O, Utzinger J, Koudou B 2014. Micro-encapsulated pirimiphos-methyl shows high insecticidal efficacy and long residual activity against pyrethroid-resistant malaria vectors in central Cote d'Ivoire. *Malar J*, 13, 332.
- Thawer NG, Ngondi JM, Mugalura FE, Emmanuel I, Mwalimu CD, Morou E, Vontas J, Protopopoff N, Rowland M, Mutagahywa J, Lalji S, Molteni F, Ramsan MM, Willilo R, Wright A, Kafuko JM, Ndong I, Reithinger R, Magesa SM 2015. Use of insecticide quantification kits to investigate the quality of spraying and decay rate of bendiocarb on different wall surfaces in Kagera region, Tanzania. *Parasit Vectors*, 8, 842.
- Tseng LF, Chang WC, Ferreira MC, Wu CH, Rampão HS, Lien JC 2008. Rapid Control of Malaria by Means of Indoor Residual Spraying of Alphacypermethrin in the Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. *Am J Trop Med Hyg*, 78, 248-250.
- Tsuji K 2001. Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. *Journal of microencapsulation*, 18, 137-147.
- Zero Malaria Starts With Me 2019. Available from: <https://endmalaria.org>.

- Uragayala S, Kamaraju R, Tiwari S, Ghosh SK, Valecha N 2015. Small-scale evaluation of the efficacy and residual activity of alpha-cypermethrin WG (250 g AI/kg) for indoor spraying in comparison with alpha-cypermethrin WP (50 g AI/kg) in India. *Malar J*, 14, 223.
- Vargas F, Córdova O, Alvarado A 2006. Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 23, 259-264.
- Vatandoost H, Abai MR, Abbasi M, Shaeghi M, Abtahi M, Rafie F 2009. Designing of a laboratory model for evaluation of the residual effects of deltamethrin (K-othrine WP 5%) on different surfaces against malaria vector, *Anopheles stephensi* (diptera: culicidae). *J Vector Borne Dis*, 46, 261-267.
- Vittor AY, Pan W, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Sánchez-Lozano W, Pinedo VV, Salas-Cobos E, Flores S, Patz JA 2009. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Am J Trop Med Hyg*, 81, 5-12.
- Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, Patel S, Umblas N, Mirel D, Higuchi R, Germer S 2005. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *Biotechniques*, 39, 885-893.
- WHO 1975. *Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II. Methods and Techniques*. World Health Organization, Geneva, 186 pp.
- 1981a. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. WHO/VBC/81.807. World Health Organization, Geneva, 6 pp.
- 1981b. *Instructions for the bioassay of insecticidal deposits on wall surfaces*. VBC/81.5 (WHO/VBC/81.812) World Health Organization, Geneva.
- 1993. Implementation of the global malaria control strategy. Report of a WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control 1993-2000. In *World Health Organ Tech Rep Ser*, Geneva, p. 1-57.
- 1995. Vector control for malaria and other mosquito-borne diseases. Report of a WHO study group. In *World Health Organ Tech Rep Ser*, Geneva, p. 1-91.
- 1997. *Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance*. WHO/CDT/WHOPES/97.2. World Health Organization, Geneva, 129 pp.
- 1998. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces*. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12. World Health Organization, Geneva, 45 pp.



- 1999. Report of the third WHOPES working group meeting : review of deltamethrin 1% SC and 25% WT etofenprox 10% EC and 10% EW. World Health Organization. In, World Health Organization, Geneva.
- 2005. *Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11.* World Health Organization, Geneva, 18 pp.
- 2006a. *Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3.* World Health Organization, Geneva, 60 pp.
- 2006b. *Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group.* World Health Organization, Geneva, 72 pp.
- 2006c. *Pesticides and their application – For the control of vectors and pests of public health importance. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1.* 6 ed., World Health Organization, Geneva, 114 pp.
- 2007. *Manual for indoor residual spraying. Application of residual sprays for vector control.* World Health Organization, Geneva.
- 2012. *Disease surveillance for malaria elimination: an operational manual.*, World Health Organization Geneva.
- 2013a. *Malaria entomology and vector control. Guide for tutors.* 2 ed., World Health Organization, Geneva, 50 pp.
- 2013b. *Recommendations for achieving universal coverage with long-lasting insecticidal nets in malaria control.* World Health Organization, Geneva, 3 pp.
- 2014. *Preserving pyrethroids. Bulletin of the World Health Organization.* Bull World Health Organ, 158-159 pp.
- 2015a. *Global technical strategy for malaria 2016-2030.* World Health Organization, Geneva, 30 pp.
- 2015b. *Guidelines for the treatment of malaria.* World Health Organization, Geneva.
- 2015c. *Indoor residual spraying: an operational manual for indoor residual spraying (IRS) for malaria transmission control and elimination.* 2nd ed., World Health Organization, Geneva, 125 pp.
- 2015d. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. In.

- 2016. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes* 2ed., World Health Organization, Geneva.
- 2017. *Global vector control response 2017–2030*. Geneva, 64 pp.
- 2018a. *Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010–2016*. World Health Organization Geneva.
- 2018b. World malaria report 2018. In, World Health Organization, Geneva, p. 165.
- 2019a. *Guidelines for Malaria Vector Control*. World Health Organization, Geneva, 138 pp.
- Neglected tropical diseases 2019b. Available from: [https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/).
- Q&A on the Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors, Geneva: World Health Organization; 2019c. Available from: [https://www.who.int/malaria/media/insecticide\\_resistance\\_management\\_qa/en/](https://www.who.int/malaria/media/insecticide_resistance_management_qa/en/).
- WHO recommended Long-lasting insecticidal mosquito nets, Geneva: World Health Organization; 2014.
- WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors 2015.
- Recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors 2018 [updated 21 September 2018]. Available from: [http://www.who.int/whopes/Insecticides\\_IRS\\_2\\_Mar\\_2015.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticides_IRS_2_Mar_2015.pdf).
- The Worldwid Insecticide resistance Network 2018. Available from: <https://win-network.ird.fr/>.
- Winkler MS, Tchicaya E, Koudou BG, Donzé J, Nsanzabana C, Müller P, Adja AM, Utzinger J 2012. Efficacy of ICON® Maxx in the laboratory and against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* in central Côte d'Ivoire. *Malar J*, 11, 167.
- Wondji CS, Coleman M, Kleinschmidt I, Mzilahowa T, Irving H, Ndula M 2012. Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, N'Guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto MC 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal*, 9, 83.
- Zaim M, Guillet P 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol*, 18, 161-163.

- Zamora Perea E, Balta León R, Palomino Salcedo M, Brogdon WG, Devine GJ 2009. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malar J*, 8, 208.
- Zhu HM, Li J, Zheng H 2006. Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*, 24, 70-71.
- Zimmerman RH, Galardo AKR, Lounibos LP, Arruda M, Wirtz R 2006. Bloodmeal hosts of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*, 43, 947-956.

## 9 APÊNDICES

### APÊNDICE A – Boletim para Bioensaios de Parede.

GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ  
INSTITUTO DE PESQUISAS CIENTÍFICAS E TECNOLÓGICAS DO ESTADO DO AMAPÁ  
LABORATÓRIO DE ENTOMOLOGIA EM MÉDICA

Estado: AP    Município: Macapá    Localidade: \_\_\_\_\_    Prova: \_\_\_\_\_  
Local da prova: \_\_\_\_\_ (IEPA/FIOCRUZ)    Nome do Inseticida: \_\_\_\_\_  
Tipo de superfície: \_\_\_\_\_    Data da Aplicação: / /

CONE		SUPERFÍCIE TESTADA	EXEMPLARES EM EXPOSIÇÃO				24 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO				Efeito <i>knockdown</i> 30'
N°	Altura		Número	HORA		Caidos após 30 min	N° DE EXEMPLARES		% DE MORTALIDADE		
				Início	Término		Vivos	Mortos	Observada	Corrigida	
1	0,5										
2											
3											
1	1,0										
2											
3											
1	1,5										
2											
3											
<b>Total</b>											
1	0,5										
2	1,0										
3	1,5										
<b>Controle</b>											
Temperatura			Início:	Término:		Max.		Min.			
Umidade Relativa			Início:	Término:		Max.		Min.			

Prova realizada por: \_\_\_\_\_    Data: \_\_\_\_\_

OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B - Boletim para bioensaios com papel impregnado

### FORMULÁRIO PARA ENSAIO COM PAPÉIS IMPREGNADOS DOSE -DIAGNÓSTICA

POPULAÇÃO: \_\_\_\_\_ ESPÉCIE: \_\_\_\_\_ GERAÇÃO: \_\_\_\_\_

DATA DE IMPREGNAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ PRODUTO: \_\_\_\_\_

DATA DO ENSAIO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nº VEZES USADO: \_\_\_\_\_ CONCENTRAÇÃO: \_\_\_\_\_

Efeito *Knocdown*

	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		Controle 1		Controle 2	
	Hora	Nº	Hora	Nº	Hora	Nº	Hora	Nº	Hora	Nº	Hora	Nº
Início												
5'												
10'												
15'												
20'												
25'												
30'												
35'												
40'												
45'												
50'												
55'												
60'												
Temperatura	Início		Término		Umidade Relativa	início		Término				

Mortos e vivos após espera de 24 horas

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Controle 1	Controle 2
Nº Mortos						
Nº Vivos						
Temperatura	Max	Min	Umidade	Max	Min	

Observação: \_\_\_\_\_ Realizado por: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C

Tabela S1 Resumo dos resultados do modelo de regressão logística para duas formulações de inseticidas testados em *Anopheles marajoara* para medir o impacto do Grupo (Controle ou Exposto), Condição (Painel, Simulado de campo e Campo), Superfície (Alvenaria e Parede de Madeira), Mês (24 horas até 6 meses após a aplicação) e a interação de três vias entre Condição, Superfície e Mês. Entradas em negrito indicam significância estatística em 5%. Cnd = condição; Srf = Superfície; Mnt = Mês.

Effects	Etofenprox WP				Deltametrina WG			
	Estimate	Std. Error	z value	P-value	Estimate	Std. Error	z value	P-value
Intercept	<b>-0.26253</b>	<b>0.12686</b>	<b>-2.069</b>	<b>0.038503</b>	-0.002979	0.132234	-0.023	0.982
Group Control	<b>-2.27384</b>	<b>0.09279</b>	<b>-24.506</b>	<b>&lt; 2e-16</b>	<b>-2.28133</b>	<b>0.077791</b>	<b>-29.326</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Cnd Semi-field	0.11734	0.1779	0.66	0.509538	-0.035596	0.17576	-0.203	0.84
Cnd Field	0.08608	0.17717	0.486	0.627089	-0.029588	0.171508	-0.173	0.863
Srf WW	0.21018	0.17355	1.211	0.225869	-0.031205	0.177613	-0.176	0.861
Mnt 1	-0.26924	0.18331	-1.469	0.141899	0.034796	0.169865	0.205	0.838
Mnt 2	<b>-0.46934</b>	<b>0.19617</b>	<b>-2.392</b>	<b>0.016736</b>	-0.003041	0.175728	-0.017	0.986
Mnt 3	-0.04517	0.17757	-0.254	0.799199	-0.033546	0.170648	-0.197	0.844
Mnt 4	-0.07536	0.18118	-0.416	0.677448	-0.066267	0.172685	-0.384	0.701
Mnt 5	<b>-2.29033</b>	<b>0.33738</b>	<b>-6.789</b>	<b>1.13E-11</b>	-0.249809	0.176936	-1.412	0.158
Mnt 6	<b>-2.26255</b>	<b>0.31455</b>	<b>-7.193</b>	<b>6.34E-13</b>	-0.166806	0.174738	-0.955	0.34
Cnd Semi-field: Srf WW	-0.07971	0.2447	-0.326	0.74461	-0.33992	0.248625	-1.367	0.172
Cnd Field: Srf WW	-0.01549	0.23908	-0.065	0.948327	0.075176	0.236928	0.317	0.751
Cnd Semi-field: Mnt 1	0.0344	0.25168	0.137	0.891296	0.050291	0.231751	0.217	0.828
Cnd Field: Mnt 1	-0.10464	0.25794	-0.406	0.68498	-0.047874	0.231052	-0.207	0.836
Cnd Semi-field: Mnt 2	0.1139	0.2669	0.427	0.669579	-0.214686	0.238244	-0.901	0.368
Cnd Field: Mnt 2	<b>-1.01581</b>	<b>0.30761</b>	<b>-3.302</b>	<b>0.000959</b>	-0.158211	0.236927	-0.668	0.504
Cnd Semi-field: Mnt 3	-0.31079	0.25422	-1.223	0.221518	-0.295311	0.232784	-1.269	0.205
Cnd Field: Mnt 3	<b>-1.69883</b>	<b>0.34381</b>	<b>-4.941</b>	<b>7.76E-07</b>	-0.380424	0.236468	-1.609	0.108
Cnd Semi-field: Mnt 4	<b>-1.69322</b>	<b>0.32065</b>	<b>-5.281</b>	<b>1.29E-07</b>	-0.232982	0.231055	-1.008	0.313
Cnd Field: Mnt 4	<b>-1.58226</b>	<b>0.31021</b>	<b>-5.101</b>	<b>3.39E-07</b>	-0.246445	0.237866	-1.036	0.3


Cnd Semi-field: Mnt 5	-0.52606	0.51058	-1.03	0.302862	0.008722	0.241639	0.036	0.971
Cnd Field: Mnt 5	<b>1.14127</b>	<b>0.41033</b>	<b>2.781</b>	<b>0.005413</b>	-0.005999	0.23584	-0.025	0.978
Cnd Semi-field: Mnt 6	0.18639	0.4398	0.424	0.671701	-0.11176	0.241512	-0.463	0.644
Cnd Field: Mnt 6	0.4301	0.41318	1.041	0.297899	-0.411801	0.242562	-1.698	0.09
Srf WW: Mnt 1	0.31145	0.24703	1.261	0.207389	-0.039958	0.233684	-0.171	0.864
Srf WW: Mnt 2	0.49785	0.25709	1.936	0.052808	-0.059589	0.239259	-0.249	0.803
Srf WW: Mnt 3	0.031	0.24303	0.128	0.898513	-0.100575	0.238489	-0.422	0.673
Srf WW: Mnt 4	-0.04	0.24878	-0.161	0.872263	0.056124	0.23069	0.243	0.808
Srf WW: Mnt 5	<b>2.31947</b>	<b>0.37561</b>	<b>6.175</b>	<b>6.61E-10</b>	0.253517	0.240913	1.052	0.293
Srf WW: Mnt 6	<b>2.28552</b>	<b>0.3563</b>	<b>6.415</b>	<b>1.41E-10</b>	0.024021	0.239168	0.1	0.92
Cnd Semi-field: Srf WW: Mnt 1	-0.16729	0.34308	-0.488	0.625819	0.141888	0.332948	0.426	0.67
Cnd Field: Srf WW: Mnt 1	-0.02145	0.3439	-0.062	0.950257	-0.202508	0.325299	-0.623	0.534
Cnd Semi-field: Srf WW: Mnt 2	-0.28728	0.35774	-0.803	0.421954	0.427067	0.337951	1.264	0.206
Cnd Field: Srf WW: Mnt 2	<b>0.76406</b>	<b>0.38565</b>	<b>1.981</b>	<b>0.047566</b>	0.077803	0.329841	0.236	0.814
Cnd Semi-field: Srf WW: Mnt 3	0.21248	0.34755	0.611	0.540953	0.425609	0.332849	1.279	0.201
Cnd Field: Srf WW: Mnt 3	<b>1.46146</b>	<b>0.42065</b>	<b>3.474</b>	<b>0.000512</b>	-0.191079	0.340583	-0.561	0.575
Cnd Semi-field: Srf WW: Mnt 4	<b>1.71956</b>	<b>0.40099</b>	<b>4.288</b>	<b>1.80E-05</b>	0.194096	0.323582	0.6	0.549
Cnd Field: Srf WW: Mnt 4	<b>1.5151</b>	<b>0.38811</b>	<b>3.904</b>	<b>9.47E-05</b>	0.231871	0.32498	0.713	0.476
Cnd Semi-field: Srf WW: Mnt 5	0.39822	0.5618	0.709	0.478429	0.033358	0.342589	0.097	0.922
Cnd Field: Srf WW: Mnt 5	<b>-1.44085</b>	<b>0.47446</b>	<b>-3.037</b>	<b>0.002391</b>	-0.405604	0.32963	-1.23	0.219
Cnd Semi-field: Srf WW: Mnt 6	-0.41348	0.50136	-0.825	0.409529	0.313273	0.341323	0.918	0.359
Cnd Field: Srf WW: Mnt 6	-0.52259	0.47319	-1.104	0.269416	0.306195	0.334578	0.915	0.36

RESEARCH

Open Access



# Efficacy of insecticides used in indoor residual spraying for malaria control: an experimental trial on various surfaces in a “test house”

Ana Paula S. A. Corrêa<sup>1,2\*</sup> , Allan K. R. Galardo<sup>2</sup>, Luana A. Lima<sup>2</sup>, Daniel C. P. Câmara<sup>3</sup>, Josiane N. Müller<sup>1,2</sup>, Jéssica Fernanda S. Barroso<sup>2</sup>, Oscar M. M. Lapouble<sup>4,5,6</sup>, Cynara M. Rodvalho<sup>1</sup>, Kaio Augusto N. Ribeiro<sup>7</sup> and José Bento P. Lima<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Malaria is a public health problem in the Brazilian Amazon region. In integrated vector management for malaria (anopheline) control, indoor residual spraying (IRS) represents one of the main tools in the basic strategy applied in the Amazonian states. It is essential to understand the residual efficacy of insecticides on different surfaces to determine spray cycles, ensure their rational use, and prevent wastage. This study aimed to evaluate the residual efficacy of six insecticide formulations used in the National Malaria Control Programme on four different types of walls in a field simulation at a “test house”.

**Methods:** The tests were performed as a field-simulating evaluation at a “test house” built in the municipality of Macapá. Six insecticide formulations comprising four pyrethroids, a carbamate, and an organophosphate were used, and evaluated when applied on different wall surfaces: painted wood, unpainted wood, plastered cement, and unplastered cement. The insecticides were applied to the interior walls of the “test house” by a trained technician.

**Results:** In the bioassays performed with pyrethroids, deltamethrin water-dispersible granules (WG) performed particularly well, presenting residual bioefficacy of 8 months on both wood surfaces after the IRS, whereas alpha-cypermethrin suspension concentrate (SC) and etofenprox wettable powder (WP) demonstrated residual bioefficacy of 4 months on at least one of the wood surfaces; however, the pyrethroid lambda-cyhalothrin WP showed a low residual bioefficacy (< 3 months) on all tested surfaces, demonstrating its inefficiency for areas with a long transmission cycle of malaria. For the carbamate-bendiocarb WP, residual bioefficacy for 3 months was achieved only on wood surfaces. In general, the organophosphate pirimifos-methyl capsule suspension (CS) demonstrated the best result, with a mortality rate < 80% over a period of 6 months on all surfaces tested.

**Conclusion:** Insecticide efficiency varies among different types of surface; therefore, a “test house” is a valuable evaluation tool. This work highlights the usefulness of associating the residual efficacy of insecticides on the surfaces commonly found in houses in endemic areas, together with knowledge about the transmission cycle duration of the transmission cycle and the insecticide susceptibility of the vector. This association helps in the decision-making for the malaria control intervention regarding.

**Keywords:** *Anopheles*, Wall surface type, Indoor residual spraying, Malaria, Integrated vector management

\*Correspondence: [apsacorrea@gmail.com](mailto:apsacorrea@gmail.com)

<sup>2</sup> Laboratório de Entomologia Médica, Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado de Amapá-IEPA, Macapá, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



## Background

Malaria is an avoidable and treatable disease, but it remains one of the most serious public health problems globally. In endemic countries, poor, disadvantaged people with limited access to healthcare facilities are the most affected [1]. Approximately 90% of malaria cases in the Americas are reported in the Amazonian parts of South America, Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, French Guiana, Guyana, Peru, Suriname, and Venezuela, with cases being mainly concentrated in Venezuela and Brazil [2]. According to the Brazilian Malaria Epidemiological Surveillance Information System (SIVEP/Malaria) [3], 99.8% of the cases are reported in the Amazon region, considered the endemic area, with high rates in states such as Amazonas, Acre, Pará, and Amapá [4, 5].

The set of interventions recommended by the World Health Organization (WHO), and adopted by the National Malaria Control Programme (NMCP), proposes: reducing the lethality and severity of cases, reducing the incidence of the disease through the elimination of transmission in urban areas, and maintaining the absence of the disease in places where the transmission has already been interrupted. This approach is understood to involve integrated, selective, and economic control activities that are suitable for the epidemiological scenario and appropriate to the actual conditions in each region [1, 6]. Among the proposed activities, vector control is an essential component and should be implemented based on local entomo-epidemiological data; for this, long-lasting insecticidal nets (LLIN) and indoor residual sprays (IRS) can be widely applied, which have achieved decreases in malaria cases [7, 8] in Africa, Asia, Europe, and Latin America [9–11].

Some limitations in *Anopheles* neotropical bioassays include a lack of mosquito colonization in laboratory circumstances and low availability of bioassays, except for colonies of *Anopheles aquasalis* and *Anopheles albitalensis* sensu stricto, which were kept in a laboratory by the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro, Brazil [12, 13]. Therefore, it is a priority to establish colonies of vectors that transmit malaria in Brazil [14]. Although malaria represents a serious public health problem in Brazil, few studies have evaluated the resistance of vectors to insecticides [15, 16]. However, Silva et al. [17] evaluated the susceptibility profile of insects to pyrethroids in the larvae of *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara*, using a simple, fast, and low-cost methodology, as an alternative to traditional, certified tests in the Amazonian states of Brazil, with the results showing susceptibility in the populations in the municipality of Macapá.

The development of insecticides that remain active for long periods was one of the most important advances in insect control in the 20th century. Controlling malaria

with insecticides in the Amazon dates back to the 1940s when two-thirds of the Brazilian population lived in endemic areas. Thus, a national campaign for the eradication of the disease with the expressive use of organochlorine DDT (dichlorodiphenyl-trichloroethane) in an organized and systemic manner [18, 19] was initiated, also contributing to the prevention of the epidemic of typhus transmitted by lice [20].

Organophosphates (e.g., malathion, temephos, and fenitrothion) were developed in the 1940s and have been used ever since as insecticides, herbicides, and plant growth regulators. In the 1970s, organochlorines were replaced by organophosphates [21]; although they are biodegradable and non-cumulative, they present chemical instability and high toxicity in vertebrates [22]. Carbamates present a rapid lethal action; however, as well as organophosphates, their persistence in the environment is short, making more frequent applications necessary [23]. The adoption of pyrethroids in the fight against malaria vectors in Brazil began in the mid-1990s, with cypermethrin in a wettable powder formulation [16], with lambda-cyhalothrin 5% for thermonebulization, and etofenprox WP 20% for BRI [24]. In addition, LLIN is impregnated with pyrethroids. However, the judicious use of chemical insecticides is necessary, avoiding the contamination of the environment and the selection of populations of resistant vectors [25, 26].

Knowledge about the persistence of insecticides (residual effect) is essential to determine the appropriate frequency of insecticide application in dwellings in areas with a high malaria incidence, considering the duration of the malaria transmission season, and to systematize the cycles of application of such products [16, 27–29]. This activity consists of spraying the walls of residences with insecticides that remain in place on the applied surfaces. The residual efficacy of this is evaluated by performing bioassays as recommended by the WHO [30, 31], which should ideally be conducted in actual human habitations. However, factors such as the operational cost of mobilizing teams to perform this, the difficulty in accessing areas with houses sprayed with insecticides, ethical considerations [32], the variability of dwellings, and the non-use of  $F_1$  generation mosquitoes of a known age compromise the performance of such tests in field conditions [33]. On the other hand, laboratory panel bioassays, under controlled conditions, have demonstrated a more prolonged residual effect [34], which may lead to a longer interval in the spray cycles.

Historically, the use of experimental huts began in the 1940s, with the goal of capturing mosquitoes. Subsequent works adapted the models for studies including the evaluation of IRS and LLIN, repellents, and synthetic attractants [35–38]; such dwellings may even be transportable,

such as the modified experimental Ifakara hut [39], which also exhibited the proven merits of the previously developed huts; however, there are no studies of studies of this nature in the Brazilian Amazon region, despite this being the location of the majority of the cases reported in the country [2]. The use of a “test house” for the field simulation for the wall bioassays can minimize the differences between the laboratory and the field; it can also decrease the operational costs, providing a better solution to define the spray cycles for IRS.

The aim of the present study was to evaluate, for the first time in a field simulation, the residual effect of six insecticide formulations used by the NMCP in an experimental hut called a “test house”, featuring walls composed of four different surfaces in the Brazilian Amazon.

## Methods

### Study area

This study was carried out in the city of Macapá (latitude: 0°2'20"N, longitude: 51°3'59"W), in the state of Amapá (Fig. 1). This site has a humid equatorial climate with an annual average temperature of 27 °C and two well-defined seasons: summer (drought period, from July to December) and winter (rainy season, from January to June) [40]. Malaria is endemic in this region, with its

incidence peaking in the period from August to November SIVEP-Malaria ([http://200.214.130.44/sivep\\_malaria/](http://200.214.130.44/sivep_malaria/)).

### Study period

The study was conducted from October 2014 to March 2016, in the external area of the Laboratory of Medical Entomology-Campus Fazendinha, Institute of Scientific and Technological Research of the State of Amapá-IEPA, in two phases:

#### First phase

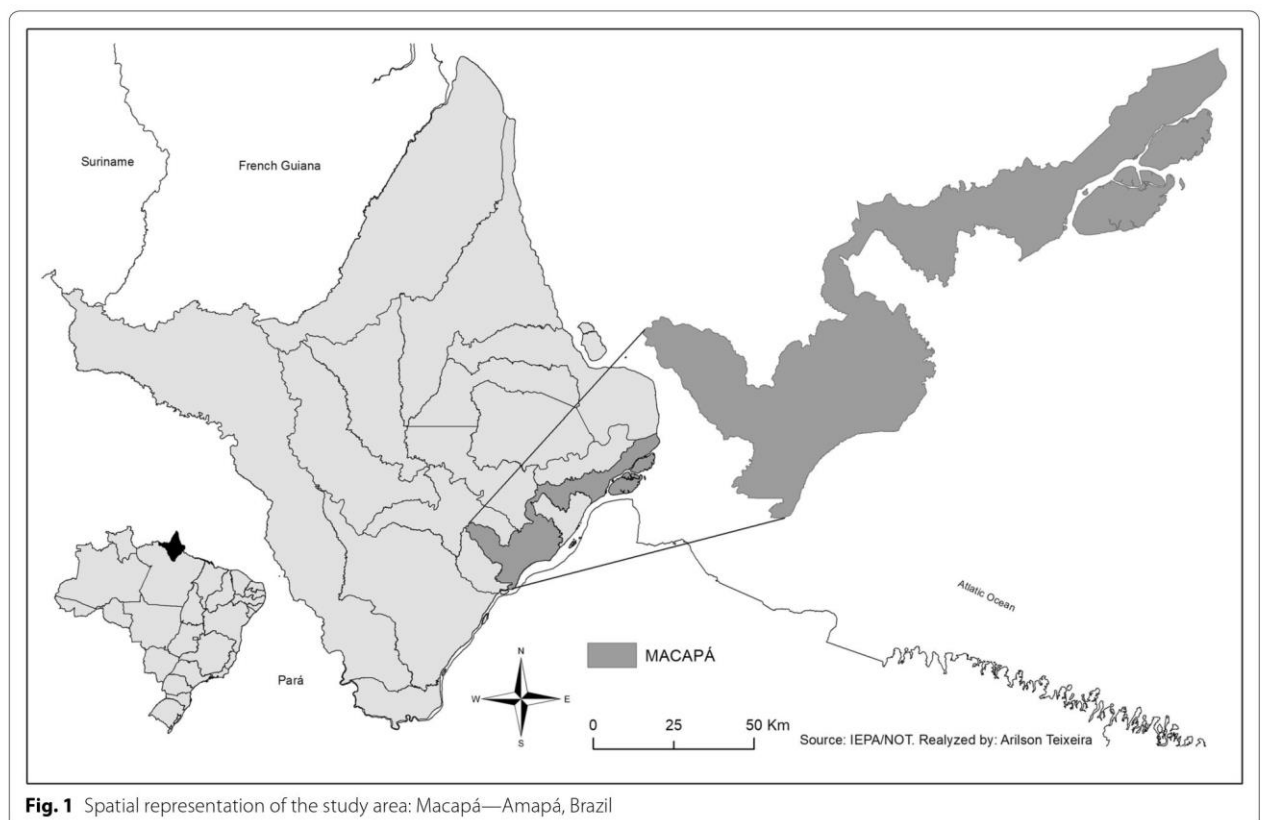
October 2014 to April 2015—testing of the insecticides alpha-cypermethrin SC, etofenprox WP, and lambda-cyhalothrin WP.

#### Second phase

May 2015 to March 2016—testing of the insecticides deltamethrin WG, bendiocarb WP, and pirimiphos-methyl CS.

#### “Test house”

A house was built in the external area of the Laboratory of Medical Entomology (IEPA) with the following characteristics: internal dimensions (3 m wide, 6 m long, 3 m



**Fig. 1** Spatial representation of the study area: Macapá—Amapá, Brazil

high), a corrugated fiber cement roof supported by hardwood beams, unlined, and a bare concrete floor with a window measuring  $1 \times 0.74$  m and a wooden door measuring  $0.85 \times 2.10$  m. Externally, it had a pavement which was 0.70 m wide surrounding the house and a front porch of 2 m with the characteristics of the floor and cover (Fig. 2).

The front wall and one of the side walls were made of bricks (masonry), whereas the other side wall and the back of the house were made of wood. Each side wall was divided into two parts. For the masonry wall, one part was left with only bricks, whereas the other was covered with plastered cement, referred to as plastered cement (CP1) and unplastered cement (CP2) surfaces. For the wooden wall, one part was painted with white acrylic paint, and the other part was kept without any paint, which is referred to as painted wood (WP1) and unpainted wood (WP2) surfaces. The front masonry wall was divided into two parts, CP1 and CP2, constituting the surfaces used as the controls. The same procedure was performed for the wooden back wall, where the WP1 and WP2 surfaces were used as the controls. Each side wall was divided into three 1-m-wide strips, and each strip was sprayed with one insecticide (Fig. 3).

The choice of the surfaces for the walls of the “test house” was based on the typical characteristics of the houses in the Amazon region. Houses in this region are also typically built on stilts. However, considering that the areas in which malaria is endemic are generally rural (e.g., settlements, villages, and districts) or forested, housing at these sites commonly features construction materials such as wood (abundant in the region), bricks, and cement, along with sand and straw roofs, ceramic tiles, or cement.

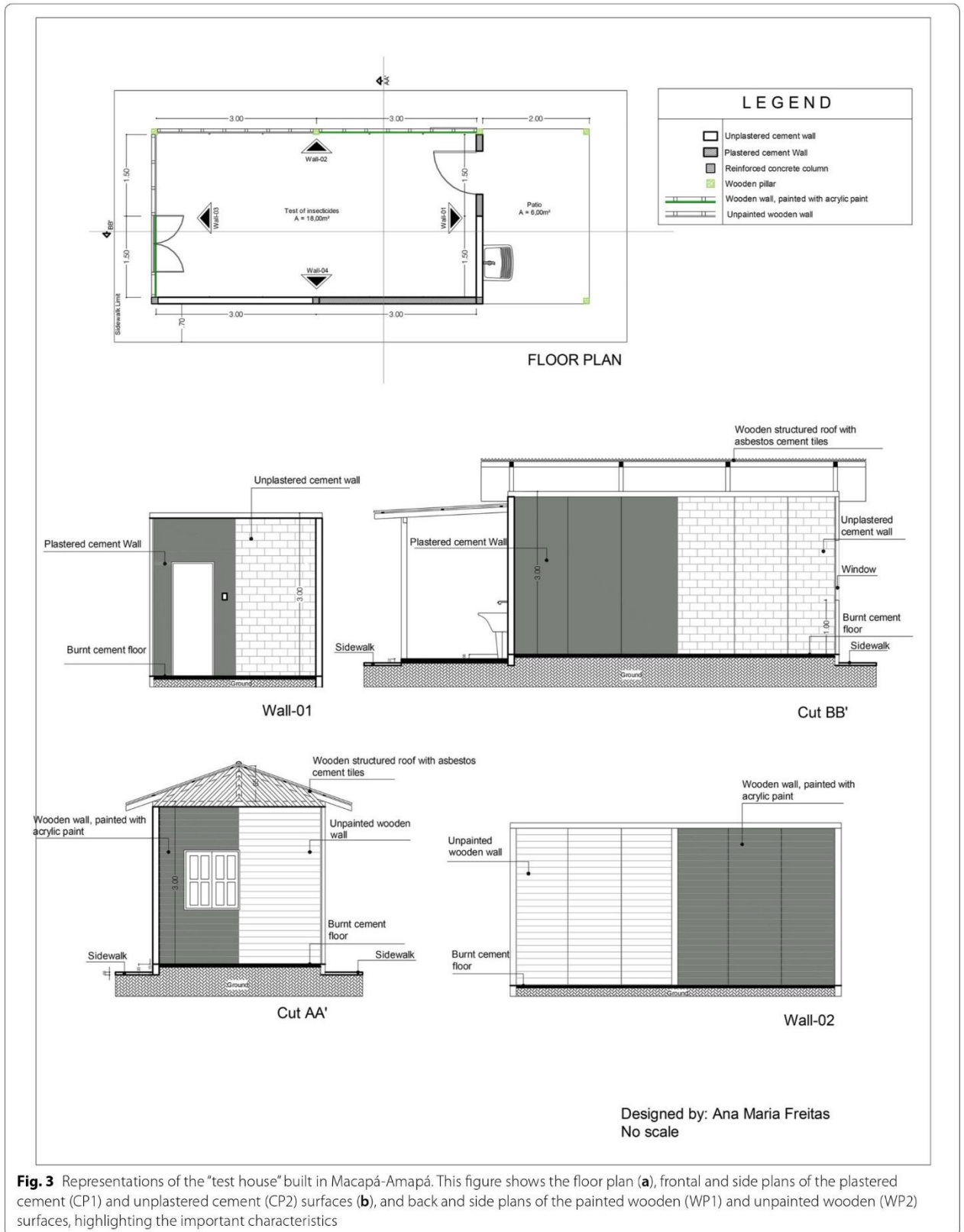
### Insecticides

Six insecticide formulations were evaluated, with the first analysis focusing on three pyrethroids, followed by a second analysis on a pyrethroid, a carbamate, and an organophosphate. The chemicals were used at the maximum concentrations for each formulation according to the World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) recommendations [41, 42], and included: (1) alpha-cypermethrin—ALFATEK<sup>®</sup> 200 SC, sprayed at a concentration of 0.03 g a.i./m<sup>2</sup> (grams of active ingredient), lambda-cyhalothrin—ICON<sup>®</sup> 10 WP sprayed at a concentration of 0.03 g a.i./m<sup>2</sup>, and etofenprox—VECTRON<sup>®</sup> 20 WP, sprayed at 0.3 g a.i./m<sup>2</sup>; (2) deltamethrin—DELTAGARD<sup>®</sup> 250 WG sprayed at a concentration of 0.025 g/m<sup>2</sup>, bendiocarb—FICAM<sup>®</sup> VC—WP at 0.4 g a.i./m<sup>2</sup>, and pirimiphos-methyl CS—Experimental Sample (Syngenta, Switzerland) sprayed at 1 g a.i./m<sup>2</sup>. The compounds have complete or provisional WHO approval and represent a diverse range of common insecticides currently used in vector control.

### Wall bioassays—residual efficacy tests

Considering that most species of Brazilian anophelines are not yet colonizable in the laboratory, obtaining a sufficient number of individuals to be used in the bioassays is difficult. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *marajoara*, was chosen for the residual efficacy bioassays because of the high population density of the vector that can be captured abundantly using animals as attractive. These anophelines are collected directly from the walls of buffalo corrals with the help of the mouth aspirator in rural areas of the region. In addition, *An. marajoara* is a vector of the complex Albitarsis, which has been implicated as the main vector in some municipalities of the state of





**Fig. 3** Representations of the “test house” built in Macapá-Amapá. This figure shows the floor plan (a), frontal and side plans of the plastered cement (CP1) and unplastered cement (CP2) surfaces (b), and back and side plans of the painted wooden (WP1) and unpainted wooden (WP2) surfaces, highlighting the important characteristics

Amapá [43–45], with anthropophilic and zoophilic, endo and exophageal behaviour, but being almost exclusively exophilic [46].

Against this background and considering the work of Silva [47] on the susceptibility/resistance of this vector in the Amazon region, including the state of Amapá, it was considered that populations collected in areas with little or no use of insecticides could be used for conducting bioassays. As such, the population of *An. marajoara* was used for this study since the samples were collected monthly, in the municipality of Mazagão, with the aid of a mouth aspirator at sites in which insecticides have not been directly applied. Females of *An. marajoara* (F<sub>1</sub> generation) were raised in the Insectary Laboratory of Medical Entomology/IEPA in accordance with a modified version of the protocol of Horosko et al. [12].

For the two phases in this study, with the exception of the control strips, the water-diluted insecticides were applied to the inner walls of the “test house” with a Hudson X-Pert nozzle type 8002-E pump by a trained technician from the Amapá State Secretary of Health. This was supervised by IEPA technicians and performed in accordance with the WHO guidelines, with the following specifications: a pressure of 25–55 psi, the distance from the tip of the nozzle to the sprayed surface of 45 cm, and a sprayed strip width of 75 cm [7, 48, 49].

To avoid cross-contamination between the insecticides at the time of spraying, they were applied on different days of the same week. Additionally, all the internal walls were completely sealed with a waterproof plastic tarpaulin, being exposed only four different swaths per surface type (CP1, CP2, WP1, and WP2), which were then sprayed with the specific insecticide. This tarpaulin was only removed after the insecticide had completely dried.

In the bioassays, each strip of the tested surface received nine plastic cones, distributed at three heights corresponding to 0.5, 1.0, and 1.5 m above the ground. For the control walls, one cone was used for each height. All the cones received approximately 15 mosquitoes [30, 31, 50–53]. After 30 min of exposure to the treated walls, the mosquitoes were transferred from the cones to clean entomological cups, where the first reading was performed. Subsequently, the mosquitoes were taken to the laboratory located on the same campus as the “test house”, fed 10% sucrose solution and, stored in a humid chamber, with a temperature between 25 and 27 °C and relative humidity between 70 and 80%.

The mortality rate was calculated 24 h after the end of the test, considering live mosquitoes as those capable of flying after slight agitation in the entomological cup, regardless of the degree of damage suffered. Abbott’s formula was used to correct the mortality rates when there was a mortality rate of between 5 and 20% in the control

group. No correction was necessary when the mortality rate was below 5%, while the bioassay was repeated when the rates were above 20% [54].

The first bioassay was carried out 1 day after the application of the insecticides, and then at approximately 30-day intervals. The mortality rates in the exposed group were established as satisfactory when they were greater than or equal to 80%, in accordance with the WHO criteria [30]. In this study, the end of the evaluation period for each insecticide was defined as when a reduction in the mortality rate occurred for two consecutive months or for up to 240 days after surface spraying for insecticides that maintained a mortality <80%.

In the interval from one stage to the next, the test house was cleaned, and its walls were washed several times with the aid of neutral soap and a high-pressure washer for the complete removal of the residues from the applied insecticides. After each wash, the cleaning of the wall was verified with wall bioassays, following the recommended methodology with an expected 0% mortality rate. Once this rate had been observed on all the internal surfaces of the test house, it was released for the application of the insecticides in the second stage.

#### Climate data

Environmental data concerning relative humidity, temperature and rainfall were obtained at the Fazendinha campus meteorological station of the Hydrometeorology and Renewable Energies Nucleus/IEPA.

#### Data analysis

Statistical analyses were performed using R [55] and RStudio [56] with a significance level of 5%. A series of logistic regression models were used to estimate the residual effect of six different formulations of insecticides on the mortality of *An. marajoara* exposed on four types of surfaces up to 8 months after the initial application of the insecticide. Similar data analysis was used to estimate the effects of the surface type and cone height on *An. marajoara* mortality. A separate model was established for each of the six formulations of insecticides used: alpha-cypermethrin SC, etofenprox WP, lambda-cyhalothrin WP, deltamethrin WG, bendiocarb WP, and pirimiphos-methyl CS. The models tested the surface type 1 month after the initial exposure and its interaction with fixed effects. The mortality was calculated after 24 h of product exposure. When significant effects were found, follow-up analyses were performed for paired comparisons using the Bonferroni method available in the lsmeans package [57].

Average temperature and mean relative humidity were compared in both experimental phases using a Welch’s *t* test, due to unequal sample size (187 days in phase 1 and

281 days in phase 2). The total number of rainy days was compared in each phase using a Wilcoxon–Mann–Whitney test.

The exclusion criterion for the statistical analyses was a mortality rate that did not meet the manufacturers’ specifications of a residual effect varying from 2 to 6 months. In this way, insecticides with a mortality rate below 80% in a period shorter than 60 days were excluded from the tests.

**Results**

The results presented in the tables and line graphs demonstrate the decay rate of the six different insecticides expressed as the 24 h mortality rate *versus* the number of days post spraying on the four different surfaces. Here the survival of the mosquitoes is considered as an indicator of the decreased of the residual effect of the insecticide on a given surface. The evaluation of the residual effect of the insecticides was carried out considering the

application of different formulations on distinct surfaces: WP1, WP2, CP1, and CP2 (Tables 1, 2).

There was no significant difference between relative humidity ( $t=1.453$ ,  $df=352.52$ ,  $p\text{-value}=0.15$ ) and number of rainy days ( $W=26,714$ ,  $p\text{-value}=0.72$ ) when comparing both experimental phases, but there was a significant difference when comparing mean temperature ( $t=-6.4421$ ,  $df=358.78$ ,  $p\text{-value}<0.001$ ) (Additional file 1).

**Findings in the first phase**

In the bioassays performed with the pyrethroids, the results of the tests after 24 h of spraying revealed a mortality rate above 80% for all of the surfaces used, with results reaching 100% for alpha-cypermethrin SC in WP1 and for etofenprox WP in WP1 and WP2, attesting to the efficacy of the spraying. These insecticides showed high residual activity (mortality  $\geq 80\%$ ) for 4 months after spraying on at least one of the surfaces (Table 1). There were no significant relationships between the surface

**Table 1 The mean (SE) monthly mortality rate of *An. marajoara* after 24 h post-exposure to six different insecticides sprayed on four different surfaces: painted wooden wall (WP1), unpainted wooden wall (WP2), plastered cement wall (CP1), and the unplastered cement wall (CP2)**

Insecticide	Substrate	Days post IRS								
		1	30	60	90	120	150	180	210	240 <sup>a</sup>
Alpha-cypermethrin SC	WP1	1.00 (–)	1.00 (–)	0.99 (0.02)	0.78 (0.04)	0.81 (0.04)	0.49 (0.07)	0.25 (0.06)	–	–
	WP2	0.82 (0.05)	0.92 (0.03)	0.47 (0.14)	0.43 (0.12)	–	–	–	–	–
	CP1	0.99 (0.02)	0.77 (0.06)	0.22 (0.05)	–	–	–	–	–	–
	CP2	0.97 (0.03)	0.51 (0.04)	0.49 (0.08)	–	–	–	–	–	–
Etofenprox WP	WP1	1.00 (–)	1.00 (–)	0.85 (0.04)	0.82 (0.05)	0.58 (0.10)	0.30 (0.08)	–	–	–
	WP2	1.00 (–)	0.97 (0.02)	0.98 (0.03)	0.97 (0.02)	0.86 (0.06)	0.68 (0.08)	0.33 (0.08)	–	–
	CP1	1.00 (–)	0.93 (0.03)	0.87 (0.05)	0.40 (0.07)	0.54 (0.08)	–	–	–	–
	CP2	0.97 (0.02)	0.67 (0.11)	0.54 (0.07)	–	–	–	–	–	–
Lambda-cyhalothrin WP	WP1	1.00 (–)	0.98 (0.02)	0.62 (0.11)	0.43 (0.07)	–	–	–	–	–
	WP2	0.96 (0.02)	0.96 (0.03)	0.73 (0.05)	0.63 (0.10)	–	–	–	–	–
	CP1	0.88 (0.04)	0.79 (0.06)	0.03 (0.02)	–	–	–	–	–	–
	CP2	0.98 (0.02)	0.74 (0.05)	0.60 (0.11)	–	–	–	–	–	–
Deltamethrin WG	WP1	1.00 (–)	1.00	0.98 (0.03)	0.97 (0.03)	0.95 (0.02)	0.94 (0.02)	0.85 (0.05)	0.82 (0.04)	0.83 (0.06)
	WP2	1.00 (–)	0.98 (0.02)	0.58 (0.08)	0.94 (0.03)	0.94 (0.03)	0.94 (0.03)	0.92 (0.04)	0.98 (0.02)	1.00 (–)
	CP1	1.00 (–)	1.00 (–)	0.90 (0.06)	0.87 (0.04)	0.74 (0.07)	0.68 (0.08)	–	–	–
	CP2	1.00 (–)	0.99 (0.02)	0.85 (0.06)	0.73 (0.13)	0.66 (0.07)	–	–	–	–
Bendiocarb WP	WP1	1.00 (–)	1.00 (–)	1.00 (–)	1.00 (–)	0.53 (0.13)	0.60 (0.12)	–	–	–
	WP2	1.00 (–)	1.00 (–)	1.00 (–)	1.00 (–)	0.46 (0.12)	0.65 (0.14)	–	–	–
	CP1	1.00 (–)	0.11 (0.03)	0.03 (0.02)	–	–	–	–	–	–
	CP2	1.00 (–)	0.05 (0.03)	0.06 (0.02)	–	–	–	–	–	–
Pirimiphos-methyl CS	WP1	1.00 (–)	1.00 (–)	1.00 (–)	0.98 (0.03)	1.00 (–)	1.00 (–)	1.00 (–)	0.98 (0.02)	0.79 (0.10)
	WP2	1.00 (–)	1.00 (–)	0.94 (0.04)	0.79 (0.08)	0.84 (0.05)	0.87 (0.05)	0.73 (0.10)	0.66 (0.07)	–
	CP1	1.00 (–)	0.98 (0.03)	1.00 (–)	0.92 (0.06)	0.69 (0.11)	0.95 (0.04)	0.65 (0.09)	1.00 (–)	0.90 (0.06)
	CP2	1.00 (–)	0.97 (0.02)	1.00 (–)	0.98 (0.02)	1.00 (–)	0.98 (0.02)	0.97 (0.04)	0.92 (0.03)	0.98 (0.03)

<sup>a</sup> The experiments were maintained until a mortality rate of less than 80% was observed for two consecutive months

**Table 2 The odds ratio [95% confidence interval] of monthly mortality rates of *An. marajoara* after 24 h post-exposure to alpha-cypermethrin, etofenprox WP, and lambda-cyhalothrin CS on four different surfaces: plastered cement wall (CP1), unplastered cement wall (CP2), painted wooden wall (WP1), and the unpainted wooden wall (WP2)**

Insecticide	Substrate	Days post IRS											
		1	30	60	90	120	150	180	210	240 <sup>a</sup>			
Alpha-cypermethrin SC	WP1	1.00 [0.78, 1.28]	1.00 [0.81, 1.24]	0.99 [0.73, 1.34]	0.77 [0.57, 1.05]	0.81 [0.59, 1.10]	0.49 [0.34, 0.70]	0.24 [0.15, 0.38]	-	-	-	-	-
	WP2	0.83 [0.64, 1.08]	0.91 [0.73, 1.14]	0.45 [0.31, 0.66]	0.42 [0.28, 0.61]	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP1	0.98 [0.77, 1.26]	0.7 [0.57, 1.04]	0.21 [0.13, 0.35]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP2	0.97 [0.73, 1.28]	0.51 [0.36, 0.71]	0.50 [0.36, 0.70]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etofenprox WP	WP1	1.00 [0.79, 1.27]	1.00 [0.73, 1.37]	0.85 [0.62, 1.15]	0.81 [0.59, 1.12]	0.57 [0.40, 0.82]	0.29 [0.19, 0.45]	-	-	-	-	-	-
	WP2	1.00 [0.80, 1.25]	0.96 [0.72, 1.28]	0.98 [0.73, 1.31]	0.97 [0.72, 1.30]	0.86 [0.64, 1.16]	0.68 [0.49, 0.94]	0.34 [0.23, 0.50]	-	-	-	-	-
	CP1	1.00 [0.79, 1.26]	0.92 [0.70, 1.22]	0.86 [0.64, 1.17]	0.40 [0.27, 0.59]	0.52 [0.36, 0.73]	-	-	-	-	-	-	-
	CP2	0.97 [0.77, 1.23]	0.66 [0.48, 0.91]	0.53 [0.37, 0.77]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lambda-cyhalothrin WP	WP1	0.99 [0.79, 1.25]	0.98 [0.72, 1.32]	0.65 [0.46, 0.91]	0.42 [0.29, 0.62]	-	-	-	-	-	-	-	-
	WP2	0.96 [0.77, 1.19]	0.96 [0.72, 1.28]	0.72 [0.53, 0.98]	0.62 [0.44, 0.87]	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP1	0.88 [0.70, 1.11]	0.78 [0.57, 1.05]	0.02 [0.01, 0.09]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP2	0.98 [0.77, 1.24]	0.73 [0.53, 1.00]	0.58 [0.39, 0.86]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deltamethrin WG	WP1	1.00 [0.74, 1.36]	1.00 [0.77, 1.30]	0.97 [0.75, 1.26]	0.97 [0.74, 1.27]	0.95 [0.75, 1.21]	0.94 [0.74, 1.19]	0.84 [0.64, 1.11]	0.82 [0.61, 1.10]	0.83 [0.65, 1.06]	-	-	-
	WP2	1.00 [0.74, 1.35]	0.97 [0.76, 1.26]	0.59 [0.45, 0.78]	0.94 [0.70, 1.25]	0.94 [0.73, 1.20]	0.93 [0.73, 1.19]	0.92 [0.70, 1.20]	0.97 [0.75, 1.26]	0.99 [0.79, 1.25]	-	-	-
	CP1	1.00 [0.74, 1.35]	1.00 [0.77, 1.30]	0.90 [0.70, 1.17]	0.87 [0.66, 1.15]	0.72 [0.56, 0.94]	0.68 [0.52, 0.88]	-	-	-	-	-	-
	CP2	1.00 [0.75, 1.33]	0.98 [0.77, 1.26]	0.84 [0.65, 1.09]	0.72 [0.53, 0.98]	0.66 [0.50, 0.88]	-	-	-	-	-	-	-
Bendiocarb WP	WP1	1.00 [0.78, 1.27]	1.00 [0.78, 1.28]	1.00 [0.81, 1.24]	1.00 [0.76, 1.32]	0.53 [0.40, 0.69]	0.61 [0.46, 0.80]	-	-	-	-	-	-
	WP2	1.00 [0.77, 1.29]	1.00 [0.76, 1.31]	1.00 [0.79, 1.27]	0.99 [0.76, 1.29]	0.47 [0.36, 0.63]	0.66 [0.51, 0.87]	-	-	-	-	-	-
	CP1	1.00 [0.77, 1.31]	0.11 [0.06, 0.19]	0.02 [0.01, 0.07]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP2	1.00 [0.76, 1.31]	0.05 [0.02, 0.11]	0.05 [0.02, 0.11]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pirimiphos-Methyl CS	WP1	1.00 [0.78, 1.28]	1.00 [0.76, 1.32]	1.00 [0.80, 1.25]	0.98 [0.78, 1.24]	1.00 [0.79, 1.26]	1.00 [0.78, 1.28]	0.99 [0.78, 1.26]	0.97 [0.75, 1.26]	0.78 [0.62, 0.98]	-	-	-
	WP2	1.00 [0.78, 1.28]	1.00 [0.76, 1.32]	0.94 [0.75, 1.17]	0.79 [0.62, 1.02]	0.84 [0.65, 1.08]	0.87 [0.68, 1.12]	0.74 [0.57, 0.96]	0.65 [0.49, 0.86]	-	-	-	-
	CP1	1.00 [0.78, 1.27]	0.97 [0.76, 1.24]	0.99 [0.79, 1.24]	0.91 [0.72, 1.16]	0.70 [0.51, 0.95]	0.95 [0.74, 1.22]	0.64 [0.49, 0.84]	0.99 [0.77, 1.28]	0.90 [0.70, 1.16]	-	-	-
	CP2	1.00 [0.78, 1.29]	0.97 [0.75, 1.25]	1.00 [0.80, 1.25]	0.98 [0.77, 1.24]	1.00 [0.78, 1.28]	0.98 [0.77, 1.24]	0.97 [0.77, 1.23]	0.92 [0.72, 1.17]	0.98 [0.76, 1.25]	-	-	-

*Italic entries indicate a statistical significance at 5% in the group comparison against the preceding month*  
<sup>a</sup> The experiments were maintained until a mortality rate of less than 80% was observed for two consecutive months

type, cone height, and their interaction for *An. marajoara* mortality for alpha-cypermethrin SC, etofenprox WP, and lambda-cyhalothrin WP.

**Alpha-cypermethrin SC**

Overall, alpha-cypermethrin was more efficient on wooden surfaces than on cement surfaces (Fig. 4). The model results and comparisons showed a diverse pattern. CP1, CP2, and WP2 had mortality rates declining below 80% before reaching the second month of the experiment (Table 2). WP1 was the best surface for this formulation, with mortality rates above 80% for the first 4 months of the experiment (Table 1).

**Etofenprox WP**

Overall, the mortality rates declined faster on the cement walls than on the wooden ones (Fig. 4). On CP1, the mortality rate stayed above 80% for the first 2 months, while on the unplastered wall the mortality rate dropped to below 80% in the first month of the experiment. The painted wooden wall maintained high mortality rates for the first 3 months. On the unpainted wall, the mortality rate declined to below 80% in the sixth month (Tables 1, 2).

**Lambda-cyhalothrin WP**

Mortality rates for this formulation declined faster for the cement walls than for the wooden ones (Fig. 4). The mortality declined to levels below 80% on CP1 in the second month, whereas for the painted wooden walls, the mortality rates declined to levels below 80% in the 3rd month (Tables 1, 2).

**Findings in the second phase**

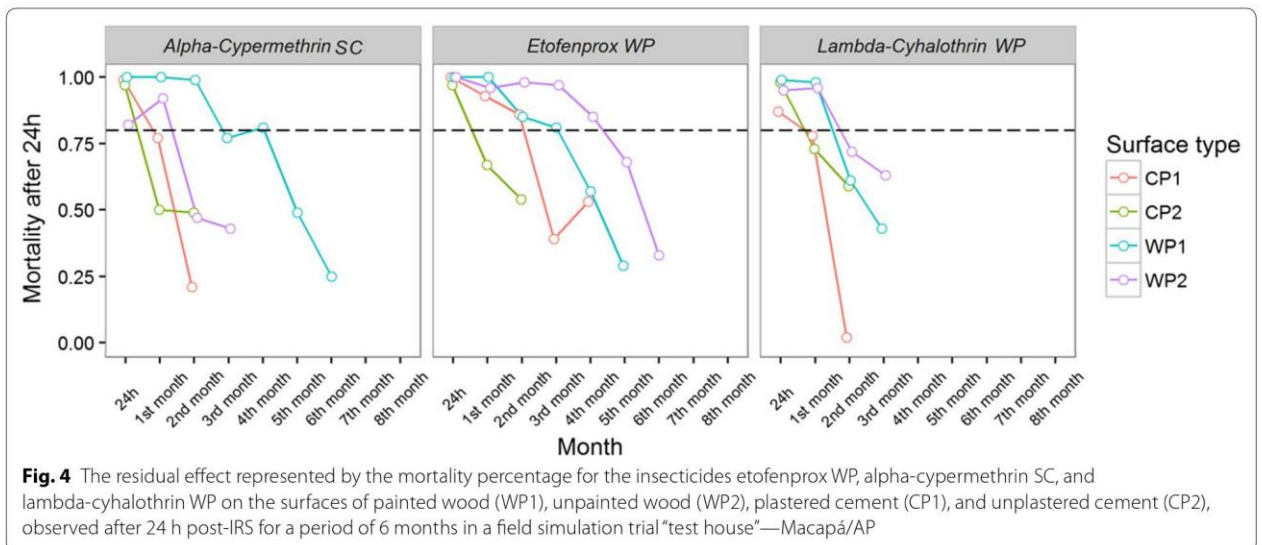
In the bioassays performed with deltamethrin WG (pyrethroid), bendiocarb WP (carbamate), and pyrimiphos-methyl CS (organophosphate), the results of the tests after 24 h of spraying showed 100% mortality on all the surfaces used, namely WP1, WP2, CP1, and CP2, which confirmed the efficacy of the spraying (Tables 1, 2). Significant relationships were found between the surface type, cone height, and their interaction for *An. marajoara* mortality only for deltamethrin WG (OR for 1.5-m height on MCP surface: 1.508; 95% CI 1.064, 2.138).

**Deltamethrin WG**

The mortality rates for this formulation were better on wooden surfaces than on cement ones, although the WP2 wall had a significant decrease in mortality in the second month (Fig. 5, Table 2). CP1 had a mortality rate above 80% up to the fifth month, while CP2 had a mortality rate above 80% up to the third month. For both the wooden walls, the mortality rates were maintained above 80% for all 8 months of the experiment (Tables 1, 2).

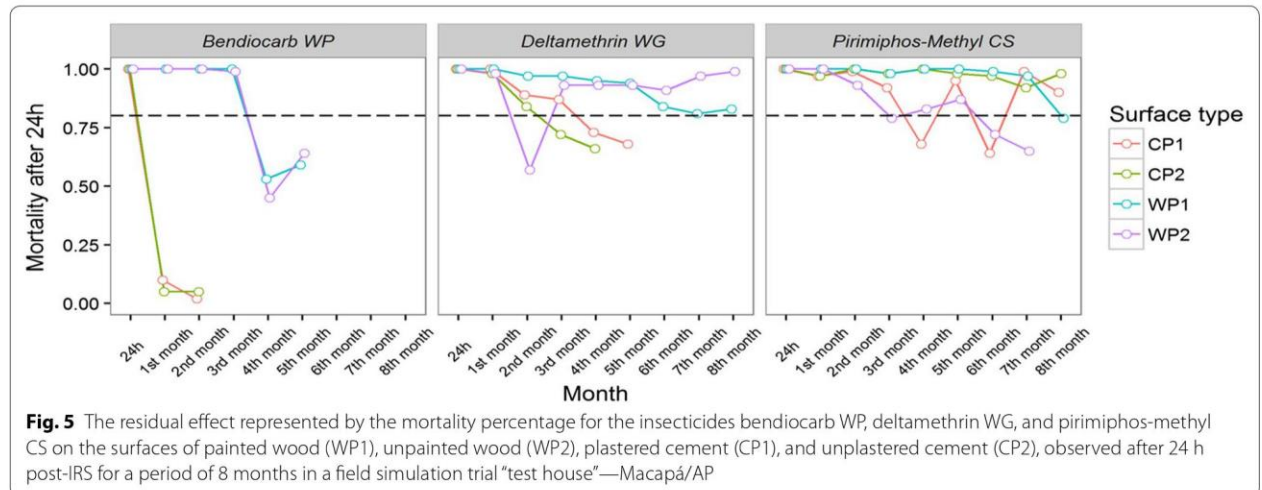
**Bendiocarb WP**

Showed better residual bioefficacy on the wooden surfaces than on cement surfaces (Fig. 5). This lasted up to 5 months on both painted and unpainted wooden surfaces. In contrast, it lasted only 1 month on the cement surfaces (Table 2), showing a rapid decline in the second month postspraying, with a mortality rate ranging between 11 and 5% on CP1 and CP2, respectively.



**Fig. 4** The residual effect represented by the mortality percentage for the insecticides etofenprox WP, alpha-cypermethrin SC, and lambda-cyhalothrin WP on the surfaces of painted wood (WP1), unpainted wood (WP2), plastered cement (CP1), and unplastered cement (CP2), observed after 24 h post-IRS for a period of 6 months in a field simulation trial “test house”—Macapá/AP





### Pirimiphos-methyl CS

Overall, this formulation maintained the mortality rates above 80% on all the surfaces tested for at least 6 months (Fig. 5). On the cement surfaces and on WP1, the mortality rates were higher than 80% for all 8 months of the experiment. On WP2, the mortality declined in the seventh month of the experiment (Tables 1, 2).

### Discussion

The present study demonstrated a wide variation in the residual efficacy of six IRS products from three classes of insecticides in a field simulation (“test house”), applied to four surfaces. The type of sprayed surface and the formulation of the insecticides showed different residual results when compared with those recommended by WHOPEs.

IRS can be optimized by adjusting the insecticide formulation depending on the sprayed surface [1]. Wettable powder and water dispersible granule formulations such as etofenprox WP, bendiocarb WP and deltamethrin WG have been shown to have higher residual effects on wood surfaces. The concentrated suspension formulation of alpha-cypermethrin SC was effective on painted wood, while the capsulated suspension of pirimiphos-methyl CS was effective on the wood and masonry surfaces. A mortality rate of 80% or more is the criterion adopted by the WHO to establish the residual effect of insecticides. In this study, in this study, products with residuals of 2 to 6 months were used; the efficacy results of the six insecticides showed that deltamethrin WG and pirimiphos-methyl CS met the WHO recommendation, presenting mortality rates within the established range for up to 240 days [42].

For the other insecticides, the mortality rate did not reach the minimum period of residuality for all the

evaluated substrates. The complexity of monitoring the IRS vector control in field situations [51] can be overcome with information obtained from the bioassays performed in field-simulating conditions. In this study the alpha-cypermethrin concentrated suspension formulation (SC) performed better on the wood surfaces than on cement ones; however, the only surface that reached the minimum period with residual efficacy within the WHO parameters for up to 120 days (4 months) was WP1. A similar result was found in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe, suggesting that IRS should be applied in three cycles per year [58]. For the WG-SB and WP formulations of alpha-cypermethrin on the clay and cement surfaces, the residual efficacy ranged from 11 to 16 weeks [59]. The data compiled by Dengela et al. [39] about the residual efficacy in African countries showed satisfactory performance of alpha-cypermethrin WP, varying from 4 to 10 months, on surfaces of mud, wood, cement, and other materials in the sprayed dwellings.

The residual efficacy of the etofenprox and lambda-cyhalothrin pyrethroid formulations, according to the WHOPEs guidelines, ranged from 3 to 6 months. In Brazil, the recommendation for the IRS with the formulation etofenprox WP was established with a 4-month interval [24], based on the laboratory bioassays performed with WP2 panels. The results in the field simulations presented the same residual efficacy for this surface; however, Santos et al. [16] using this insecticide in the field conditions, observed residuality of up to 3 months for wooden and CP2 surfaces, but on the CP1 surface the effectiveness was lower, supporting the findings of the study. The formulation of lambda-cyhalothrin WP demonstrated a short residual efficacy on the cement and wood surfaces under evaluation in Brazil [16], being in agreement with the results obtained in this study, however studies in

African countries showed satisfactory residuality, according to the period recommended by WHOPEs on surfaces of cement [60] and wood [61]. Variations in the results were also described for the concentrated suspension formulation of lambda-cyhalothrin CS concerning its effectiveness on the cement surfaces [62].

The residual effect of deltamethrin varied among the different surfaces. With the WP formulation, the results displayed the expected residual efficacy (3 to 6 months) [42, 60, 63]; they surpassed the predicted period when the SC-PE formulation was used [29], and the WG formulation presented results that were below the established [52, 64, 65]. In this study, among the evaluated pyrethroids, deltamethrin WG showed the best performance, demonstrating efficacy for 8 months on the wood surfaces and maintaining a residual effect with mortality  $\geq 80\%$  for a period equal to or greater than 90 days on three of the tested surfaces. Similar results were found in previous studies [66, 67].

It was highlighted that some factors affect the residual efficacy and persistence of insecticides; for example, the activity of pyrethroids can be compromised by the rapid degradation on porous surfaces with a high absorption [16, 66]. The low residual bioefficacy of the pyrethroids on the cement surfaces compared with the wooden ones found in the present study confirms previous observations but diverges from the findings of Dunford et al. [64].

The continuous use of pyrethroids has led to an increase in the population of resistant mosquitoes. Few studies have been performed on neotropical *Anopheles* [68, 69] and although there is a shortage of records in Brazil [17, 70], this is a reality in African countries [62, 71–73], supporting the importance of using substitute products in IRS rotation schemes [1, 23]. Bendiocarb is an insecticide of the class of carbamates recommended by the WHO, with residual efficacy varying from 2 to 6 months [42]. The WP formulation achieved the expected residual efficacy on different surfaces [51, 74], but some studies reflected a short residuality from 2 to 3 months [51, 75–78].

These results are similar to those found in this study on the wooden surfaces, but on the masonry surfaces, the effectiveness was less than 30 days. The short residuality of bendiocarb compromises its use as an alternative to replace the pyrethroids in the rotation scheme for malaria control in the Brazilian Amazon since it demands a higher number of spray cycles, not presenting a cost-effective benefit for protection in endemic areas.

In the search for long-lasting insecticides, the microencapsulation technology of pirimiphos-methyl has brought significant benefits in the current context of resistance to pyrethroids. Thus, the CS encapsulation suspension formulation minimizes the limitation of the low residuality

found in WP and EC emulsified concentrate formulations [42, 79], prolonging its persistence for up to 10 months on cement surfaces and for 6 to 8 months on the other surface types. The observed residual efficacy is beneficial in areas where there are up to two transmission periods per year [51, 53, 62, 67, 80, 81], corroborating the findings that residual efficacy was 8 months for the masonry and WP1 surfaces and 6 months for the WP2. The pirimiphos-methyl CS presented little variation and good performance among the tested surfaces. However, the bioassay was interrupted before the mortality rate dropped to less than 80% for two consecutive months due to the strong odour, as also reported elsewhere [27, 80].

In areas where there are no records of resistance to pyrethroids, its use should thus be considered with caution, to avoid rejection of its use by human inhabitants and inconsistent control activities (Additional file 2).

## Conclusions

The results of this study showed a variation of the residual effects of insecticides on the different tested surfaces. The residuality performance consistent with the WHO guidelines, among the pyrethroids evaluated, was observed for the insecticides deltamethrin WG for WP1, WP2 (240 days), and CP1 (90 days) surfaces and etofenprox WP for both the wood surfaces (90 and 120 days). Within this context, these insecticides would be effective in vector control programmes if applied in quarterly spray cycles. The pyrethroids alpha-cypermethrin SC and lambda-cyhalothrin WP, as well as the carbamate-bendiocarb WP, presented a lower residuality than the other insecticides studied, with a short or no period of effectiveness on the applied surfaces. On the other hand, the organophosphate pirimiphos-methyl CS was shown to be efficient on all of the surfaces so that it could be used in cycles with an interval of up to 6 months. Nevertheless, this insecticide exudes a strong odour and high toxicity in vertebrates; therefore, in countries in which resistance to pyrethroids has not been confirmed, its judicious use is recommended.

This study reveals that the variation in effects among different surfaces and the short residual effect compromises the use of insecticides, to the detriment of the cost-benefit. The persistence of the product is essential, and it should remain effective on the applied surface for sufficient time to cover the malaria transmission period. Against this background, the use of the “test house” for the field simulation is beneficial to evaluate the residual period of insecticides in order to obtain results that are more reflective of those in residences in endemic areas.

This study also recommends the performance of comparative wall bioassays using laboratory panels, field simulations, and directly in the field. The data generated

from such studies can serve as an important guide to malaria control programmes, by selecting insecticides for IRS in these environments.

## Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2969-6>.

**Additional file 1. Figure S1:** Climate data for each experiment. Phase 1 occurred from October 2014 to April 2015 and phase 2 from May 2015 to March 2016.

**Additional file 2. Table S1:** Estimated effects of surface type, cone height and their interaction on *Anopheles marajoara* mortality for six different insecticide formulations. Bold entries indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ).

## Abbreviations

CP1: plastered cement; CP2: unplastered cement; CS: capsule suspension; IEPA: Institute of Scientific and Technological Research of the State of Amapá; IRS: indoor residual spraying; LLIN: long-lasting insecticidal net; NMCP: National Malaria Control Program; PAHO: Pan-American Health Organization; SC: suspension concentrate; WG: water-dispersible granules; WHO: World Health Organization; WP1: painted wood; WP2: unpainted wood; WP: wettable powder; WHOPE: World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme.

## Acknowledgements

The authors are grateful for all the support from the directors of the Institute of Scientific and Technological Research (IEPA) of the State of Amapá. They also thank the technicians of the IEPA Medical Entomology Laboratory for their collaboration in the capture, maintenance of colonies, and performing the bioassays throughout this study.

## Authors' contributions

JBL, AKG, OML and KAR designed the study. JBL and AKG supervised the study. APC, LAL, and JFB performed the field collections. APC and LAL performed the bioassays. LAL and JFB raised the mosquitoes in the insectary. APC, JNM, DCC performed the data analysis and wrote the manuscript, and KAR performed the review data analysis. CMR reviewed the manuscript and English writing. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This work was funded by Pan-American Health Organization (PAHO) and the Ministry of Health of Brazil (BR/LOA/1300080.001) through the National Malaria Control Programme (NMCP) of Brazil, and by Santo Antonio Energia SAE 2745/0002 IEPA).

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on a reasonable request.

## Ethics approval and consent to participate

Ethics approval for this study was obtained from the Research Ethics Committee of the Institute of Scientific and Technological Research of Amapá (IEPA) on November 18, 2014 (approval consent number: 910.453) in collaboration with LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. We declare for whom it may concern that the Santo Antônio Energia S/A company is a partner of projects of the institutions IEPA and FIOCRUZ in which several of the coauthors are part of the manuscript: Efficacy of insecticides used in indoor residual spraying for malaria control: an experimental trial on various surfaces in a "test house"—submitted to the *Malaria Journal*. Part of Santo Antonio Energia S/A policy is to encourage its affiliates on authorship and

co-authorship of scientific articles which was the case in this study with financial support through Dr. Ribeiro's participation on this research work. More specifically in this study: Santo Antonio Energia S/A contributed with funding in the design of the study, analysis and interpretation of the data, with computer, R-Studio program for statistics analysis. Santo Antonio Energia S/A contributed with funding in revision of the manuscript to the English language. Thus, we affirm Dr. Ribeiro is affiliated with Santo Antonio Energia S/A, but that there are no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodos Vetores—Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup> Laboratório de Entomologia Médica, Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado de Amapá-IEPA, Macapá, Brazil. <sup>3</sup> Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores - Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup> Pan-American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO), Paramaribo, Suriname. <sup>5</sup> Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>7</sup> Santo Antônio Energia S/A, São Paulo, Brazil.

Received: 4 February 2019 Accepted: 21 September 2019  
Published online: 10 October 2019

## References

- WHO. Global technical strategy for malaria 2016–2030. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 30.
- WHO. World malaria report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 30.
- Ministério da Saúde: Sistema de informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP-Malária). [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp).
- Cardoso RF, Goldenberg P. Malária no Estado do Amapá, Brasil, de 1970 a 2003: trajetória e controle. *Cad Saúde Pública*. 2007;23:1339–48.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
- Tauil PL, Lima JTF. Critical analysis of malaria control measures in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:337–9.
- WHO. Indoor residual spraying: an operational manual for indoor residual spraying (IRS) for malaria transmission control and elimination. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2013.
- WHO. Recommendations for achieving universal coverage with long-lasting insecticidal nets in malaria control. Geneva: World Health Organization; 2013.
- Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health*. 2004;9:846–56.
- Tukei BB, Beke A, Lamadrid-Figueroa H. Assessing the effect of indoor residual spraying (IRS) on malaria morbidity in Northern Uganda: a before and after study. *Malar J*. 2017;16:4.
- Murphy C, Ringheim K, Woldehanna S, Volmink J. Reducing malaria burden: evidence of effectiveness for decision makers. Washington DC: Technical Report, Global Health Council; 2003.
- Horosko S 3rd, Lima JB, Brandolini MB. Establishment of a free-mating colony of *Anopheles albiparvus* from Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*. 1997;13:95–6.
- Lima JB, Valle D, Peixoto AA. Adaptation of a South American malaria vector to laboratory colonization suggests faster-male evolution for mating ability. *BMC Evol Biol*. 2004;4:12.
- Baia-da-Silva DC, Brito-Sousa JD, Rodovalho SR, Peterka C, Moresco G, Lapouble OMM, et al. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20180542.
- Malcolm CA. Current status of pyrethroid resistance in anophelines. *Parasitol Today*. 1988;4:513–5.
- Santos RLC, Fayal AS, Aguiar AEF, Vieira DBR, Póvoa MM. Avaliação do efeito residual de piretroides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. *Rev Saúde Pública*. 2007;41:276–83.
- Silva APB, Alves WS, Martins AJ, Tadei WP, Santos JMM. Adaptação de um bioensaio simplificado para avaliação do status de susceptibilidade em

from such studies can serve as an important guide to malaria control programmes, by selecting insecticides for IRS in these environments.

### Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2969-6>.

**Additional file 1. Figure S1:** Climate data for each experiment. Phase 1 occurred from October 2014 to April 2015 and phase 2 from May 2015 to March 2016.

**Additional file 2. Table S1:** Estimated effects of surface type, cone height and their interaction on *Anopheles marajoara* mortality for six different insecticide formulations. Bold entries indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ).

### Abbreviations

CP1: plastered cement; CP2: unplastered cement; CS: capsule suspension; IEPA: Institute of Scientific and Technological Research of the State of Amapá; IRS: indoor residual spraying; LLIN: long-lasting insecticidal net; NMCP: National Malaria Control Program; PAHO: Pan-American Health Organization; SC: suspension concentrate; WG: water-dispersible granules; WHO: World Health Organization; WP1: painted wood; WP2: unpainted wood; WP: wettable powder; WHOPES: World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme.

### Acknowledgements

The authors are grateful for all the support from the directors of the Institute of Scientific and Technological Research (IEPA) of the State of Amapá. They also thank the technicians of the IEPA Medical Entomology Laboratory for their collaboration in the capture, maintenance of colonies, and performing the bioassays throughout this study.

### Authors' contributions

JBL, AKG, OML and KAR designed the study. JBL and AKG supervised the study. APC, LAL, and JFB performed the field collections. APC and LAL performed the bioassays. LAL and JFB raised the mosquitoes in the insectary. APC, JNM, DCC performed the data analysis and wrote the manuscript, and KAR performed the review data analysis. CMR reviewed the manuscript and English writing. All authors read and approved the final manuscript.

### Funding

This work was funded by Pan-American Health Organization (PAHO) and the Ministry of Health of Brazil (BR/LOA/1300080.001) through the National Malaria Control Programme (NMCP) of Brazil, and by Santo Antonio Energia SAE 2745/0002 IEPA).

### Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on a reasonable request.

### Ethics approval and consent to participate

Ethics approval for this study was obtained from the Research Ethics Committee of the Institute of Scientific and Technological Research of Amapá (IEPA) on November 18, 2014 (approval consent number: 910.453) in collaboration with LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. We declare for whom it may concern that the Santo Antônio Energia S/A company is a partner of projects of the institutions IEPA and FIOCRUZ in which several of the coauthors are part of the manuscript: Efficacy of insecticides used in indoor residual spraying for malaria control: an experimental trial on various surfaces in a "test house"—submitted to the *Malaria Journal*. Part of Santo Antonio Energia S/A policy is to encourage its affiliates on authorship and

co-authorship of scientific articles which was the case in this study with financial support through Dr. Ribeiro's participation on this research work. More specifically in this study: Santo Antonio Energia S/A contributed with funding in the design of the study, analysis and interpretation of the data, with computer, R-Studio program for statistics analysis. Santo Antonio Energia S/A contributed with funding in revision of the manuscript to the English language. Thus, we affirm Dr. Ribeiro is affiliated with Santo Antonio Energia S/A, but that there are no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodos Vetores—Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup> Laboratório de Entomologia Médica, Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado de Amapá-IEPA, Macapá, Brazil. <sup>3</sup> Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores - Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup> Pan-American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO), Paramaribo, Suriname. <sup>5</sup> Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>7</sup> Santo Antônio Energia S/A, São Paulo, Brazil.

Received: 4 February 2019 Accepted: 21 September 2019

Published online: 10 October 2019

### References

1. WHO. Global technical strategy for malaria 2016–2030. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 30.
2. WHO. World malaria report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 30.
3. Ministério da Saúde: Sistema de informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP-Malária). [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp).
4. Cardoso RF, Goldenberg P. Malária no Estado do Amapá, Brasil, de 1970 a 2003: trajetória e controle. *Cad Saúde Pública*. 2007;23:1339–48.
5. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
6. Tauil PL, Lima JTF. Critical analysis of malaria control measures in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:337–9.
7. WHO. Indoor residual spraying: an operational manual for indoor residual spraying (IRS) for malaria transmission control and elimination. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2013.
8. WHO. Recommendations for achieving universal coverage with long-lasting insecticidal nets in malaria control. Geneva: World Health Organization; 2013.
9. Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health*. 2004;9:846–56.
10. Tukei BB, Beke A, Lamadrid-Figueroa H. Assessing the effect of indoor residual spraying (IRS) on malaria morbidity in Northern Uganda: a before and after study. *Malar J*. 2017;16:4.
11. Murphy C, Ringheim K, Woldehanna S, Volmink J. Reducing malaria burden: evidence of effectiveness for decision makers. Washington DC: Technical Report, Global Health Council; 2003.
12. Horosko S 3rd, Lima JB, Brandolini MB. Establishment of a free-mating colony of *Anopheles albiparvus* from Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*. 1997;13:95–6.
13. Lima JB, Valle D, Peixoto AA. Adaptation of a South American malaria vector to laboratory colonization suggests faster-male evolution for mating ability. *BMC Evol Biol*. 2004;4:12.
14. Baia-da-Silva DC, Brito-Sousa JD, Rodovalho SR, Peterka C, Moresco G, Lapouble OMM, et al. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20180542.
15. Malcolm CA. Current status of pyrethroid resistance in anophelines. *Parasitol Today*. 1988;4:513–5.
16. Santos RLC, Fayal AS, Aguiar AEF, Vieira DBR, Póvoa MM. Avaliação do efeito residual de piretroides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. *Rev Saúde Pública*. 2007;41:276–83.
17. Silva APB, Alves WS, Martins AJ, Tadei WP, Santos JMM. Adaptação de um bioensaio simplificado para avaliação do status de susceptibilidade em

- larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao piretroide delta-metrimina. *BioAssay*. 2014;9:1–9.
18. Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:223–30.
  19. Loiola CCP, Silva CJMd, Tauil PL. Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. *Pan Am J Public Health*. 1965;2002(11):235–43.
  20. Flores AV, Ribeiro JN, Neves AA, Queiroz ELRD. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambiente Sociedade*. 2004;7:111–24.
  21. Carneiro FF, Augusto LGS, Rigotto RM, Friedrich K, Búrigo AC. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde Rio de Janeiro: EPSJV. São Paulo: Expressão Popular; 2015.
  22. Morales-Rojas H, Moss RA. Phosphorylative reactivity of o-iodosulcarbonylates and related nucleophiles. *Chem Rev*. 2002;102:2497–522.
  23. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2007;16:295–302.
  24. Brasil. Uso do Etofenprox PM 20% para Borrifação Residual Intradomiciliar no controle da malária. *Transmissíveis DdVdD ed*. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
  25. IRAC. Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): prevention and management of insecticide resistance in vectors of public health importance, 2nd Edn. 2011.
  26. WIN. The Worldwide Insecticide Resistance Network. 2018. <https://win-network.ird.fr/>. Accessed 15 Jan 2018.
  27. Tangena JA, Adiamoh M, D'Alessandro U, Jarju L, Jawara M, Jeffries D. Alternative treatments for indoor residual spraying for malaria control in a village with pyrethroid- and DDT-resistant vectors in the Gambia. *PLoS One*. 2013;8:e74351.
  28. Oxborough R, Kitau J, Jones R, Feston E, Matowo J, Moshaf F, Rowland M. Long-lasting control of *Anopheles arabiensis* by a single spray application of micro-encapsulated pirimiphos-methyl (Actellic(R) 300 CS). *Malar J*. 2014;13:37.
  29. Oxborough RM, Kitau J, Jones R, Moshaf FW, Rowland MW. Experimental hut and bioassay evaluation of the residual activity of a polymer-enhanced suspension concentrate (SC-PE) formulation of deltamethrin for IRS use in the control of *Anopheles arabiensis*. *Parasit Vectors*. 2014;7:454.
  30. WHO. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3. Geneva: World Health Organization; 2006.
  31. WHO. Instructions for the bioassay of insecticidal deposits on wall surfaces. VBC/81.5 (WHO/VBC/81.812). Geneva: World Health Organization; 1981.
  32. London L, Coggon D, Moretto A, Westerholm P, Wilks MF, Colosio C. The ethics of human volunteer studies involving experimental exposure to pesticides: unanswered dilemmas. *Environ Health*. 2010;9:50.
  33. Okumu FO, Chipwaza B, Madumla EP, Mbeyela E, Lingamba G, Moore J, et al. Implications of bio-efficacy and persistence of insecticides when indoor residual spraying and long-lasting insecticide nets are combined for malaria prevention. *Malar J*. 2012;11:378.
  34. Galardo AKR, Galardo CD. Relatório técnico sobre o Estudo da Eficácia de Redes Impregnadas com Inseticidas e do uso de Fendona® em borrifações domiciliares para o controle de *Anopheles* sp. em bioensaios de campo e laboratório no estado do Amapá—Brasil. Macapá: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá; 2009.
  35. Muirhead-Thomson RC. DDT and gammexane as residual insecticides against *Anopheles gambiae* in African houses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1950;43:401–12.
  36. Busvine J. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*. 1951;168:193–5.
  37. Rapley RE. Notes on the construction of experimental huts. *Bull World Health Organ*. 1961;24:659–63.
  38. Haddow AJ. The mosquito fauna and climate of native huts at Kisumu, Kenya. *Bull Entomol Res*. 2009;33:91–142.
  39. Okumu FO, Moore J, Mbeyela E, Sherlock M, Sangusangu R, Ligamba G, et al. A modified experimental hut design for studying responses of disease-transmitting mosquitoes to indoor interventions: the Ifakara experimental huts. *PLoS ONE*. 2012;7:e30967.
  40. IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE Cidades. 2018. <http://www.ibge.gov.br/estadosat>. Accessed 17 Jan 2018.
  41. FAO/WHO. Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides, 1st Edn. Geneva and Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.
  42. WHOPES Recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. 2018. [http://www.who.int/whopes/insecticides\\_IRS\\_2\\_Mar\\_2015.pdf](http://www.who.int/whopes/insecticides_IRS_2_Mar_2015.pdf).
  43. Póvoa M, Wirtz R, Lacerda R, Miles M, Warhurst D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region. Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:179–84.
  44. Galardo AKR. A importância dos *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Anopheles marajoara* Galvão e Damasceno, 1942 na transmissão de malária no município de Macapá/Ap—Brasil, Tese. Instituto de Ciências Biológicas: Universidade Federal do Pará; 2010.
  45. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110:701–18.
  46. WHO. Guidelines for malaria vector control. Geneva: World Health Organization; 2019.
  47. Silva APB. Variabilidade do domínio IIS6 do gene do canal de sódio, associada à resistência aos inseticidas piretróides, em populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* da Amazônia brasileira. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia: Genética, conservação e biologia evolutiva; 2014.
  48. WHO. Pesticides and their application—for the control of vectors and pests of public health importance. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1, 6th Edn. Geneva: World Health Organization; 2006.
  49. WHO. Manual for indoor residual spraying. Application of residual sprays for vector control. Geneva: World Health Organization; 2007.
  50. WHO. Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and techniques. Geneva: World Health Organization; 1975.
  51. Dengela D, Seyoum A, Lucas B, Johns B, George K, Belemvire A, et al. Multi-country assessment of residual bio-efficacy of insecticides used for indoor residual spraying in malaria control on different surface types: results from program monitoring in 17 PMI/USAID-supported IRS countries. *Parasit Vectors*. 2018;11:71.
  52. Nikpour F, Vatandoost H, Hanafi-Bojd AA, Raeisi A, Ranjbar M, Enayati AA, et al. Evaluation of deltamethrin in combination of piperonyl butoxide (PBO) against pyrethroid resistant, malaria vector, *Anopheles stephensi* in IRS implementation: an experimental semi-field trial in Iran. *J Arthropod Borne Dis*. 2017;11:469–81.
  53. Mashauri FM, Manjurano A, Kinung'yi S, Martine J, Lyimo E, Kishamawe C, et al. Indoor residual spraying with micro-encapsulated pirimiphos-methyl Actellic 300CS against malaria vectors in the Lake Victoria basin, Tanzania. *PLoS One*. 2017;12:e0176982.
  54. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of the insecticides. *J Econ Entomol*. 1925;18:265–7.
  55. Team RC. R: A language and environment for statistical computing.
  56. RStudio Team. R: a language and environment for computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
  57. Lenth RV. Least-squares means: the R Package lsmeans. *J Stat Softw*. 2016;69:1–33.
  58. Tseng LF, Chang WC, Ferreira MC, Wu CH, Rampão HS, Lien JC. Rapid control of malaria by means of indoor residual spraying of alphacypermethrin in the Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:248–50.
  59. Urabayala S, Kamaraju R, Tiwari S, Ghosh SK, Valecha N. Small-scale evaluation of the efficacy and residual activity of alpha-cypermethrin WG (250 g AI/kg) for indoor spraying in comparison with alpha-cypermethrin WP (50 g AI/kg) in India. *Malar J*. 2015;14:223.
  60. Khosravani M, Rafatpanah A, Amiri S, Zare A. The field practices of lambda-cyhalothrin and deltamethrin insecticides against adult mosquitoes of *Anopheles stephensi* as the main vector of malaria: residual effects. *Zahedan J Res Med Sci*. 2017;19:e7629.
  61. Mulambalah CS, Siamba DN, Ngeiywa MM, Vulule JM. Evaluation of lambda-cyhalothrin persistence on different indoor surfaces in a malaria epidemic-prone area in Kenya. *Res J Biol Sci*. 2010;5:258–63.
  62. Rowland M, Boko P, Odjo A, Asidi A, Akogbeto M, N'Guessan R. A new long-lasting indoor residual formulation of the organophosphate insecticide pirimiphos methyl for prolonged control of pyrethroid-resistant mosquitoes: an experimental hut trial in Benin. *PLoS One*. 2013;8:e69516.

63. Vatandoost H, Abai MR, Abbasi M, Shaeghi M, Abtahi M, Rafie F. Designing of a laboratory model for evaluation of the residual effects of deltamethrin (K-othrine WP 5%) on different surfaces against malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *J Vector Borne Dis*. 2009;46:261–7.
64. Dunford JC, Estep AS, Waits CM, Richardson AG, Hoel DF, Horn K, et al. Evaluation of the long-term efficacy of K-Othrine PolyZone on three surfaces against laboratory reared *Anopheles gambiae* in semi-field conditions. *Malar J*. 2018;17:94.
65. Raeisi A, Abai M, Akbarzadeh K, Nateghpour M, Sartipi M, Hassanzehi A, et al. Residual effects of deltamethrin WG 25% as a new formulation on different surfaces against *Anopheles stephensi*, in Southeastern Iran. *J Arthropod Borne Dis*. 2010;4:60–5.
66. Etang J, Nwane P, Mbida JA, Piameu M, Manga B, Souop D, et al. Variations of insecticide residual bio-efficacy on different types of walls: results from a community-based trial in south Cameroon. *Malar J*. 2011;10:333.
67. Chanda E, Chanda J, Kandyata A, Phiri FN, Muzia L, Haque U, et al. Efficacy of ACTELLIC 300 CS, pirimiphos methyl, for indoor residual spraying in areas of high vector resistance to pyrethroids and carbamates in Zambia. *J Med Entomol*. 2013;50:1275–81.
68. Suarez MF, Quinones ML, Palacios JD, Carrillo A. First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *J Am Mosq Control Assoc*. 1990;6:72–4.
69. Zamora Perea E, Balta Leon R, Palomino Salcedo M, Brogdon WG, Devine GJ. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2009;8:208.
70. Galardo AKR, Póvoa MM, Sucupira IMC, Galardo CD, Santos RLC. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48:765–9.
71. Winkler MS, Tchicaya E, Koudou BG, Donzé J, Nsanabana C, Müller P, Adja AM, Utzinger J. Efficacy of ICON<sup>®</sup> Maxx in the laboratory and against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* in central Côte d'Ivoire. *Malar J*. 2012;11:167.
72. Oxborough RM. Trends in US President's Malaria Initiative-funded indoor residual spray coverage and insecticide choice in sub-Saharan Africa (2008–2015): urgent need for affordable, long-lasting insecticides. *Malar J*. 2016;15:146.
73. Wondji CS, Coleman M, Kleinschmidt I, Mzilahowa T, Irving H, Ndula M. Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:19063–70.
74. Randriamaherijaona S, Nepomichene T, Assoukpa J, Madec Y, Boyer S. Efficacy of bendiocarb used for indoor residual spraying for malaria control in Madagascar: results with local *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) from experimental hut trials. *J Med Entomol*. 2017;54:1031–6.
75. Akogbéto MC, Padonou GG, Gbénou D, Irish S, Yadouleton A. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J*. 2010;9:204.
76. Thawer NG, Ngondi JM, Mugalura FE, Emmanuel I, Mwalimu CD, Morou E, et al. Use of insecticide quantification kits to investigate the quality of spraying and decay rate of bendiocarb on different wall surfaces in Kagera region, Tanzania. *Parasit Vectors*. 2015;8:842.
77. Agossa FR, Aikpon R, Azondekon R, Govoetchan R, Padonou GG, Oussou O, et al. Efficacy of various insecticides recommended for indoor residual spraying: pirimiphos methyl, potential alternative to bendiocarb for pyrethroid resistance management in Benin, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108:84–91.
78. Kirunda J, Okello-Onen J, Opiyo EA, Rwakimari JB, de Alwis R, Okia M, et al. Assessment of Ficam VC (Bendiocarb) residual activity on different wall surfaces for control of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) in Northern Uganda. *J Med Entomol*. 2017;54:1006–12.
79. Aikpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Okè M, Oussou O, Oké-Agbo F, et al. Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC Indoor Residual Spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa. *Parasit Vectors*. 2014;7:256.
80. Tchicaya E, Nsanabana C, Smith T, Donze J, de Hipsi M, Tano Y, et al. Micro-encapsulated pirimiphos-methyl shows high insecticidal efficacy and long residual activity against pyrethroid-resistant malaria vectors in central Côte d'Ivoire. *Malar J*. 2014;13:332.
81. Haji K, Thawer N, Khatib B, Mcha J, Rashid A, Ali A, et al. Efficacy, persistence and vector susceptibility to pirimiphos-methyl (Actellic<sup>®</sup> 300CS) insecticide for indoor residual spraying in Zanzibar. *Parasit Vectors*. 2015;8:628.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## 10 ANEXOS

### ANEXO A – Parecer consubstanciado do IEPA e da FIOCRUZ

INSTITUTO DE PESQUISAS  
CIENTÍFICAS E  
TECNOLÓGICAS DO ESTADO



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação residual em laboratório e diretamente no campo de produtos recomendados para o controle da malária utilizando diferentes substratos, e do perfil de susceptibilidade/resistência de populações naturais de anofelinos no estado do Amapá

**Pesquisador:** Ana Paula Sales de Andrade Corrêa

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 38470714.3.0000.0001

**Instituição Proponente:** Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá -

**Patrocinador Principal:** ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 910.453

**Data da Relatoria:** 18/11/2014

##### Apresentação do Projeto:

Dentre as abordagens integradas para controle do vetor, a Borrifação Residual Intradomiciliar-BRI é uma estratégia básica importante, que requer constante monitoramento, para o conhecimento quanto à seleção de anofelinos resistentes aos inseticidas usados, quanto para conhecimento do efeito residual desses inseticidas. Na prática o efeito residual depende não somente do composto em si, mas do tipo de material que compõe estas paredes.

##### Objetivo da Pesquisa:

Estudar efeito residual de inseticidas utilizados no controle de malária em painéis em condições de laboratório e campo, e o perfil de susceptibilidade/resistência a inseticidas em *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* de populações de dois municípios do Amapá.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: incômodo domiciliar e alergias;

Benefícios: Não incidirá qualquer vantagem financeira.

O benefício indireto será o resultado da pesquisa, que ajudará no conhecimento sobre status de susceptibilidade/resistência e da ação residual dos inseticidas, que define os intervalos mínimos de

**Endereço:** Av. Feliciano Coelho, 1509

**Bairro:** Trem

**CEP:** 68.908-220

**UF:** AP

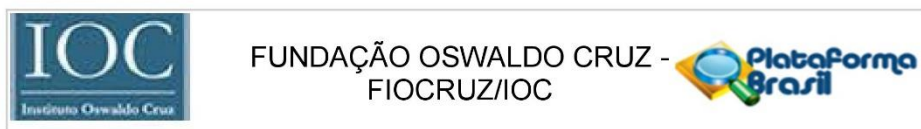
**Município:** MACAPA

**Telefone:** (96)3212-5353

**Fax:** (96)3212-5349

**E-mail:** cep.iepa@iepa.ap.gov.br

## ANEXO – B



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação residual em laboratório e diretamente no campo de produtos recomendados para o controle da malária utilizando diferentes substratos, e do perfil de susceptibilidade/resistência de populações naturais de anofelinos no estado do Amapá

**Pesquisador:** Ana Paula Sales de Andrade Corrêa

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 38470714.3.3001.5248

**Instituição Proponente:** Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá -

**Patrocinador Principal:** ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.036.165

**Data da Relatoria:** 14/04/2015

#### Apresentação do Projeto:

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá (IEPA) sob número datado de em colaboração com o LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ.

A malária, dentre as parasitoses humanas, constitui-se um dos mais graves e conhecidos problemas de saúde pública no mundo, afetando a população de diferenciadas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Em consequência da ausência de vacina e da seleção de parasitas resistentes aos fármacos disponíveis, o controle de vetores do gênero Anopheles, proteção pessoal, participação da comunidade são os pilares das estratégias da Organização Mundial de Saúde-OMS para controle da malária. Dentre as abordagens integradas para controle do vetor, a Borrifação Residual Intradomiciliar-BRI é uma estratégia básica importante, que requer constante monitoramento, para o conhecimento quanto à seleção de anofelinos resistentes aos inseticidas usados, quanto para conhecimento do efeito residual desses inseticidas.

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