

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara**

**CAMILA FEITOSA DE CASTRO**

**ELABORAÇÃO DE METODOLOGIA PARA TESTES DE REPELÊNCIA PARA  
FLEBOTOMÍNEOS**

**ARARAQUARA**

**2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

CAMILA FEITOSA DE CASTRO

**ELABORAÇÃO DE METODOLOGIA PARA TESTES DE REPELÊNCIA PARA  
FLEBOTOMÍNEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC),  
apresentado ao curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade  
Estadual Paulista para obtenção do grau de  
Farmacêutica-Bioquímica.

**ARARAQUARA**

**2016**

Aos meus pais Doraci e Pedro,  
por toda dedicação, confiança e por  
me ensinarem que com esforço meus  
sonhos seriam possíveis.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, a oportunidade concedida de estudar na UNESP e por ter colocado sempre no meu caminho pessoas boas e maravilhosas, tanto antes quanto durante a graduação.

Agradeço a minha família e familiares por todo incentivo, apoio nos momentos difíceis, amor e interesse no meu desenvolvimento profissional.

À professora Doutora Mara Cristina Pinto por me conceder à oportunidade de realizar a Iniciação Científica no laboratório, pela dedicação, por todos os ensinamentos, por toda ajuda e tempo disponível, por me mostrar a eficácia de um trabalho em grupo, por ter se tornado uma amiga e não ter me expulsado do laboratório quando aconteceu um pequeno acidente.

Quero agradecer a minha amiga e Co-orientadora Doutora Thais Marchi Goulart, por me ensinar tudo sobre os flebotomíneos, por confiar à colônia em minhas mãos desde o começo, por toda ajuda, por todas as risadas e jantares na sua residência.

Em especial agradeço a Flávia Benini pelos anos de companheirismo no PET, PAFE e laboratório, por me mostrar a importância da Parasitologia e por ser a primeira pessoa que eu acompanhei no estágio de treinamento aprendendo sobre *Aedes aegypti*, espero que nossa amizade dure por muitos outros anos.

Aos meus voluntários e amigos de experimento Dennys, Vicente e Wanderson por estarem sempre presentes me auxiliando, pensando em conjunto na tentativa de alcançar um resultado positivo, por doarem seus braços pela ciência e desculpa pelas picadas.

Também quero agradecer a todas às pessoas do laboratório de Parasitologia, por tornarem um ambiente de trabalho acolhedor, integrativo e por serem solícitos nos momentos em que precisei de auxílio. Principalmente, ao Professor Doutor João Aristeu da Rosa pelos anos de amizade e PET, pelo interesse na minha pesquisa, pela presença em todos os

momentos bons e ruins, por ser meu exemplo de profissional e uma pessoa que nasceu para o bem.

Não posso me esquecer das minhas amigas (desesperados, interunespianas e amoras), que fizeram desses cinco anos os melhores da minha vida e por estarem presentes em vários momentos inesquecíveis. Eu sei que esse foi somente o começo da nossa jornada. A dupla Alice e Mariana, por terem chegado de modo inesperado, mas que vai permanecer para sempre, pois nem mesmo a distância pode nos separar. Obrigado por todo apoio, cobrança e puxões de orelha para o término desse trabalho.

Agradeço imensamente ao Programa de Educação Tutorial (PET) Farmácia, minha segunda família, com quem eu vivi experiências únicas e incomparáveis. Agradeço os petianos atuais e os petianos egressos por todo carinho e lembrem-se “uma vez petiano, sempre petiano”, vocês sempre terão um espaço no meu coração.

Não menos importante, agradeço a Thiana pela paciência em me entregar a chave do biotério, pela simpatia, pelas conversas e saiba que não me esquecerei de você.

A todos docentes e funcionários da UNESP/Araraquara, pois sem o trabalho de vocês, tanto de ensino quanto de apoio as tarefas dos discentes, o tão sonhado diploma não seria possível. Por fim, agradeço a todos que ajudaram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

*“Seja a mudança que você quer ver no mundo”.*

*(Mahatma Gandhi)*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Informe da PAHO (Pan American Health Organization) com a incidência de casos de Leishmaniose no Brasil.....	13
Figura 2. Fórmula Estrutural do DEET . .....	15
Figura 3. Fórmula Estrutural da icaridina.....	16
Figura 4. (a) Gaiola onde os insetos são mantidos no laboratório; (b) Gaiolas envoltas em sacos plásticos para ajudar na manutenção da umidade. ....	19
Figura 5. (a) Fêmea ingurgitada; (b) Casais com fêmeas ingurgitadas transferidos para potes de criação.....	20
Figura 6. Mão com luva de látex inserida na gaiola com insetos.....	22
Figura 7. Mão com luva de tecido “voil”. .....	22
Figura 8. Mão com luva de papel filme inserida na gaiola com insetos.....	23
Figura 9. Mão com luva de vinil inserida na gaiola com insetos. ....	24
Figura 10. Luva de nitrila azul utilizada em experimento.....	25
Figura 11. “BG-cage” utilizada nos testes de repelência de flebotomíneos. ....	25
Figura 12. Gaiola dividida pela metade para impedir a fuga e a mortalidade dos insetos. ....	26
Figura 13. Caixa de acrílico foi inserida dentro da “BG-cage” e o tecido voil foi trocado a cada inserção de braço.....	27
Figura 14. Caixa de acrílico utilizada em teste.....	27

**LISTA DE TABELAS**

Tabela I. Tempo de pouso da primeira fêmea em teste de repelência da luva de papel filme com o composto icaridina.....	29
Tabela II. Tempo de pouso da primeira fêmeas em teste de repelência da luva de acrilamida com o composto icaridina.....	30
Tabela III. Tempo de pouso da primeira fêmea em teste de repelência da luva de acrilamida-azul com o composto icaridina. ....	30
Tabela IV. Teste de reepelência na gaiola e com o composto icaridina.....	31
Tabela V. Teste de repelência do composto icaridina na metade da “BC-cage”. ....	32
Tabela VI. Teste de repelência do composto icaridina em caixa de acrílico na "BG-cage". ...	32
Tabela VII. Teste de repelência do composto icaridina em caixa de acrílico. ....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Manutenção da colônia de <i>Ny. neivai</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Metodologias avaliadas .....</b>	<b>20</b>
<b>I. Metodologia da luva.....</b>	<b>21</b>
<b>II. Teste da Gaiola “BG-cage” .....</b>	<b>25</b>
<b>III. Teste da caixa de acrílico.....</b>	<b>27</b>
<b>IV. Teste dos dedos .....</b>	<b>28</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Metodologia da luva .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Teste da gaiola “BG-cage” .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3. Teste da caixa de acrílico .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4. Teste do dedo.....</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

## RESUMO

Os flebotomíneos, são insetos da ordem Diptera, conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, entre outros, preferem ambientes úmidos, escuros, quentes e ricos em matéria orgânica para o seu desenvolvimento. Por isso, estão distribuídos principalmente nos países tropicais e sub-tropicais. Os adultos se alimentam de seiva e as fêmeas, além disso, necessitam de sangue para a maturação dos ovos. O repasto sanguíneo ocorre em animais de sangue quente, dentre esses, o ser humano levando a diversos problemas desde uma irritabilidade na pele local até a transmissão de patógenos. Dentre os patógenos, destacam-se: os vírus da febre de três dias, vírus toscana e chandipura; a bactéria *Bartonella bacilliformis* e o protozoário *Leishmania* spp. Estima-se que um milhão de novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e 300 mil de Leishmaniose Visceral (LV) aconteçam por ano. Como forma de evitar a picada do inseto, buscam-se medidas de prevenção como o uso de inseticidas, mosquiteiros e principalmente o uso de repelentes. O objetivo deste trabalho foi estudar e desenvolver uma metodologia para avaliar compostos com potencial de repelência para flebotomíneos, em que os voluntários não sejam expostos à picada do inseto. Com esse intuito, 11 metodologias foram testadas, separadas em quatro grupos: luva, gaiola, caixa de acrílico e dedo. Foram utilizados como compostos repelentes o DEET (N-N-dietil-3-metilbenzeno, obtido do composto comercial OFF<sup>®</sup>) e a icaridina (obtida do composto comercial EXPOSIS<sup>®</sup>). Nenhuma metodologia foi adequada, apenas podem ter direcionado experimentos futuros. Por exemplo, a procura de outros materiais que não permitam o acesso à pele exposta e a necessidade de isolamento dos insetos utilizados no controle dos testes. Tanto o DEET quanto a icaridina mostraram-se ineficientes como repelentes para flebotomíneos. Os resultados deixam claro como ainda são necessários avanços na área de testes de repelência para flebotomíneos, tanto na metodologia de execução dos testes, como na obtenção de substâncias repelentes.

## 1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae que inclui os pequenos insetos da subfamília Phebotominae, conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, asa branca, asa dura, mosquito do rio, cangalhinha, dentre outros (MARCONDES, 2001a; MAROLI et al., 2012).

Esses insetos são facilmente reconhecidos devido a algumas características marcantes como a sua dimensão (2 a 4 mm), corpo extremamente piloso, cor variando desde branco a cores mais escuras, asas de formas lanceoladas, apresentando a forma de V quando o inseto está pousado e vôos curtos não sendo capaz de se deslocar para locais distantes de seu abrigo (MAROLI et al., 2012; BRAZIL et al., 2015).

Apresentam ciclo holometábolo passando pela metamorfose completa durante o seu desenvolvimento, sendo assim temos os estágios de ovo, larva (quatro fases), pupa e adulto (MAROLI et al., 2012). Para o desenvolvimento de seu ciclo, preferem ambientes úmidos, escuros, quentes e ricos em matéria orgânica. (BARRETO, 1942). Por isso, os flebotomíneos estão distribuídos principalmente na Ásia, África, Sul da Europa e nas Américas.

Os adultos se alimentam de seiva, no entanto as fêmeas também se alimentam de sangue para a maturação dos ovos. O repasto sanguíneo é feito em animais de sangue quente, dentre esses o ser humano, levando a diversos problemas desde uma irritabilidade na pele local até a transmissão de bactérias, protozoários e arbovírus (STEFANI, 2009; RANGEL & LAINSON, 2003).

A picada do inseto gera um desconforto que pode resultar em uma hipersensibilidade da pele, conseqüentemente à formação de prurido, vesículas e dor (STEFANI, 2009). Além disso, esses insetos são considerados um grave risco à saúde pública, por serem vetores de flebovírus que causam febre de três dias, vírus Toscana relacionada à meningite, Chandipura

que causa a encefalite e a estomatite vesicular; bactéria *Bartonella bacilliformis* agente etiológico da bartonelose e principalmente o protozoário do gênero *Leishmania*; agente etiológico das leishmanioses (RANGEL & LAINSON, 2003; MAROLI et al., 2012; BATES et al.,2015).

Atualmente existem aproximadamente 1.000 espécies descritas de flebotomíneos e 530 espécies foram encontradas na região Neotropical; dentre elas 20 espécies são possíveis transmissores da leishmaniose, o que justifica a sua importância (BATES et al., 2015).

Além disso, o número de casos ocorridos a cada ano é outro fator que leva ao destaque da doença, estima-se que seja de um milhão de novos casos por ano de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e 300 mil casos de leishmaniose visceral (LV) e acredita-se que 310 milhões de pessoas têm o risco de adquirir a doença, sendo endêmica em 98 países e territórios (WHO, 2016).

As leishmanioses são ocasionadas pelo protozoário *Leishmania* spp, que são transmitidos por uma variedade de espécies de flebotomíneos. A doença pode se manifestar clinicamente de três formas diferentes: leishmaniose tegumentar americana: cutânea (pele) e mucosa (muco-membranas), e leishmaniose visceral (atinge diferentes órgãos internos) (PAHO, 2016).

Os agentes etiológicos das leishmanioses podem ficar incubados por um período de dois meses até dois anos, sendo mais comum entre dois e três meses. A leishmaniose cutânea é a forma que apresenta uma maior prevalência, caracterizada por ulcerações na pele exposta (braço, perna e face) e a mucosa é caracterizada, por uma disfunção no palato, dificuldade na fala e na respiração. A leishmaniose visceral apresenta um período de incubação de 10 dias a 24 meses, caracterizada pelo aumento dos órgãos, problemas respiratórios e distúrbios gastrointestinais (PAHO, 2016).



**Figura 1.** Informe da PAHO (Pan American Health Organization) com a incidência de casos de leishmaniose no Brasil.

Segundo o Informe Epidemiológico das Américas da PAHO (2016), o Brasil no ano de 2014 registrou 19.402 casos de leishmaniose cutânea e 1.016 casos de leishmaniose mucosa, totalizando 20.418 novos casos (Figura 1). Além disso, outros dados presentes no informe e que ratificam a prevalência da doença, 60% da população brasileira vivem em áreas sob maior risco de adquirir a doença (PAHO - 2016).

Com o intuito de conseguir evitar as enfermidades transmitidas por esses e outros insetos, os seres humanos sempre buscaram meios de erradicá-los ou formas de se prevenir de suas picadas, no caso da leishmaniose, principalmente devido às dificuldades do tratamento e por não haver vacina (STAFANI, 2009). Os problemas relacionados com o tratamento da leishmaniose são os efeitos adversos, como a insuficiência renal,

hepatotoxicidade e cardiotoxicidade; a resistência do parasita a algumas medicações e a baixa adesão ao tratamento (REITHINGER et al., 2007).

Assim, as formas de controle podem ser divididas em barreiras físicas e as barreiras químicas, que reduzem o contato entre os seres humanos e o vetor. As barreiras físicas encontram-se o uso de telas em portas e janelas, mosquiteiro, roupas que cobrem a pele e as barreiras químicas são os inseticidas e repelentes. As barreiras físicas apesar de serem facilmente implementadas, não são as mais utilizadas por dependerem de muitas variáveis, por exemplo, o tipo de tecido da roupa ou a quantidade de roupa vestida (CATMAT, 2016).

O inseticida é uma estratégia utilizada em áreas endêmicas, podendo ser pulverizado nas residências e abrigos de animais, além dos mosquiteiros e das coleiras dos animais domésticos tratadas. No país existem relatos de uso de inseticidas para o extermínio de flebotomíneos desde 1954, porém, essa medida foi restringida devido ao uso inadequado, a sua toxicidade e a resistência dos insetos frente a essas substâncias (ALEXANDER & MAROLI, 2003; CATMAT, 2016).

Além disso, a utilização dessas substâncias no ambiente silvestre pode causar um grave impacto ao meio ambiente e custos elevados (CASTRO et al., 2008).

O cenário descrito acima sobre a complexidade do tratamento da doença e levando em conta a dificuldade de se obter medidas de controle eficazes, trouxe como consequência o aumento do uso de repelentes, que vem ganhando cada vez mais destaque por ser um método simples, econômico e prático (STAFANI, 2009; CHAMPAKAEW et al., 2016).

Os primeiros repelentes foram descritos por Plínio (23-75 a.D.) e Discorides (60 a. D.), na literatura greco-romana, que utilizavam o suco de madeira quente (*Artemisia absinthium*) e fruta cítrica, aplicados sobre a roupa, para repelir os insetos (KATZ et al., 2008).

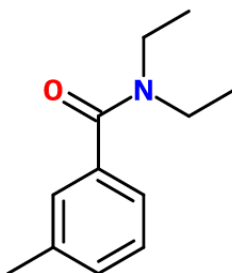
Desde essa época, procura-se o repelente ideal que deve preencher alguns requisitos: ser atóxico, inodoro, efeito prolongado e contra diversas espécies de insetos, não ser irritante a pele, ser resistente a água e a brasão, não manchar o tecido, ser estável quimicamente, economicamente viável e não prejudicial ao meio ambiente (BROWN & HEBERT, 1997; KATZ, 2008; RIBAS, 2009).

Assim, conseguir atingir esses objetivos é complexo por envolver uma série de fatores que favorecem a picada do inseto, como a condição climática quente e úmida, odor, roupas escuras e a predisposição individual do indivíduo de acordo com as substâncias exaladas pela pele como CO<sub>2</sub> e o suor (STEFANI, 2009).

Este projeto teve como objetivo central a padronização de uma metodologia de teste de repelência para flebotomíneos, sem que o inseto entre em contato direto com o voluntário, tendo como controle positivo repelentes comerciais OFF<sup>®</sup> e EXPOSIS<sup>®</sup>, por serem substâncias aprovadas para o uso e amplamente utilizadas pela população.

O DEET é composto químico conhecido cientificamente por N,N-dietil-3-metilbenzêmina ou N,N-dietil-meta-toluamida, considerado o padrão ouro em estudos de repelência que avaliam a eficácia de novos compostos (Figura 2).

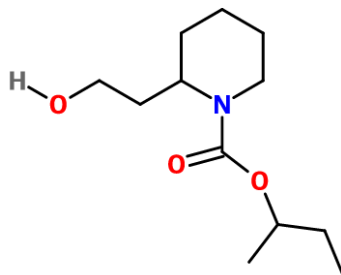
O composto é utilizado por apresentar eficácia comprovada contra picadas de mosquitos e moderada na proteção de outros insetos (CHAMPAKAEW et al., 2016), e por estar presente na maioria das formulações dos repelentes comerciais. Segundo a EPA (Environmental Protection Agency), em 2011, 9,2 milhões de produto contendo DEET foram utilizados (EPA, 2014).



**Figura 2.** Fórmula Estrutural do DEET. Desenhado no site: <https://www.emolecules.com/>.

Apesar disso, o composto apresenta relatos de efeitos adversos, dentre as queixas mais comuns estão as dermatites e reações alérgicas, sendo mais frequentes em crianças do que em adultos. Nas reações adversas mais graves encontram-se problemas no sistema nervoso central (enxaqueca e tremores) e no sistema cardiovascular (hipotensão e bradicardia). Por isso, é recomendado o seu uso após o terceiro trimestre de gravidez e nas crianças com mais de dois meses (BROWN & HEBERT, 1997; KATZ et. al., 2008; YATES et.al., 2015; CHAMPAKAEW et. al., 2016).

A icaridina ou picaridina (KBR 3023) é outro composto que apresenta eficácia semelhante ao DEET, sendo recomendado como repelente de primeira escolha contra picadas de insetos. Foi isolada da pimenta (*Pipernigrum*) e quimicamente apresenta-se como ácido 1-piperidino carboxílico e 2 (2-hidroxietil)-1-metilpropilester (Figura 3) (STEFANI, 2009; YATES et. al., 2015; CATMAT, 2016).



**Figura 3.** Fórmula Estrutural da icaridina. Desenhado no site: <https://www.emolecules.com/>.

Atualmente, 54 produtos são comercializados com o princípio ativo (picaridina) nos Estados Unidos, segundo a EPA. Diferente do DEET, a icaridina, não interage com plásticos ou materiais sintéticos; é praticamente sem odor e pode ser utilizada em crianças e mulheres grávidas, pois, apesar de poucos estudos apresenta baixa absorção sistêmica quando aplicados sobre a pele (STEFANI, 2009; YATES et al., 2015).

No entanto, essas substâncias sintéticas também podem causar danos à saúde por causa do uso contínuo, aplicação inadequada ou odores desagradáveis. Por isso, se investe na

procura do repelente ideal e uma alternativa na busca por substâncias orgânicas (CHAMPAKAEW et al. 2016).

Para a avaliação da eficácia dos repelentes é necessário que testes sejam realizados em laboratório. Para alguns insetos hematófagos, como os culicídeos, os testes de repelência estão bem estabelecidos e já há aparatos desenvolvidos para que os insetos não entrem em contato com os voluntários (Obemayr et al. 2010). Entretanto, para flebotomíneos, o cenário não é o mesmo. Na grande maioria dos trabalhos publicados com repelência e flebotomíneos, os testes são feitos de uma forma que o ser humano fica exposto às picadas dos insetos.

Em um experimento com DEET e indalone, uma gaiola para testes foi adaptada com cinco cilindros de plástico, com 1 centímetro de altura, em que o antebraço dos voluntários ficava fixo na gaiola por 10 minutos (MAROLI & FOSSATI, 1986). Em outro estudo, quatro voluntários foram selecionados e foram aplicados 2 mL de óleo de neem de 2 e 5%, óleo de mostarda e o quarto voluntário foi o controle sem nenhum produto. Os quatro voluntários foram colocados numa sala com paredes rebocadas de lama, telhado de palha, sem ventilador e com as pernas, braços e o rosto expostos por 5 noites. Os flebotomíneos que se alimentavam ou pousavam nos voluntários eram capturados (DHIMAN & SHARMA, 1993). Os mesmos autores utilizaram uma segunda metodologia, com fêmeas de dois dias de idade liberadas em três gaiolas de madeira de (30x30x30 cm) modificadas para a realização dos testes. Sobre o antebraço dos voluntários aplicou-se 1 mL da mistura de óleo de neem, óleo de mostarda e outro sem nenhum composto. Cada antebraço foi exposto por 41min e, assim como no anterior, os flebotomíneos eram coletados quando pousavam (DHIMAN & SHARMA, 1993).

Outro método descrito utilizava quarenta fêmeas de *P. papatasi*, com idades entre 4-6 dias, que ainda não haviam se alimentado de sangue. O primeiro passo foi avaliar, individualmente, a atratividade de cinco voluntários, para isso, cada um introduzia a mão não tratada na gaiola por cinco minutos. Assim a tentativa de picada e pouso foi contabilizada, em

triplicata. Depois, colocou-se uma luva de látex inerte com uma abertura (4x3 cm), nesta abertura 15µL de óleo de alho foi aplicado sob o dorso da mão, para deixar somente uma área de exposição, durante cinco minutos nos tempos de 0, 30 e 60 minutos (VALERIO & MAROLI, 2005).

Em 2010, Nieves utilizou 1680 fêmeas da espécie *Migonemyia. migonei*, de 5 a 7 dias de idade que permaneciam numa gaiola de nylon (15x15x15 cm). Anteriormente a cada ensaio, os voluntários lavavam a mão com água e sabão e 50µL de óleo essencial foi aplicado sobre a superfície da mão. Para a realização do teste, somente, 20 fêmeas permaneciam na gaiola. A mão permanecia por 20 min com intervalos de 30min, registrando o número de picadas (NIEVES, 2010).

Desta forma, evidencia-se a necessidade da realização de testes de repelência com flebotomíneos. O conhecimento nesta área ainda é restrito, dificultando a comprovação de substâncias naturais, que resulta em menores efeitos adversos.

Utilizamos para todos os testes flebotomíneos mantidos em colônia da espécie *Nyssomyia neivai*, incriminada na transmissão da leishmaniose tegumentar.

## **2. OBJETIVO**

Padronizar uma metodologia para a realização de teste de repelência em flebotomíneos da espécie *Nyssomyia neivai*, sem haver o contato direto entre o inseto e o voluntário, tendo como referência os compostos comerciais OFF® e EXPOSIS®.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os flebotomíneos foram adquiridos da colônia de *Ny. neivai* mantida pelo Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Diversos testes foram realizados com a finalidade de encontrar a metodologia adequada para experimentos com repelência.

#### 3.1. Manutenção da colônia de *Ny. neivai*

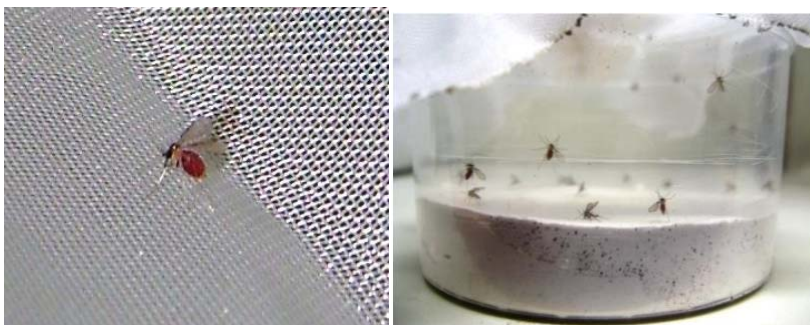
No laboratório, os flebotomíneos foram mantidos em gaiolas de “voil” (30x30x30cm) a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 80-90% de umidade, fotoperíodo de 12h com acesso a solução açucarada a 30% (Figura 4a e b).



**Figura 4.** (a) Gaiola onde os insetos são mantidos no laboratório; (b) Gaiolas envoltas em sacos plásticos para ajudar na manutenção da umidade.

Para a reprodução do inseto, as fêmeas foram alimentadas com camundongos Balb/c e, após a sua alimentação, foram transferidas com um número equivalente de machos para potes plásticos de criação de 145 mL.

Os potes de criação contêm 2 cm de gesso no fundo e sua tampa foi removida e substituída pelo tecido “voil”. Após cinco dias de alimentação os adultos foram retirados e passaram por nova alimentação. O ciclo de vida do inseto se completou dentro desses mesmos potes, que eram observados diariamente quanto à alimentação das larvas, controle de umidade e de fungos até o surgimento de adultos. Os potes foram mantidos no escuro, a  $26^\circ\text{C}$  e com umidade de 80 a 90% (Figura 5a e b).



**Figura 5.** Fotos tiradas pela Dr<sup>a</sup>. Thais Marchi Goulart: (a) Fêmea ingurgitada; (b) Casais com fêmeas ingurgitadas transferidos para potes de criação.

### 3.2. Metodologias avaliadas

Em todas as metodologias avaliadas, o voluntário previamente lavava as mãos com Extran<sup>®</sup> MA 02 neutro (MERCK S.A., Brasil) a 5% e logo após com uma solução de álcool isopropílico P.A. – A.C.S. (99,5% puro, LABSYNTH Ltda., Brasil) a 50% para que não houvesse interferência dos voláteis presentes na pele, devido contato anterior com alguma substância.

Os testes foram realizados no período da tarde, as fêmeas utilizadas estavam em jejum de 5 a 7 dias e nos dias dos experimentos a temperatura e a umidade foram, em média, de 25°C e de 60,3%, respectivamente.

A proposta inicial seria o voluntário colocar a mão na gaiola por dois minutos e aqueles insetos que pousassem na sua mão, seria retirado com um aspirador de Castro por uma segunda pessoa antes de picarem. Entretanto, essa metodologia mostrou-se inviável na prática por causar muita agitação nos insetos e algumas vezes a fuga dos mesmos.

Os repelentes utilizados como controles positivos foram os produtos comerciais OFF<sup>®</sup> e EXPOSIS<sup>®</sup>, contendo DEET (7,125%) e icaridina (25%) como princípio ativo. No entanto, os resultados de alguns testes realizados indicaram uma ineficácia do composto DEET e a partir disso padronizou-se a icaridina como o controle positivo nos testes posteriores.

O cálculo para aplicação dos repelentes levou em consideração a porcentagem de cada princípio ativo nos produtos comerciais e a área de cobertura da gaiola BC-cage. No artigo em que a BG-cage foi utilizada, houve a padronização de 0,33 mg do princípio ativo por  $\text{cm}^2$  da área exposta aos insetos. Desse cálculo resultam 18,5 mg do princípio ativo, para serem aplicados em uma área de  $56 \text{ cm}^2$ , correspondente à abertura da gaiola (OBERMAYR et al., 2010). Para a obtenção de 18,5 mg do princípio ativo na quantidade aplica à pele, considerou-se a porcentagem de cada princípio ativo nos respectivos produtos comerciais. Dessa forma, para o DEET foram utilizadas 260 mg do produto comercial e para a icaridina, 75,9  $\mu\text{L}$  (considerando a densidade do produto) na BG-cage. Para cada experimento, houve uma variação da área de exposição e, conseqüentemente, do volume do produto aplicado, como exemplificado abaixo.

$$X = 260 \text{ mg} \times (\text{área de exposição da pele em cada experimento}) / 56 \text{ cm}^2$$

X= DEET (mg)

260 mg é a quantidade do composto comercial utilizada para cobrir a área de exposição de  $56 \text{ cm}^2$

$$X = 76 \mu\text{L} \times (\text{área de exposição da pele em cada experimento}) / 56 \text{ cm}^2$$

X= icaridina ( $\mu\text{L}$ )

76  $\mu\text{L}$  é a quantidade de repelente utilizada para cobrir a área uma área de exposição de  $56 \text{ cm}^2$ .

Abaixo serão descritas todas as metodologias avaliadas.

## I. Metodologia da Luva

- **Luva Latéx** - Um retângulo de 10 x 5 cm foi recortado em duas luvas de látex para demarcar a área em que contaríamos o número de tentativa de picadas dos flebotomíneos. Após a lavagem das mãos do voluntário a luva foi inserida, em uma das mãos nenhum produto foi aplicado (controle) e na outra se aplicou o repelente OFF®. Cada mão foi colocada dentro da gaiola contendo 20 flebotomíneos fêmeas e por 2 min, com intervalos

de 30 min, as tentativas de picadas foram contabilizadas. Tanto a mão controle como a mão do tratamento foram inseridas na mesma gaiola (Figura 6).



**Figura 6.** Mão com luva de látex inserida na gaiola com insetos.

- **Luva de “Voil”** - Enrolou-se um pedaço de tecido “voil” nas mãos lavadas do voluntário (Figura 7). O tecido apresentava uma abertura igual ao do teste anterior e uma das mãos aplicou o repelente OFF<sup>®</sup>. As mãos foram inseridas alternadamente na mesma gaiola contendo 20 flebotomíneos fêmeas por 2 min, com intervalos de 30 min, as tentativas de picadas foram contabilizadas.



**Figura 7.** Mão com luva de tecido “voil”.

- **Luva de Meia** - Para a realização desse teste utilizou-se um par de meias de algodão previamente lavadas com Extran a 5%, para eliminar os odores presentes no tecido. Após a lavagem, foi realizado um corte de 10 x 5 cm para delimitar a área de tentativa de picada dos flebotomíneos. A meia foi escolhida por ser um tecido mais grosso do que o

“voil”, dificultando a picada dos flebotomíneos em outros locais que não fosse o delimitado, eliminando a interferência ocorrida no segundo teste.

A meia foi utilizada como um par de luvas pelo voluntário que tinha as mãos lavadas, sendo uma delas o tratamento com o repelente OFF<sup>®</sup>. A mão do voluntário permanecia na gaiola pelo mesmo período de tempo dos testes anteriores e a contagem realizada.

• **Luva de Papel filme** – Ambas as mãos do voluntário foram lavadas e com suas mãos fechadas, um papel filme foi utilizado para cobrir suas mãos e uma área de 22,5 cm<sup>2</sup> foi exposta aos insetos. A mão controle e a mão tratamento (com repelente EXPOSIS<sup>®</sup>) foram inseridas, alternadamente, em uma gaiola contendo 30 flebotomíneos fêmeas e 20 machos. As mãos permaneciam na gaiola até o momento em que o primeiro inseto fêmea pousasse na área delimitada. O tempo foi marcado e a mão retirada.

O limite de tempo esperado para o pouso do inseto foi 4 min e o intervalo entre cada teste foi 30 min. O experimento transcorreu até que o tempo da mão controle e do teste se igualasse ou o tempo da mão teste fosse menor do que o controle (Figura 8).



**Figura 8.** Mão com luva de papel filme inserida na gaiola com insetos.

• **Luva de Vinil transparente** – Devido à observação experimental de que a luva de látex repelia os flebotomíneos pensou-se na utilização da luva de vinil. Cortamos uma área de 15cm<sup>2</sup> em duas luvas que seriam utilizadas pelo voluntário que lavou as mãos

com água e sabão, sem utilizar Extran e álcool isopropílico. Nesse experimento também se utilizou duas gaiolas; uma para o controle e outra para o teste. A mão controle foi inserida em uma gaiola com 30 fêmeas e 20 machos e o tempo em que a primeira fêmea pousou foi marcado, sendo que a mão permaneceria na gaiola por um tempo máximo de 5 min (Figura 9).



**Figura 9.** Mão com luva de vinil inserida na gaiola com insetos.

Depois que a mão foi retirada a gaiola permanecia dentro de um saco plástico com placas de petri contendo algodão molhado para manter a umidade. Desse modo, a gaiola controle permaneceria isolada e não teria uma possível interferência do cheiro residual da mão com o repelente.

Em outra gaiola, contendo o mesmo número de flebotomíneos, a mão com repelente (EXPOSIS<sup>®</sup>) foi inserida e a mesma análise foi realizada. O intervalo entre cada teste foi de 30 min. O experimento transcorreu até que o tempo da mão controle e do teste se igualassem ou o tempo da mão teste fosse menor do que o controle.

• **Luva de Nitrila azul** – A luva de acrilamida-azul é uma luva mais grossa e mais resistente que a luva de vinil. A metodologia foi a mesma utilizada para a luva de vinil, porém aumentou-se o número de fêmeas para 50. Além disto, avaliou-se se haveria diferença entre a espessura das luvas (Figura 10).



**Figura 10.** Luva de nitrila azul utilizada em experimento.

## **II. Teste da Gaiola “BG-cage”**

• **Teste da gaiola “BG-cage”** – Neste experimento foi utilizada a gaiola “BG-cage” desenvolvida por Obermayr et al. (2010), de dimensão de 27000 cm<sup>3</sup> (41x41x16) constituída de acrílico e chão metálico, abertura de 56 cm<sup>2</sup> (14,8 x 3,8 cm). A abertura é coberta com tecido ‘voil’ e apresenta uma distância de 150 mm entre o antebraço do voluntário e a tela, não havendo contato direto entre o inseto e os voluntários. Um dos braços do voluntário foi utilizado como controle e o outro, como tratamento (Figura 11).



**Figura 11.** “BG-cage” utilizada nos testes de repelência de flebotomíneos.

Para esse teste, utilizou-se os produtos comerciais OFF<sup>®</sup> e EXPOSIS<sup>®</sup>. Na gaiola foram adicionadas trinta fêmeas de 5 – 7 dias em jejum. O braço do voluntário permanecia em

contato com a gaiola em um período de 2 minutos, com intervalos de 30 minutos até a porcentagem de repelência ser zero ou até o período máximo de eficácia do repelente. A porcentagem de repelência é calculada pela seguinte fórmula:

$$\% = (N_c - N_t) \times 100 / N_c,$$

onde  $N_c$  corresponde ao número de tentativas de picadas no braço controle e  $N_t$  ao número de tentativas de picada no braço com repelente. Os parâmetros de temperatura e umidade foram monitorados durante a realização dos testes.

- **Metade da gaiola “BG-cage”** – Devido a tentativa anterior não ter sido eficaz tentou-se a mesma metodologia, porém dividiu-se a gaiola “BG-cage” ao meio com a fixação de uma cartolina e atrás dela colocou-se um algodão encharcado com água, para a manutenção da umidade (Figura 12). Além disso, o experimento utilizou como controle positivo, somente, o repelente EXPOSIS®.



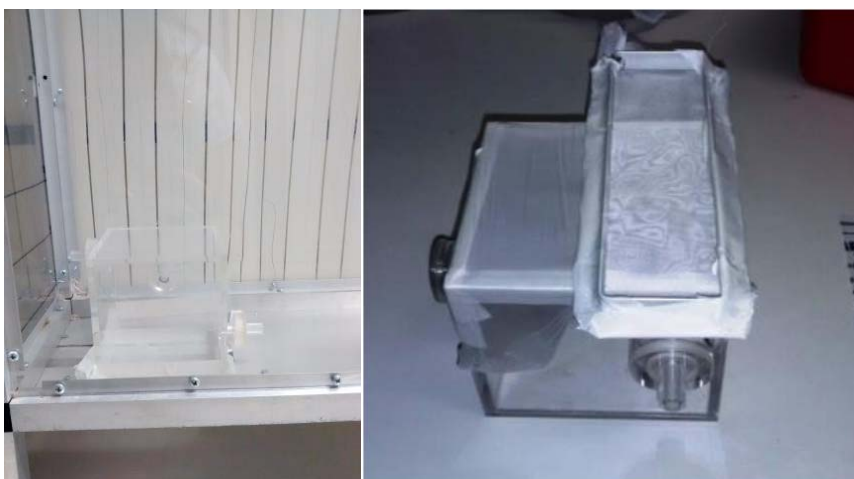
**Figura 12.** Gaiola dividida pela metade para impedir a fuga e a mortalidade dos insetos.

Na metade da gaiola foram adicionadas 50 fêmeas em jejum. O braço do voluntário permanecia na abertura da gaiola no período de 2 min e as tentativas de picadas eram contadas. Não havendo contato direto entre os flebotomíneos e o braço do voluntário.

- **Gaiola “BG-cage” e a caixa de acrílico** – A nova metodologia utilizava uma caixa de acrílico de 30cm<sup>3</sup> (10x10x10 cm) fixada na gaiola “BC-cage” na área de abertura.

Nessa caixa foram colocadas 20 fêmeas em jejum sendo que a abertura foi vedada com tecido “voil”.

O braço era posicionado na abertura da gaiola e o “voil” da gaiola “BC-cage” foi trocado entre o braço controle e o braço teste (EXPOSIS<sup>®</sup>) que permaneceram no local por 2 min. Desse modo, não houve o contato direto da pele do voluntário tanto com o “voil” da caixa, quanto com os flebotomíneos (Figura 13).



**Figura 13.** Caixa de acrílico foi inserida dentro da “BG-cage” e o tecido voil foi trocado a cada inserção de braço.

### III. Teste da caixa de acrílico

Na mesma caixa de acrílico utilizada no experimento anterior foram colocadas 20 fêmeas em jejum. A caixa tem uma abertura em um dos lados (10x10 cm) que foi vedado com tecido “voil” (Figura 14).



**Figura 14.** Caixa de acrílico utilizada em teste.

A abertura da caixa foi colocada primeiramente em cima do braço controle no período de dois minutos, e depois no braço com repelente (EXPOSIS<sup>®</sup>) durante o mesmo período. Sendo a tentativa de picadas em ambos os braços contabilizadas.

O intervalo entre os experimentos foi de 30 min e a repelência foi avaliada de acordo com os parâmetros do terceiro teste. Além disto, as condições ambientais foram monitoradas.

#### **IV. Teste dos dedos**

Em uma gaiola com 20 fêmeas foi realizado um corte de cada lado, onde se colocaram os dedos indicadores lavados de um voluntário. O dedo esquerdo sem repelente (controle) e o dedo direito com repelente (OFF<sup>®</sup>). Os dedos permaneceram dentro de uma mesma gaiola, simultaneamente, em um período de 2 min e observou-se o comportamento dos flebotomíneos, sendo contado o número de tentativas de picadas.

### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.1. Metodologia da Luva**

- **Luva de Látex** - Percebeu se no tempo zero do teste que os flebotomíneos não se aproximavam de ambas as mãos na presença da luva. No entanto, quando uma pessoa que não tinha colocado a luva na mão, a inseria na gaiola havia uma aproximação e tentativa de repasto dos insetos. Percebemos então que algum componente da luva repelia os insetos interferindo nos testes.

- **Luva de Tecido “Voil”** - Devido ao resultado negativo do primeiro teste esta nova metodologia foi aplicada, trocando a luva de látex pelo tecido “voil” que é utilizado normalmente na manutenção da colônia. No entanto, o resultado obtido não foi satisfatório, pois os flebotomíneos preferiam picar pelo tecido em locais aleatórios do que

na área que a pele estava exposta. Esse comportamento dos insetos indica que os voláteis liberados pela mão do voluntário passaram pelo tecido “voil”. Devido à alta variação nas tentativas de picadas em diversos locais das mãos, tanto na mão controle quanto na mão com o repelente, impossibilitou a comparação dos dados obtidos.

• **Luva de Meia** - Apesar de a meia ser confeccionada com um tecido mais grosso, essa barreira não impediu que as tentativas de alimentação ocorressem na área da mão inteira. Como o controle e a mão tratamento tinham uma elevada variação entre o número de picadas, não foi possível a comparação entre os dados do experimento.

• **Luva de papel filme** – Nos três tempos, não houve pouso de fêmeas na mão com o produto comercial, durante o período de 4 min de exposição. No tempo de 60 min, o número de picadas na mão controle foi igual ao da mão teste, encerrado assim o teste de repelência (Tabela I).

**Tabela I.** Tempo de pouso da primeira fêmea em teste de repelência da luva de papel filme com o produto comercial EXPOSIS®.

Tempo (minutos)	Controle	EXPOSIS®
0	0:00:08	-
30	0:03:04	-
60	-	-

(-) nenhuma fêmea pousou.

Além disso, o teste apresenta como ponto negativo a imobilização da mão do voluntário durante todo o período do experimento não podendo remover a luva e a mobilidade do papel filme que acabava por cobrir ou descobrir as áreas demarcadas nas mãos do voluntário.

• **Luva de Vinil transparente** – De acordo com os resultados obtidos no experimento, nos primeiros tempos de avaliação, as fêmeas pousaram antes dos 5 min. No entanto, conforme o tempo decorria, a repelência aumentava (Tabela II). Além disso, as fêmeas conseguiram picar a mão do voluntário por meio da luva, pousaram e picaram os dedos ao invés da área demarcada.

**Tabela II.** Tempo de pouso da primeira fêmeas em teste de repelência da luva de acrilamida com o produto comercial EXPOSIS®.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Controle</b>	<b>EXPOSIS®</b>
<b>0</b>	0:00:45	0:02:25
<b>30</b>	0:01:23	0:03:15
<b>60</b>	0:01:10	-
<b>90</b>	0:01:14	-
<b>120</b>	0:03:50	-
<b>150</b>	0:01:34	-

(-) nenhuma fêmea pousou.

• **Luva de Nitrila azul** – Nesse experimento os resultados obtidos nos primeiros tempos de exposição foram similares ao experimento anterior, pois nos tempos 0 e 30 min as fêmeas pousaram antes dos 5 min na mão com o repelente, mas no tempo de 60 min não houve pouso (Tabela III).

**Tabela III.** Tempo de pouso da primeira fêmea em teste de repelência da luva de acrilamida-azul com o produto comercial EXPOSIS®.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Controle</b>	<b>EXPOSIS®</b>
<b>0</b>	0:01:03	0:01:27
<b>30</b>	0:01:44	0:03:33
<b>60</b>	0:00:55	-
<b>90</b>	0:01:52	0:04:18
<b>120</b>	0:00:18	0:04:14
<b>150</b>	0:01:10	-
<b>180</b>	0:01:38	-
<b>210</b>	0:02:45	0:01:54
<b>240</b>	0:01:28	-

(-) nenhuma fêmea pousou.

Embora em menor número do que as luvas anteriores, ainda houve a ocorrência de picadas com a luva de nitrila. Houve a tentativa da sobreposição de duas luvas, porém o material não é resistente o suficiente o que causa seu rompimento.

#### 4.2. Teste da gaiola “BG-cage”

- **Teste da gaiola “BG-cage”** - Utilizando o OFF<sup>®</sup> como repelente com o tempo de exposição de dois minutos, obteve-se no tempo zero a porcentagem de repelência de 0%. O número de tentativas de picadas no braço controle foi a mesma do braço com o repelente: 13 fêmeas.

Com o EXPOSIS<sup>®</sup>, aumentou-se o tempo de exposição para 4 min e conforme o tempo de aplicação do produto se estendia, a repelência aumentava. Exceto no tempo de 90 minutos, que houve um decréscimo (Tabela IV).

Além disso, devido às características físicas da gaiola e a baixa umidade as fêmeas acabaram morrendo e algumas conseguiram escapar, demonstrando que a metodologia não seria a mais adequada para a espécie.

**Tabela IV.** Teste de repelência na gaiola “BC-cage” com o produto comercial EXPOSIS<sup>®</sup>.

Tempo (minutos)	Nº de tentativas de picadas no controle (quantidade de fêmeas)	Nº de tentativas de picadas no tratado (quantidade de fêmeas)	Porcentagem de repelência
T <sub>0</sub>	18	8	55,5
T <sub>30</sub>	25	11	56
T <sub>60</sub>	19	8	57,9
T <sub>90</sub>	10	8	20
T <sub>120</sub>	16	6	62,5

- **Metade da gaiola “BC-cage”** – O resultado obtido foi uma repelência de quase metade da eficácia do repelente, logo após a aplicação do produto. Apesar de um resultado favorável, o experimento não pode prosseguir com os intervalos de tempo previstos. Isso

aconteceu devido à alta mortalidade das fêmeas, mesmo com a presença do algodão umedecido com água para tentar aumentar a umidade na gaiola, houve também elevada fuga das fêmeas (Tabela V).

**Tabela V.** Teste de repelência com produto comercial EXPOSIS® realizado na metade da gaiola “BC-cage”.

Tempo (minutos)	Nº de tentativas de picadas no controle (quantidade de fêmeas)	Nº de tentativas de picadas no tratado (quantidade de fêmeas)	Porcentagem de repelência
T <sub>0</sub>	40	21	47,5

• **Gaiola “BC-cage” e a caixa de acrílico** – Em decorrência dos resultados alcançados no teste da caixa de acrílico e também como forma de eliminar o interferente do teste anterior, a caixa foi fixada na gaiola “BC-cage”. Dessa forma, seria viável a troca do tecido que teria contato com o braço do voluntário.

Nesse experimento, o tempo inicial mostrou repelência maior que 60%, mas posterior ao intervalo de 30 minutos a porcentagem decaiu a zero. Esse resultado indica que após trinta minutos da aplicação do produto não há mais o efeito repelente contra os flebotomíneos (Tabela VI).

**Tabela VI.** Teste de repelência com produto comercial EXPOSIS® realizado na gaiola “BC-cage” com a caixa de acrílico.

Tempo (minutos)	Nº de tentativas de picadas no controle (quantidade de fêmeas)	Nº de tentativas de picadas no tratado (quantidade de fêmeas)	Porcentagem de repelência
T <sub>0</sub>	13	4	69,2
T <sub>30</sub>	7	9	-

#### 4.3. Teste da caixa de acrílico

No tempo inicial a porcentagem de repelência foi de 26% e após 30 minutos houve um aumento para 60% de repelência. Observou-se que a atividade repelente aumentava conforme se passava o tempo.

Porém, o teste apresentou um interferente que seria a troca do “voil” entre o braço controle e o braço com repelente para que não ocorresse a interferência dos voláteis do repelente. A troca do tecido não seria possível sem a fuga das fêmeas (Tabela VII).

**Tabela VII.** Teste de repelência com o produto comercial EXPOSIS<sup>®</sup> realizados na caixa de acrílico.

Tempo (minutos)	Nº de tentativas de picadas no controle (quantidade de fêmeas)	Nº de tentativas de picadas no tratado (quantidade de fêmeas)	Porcentagem de repelência
T <sub>0</sub>	23	17	26
T <sub>30</sub>	20	8	60

#### 4.4. Teste do Dedo

No dedo controle os flebotomíneos foram atraídos e houve tentativa de picada, ao contrário do dedo com repelente não houve tentativa alguma. Apesar de não ocorrer tentativa de picada no dedo com o tratamento, as fêmeas se aproximavam repetidamente. Além desse resultado, a execução do teste envolve um risco relativo da picada no dedo do voluntário, devido à exposição.

#### 4.5. Discussão Geral

A dificuldade dos testes de repelência com flebotomíneos está no estabelecimento de uma metodologia que consiga comprovar a eficácia ou a ineficiência de um repelente químicos em a exposição do voluntário à picada do inseto como observado em artigos anteriores (MAROLI, 1986; NAUCKE, 2006; NIEVES2010).

Outra dificuldade que devemos levar em consideração é a variação entre as espécies de flebotomíneos, pois os diversos grupos de pesquisa trabalham com diferentes espécies, sendo que não há trabalhos de repelência realizados com a espécie *Ny. neivai* (NIEVES 2010). Além disso, um fator limitante encontrado nesse trabalho foi à necessidade de um número

suficiente de insetos para os testes, o que em alguns momentos não era possível, pois a colônia apresenta altos e baixos na quantidade de insetos produzidos.

Além disso, por meio de experimentos foi observada a repelência dos flebotomíneos ao látex e essa é uma vertente que precisa ser melhor entendida e explorada.

Como perspectivas futuras, os esforços deveriam ser centrados na busca de materiais que impeçam o acesso da picada dos insetos à pele sem repeli-los, e que não permitam a volatilização dos odores sob a pele protegida.

## **5. CONCLUSÕES**

Dentre as onze metodologias desenvolvidas para a realização de testes de repelência em flebotomíneos, nenhuma mostrou-se 100% eficiente. No entanto, a luva de nitrila azul mostrou-se a melhor opção comparativamente às outras, pois não apresentou repelência como a luva de látex ou tanto acesso dos insetos como os outros materiais.

Podemos concluir que tanto o DEET quanto a icaridina, também não se mostraram eficientes como repelentes para flebotomíneos. Deixando claro que essa área de repelência para flebotomíneos necessita mais estudos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, B.; MAROLI M. (2003). Control os phlebotomine sandflies – review article. **Medical and Veterinary Entomology**. 17: 1-18.

BARRETO M.P. (1942). Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae). **Tese – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**. 1-162.

BATES, P.A.; DEPAQUIT J.; GALATI E. A.B.; KAMHAWI S.; MAROLI M.; MCDOWELL M.A.; PICADO A.; READY P.D.; SALOMON O.D.; SHAW J.J.; TRAUB-CSEKO Y.M.; WARBURG A. (2015). Recent advances in phlebotomine sand fly related to leishmaniasis control. **Parasites e vectors**.8: 131- 139.

BRAZIL R.P.; RODRIGUES A.A.F; FILHO J.D.A. (2015). Sandy fly vectores of leishmania in the Americas – a mini review. **Entomology, Ornithology e Herpetology**. 4: 144 – 148.

BROWN M.; HEBERT A. A. (1997). Insect repellents: An overview – Clinical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 36: 243 – 249.

CASTRO K.R.R.; SCODRO R.B.L.; SVERSUTTI A.C.D; NEITZKE H.C.; ROSSI R.M.; KUHL J.B.; SILVEIRA T.G.V; TEODORO U. (2008). Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 41: 269 – 276.

CATMAT – Committe to Advise on Tropical Medicine and Travel (Public Health Agency of Canada). (2012). **Statement on Personal Protective Measures to Prevent Arthropod Bites**. **Canada Communicable Disease Report**. 38: 1 - 17.

CHAMPAKAEW D.; JUNKURN A.; CHAITHONG U.; JITPAKDI A.; RIYONG D.; WANNASAN A.; JITRAWADEE I.; MUANGMOON R.; CHANSANG A.; TUETUN B.; PITASAWAT B. (2016). Assessment of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels as a repellent for

personal protection against mosquitoes under laboratory and field conditions in northern Thailand. **Parasites e Vectors**. 9: 373 – 387.

KATZ T.M.; MILLER J.H.; HEBERT A.A. (2008). Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **J Am Acad Dermatol**.58: 865 – 871.

MARCONDES C.B. (2001). Flebotomíneos In: CB Marcondes. **Entomologia médica e veterinária**. Editora Atheneu. São Paulo. 1: 34.

MAROLI M.; FOSSATI F.P. (1986). Laboratory tests of three repellents against *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 80: 771-773.

MAROLI M.; FELICIANGELI M.D.; BICHAUD L.; CHARREL R.N.; GRADONI L. (2012). Phebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary entomology**. 2: 123 – 147.

NAUCKE T.J.; LORENTZ S.; GRUNEWALD H-W. (2006). Laboratory testing of the insect repellents IR3535 and DEET against *Phlebotomus mascittii* and *P. duboscqi* (Diptera: Psychodidae). **International Journal of Medical Microbiology**. 40: 230 – 232.

NIEVES E.; MENDEZ J. F.; LIAS J.; RONDON M.; BRICENO B. (2010). Actividad repelente de aceites esenciales contra las picaduras de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Revista de Biología Tropical**. 58: 1549 – 1560.

OBERMAYR U.; ROSE A.; GEIER M. (2010) A novel test cage with an air ventilation system as an alternative to conventional cages for the efficacy testing of mosquito repellents. **Journal of Medical Entomology**. 47: 1116-1122.

RANGEL E.F.; LAINSON R. (2003) Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro. **Editora Fiocruz**. 23-51.

REITHINGER R.; DUJARDIN J. C.; LOUZIR H.; PIRMEZ C.; ALEXANDER B.; BROOKER S. (2007). Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**.7: 581 – 596.

RIBAS J.; CARRENO AM. (2009). Evolution of the use of repellent against mosquito bite by military personnel in the Amazon Basin. **An Bras Dermatol**. 85: 33 – 38.

STEFANI G.P.; PASTORINO A.C.; CASTRO A.P.B.M.; FOMIN A.B.F.; JACOB C.M.A. (2009). Repelentes de insetos: recomendações para o uso em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**. 27: 81 – 89.

VALERIO L.; MAROLI M. (2005). Valutazione dell'effetto repellente ed *anti-feeding* delle'olio d' aglio (*Allium sativum*) nei confronti dei flebotomi (Diptera: Psychodidae). **Ann Ist Super Sanità**. 41: 253 – 256.

WHO (2010). Control of Leishmaniasis: report of the meeting of the WHO Expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: World Health Organization Technical Report Series.

WHO (2014). Leishmaniasis Fact sheet n° 375 (atualizado em 2015). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado em 23 de agosto de 2016.

WHO (2016) Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acessado em 23 de agosto de 2016.

YALES J.; M.D.; DTMeH; FAAFP. (2015). Advice for Protection Against Mosquitoes and Ticks. **American Family Physician**. 91: 754-755.

Araraquara, ..... de Dezembro de 2016.

---

Camila Feitosa de Castro

De acordo,

---

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto