



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RAISA RODRIGUES SANTOS RIOS

**Extração e identificação de compostos voláteis de ovinos e provável
ação no controle de *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera:
Ceratopogonidae), vetores do vírus da Língua Azul**

MACEIÓ – AL

2020

RAISA RODRIGUES SANTOS RIOS

**Extração e identificação de compostos voláteis de ovinos e provável
ação no controle de *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera:
Ceratopogonidae), vetores do vírus da Língua Azul**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientadora: Prof. Dr^a Angelina Bossi
Fraga

Coorientador: Prof. Dr^o Antônio Euzébio
Goulart Santana

MACEIÓ – AL

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos - CRB-4 - 2062

R586e Rios, Raisa Rodrigues Santos.
Extração e identificação de compostos voláteis de ovinos e provável ação no controle de *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae), vetores do vírus da Língua Azul / Raisa Rodrigues Santos Rios. – 2020.
93 f. : il. ; figs. ; tabs. color.

Orientadora: Angelina Bossi Fraga.
Coorientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 77-81.
Apêndices: f. 83-93.

1. Semioquímicos. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3. Pragas – Controle. 4. Ovinos – Doenças. 5. *Culicoides insignis*. 6. Língua azul. I. Título.

CDU: 54: 636.3


RAISA RODRIGUES SANTOS RIOS

**Extração e identificação de compostos voláteis de ovinos e provável
ação no controle de *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera:
Ceratopogonidae), vetores do vírus da Língua Azul**

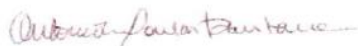
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Aprovada em: 30/04/2020.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Angelina Bossi Fraga
Orientadora - Universidade Federal de Alagoas - UFAL




Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Coorientador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam
Universidade Federal de Sergipe - UFS



Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Universidade Federal de Alagoas – UFAL



Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart
Universidade Federal de Alagoas – UFAL



Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Dedicatória,

À você Mãe, razão da minha vida!

À você Vó (in memoriam), minha luz!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por eu ter conseguido chegar até aqui, por ter me dado força para superar todos os obstáculos, e por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis.

À minha família, por todo amor!

À minha mãe, meu porto seguro! Sempre acreditou e me deu força para seguir. Essa conquista é nossa!!

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a Angelina Bossi Fraga, por muito ter ensinado, pessoal e profissionalmente, por ter me acolhido como filha, e ter acreditado em mim. Minha gratidão!

Ao meu coorientador, Prof. Dr^o Antônio Euzébio Goulart Santana, pelos seus ensinamentos! Muito obrigada pela acolhida em seu grupo de pesquisa no laboratório.

Aos meus amigos do grupo de Melhoramento Animal, pelos dias de convivência leve e harmoniosa, e nossas saídas ecléticas.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais, por todos os dias de aprendizado no laboratório e por nossas saídas. Deixo aqui, o meu carinho e admiração.

Aos amigos queridos, Cenira e Aldy, pelas conversas, ensinamentos, pela acolhida em suas famílias. Sempre pude contar com vocês!

Às minhas amigas queridas do grupo “Everybody” e Manu, pelos momentos de descontração, lazer, bons vinhos e boas conversas.

Ao casal querido, Paulo e Alinny, por estarem comigo desde o início do meu doutorado.

Aos amigos de Fortaleza, que mesmo distante, sempre foram presentes com as mensagens de carinho.

Às minhas “Novinhas”, por tentarem me ensinar a cozinhar e ser uma dona de casa, durante esses anos. Acho que eu consegui!

Ao Instituto Federal de Alagoas (IFAL/Satuba) pela concessão dos animais, objetos de estudo dessa pesquisa, em especial à Prof^a Msc. Carla Cordeiro. Deixo também meu agradecimento aos funcionários, sempre solícitos comigo.

À Fazenda Pratagy, na pessoa de Thiago, por ter aberto as portas para eu conduzir parte dos experimentos usando os animais.

Ao Drº Simon Carpenter, Pirbright Institute, Londres - Reino Unido, pelas valiosas contribuições.

À Drª Maria Luiza Felipe-Bauer e, em especial a Drª Maria Clara Alves Santarém, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), pela identificação dos insetos utilizados na pesquisa, e pelos ensinamentos para a sua coleta.

À Drª Ruth Rufino do Nascimento por todo o aprendizado e disponibilidade sempre!

Ao Drº Henrique Fonseca Goulart pelas contribuições nas interpretações das análises.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), ao Centro de Ciências Agrárias (CECA), e ao Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LpRN/ UFAL). Obrigada!

Ao Laboratório de microscopia do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), em especial ao Dr. Johnnatan Freitas e Jeniffer Freitas.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Alagoas - FAPEAL e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão das bolsas de pós-graduação.

RESUMO

A ecologia química estuda as substâncias químicas liberadas pelos seres vivos, e suas interações com o meio ambiente. Dentre essas substâncias, os semioquímicos fazem a mediação das interações entre os organismos, auxiliando em vários processos de comunicação entre os seres por meio dos compostos orgânicos voláteis (COVs). O conhecimento desses processos podem ser ferramentas promissoras no controle de pragas e patógenos que acometem as plantas, animais e seres humanos. Diante disso, essa pesquisa teve o objetivo de capturar e identificar insetos *Culicoides*, bem como fazer a coleta e identificar os compostos voláteis emitidos por ovinos infestados por *Culicoides*, visando dar subsídios para o controle indireto da doença da Língua Azul (LA). Além de relatar a aparição de *Culicoides insignis* no Estado de Alagoas, descrever os hábitos dos insetos e, a criação de uma armadilha luminosa para sua captura. Os *Culicoides* são minúsculos insetos hematófagos que transmitem, além da doença da LA, várias doenças de destaque preocupação para a saúde pública no âmbito internacional. A doença LA é uma enfermidade infecciosa, causada por um arbovírus, transmitido pelos *Culicoides* (maruins) e acomete ruminantes domésticos e selvagens, sendo amplamente disseminada no mundo. Em geral, os locais de foco da doença da LA estão associados à presença dos *Culicoides*. Os COV's foram coletados em 12 ovinos (machos e fêmeas), pelo método da aeração e, analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Após a caracterização dos COV's foram realizados os bioensaios comportamentais para testar o potencial das substâncias frente aos insetos. Dentre os compostos coletados, após as análises, foram caracterizados quanto ao índice de retenção de Kóvats e análise de espectro, 22 COV's nos ovinos machos e, 20 COV's nos ovinos fêmeas. Foram identificados 17 compostos em comum para os dois sexos. As análises cromatográficas mostraram que os COV's provenientes dos ovinos machos apresentaram as maiores intensidades de compostos. Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que os compostos caracterizados não apresentaram poder de atração ou repulsão dos insetos *Culicoides*.

Palavras chaves: análise cromatográfica, ecologia química, índice de Kóvats, insetos hematófagos

ABSTRACT

Chemical ecology studies chemical substances released by living beings, and their interactions with the environment. Among these substances, semiochemicals mediate interactions between organisms assisting in various communication processes between beings, with volatile organic compounds (VOCs) being part of these chemical substances. The knowledge of these processes can be promising tools in the control of pests and pathogens that affect plants, animals and humans. Therefore, this research aimed to collect and identify volatile compounds emitted by sheep infested by *Culicoides*, aiming to provide subsidies for the indirect control of Bluetongue (BT) disease. In addition to reporting the appearance of *Culicoides insignis* in the State of Alagoas, describing the habits of insects and creating a light trap for their capture. *Culicoides* are tiny hematophagous insects that transmit, in addition to BT disease, several diseases of particular concern for public health at the international level. BT disease is an infectious disease, caused by an arbovirus, transmitted by *Culicoides* and affects domestic and wild ruminants, being widely disseminated in the world. In general, the LA disease focus sites are associated with the presence of *Culicoides*. VOCs were collected from 12 sheep (male and female) using the aeration method and analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-DIC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). After characterization of VOCs, behavioral bioassays were performed to test the potential of substances against insects. Among the collected compounds, after analysis, they were characterized in terms of Kóvats retention index and spectrum analysis, 22 VOCs in male sheep and 20 VOCs in female sheep. 17 common compounds were identified for both sexes. Chromatographic analyzes showed that VOCs from male sheep had the highest compound intensities. The results of the biological tests showed that the compounds characterized did not show the power of attraction or repulsion of *Culicoides* insects with the concentrations used and experimental design used.

Keywords: chromatographic analysis, chemical ecology, Kóvats index, biting midge insects

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Ecologia química	12
2.1.1	Compostos orgânicos voláteis (COV's).....	12
2.1.2	Coleta, Extração e Identificação dos COV's.....	13
2.1.3	Índice de Kovats (KI)	13
2.1.4	Análise por Cromatografia Gasosa CG.....	14
2.1.5	Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas CG/EM 15	
2.1.6	Bioensaios comportamentais	16
2.2	Os insetos do gênero <i>Culicoides</i>	17
2.2.1	Biologia, Classificação taxonômica, ciclo e comportamento dos <i>Culicoides</i>	17
2.2.2	Doenças transmitidas por <i>Culicoides</i>	20
2.2.2.2	Schmallenberg	22
2.2.2.3	African Horse Sickness (AHS).....	22
2.2.2.4	Oropouche (ORO)	24
2.2.2.5	Infecção <i>Elizabethkingia</i>	25
2.2.3	Controle dos <i>Culicoides</i>	25
3	CAPÍTULOS	27
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

As substâncias liberadas pelos seres vivos que fazem a mediação das interações entre organismos, organismos e meio ambiente, são denominadas semioquímicos. Alguns dípteros hematófagos, de acordo com Schofield e Brady (1997), se beneficiam desses semioquímicos, os quais são os sinais químicos liberados pelos seus hospedeiros vertebrados. Vários estudos elucidaram o importante papel desses semioquímicos na identificação de hospedeiro específicos e parasitas (GOULART et al., 2015; JELVEZ SERRA et al., 2017; SOARES et al., 2019; GOULART et al., 2019).

Os insetos do gênero *Culicoides* Latreille, 1809 estão espalhados em todo mundo, com exceção da Antártida e Nova Zelândia (MELLOR et al., 2000). Eles são vetores de patógenos que causam doenças e seu comportamento de formação de aglomerados de insetos é irritante para os homens e animais. São responsáveis pela transmissão das doenças de importância veterinária: doença da Língua Azul (DU TOIT, 1944); Schmallenberg (HOFFMANN et al., 2012) African Horse Sickness (HENNING, 1956) e das doenças de importância humana: Oropouche (NUNES et al., 2005) e infecção por *Elizabethkingia* (MEE et al., 2017). Essas doenças têm importante impacto econômico, causando prejuízos para a economia, saúde e desenvolvimento social.

A doença da Língua Azul (LA) também conhecida como Bluetongue, é uma doença viral, não contagiosa, sendo transmitida à maioria dos ruminantes, dentre os quais, alguns animais selvagens. É causada por um vírus do gênero *Orbivirus*, pertencente a família Reoviridae (MELLOR e WITTMANN, 2002), transmitida por *Culicoides*. Possui ampla distribuição geográfica, devido à boa adaptabilidade de seus vetores às diversas condições climáticas. De acordo com Acevedo et al. (2016), os surtos de doenças, cujos agentes etiológicos são transmitidos pelos *Culicoides*, em geral, ocorrem em regiões favoráveis para o desenvolvimento desses insetos, evidenciando, portanto, a importância do controle de *Culicoides* no combate à LA.

O controle de pragas tem sido realizado abordando técnicas mecânicas, químicas, genéticas e biológicas, (BRAVERMAN e CHIZOV-GINZBURG, 1997; GOFFREDO e MEISWINKEL, 2004; PAGE et al., 2009; LEWIS et al., 2014; MEE et al., 2015; MILLS et al., 2015). Em geral, o controle químico é adotado com o uso de inseticidas em ambientes de maior prevalência de insetos. Entretanto, o emprego de inseticidas tem impacto negativo na saúde humana e animal, elevado custo, além dos prejuízos causados

ao meio ambiente. Por outro lado, a ecologia química pode ser promissora no combate de pragas. Essa abordagem, de acordo com Goulart et al., (2015) tem evoluído em várias áreas do mundo como na Europa, América do Norte e Ásia. A ecologia química inclui as áreas de neuroetologia de insetos, ecologia comportamental, bioquímica de insetos e plantas, química e síntese de produtos naturais e tecnologias para a exploração dos semioquímicos na agropecuária.

Esses semioquímicos são encontrados na pele dos vertebrados, bem como nas secreções glandulares, excrementos (fezes e urina) e respiração. A coleta e identificação dessas substâncias são imprescindíveis para o desenvolvimento de alternativas de controle químico. A aeração tem sido uma metodologia bastante empregada para a coleta de semioquímicos visando sua utilização no controle dos parasitas (PICKETT e BUGG, 1998; MORAES et al., 2003; LOGAN e BIRKETT, 2007; VIANA et al., 2018).

Essa pesquisa objetivou a coleta e identificação de semioquímicos em ovinos infestados por *Culicoides*, visando subsidiar diretrizes para o controle indireto da doença da LA. Além de relatar a ocorrência de *Culicoides insignis* no Estado de Alagoas, descrever os hábitos dos insetos e, a criação de uma armadilha luminosa para sua captura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ecologia química

É o estudo das substâncias químicas liberadas pelos seres vivos e suas interações com o ambiente onde estão inseridos. Os seres vivos liberam substâncias químicas, entre as quais, algumas são compostos orgânicos voláteis (COVs). Esses compostos fazem a mediação das interações entre os organismos, sendo classificados como semioquímicos (NORDLUND e LEWIS, 1976). Os semioquímicos podem ser classificados em: feromônios - quando a comunicação ocorre entre indivíduos da mesma espécie e aleloquímicos - quando a comunicação ocorre entre espécies diferentes. Os feromônios auxiliam no processo de localização dos parceiros sexuais, busca de alimentos, alerta da presença de inimigos, marcação de território e delineamento de trilhas (DICKE e SABELIS, 1988; FERREIRA et al., 2001).

Os aleloquímicos compreendem os alomônios, cairomônios e os sinomônios. Os alomônios são sinais emitidos por uma espécie em seu próprio benefício. Os cairomônios são sinais emitidos por um indivíduo que irão beneficiar apenas o receptor, por outro lado, os sinomônios são sinais que irão beneficiar tanto o emissor, quanto o receptor (KARLSON e LUSCHER, 1959; SBARBATI e OSCULATI, 2006). Dentre os aleloquímicos, os cairomônios são liberados pelos hospedeiros e detectados pelos indivíduos receptores através de suas antenas e palpos, e provocam reações de comportamento nos organismos receptores.

Alguns dípteros hematófagos, como os *Culicoides*, o mosquito da dengue, os flebotomíneos, a mosca do estábulo, o mosquito da malária, a mosca dos chifres dentre outros, se beneficiam com os compostos orgânicos voláteis (COV's), que são os sinais químicos liberados pelos seus hospedeiros vertebrados (SCHOFIELD e BRADY, 1997; ANDRADE, 2006; LOGAN e BIRKETT, 2007). O odor do hospedeiro possui um papel importante para os parasitas, facilitando assim a sua localização.

2.1.1 Compostos orgânicos voláteis (COV's)

Vários estudos elucidaram o papel dos COV's no controle de pragas (PICKETT e BUGG, 1998; TORR et al., 2006; LOGAN e BIRKETT, 2007). Esses autores corroboraram que o conhecimento das interações entre hospedeiro e praga é indispensável

para a aplicação de técnicas efetivas para o controle. A exemplo, Gikonyo et al. (2002) e Gikonyo et al. (2003) mostraram que a mosca Tsé-Tsé (*Glossina* spp.) é capaz de reconhecer a diferença entre os COV's liberados pelos bubalinos, bovinos e antílopes. Logan e Birkett (2007) relataram que os insetos hematófagos utilizam esses sinais em busca dos seus hospedeiros, sendo na maior parte dos casos, como fonte de alimento.

2.1.2 Coleta, Extração e Identificação dos COV's

Os COV's são coletados nos seres vivos por meio da aeração, os quais são transportados por um fluxo de ar constante e adsorvidos por polímeros especiais. O sistema de aeração, geralmente, é de vidro e os compostos obtidos durante esse processo são adsorvidos em carvão ativado e em polímeros porosos, como Porapack, Tenax ou super Q, entre outros. Para a dessorção do material colhido são utilizados solventes como: diclorometano, hexano e éter com alta pureza, devido à sua volatilidade, o que permite a conservação dos compostos durante a evaporação (ZARBIN et al., 1999; MORAES et al., 2003). Após a etapa de dessorção, em alguns casos, é necessário a realização da concentração do extrato. Nesse caso, normalmente, é utilizado um gás inerte como o nitrogênio e, em sequência, faz-se a identificação dos compostos existentes nas amostras biológicas recolhidas.

A identificação dos COV's ocorre normalmente pelo uso de técnicas cromatográficas, por meio da análise das amostras que serão injetadas nos equipamentos: Cromatógrafo a Gás acoplado a um detector Ionização de chamas (CG/FID); Cromatógrafo a Gás acoplado a um detector Espectrômetro de Massas (CG/EM); Cromatógrafo a Gás acoplado a um detector Eletroanténógrafo (CG/EAG). Esses equipamentos dão as informações sobre os compostos, analisando a qualidade do material injetado, o número de compostos presente na amostra analisada e a partir dos resultados obtidos, podemos determinar a proporção relativa dos compostos presentes, de acordo com os fragmentos iônicos presentes no espectro de massas de cada substância, podendo identificar as estruturas dos compostos presentes nas amostras analisadas. Ao final das análises, obtém-se uma lista de substâncias e sua composição, as quais estão associados à um índice de retenção, Kóvats (ZARBIN et al., 1999; BRATTOLI et al., 2011).

2.1.3 Índice de Kóvats (KI)

É um número que indica a retenção relativa à de alcanos adjacentes (KÓVATS, 1958). O índice pode ser calculado pela seguinte equação:

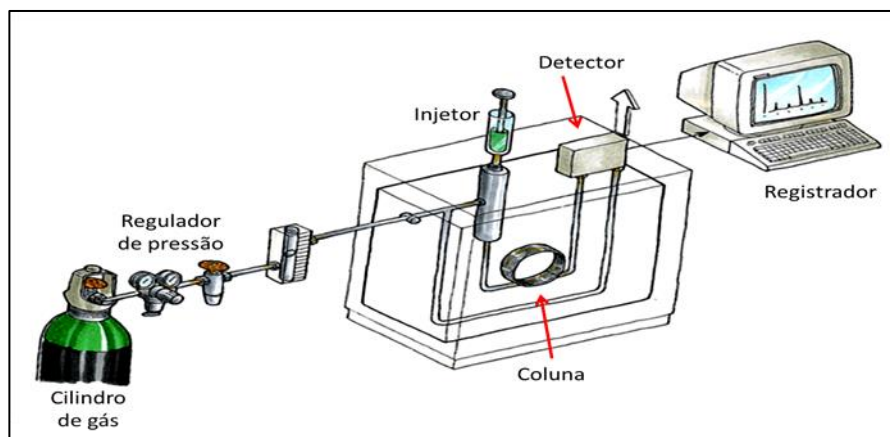
$$KI = 100 * n + 100 * \left[\frac{\log T'R_{(i)} - \log T'R_{(n)}}{\log T'R_{(n+1)} - \log T'R_{(n)}} \right]$$

onde “n” é o número de carbonos do padrão adjacente de menor tempo de retenção TR e o adjacente de maior tempo de retenção relacionado ao TR_i do analito ; TR_i é o tempo de retenção do analito; TR_n tempo de retenção de carbonos do padrão adjacente menos retido; TR_{n+1}, tempo de retenção de carbonos do padrão adjacente mais retido. Esses índices podem ser comparados com os valores disponíveis nas bibliotecas dos bancos de dados Pherobase (ASHRAF, 2009) e Nist (National Institute of Standards and Technology U.S., 1990).

2.1.4 Análise por Cromatografia Gasosa CG

A cromatografia gasosa surgiu em meados dos anos 50 e desde então vem sofrendo grandes modificações, melhorando assim seus resultados e sua precisão, consistindo em um método físico de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase gasosa móvel sobre um solvente estacionário. A cromatografia gasosa, em seu início, foi dividida em duas categorias principais: Cromatografia Gás-Líquido (CGL), neste caso, um líquido não volátil recobre um suporte inerte; e a Cromatografia Gás Sólido (CGS), que emprega um sólido com grande área superficial como fase estacionária. Como a grande maioria das aplicações atuais é de CGL, essa terminologia foi abandonada, empregando-se apenas a Cromatografia Gasosa (CG), (NETO e NUNES, 2003), Figura 1. A fase móvel na cromatografia gasosa trata-se de um fluxo de gases inertes. Geralmente os mais usados são hélio, argônio, nitrogênio e hidrogênio.

Figura 1- Esquema dos componentes do Cromatógrafo Gasoso



Fonte: Del Grande (2008)

De uma forma geral, a cromatografia gasosa é aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300°C e sejam termicamente estáveis. As amostras são introduzidas no injetor do cromatógrafo. As características desejáveis dos injetores podem ser descritas como: injeção da amostra dentro da fase móvel sem dispersão; vaporização de todos os solutos instantaneamente sem decomposição térmica; evitando a difusão de componentes da amostra na fase móvel; evitando a contaminação e perda da amostra (DEL GRANDE, 2008).

2.1.5 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas CG/EM

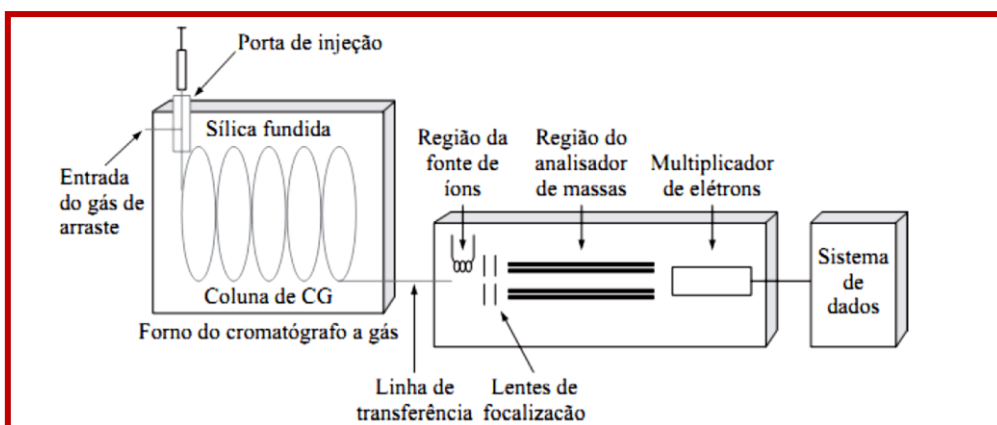
O espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) de íons que são produzidos pela amostra. A técnica de espectrometria de massas baseia-se na separação na fase gasosa de íons provenientes, ou produzidos, a partir dos componentes presentes em amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Tipicamente, as moléculas são ionizadas com um feixe de elétrons ou com íons. Desta forma, um íon pode ser separado de outros de acordo com a sua relação massa/carga (m/z), permitindo que somente os íons selecionados, de uma estreita faixa de massa, atinjam o detector em um determinado momento (MCLAFFERTY e TURECEK, 1993).

As moléculas da amostra, no caso de um CG, entram no espectrômetro de massas na forma líquida, sendo vaporizada. A sua entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de CG e a baixa pressão (10^{-5} a 10^{-8} atm) do sistema do espectro de massas. Um sistema complexo de vácuo é necessário para manter a pressão baixa. As fontes de ionização para espectrometria de massas moleculares são energéticas o

suficiente para quebrar as ligações das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor essas moléculas em seus átomos constituintes, assim como acontece na espectrometria atômica (SKOOG et al., 2006).

Após a entrada no equipamento (Figura 2), a amostra segue para a fonte de ionização, onde sofrerá o bombardeamento de elétrons, produzindo íons positivos, íons negativos e espécies neutras. Os íons positivos são direcionados para o analisador por repulsão eletrostática, e em seguida separados de acordo com seus valores de m/z . Esses íons são detectados após a sua colisão com a superfície de um detector. Essas colisões causam a liberação de elétrons, fótons ou outros íons. Estes podem ser medidos por detectores de carga ou radiação. As informações desse processo serão analisadas em um sistema de dados (SKOOG et al., 2006).

Figura 2 - Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas mostrando seus componentes constituintes



Fonte: Skoog et al. (2006)

2.1.6 Bioensaios comportamentais

Os bioensaios comportamentais têm como objetivo quantificar e qualificar a resposta motora dos insetos frente a uma fonte de estímulo. Para quantificar é utilizado o número de vezes em que o inseto correspondeu a emissão de um determinado odor. Para qualificar, são observadas as atividades comportamentais associadas à percepção da fonte de odor. Na maioria das vezes, os insetos mostram comportamentos como movimentação das antenas eretas em forma de “V”, elevação do pronoto e vibração das asas. O comportamento de busca irá depender da bioatividade do estímulo, ou seja, o tipo de reação do inseto ao se deparar com o estímulo, como exemplo, voo ou caminhada (EIRAS

e MAFRA NETO, 2001). Em bioensaios laboratoriais com dípteros, a olfatométria é utilizada para avaliar o comportamento do inseto em busca do estímulo olfativo.

Nos bioensaios comportamentais usando a olfatométria, a arena normalmente é bifurcada, e o inseto pode escolher entre o extrato biológico extraído de frutos, animais ou plantas, os COV's sintéticos e diluentes. Neste ensaio, devem ser considerados a idade e sexo do inseto, a temperatura, a umidade relativa do ar, o horário da avaliação, a luminosidade, dentre outros fatores, os quais podem causar interferência no comportamento do inseto (SANT'ANA e STEIN, 2001). Nos bioensaios podem ser empregadas duas metodologias: a primeira é realizada com extratos dos compostos coletados e identificados e, a segunda maneira, é realizada utilizando padrões sintéticos, no qual, serão avaliados o poder de atração ou repelência dos compostos frente aos insetos. O poder de atração de COV's frente aos insetos em laboratório é definido quando os insetos apresentam interesse pelos COV's, ou seja, eles vão ao encontro do composto, por exemplo: em ensaios de olfatométria em Y, os insetos que são atraídos pelos voláteis de interesse vão ao encontro do seu odor por um tempo máximo de 10 minutos, caracterizando assim a atração. O mesmo comportamento acontece em campo, vale ressaltar que as condições de campo, possui mais variáveis, porém a percepção do inseto a concentrações de atração continuam sendo as mesmas. Para a repelência, o comportamento dos insetos é bem contrário ao de atração. Geralmente, os insetos quando não são atraídos pelos COV's ficam estáticos ou buscando a saída das arenas de testes (olfatométria ou arena bifurcada). Em campo, a repelência é de difícil mensuração, pois pode ser confundida com a falta de eficiência da concentração estudada, sendo necessário a identificação de repelência em laboratório para maior segurança.

2.2 Os insetos do gênero *Culicoides*

Esses dípteros são os mais importantes e os menores insetos hematófagos dessa família. Os *Culicoides* transmitem doenças através de suas picadas, cujos sintomas são a formação de edemas, febre, salivação excessiva, entre outros (MELLOR et al., 2008). Além disso, o comportamento de formação de nuvens de insetos provoca irritação para os humanos e os animais.

2.2.1 Biologia, Classificação taxonômica, ciclo e comportamento dos *Culicoides*

Os *Culicoides* são dípteros pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta, da família Ceratopogonidae (Figura 3). São insetos de pequeno porte, medindo aproximadamente 1,5 a 5 mm de comprimento. A cabeça é voltada para baixo e arredondada posteriormente, com antenas longas e segmentadas. As antenas são importantes para a identificação do sexo, sendo que, nas fêmeas elas apresentam aspecto piloso e nos machos plumosos. A região do tórax é levemente arqueada, sem pelos ou escamas. Em geral, as asas apresentam manchas, as quais auxiliam na determinação das espécies. As asas do macho são mais estreitas e finas com manchas menos evidentes. As fêmeas geralmente possuem espermatecas e fazem a postura dos ovos em locais úmidos e ricos em matéria orgânica, considerados ambientes fundamentais para o desenvolvimento da fase imatura dos insetos.

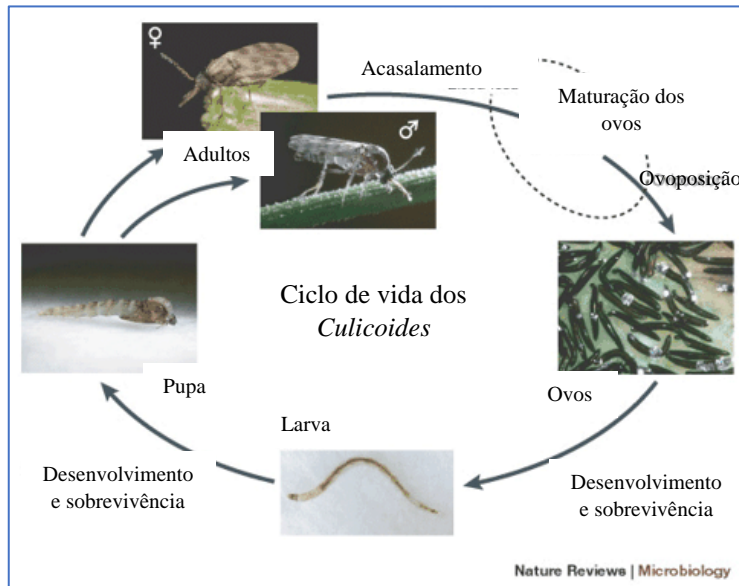
Figura 3- Classificação taxonômica dos insetos *Culicoides*

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Diptera
Família	Ceratopogonidae
Subfamília	Ceratopogoninae
Gênero	<i>Culicoides</i>
Latreille	1809

Após o acasalamento, as fêmeas necessitam realizar o repasto sanguíneo, o qual é imprescindível para a maturação e desenvolvimento dos ovos (Figura 4). O período que vai desde o acasalamento até o início da atividade de postura é chamado de período de pre oviposição. A fêmea, por sua vez, põe ovos cilíndricos ou em forma de banana no solo úmido ou em matéria vegetal em decomposição perto de água. O período que vai desde a postura até a eclosão das larvas é chamado de período de incubação dos ovos, que dura de dois a oito dias, em condições favoráveis de temperatura e das condições do meio. A fase imatura (fase aquática) possui quatro estádios larvais. Essas larvas se movimentam constantemente nadando de forma sinuosa e se alimentam de material vegetal em decomposição. O desenvolvimento larval tem um período de 21 dias em média, nas regiões quentes, (Figura 5) podendo estender até sete meses em regiões temperadas. As pupas são encontradas na superfície, ou às margens, da água e apresentam mobilidade, no entanto, são menos ativas. Esta fase dura aproximadamente de três a 10 dias e, em

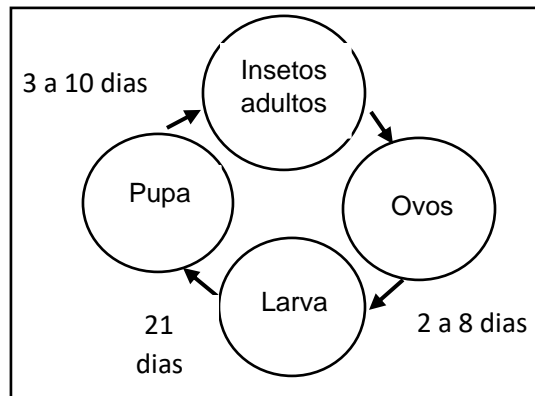
seguida, ocorre a emergência do mosquito adulto que está apto a reiniciar a atividade reprodutiva (PURSE et al., 2005).

Figura 4 - Ciclo biológico dos insetos do gênero *Culicoides*



Fonte: Purse et al. (2005)

Figura 5- Duração do ciclo biológico dos insetos do gênero *Culicoides*



2.2.2 Doenças transmitidas por *Culicoides*

2.2.2.1 Língua Azul

A Língua Azul (LA) é uma doença viral e não contagiosa, causada por um vírus do gênero *Orbivirus*, pertencente à família Reoviridae, sendo transmitida a todos os ruminantes, incluindo animais domésticos e alguns animais selvagens. Existem 27 sorotipos virais reconhecidos da febre catarral ovina. Os três últimos, 25°, 26° e 27°, foram identificados por HOFMANN et al. (2008) em cabras, MAAN et al. (2011) em cabras e ovelhas e por ZIENTARA et al. (2014) em cabras, respectivamente. Cada um desses sorotipos pode ter diferentes taxas de virulência e mortalidade.

Os principais sinais clínicos da doença LA em ovinos são: febre, hemorragias e ulcerações do tecido oral e nasal, salivação excessiva, secreção nasal e inchaço dos lábios e língua, claudicação, fraqueza, depressão, perda de peso, língua 'azul' como resultado cianose (rara), abortamento, perda parcial ou total de lã. O aparecimento de sinais clínicos em bovinos dependerá da cepa do vírus, e outros ruminantes domésticos, como cabras, geralmente apresentam poucos ou nenhum sinal clínico. O diagnóstico da LA requer sinais clínicos típicos, prevalência de vetores de insetos e, principalmente, em áreas onde a doença é endêmica (OIE, 2020).

Em relação às perdas econômicas decorrentes da LA ovina, os custos estimados consideram as perdas diretas, como óbito, aborto, perda de peso, redução da produção de leite e redução da eficiência da produção de carne, além de perdas indiretas, como restrições à exportação de animais vivos, sêmen e alguns outros produtos (SPERLOVA

e ZENDULKOVA, 2011). O financiamento da União Europeia para o controle e erradicação da LA havia sido de € 92.007.724 em 2002. No período de 2005 a 2009, os 23 Estados-Membros da União Europeia foram beneficiados, cujos valores variavam entre eles, dependendo da adoção da prática da vacinação ou não, além do tamanho da população de ruminantes de cada um deles. Os beneficiários dos maiores montantes de financiamento foram: Espanha (€30.546.721), França (€27.668.316), Alemanha (€10.187.305), Itália (€5.257.443), Bélgica (€4.435.105) e Portugal (€3.688.087), (SANCO, 2011). A LA ovina é uma das principais preocupações em saúde animal, sendo estudada para esclarecer sua epidemiologia, patogênese e controlar sua propagação (ACEVEDO et al., 2016).

Esta doença ocorre mais comumente em países tropicais, subtropicais e temperados, onde existem condições favoráveis à propagação do vetor *Culicoides* (PURSE et al., 2005). Assim, o papel central dos insetos voadores na epidemiologia da LA significa que a prevalência da doença depende dos fatores ecológicos que favorecem a sobrevivência dos insetos. Surtos de LA, geralmente, ocorrem sazonalmente e em climas quentes. Esta doença tem uma ampla distribuição geográfica devido à alta adaptabilidade de seus vetores às condições climáticas variáveis (SANCO, 2011).

É importante destacar que o comércio de animais vivos e a globalização também pode ter contribuído com a expansão do vírus LA. Essa doença também pode ser considerada exemplo de enfermidade, cuja expansão também é reflexo do aquecimento global. O vírus LA é transmitido aos animais do gênero *Culicoides*, e a hipótese de que o surgimento da LA na Europa Mediterrânea foi uma consequência da recente colonização da região por *Culicoides imicola*, que tem sido associada às mudanças climáticas (MARDULYN et al., 2013).

Desde 2000, a União Europeia ordena medidas para o estabelecimento de zonas de proteção e vigilância, visando o combate à LA ovina. Existem algumas técnicas de controle de LA disponíveis, como monitoramento sorológico e virológico, monitoramento entomológico capturando mosquitos através de armadilhas especiais e, vacinação específica para cada sorotipo circulante (SANCO, 2011). Além disso, a prevenção de LA na pecuária requer quarentena de animais e diagnóstico sorológico. Caso seja confirmada a doença nos animais, estes devem ser sacrificados. O abate de animais infectados é indispensável para evitar a propagação da doença, embora acarrete uma grande perda econômica para os agricultores.

2.2.2.2 Schmallerberg

No final de 2011, uma nova doença viral em ruminantes chamada Schmallerberg (SB) foi relatada na Alemanha e Holanda. O vírus causador desta doença pertence ao gênero *Orthobunyavirus* da família Bunyaviridae, e a infecção por esse vírus é caracterizada por poucos dias de viremia. Animais acometidos com SB podem desenvolver febre, redução na produção de leite, diarreia, malformação fetal e natimortos (HOFFMANN et al., 2012). Os procedimentos de diagnóstico para a detecção de infecções por SB incluem: transcriptase reversa em tempo real (RT) - PCR; testes de neutralização e ensaios indiretos de imunofluorescência; teste ELISAs de anticorpos SBV, permitindo triagem em massa (ANON et al, 2012).

As perdas econômicas causadas pelo SB na produção animal são malformações congênitas, redução da produção de leite, retorno às taxas de serviço prolongado, distocia e sintomas nervosos na prole. Os surtos de SB tiveram um grande impacto no comércio internacional de animais e produtos animais suscetíveis, como sêmen e embriões. Em relação à ocorrência, em 2012 foi revelada a disseminação da epidemia de SB mostrando os casos confirmados na Europa afetando bovinos, caprinos e ovinos. Os países afetados foram França, Bélgica, Holanda, Luxemburgo, Reino Unido, Itália, Espanha, Dinamarca, Suíça e Alemanha.

O diagnóstico veterinário na Europa demonstrou estar preparado para esse tipo de situação de surto e foi demonstrado que existe uma rede muito eficaz de instituições que trabalham com doenças epizooticas na União Europeia. As estratégias para melhorar a proteção veterinária e à saúde pública em relação aos patógenos emergentes têm se concentrado em melhorias no monitoramento e vigilância para permitir a detecção de doenças novas ou inesperadas. O fortalecimento do conceito de vigilância sindrômica pode ser uma abordagem possível para atingir esse objetivo (BEER et al., 2013).

2.2.2.3 African Horse Sickness (AHS)

A primeira referência histórica à doença semelhante à peste equina (AHS) foi relatada no Iêmen em 1327 (HENNING, 1956). O AHS é uma doença não zoonótica, não contagiosa, transmitida por insetos aos equídeos, causada pelo vírus AHS (AHSV). Atualmente, AHSV é apenas endêmico na África, no entanto, pode existir fora desta área e animais ou vetores infectados podem transportar o vírus para regiões livres de AHS

(CFSP, 2015). Até o presente, foram reconhecidos nove sorotipos de AHS. Como o vírus da LA, o vírus AHS é transmitido biologicamente por *Culicoides* spp. (MEISWINKEL et al., 2000; CFSP, 2015). Além disso, os mosquitos foram indicados como possíveis vetores biológicos e as moscas picadoras (*Stomoxys* e *Tabanus*) também podem transmitir o vírus mecanicamente. Outros artrópodes também podem ser capazes de transmitir o vírus AHS (CFSP, 2015).

Existem quatro formas diferentes de sintomas da AHS: a febre per aguda (pulmonar), a subaguda edematosa (cardíaca), a aguda (mista) e a febre de AHS. A morte súbita também pode ocorrer sem sinais anteriores (CFSP, 2015). Nos cavalos, a doença é geralmente aguda e depois de enfraquecidos pela doença, mais de 90% dos animais afetados morrem. Mulas são menos suscetíveis à AHS do que cavalos e burros, e as zebras raramente mostram sinais clínicos da doença (ZIENTARA et al., 2015). Essa doença é frequentemente diagnosticada por métodos virológicos, sendo que mais de um teste deve ser usado para diagnosticar um surto. O vírus AHS pode ser isolado do sangue de animais vivos ou de amostras de tecido, especialmente baço, pulmão e linfonodos, coletados na necropsia. O isolado deve ser sorotipado usando a neutralização do vírus ou outros métodos, para permitir a seleção de uma cepa de vacina apropriada. Os antígenos do vírus AHS podem ser detectados no sangue e nos tecidos (por exemplo, baço) com ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA). Além disso, o teste sorológico pode ser usado para diagnosticar esta doença, com anticorpos geralmente detectados dentro de 8 a 14 dias após a infecção (CFSP, 2015).

A doença tem ocorrência sazonal e sua prevalência é influenciada por condições climáticas e outras que favorecem a criação de *Culicoides* spp. Embora outros insetos tenham sido sugeridos como possíveis vetores da AHS, a única introdução registrada de AHS de uma região enzoótica, para uma região livre, ocorreu como resultado do comércio legal de equídeos, o surto na Península Ibérica na década de 1980. Isso foi associado à importação de zebra da Namíbia sem aplicação de condições sanitárias apropriadas. A União Européia agora padronizou as condições de importação e outras normativas veterinárias, estando cientes dos riscos associados à importação de espécies exóticas e, portanto, é improvável uma recorrência (MACLACHLAN e GUTHRIE, 2010). Os surtos de AHS ocorreram fora da África, no Oriente Médio, na região mediterrânea da Europa e em partes da Ásia (por exemplo, o subcontinente indiano). Embora todos os surtos, até o momento, tenham sido erradicados, o AHS foi capaz de persistir por anos em algumas

áreas (CFSP, 2015). De acordo com Robin et al. (2016), os efeitos das mudanças climáticas podem alterar a distribuição dos vetores conhecidos do vírus AHS.

Uma das formas de controle é que as informações de suspeita do vírus AHS devem ser fornecidas rapidamente às autoridades veterinárias para conter surtos em regiões livres de AHS. Embora as vacinas estejam disponíveis, a proteção cruzada entre os sorotipos é limitada e a introdução de um novo sorotipo em uma área pode resultar em surtos. Vacinas vivas atenuadas são rotineiramente usadas para controlar a AHS em regiões endêmicas. Vacinas monovalentes ou polivalentes podem ser empregadas, dependendo dos vírus que circulam na região (CFSP, 2015). Assim, os cavalos podem ser transferidos com segurança para regiões livres de AHSV, independentemente do status da região exportadora, mas apenas com rigorosa aderência às práticas apropriadas de teste e quarentena. Não existe tratamento específico para a peste equina, a não ser cuidados preventivos. O tratamento também pode ser necessário para infecções secundárias (CFSP, 2015). Um resumo do plano de prevenção e controle é fornecido por Robin et al. (2016).

2.2.2.4 Oropouche (ORO)

A febre de Oropouche (ORO) é uma doença zoonótica emergente, causada pelo agente etiológico, o vírus Oropouche (OROV) transmitido principalmente por *Culicoides paraensis* (ROMERO-AVAREZ e ESCOBAR, 2018). Este vírus é um arbovírus pertencente ao gênero *Orthobunyavirus*, à família Peribunyaviridae e à ordem Bunyvirales. O OROV foi isolado em 1955, pela primeira vez, do sangue de um trabalhador florestal em Vega de Oropouche, Trinidad e Tobago (ANDERSON et al., 1961). Até o momento, segundo Cardoso et al., (2015), a ocorrência de Oropouche foi detectada na Amazônia brasileira e nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. O último registro dessa doença no Brasil foi em 2017, notificado pelo Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde, por meio de relatório informativo na região próxima à cidade de Salvador, Bahia (CIEVS, 2017).

Esta doença afeta os seres humanos causando febre aguda, semelhante à causada pela dengue, com outros sintomas clínicos comuns. Entre eles, dores de cabeça, dores musculares, dores nas articulações e erupções cutâneas, que podem evoluir para meningite ou encefalite (CARDOSO et al., 2015). O diagnóstico clínico desta doença é difícil. As análises laboratoriais mostraram leucopenia acentuada, mas, em geral, exames de sangue comuns, como o painel metabólico básico, são inconclusivos. A combinação

de sintomas compatíveis mais uma amostra sérica positiva de IgM, detectada pelo ensaio imuno vírus enzimático (ELISA), deve ser considerada positiva para um caso agudo de febre de Oropouche, até que a detecção do vírus possa ser estabelecida. O tratamento é baseado no controle da febre e no alívio da dor, como na dengue aguda, mas em caso de recidiva, o tratamento com Oropouche deve ser repetido (ROMERO-AVAREZ e ESCOBAR, 2018).

As recomendações para o controle de Oropouche feitas pelo CIEVS (2017) foram: comunicação com o Distrito Sanitário residencial local; solicitação de dados de atendimento de casos para as unidades de saúde; identificação do caso notificado; elaboração de questionário de investigação epidemiológica; investigação epidemiológica do caso e busca ativa na área de residência; e entrevista e coleta de amostra de casos suspeitos.

2.2.2.5 Infecção *Elizabethkingia*

Das diversas espécies de insetos *Culicoides*, algumas transmitem patógenos à humanos, sendo necessários estudos detalhados. A infecção por *Elizabethkingia* tem sido reconhecida como a causa de infecções nasocomiais emergentes, sepsse neonatal e infecções em pessoas imunocomprometidas. De acordo com Lau et al. (2016), o diagnóstico mais comum de bacteremia do tipo *Elizabethkingia* foi pneumonia, seguida por bacteremia relacionada ao cateter, meningite neonatal, bacteremia nosocomial e febre neutropênica.

Na Austrália, Mee et al. (2017) relataram que os mosquitos *Culicoides brevitarsis* são capazes de transmitir *Elizabethkingia*. Esses autores destacam que, como os mosquitos *Culicoides* são difundidos e podem ser deslocados a grandes distâncias pelas correntes de vento, o potencial deles transportar a bactéria justifica uma investigação mais aprofundada.

2.2.3 Controle dos *Culicoides*

Os principais métodos de controle dos insetos em geral são mecânico, químico, biológico e genético (BRAVERMAN e CHIZOV-GINZBURG, 1997; GOFFREDO e MEISWINKEL, 2004; PAGE et al., 2009; LEWIS et al., 2014; MEE et al., 2015; MILLS et al., 2015; HARRUP et al., 2016). O método mecânico envolve técnicas ou ferramentas

que dificultam ou inviabilizam o desenvolvimento e sobrevivência dos insetos. Dentre esses podem ser citados as armadilhas em geral que visam capturar os parasitas. As técnicas de manejo do solo, que objetiva a destruição de ovos e outras fases de vida livre, impedindo que os parasitas completem o ciclo de vida.

Com relação aos métodos de controle químicos, podem ser citadas diferentes abordagens. O método mais comum é o emprego de substâncias pesticidas disponíveis no mercado, à exemplo dos piretróides e DEET (Page et al., 2009). Entretanto, existem outras metodologias com grande potencial de controle dos insetos, como as técnicas de ecologia química. Essa última visa interferir na comunicação entre os insetos por meio do uso dos compostos orgânicos voláteis, não se tratando de controle químico e sim de um controle alternativo visando menos prejuízo ao ambiente e aos animais.

O controle biológico, pode ser descrito como uma estratégia de uso de bactérias endossimbiontes. Em pesquisas realizadas por Lewis et al. (2014), observaram que na microbiota dos insetos *Culicoides* foram identificadas algumas bactérias intracelulares como as *Cardinium* e *Wolbachia* juntamente com uma variedade de outras microbiotas. Entretanto, ainda não bem elucidado sobre o papel das bactérias, como a *Wolbachia* ou outro endossimbionte nos *Culicoides*, influenciando sobre o bloqueio viral, a fecundidade, sexo, entre outros. Essas características foram observadas em outros artrópodes infectados por *Wolbachia* que são a base da no controle vetorial (HOFFMANN et al., 2015).

O controle genético, é baseado na aplicação da genômica para o controle dos insetos, ensaios baseados em PCR e sequenciamento Sanger são utilizados para identificar espécies vetores de doenças em programas de vigilância sanitária (HARRUP et al., 2016).

3 CAPÍTULOS

3.1 CAPÍTULO 1. PATENTE

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para

“Armadilhas para captura de maruins (*Culicoides*)”

[001] As armadilhas de luz têm sido amplamente usadas para gerenciar e monitorar as populações de insetos praga, desempenhando um papel crucial no controle físico dos insetos. De forma que, a eficiência do controle integrado de pragas, conhecido como Management Integrated Pest (MIP), tem sido atribuída atualmente, ao monitoramento dos insetos por meio do uso de armadilhas luminosas. Segundo (KIM, K.N., HUANG, Q.Y., LIANG, L. Advances in insect phototaxis and application to pest management: a review. 75: 3135–3143, 2019), a maioria dos insetos de hábitos noturnos exibe fototaxia positiva para luzes artificiais.

[002] Entretanto, durante a coleta de insetos *Culicoides* verificaram-se grandes desafios por ocasião do uso das armadilhas luminosas convencionais, principalmente, devido ao minúsculo tamanho do *Culicoides*. Diante do exposto, um novo projeto de armadilha para *Culicoides* foi delineado visando atender as demandas específicas para a coleta desses insetos praga.

[003] A presente invenção consiste no desenvolvimento de um novo modelo de armadilhas luminosas para uma eficiente coleta de insetos minúsculos, sendo nesse caso, os *Culicoides*. Esse novo modelo é constituído pela junção de tubo PVC, com 10 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento, acoplado um cooler e lâmpada branca, sendo alimentada com energia elétrica (ligada em rede ou bateria). Os materiais utilizados para a fabricação das armadilhas são leves, de fácil acesso, baixo custo, sendo na maioria das vezes, reciclados. A exemplo, do cooler (ventilação) e da rede metálica, os quais são provenientes de material de descarte de computadores. O posicionamento do cooler nessa armadilha (sentido anti-horário) impede que os minúsculos *Culicoides* fujam e, a instalação de uma rede de proteção, evita a entrada de insetos indesejáveis (predadores). Esse novo equipamento, propõe o uso de iluminação ininterrupta de LED autônoma noturna, potência de 13,20 W, para maior poder de atração. Portanto, o funcionamento dessas armadilhas consiste em alto poder de atração (lâmpadas 13,20 W) e condução dos insetos pela ventilação anti-horária produzida pelos coolers até sua porção final (rede coletora).

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[004] Controle e monitoramento de vetores de doenças humanas e veterinárias.

[005] Atração de insetos minúsculos para as armadilhas luminosas, como no caso dos *Culicoides*.

[006] A captura de insetos minúsculos de hábitos crepusculares.

[007] Contenção dos minúsculos insetos dentro das redes coletoras das armadilhas convencionais. Essa dificuldade, se prevalece porque, em virtude de seu minúsculo tamanho, os *Culicoides* são lançados de volta para o ambiente pela própria corrente de ar gerada pelo cooler.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[008] O objeto da invenção poderá ser empregado nos campos das Ciências Agrárias (Agronomia, Veterinária, Zootecnia e áreas afins) e no campo das Ciências da Saúde (Saúde pública e áreas afins).

ESTADO DA TÉCNICA

[009] Pesquisas realizadas recentemente utilizando armadilhas luminosas, para captura de insetos, a partir de dispositivos com iluminação artificial, mostraram que essa ferramenta auxilia significativamente para controle de pragas. Após a realização de pesquisas nas plataformas virtuais de publicação de patentes, Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e LATIPAT, foram encontrados vários registros de dispositivos para captura de insetos. Nessa pesquisa foram encontradas três patentes mais recentes:

[010] **Patente BR 10 2018 013670 4** - Intitulada: Dispositivo para captura de insetos. Esta patente descreve o modelo de um dispositivo capaz de capturar insetos, em especial, insetos do gênero *Aedes*, *Culex*, *Lutzomyia*, entre outros. O sistema é composto de lâmpadas de LEDs, sendo autossustentável, pois utiliza energia solar para alimentar as lâmpadas. Sistema proposto pela Universidade Federal de Minas Gerais.

[011] **Patente BR 10 2018 000671 1**- Intitulada: Dispositivo para captura de insetos constituídos por um copo para captura, e uma estrutura em formato de funil. Estas duas estruturas são removíveis e acopladas entre si mediante encaixes com fita adesiva. A presente invenção é de fácil manuseio, instalação, tendo grande durabilidade, custo

acessível e, como pode ser de vários tamanhos, pode ser facilmente adaptável a qualquer local. Além disso, pode ser usada em ambientes domésticos como casas, apartamentos e comerciais (escritórios, consultórios e hospitais).

[012] **Patente BR 20 2017 018708 5** - Intitulada: Dispositivo repelente a insetos rasteiros. Utiliza um suporte para recipientes, com conteúdo açucarado que pertence ao campo das utilidades domésticas (UD), possuindo um material de entremeio capaz de afugentar insetos rasteiros de toda espécie, mantendo-os à distância.

[013] As patentes existentes utilizam dispositivos luminosos para captura de insetos, entretanto, não eficientes para captura de insetos minúsculos como é o caso dos *Culicoides*. Após exaustiva tentativa de coleta de insetos *Culicoides* com os dispositivos disponíveis, verificou-se que eles não foram eficientes na captura desses insetos. A começar pela ineficiência da iluminação como elemento de atração desses minúsculos insetos. Para isto, identificou-se a necessidade do uso de maior potência na iluminação. Outro aspecto, diz respeito ao movimento dos *Culicoides* após caírem na rede coletora. Dentro da armadilha, o cooler produz uma ventilação que forçava a expulsão dos insetos para fora da armadilha. Nesse caso, o problema foi solucionado, mudando-se a direção da ventilação produzida pelo cooler. Essas armadilhas possuem baixo custo de fabricação, baixo consumo de energia elétrica e podem ser alimentadas por duas fontes de energia, rede elétrica e bateria.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

Tabela 1. Problemas encontrados e soluções propostas.

Problemas	Soluções
Atração de <i>Culicoides</i>	Uso de lâmpadas com forte iluminação
Expulsão dos <i>Culicoides</i> de dentro da armadilha pela corrente de ar produzidas pelo cooler	Mudança do sentido de instalação do cooler e, portanto, mudança no sentido da corrente de ar, impedindo a fuga dos <i>Culicoides</i>
Custo elevado das armadilhas existentes	Armadilha de fácil produção, baixo custo dos materiais, incluindo o aproveitamento de materiais recicláveis
Elevado tamanho das armadilhas existentes	As novas armadilhas são leves e práticas, possibilitando sua locomoção para todos os locais de coleta

Ineficiência na coleta de <i>Culicoides</i>	Proporcionam maior taxa de sucesso durante as buscas dos insetos e, portanto, são eficientes
---	--

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[014] Figura 1- Armadilha luminosa, constituída de um cano de PVC com 15 cm de comprimento, 10 cm de largura, lâmpada de iluminação branca, ventilador do tipo cooler, tela de proteção e rede de coleta na porção final. As armadilhas são alimentadas por rede elétrica ou bateria, utilizando carregadores portáteis convencionais para o funcionamento.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[015] As armadilhas luminosas, já são conhecidas e usadas por muitos pesquisadores, com o objetivo de identificar e capturar insetos.

[016] A presente invenção é uma armadilha luminosa fabricada com tubo PVC, com diâmetro menor que as armadilhas convencionais. O sistema de ventilação é realizado pela utilização de coolers (material de reciclagem: descarte de peças de computadores em desuso). Nesse invento, a ventilação possui sentido inverso ao das demais armadilhas. O sentido do vento é para baixo, evitando que os insetos capturados retornem ao ambiente de origem. Possuem um sistema de alimentação, para gerar energia para as lâmpadas e cooler, a base de rede elétrica, ou utilizando baterias. O sistema foi feito utilizando “jacarés”, um positivo e outro negativo, na porção final é conectado um carregador de celular e ligado à rede elétrica. Se no local de uso da armadilha, tiver ausência de energia elétrica, a mesma pode ser conectada a baterias de carro, ou motos. O comprimento total da armadilha é de 15 cm, portanto, possui um fácil manuseio, facilitando o deslocamento para os mais variados locais de coleta. Na porção final da armadilha é colocada uma rede de coleta, geralmente fabricada em Voal, para evitar a fuga dos insetos.

[017] As armadilhas luminosas são utilizadas de acordo com os hábitos dos insetos em estudo, na maioria das vezes são programadas para serem usadas por 12 horas, devido ao hábito crepuscular dos insetos. Normalmente, os insetos capturados que ficam nas redes de coleta, são insetos vetores de doenças em animais e humanos, portanto, sua utilização é bastante importante.

[018] Devido estas características, de importância e viabilidade, a utilização de uma armadilha prática, leve e de baixo custo de fabricação, vem de encontro com a

necessidade das pesquisas, as quais visam a captura e estudo de insetos de tamanho minúsculo, como é o caso dos *Culicoides*.

RESULTADOS OBTIDOS

[019] A iniciativa de desenvolvimento do objeto do invento foi decorrente do insucesso de várias expedições para capturar *Culicoides* com o uso de armadilhas luminosas existentes no mercado. De posse do novo dispositivo de captura de insetos, entre os meses de janeiro e agosto de 2019, foram realizadas 41 expedições (Tabela 1) à campo, com o objetivo de capturar *Culicoides*.

[020] A nova armadilha, com o aparato de iluminação de LED com 13,2 W, atraía os *Culicoides* com mais eficiência. Após a entrada na armadilha, a corrente de ar produzida pelo cooler no sentido horário impedia a volta dos insetos e esses permaneciam presos na porção final, conectada com a rede de coleta.

[021] Tabela 2. Número de *Culicoides* capturados de acordo com a data e município no Estado de Alagoas, Brasil.

Data	Município/Estado	Nº de insetos
30.01.19	Satuba/AL	3
31.01.19	Satuba/AL	3
05.02.19	Satuba//AL	3
06.02.19	Satuba/AL	0
13.02.19	Satuba/AL	1
14.02.19	Satuba/AL	0
15.02.19	Satuba/AL	10
16.02.19	Satuba/AL	0
17.02.19	Satuba/AL	0
18.02.19	Satuba/AL	7
19.02.19	Satuba/AL	4
20.02.19	Satuba/AL	5
06.06.19	Satuba/AL	5
21.06.19	Satuba/AL	1
22.06.19	Satuba/AL	4
24.06.19	Satuba/AL	17
25.06.19	Satuba/AL	12
26.06.19	Satuba/AL	14
27.06.19	Satuba/AL	19
28.06.19	Satuba/AL	3
29.06.19	Satuba/AL	3
30.06.19	Satuba/AL	12
02.07.19	Satuba/AL	8
03.07.19	Satuba/AL	28
04.07.19	Satuba/AL	14
07.07.19	Satuba/AL	31
08.07.19	Satuba/AL	34
07.07.19	Satuba/AL	31
09.07.19	Satuba/AL	36
12.07.19	Satuba/AL	16
13.07.19	Satuba/AL	3
14.07.19	Satuba/AL	2

16.07.19	Satuba/AL	5
27.07.19	Satuba/AL	16
30.07.19	Satuba/AL	12
31.07.19	Satuba/AL	4
07.08.19	Satuba/AL	73
11.08.19	Satuba/AL	20
12.08.19	Satuba/AL	30
13.08.19	Satuba/AL	10
14.08.19	Satuba/AL	23
09.08.19	Satuba/AL	227

VANTAGENS DA PATENTE

[022] O objeto de invento é fabricado com materiais de baixo custo e materiais de reciclagem oriundos do descarte de computadores e pedaços de sobras de canos PVC. A fabricação é simples, sendo fácil a sua replicação. É um instrumento de trabalho leve, podendo ser transportado facilmente para o campo e lugares de difícil acesso durante a coleta. É versátil quanto à alimentação elétrica, pois onde não existe disponibilidade de rede elétrica pode ser alimentada por bateria.

[023] Quanto ao funcionamento, tem maior poder de atração de insetos minúsculos em virtude do uso de lâmpadas de LED por todo o período noturno. Após a entrada dos Culicoides na armadilha, o sistema de ventilação horário do cooler força a permanência dos insetos no fundo da armadilha e eles ficam presos na rede coletora de Voal.

REIVINDICAÇÕES

1. EQUIPAMENTO PARA CAPTURA DE *CULICOIDES*, **caracterizado por** ser constituído de tubo PVC com 15 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro, com iluminação branca, alimentado por energia elétrica (rede ou bateria).

2. EQUIPAMENTO PARA CAPTURA DE *CULICOIDES*, conforme a reivindicação 1, **caracterizado por** possuir um sistema de ventilação, utilizando coolers com material reciclado oriundo de descarte de peças de computadores em desuso.

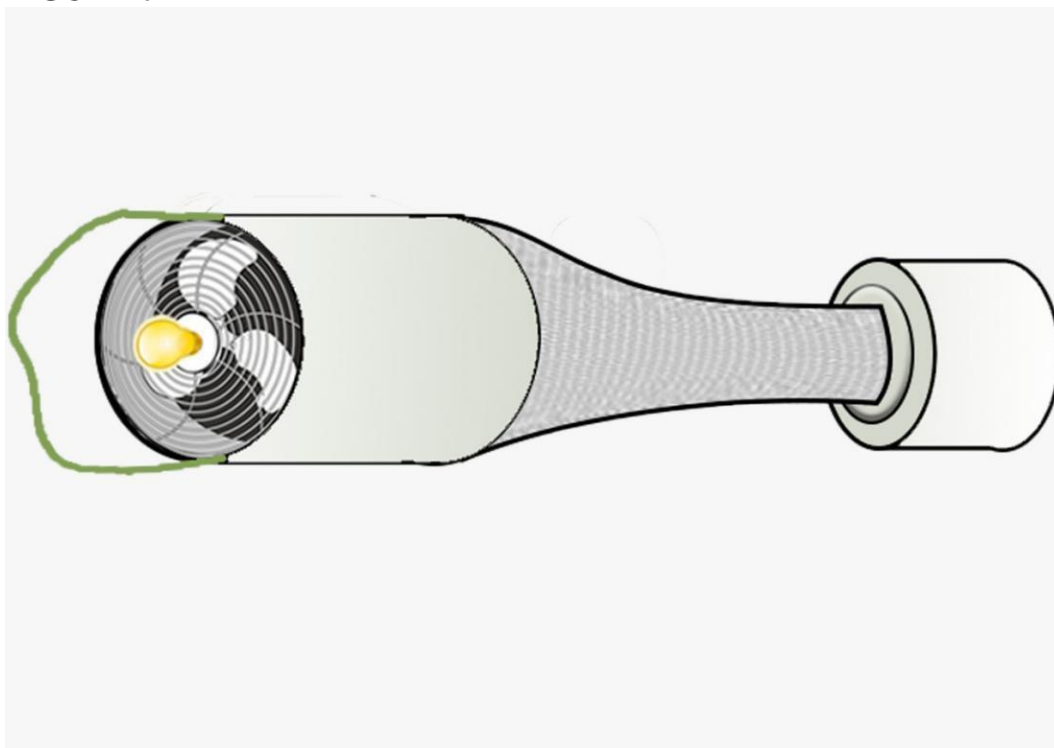
3. EQUIPAMENTO PARA CAPTURA DE *CULICOIDES*, conforme a reivindicação 2, **caracterizado por** possuir uma ventilação inversa, evitando que os insetos retornem da última porção da armadilha, situada a rede de coleta.

4. EQUIPAMENTO PARA CAPTURA DE *CULICOIDES*, **caracterizado por** ser leve, feito de material plástico, facilitando seu deslocamento e com fácil manuseio e fabricação.

5. EQUIPAMENTO PARA CAPTURA DE *CULICOIDES*, **caracterizado por** pelo sistema de carregamento ser compatível para o uso de rede elétrica, ou na ausência da mesma, poder utilizar baterias portáteis.

DESENHOS

FIGURA 01



RESUMO

Armadilhas para captura de maruins (*Culicoides*)

O invento objetiva a captura de insetos *Culicoides* para dar subsídios às pesquisas, controle e monitoramento de doenças humanas e veterinárias. Foi desenvolvido para solucionar o desafio da coleta de insetos minúsculos, com hábitos crepusculares, como os *Culicoides*. É constituído por uma armadilha, conectada à uma fonte de iluminação autônoma, com demandas específicas para o sucesso da coleta desses insetos. A contenção de minúsculos insetos dentro das redes coletoras das armadilhas convencionais têm sido um entrave para a realização de pesquisas e monitoramento dessa praga. Essa dificuldade, se prevalece porque, em virtude de seu minúsculo tamanho, os *Culicoides* são lançados de volta para o ambiente pela própria corrente de ar gerada pelo cooler. O desenvolvimento da invenção foi direcionado para essa dificuldade também, dentre outras. A atração desses insetos para as armadilhas luminosas também se constitui em dificuldades para capturar os *Culicoides*, sendo outra vantagem do novo invento, o qual também traz mecanismos capazes de resolver essa questão.

**3.2 CAPÍTULO 2. NOTA CIENTÍFICA – SUBMETIDO A REVISTA INSECTS
(A2)**

***Culicoides insignis* Lutz, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in
northeast of Brazil**

Raisa Rodrigues Santos Rios¹, Breno Araújo de Melo¹, Sybelle Georgia Mesquita da Silva¹, Neuriane Cavalcante da Silva², Vitória Regina Viana dos Santos², Jakeline Maria dos Santos², Antônio Euzébio Goulart Santana² and Angelina Bossi Fraga^{2*}

¹Northeast network of biotechnology - RENORBIO, Federal University of Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro dos Martins, Maceió, 57072-900, Alagoas, Brazil

²Agrarian Science Center, Federal University of Alagoas, BR-104, Mata do Rolo, Rio Largo, 57100-000, Alagoas, Brazil

*Correspondence: Angelina Bossi Fraga, Agrarian Science Center, Federal University of Alagoas, 57.100-000, Rio Largo, Brazil. E-mail: angelina.fraga@gmail.com

Abstract: The most of species the *Culicoides* genus is hematophagous dipterous, being vectors of important humans and animal disease. These insects are spread in almost all the regions of the world varying the species according to specific local. The knowledge of geography distribution of these different species is crucial for the development of control strategies. The aim of this work was to investigate of *Culicoides* occurrence in Alagoas State, northeast of Brazil. Using light traps, 741 *Culicoides* were captured. The identification of the insects as *Culicoides insignis* was realized by Laboratory of Dipterous, Institute Oswaldo Cruz, in Rio de Janeiro, Brazil. After the extraction of ADN, PCR analysis, sequencing and comparison with Genbank database, the samples captured was confirmed to belong to the *Culicoides* genus and species *insignis*. This was the first formal report of *C. insignis* occurrence in Alagoas State, Brazil northeast.

Keywords: *Culicoides*, Hematophagous insects, Light traps

INTRODUCTION

The *Culicoides* Latreille genus, 1809 insects are dipterous, belonging to the Arthropoda phylum, Insecta class, Ceratopogonidae family. These dipterous are the most important and the smallest hematophagous insects of this family. The most of them are vectors of diseases in humans: Oropouche [1]; and animals: Bluetongue [2], Schmallenberg [3], and African Horse Sickness [4]. These insects are spread in almost all parts of the world, being reported in American, Africa and Europe [5], Argentina [6], South American [7,8,9], Italy [10], Asian, Australian and American [11]. In Brazil, the *Culicoides* were related by [12,13,14]. The impact of these insects in public health, as important diseases vector, was highlight by [15] revealing the nearest associated of *C. imicola* population with Bluetongue epizootic. [16] emphasize the update of *Culicoides* occurrence and distribution is important to development of risk profiles of the transmitted diseases. This work aimed to investigate the occurrence of the *Culicoides* in the Alagoas State, Brazil northeast.

MATERIALS AND METHODS

Using light traps, 741 *Culicoides* were collected in the Alagoas State, Brazil northeast (09°33'48" E and 35°49'28" W), from April/2018 to December/2019. The insects were immersed in alcohol solution 70%, taken to laboratory, and washed in distilled water for the preparation blades morphological. The wings of four insects were separated and affixed in blades with 1 drop of phenol. The remainder of their body was immersed in a potassium solution 10% (KOH) for 10 min, and washed with distilled water. So, the insects were held in the Petri dish with phenol to dissection and blade assembly, putting the slide overlapping to preserve the material. Each of these blades contained an insect body part, in separated, fixated in Hoyer solution. After the drying for 12 hours, the images (conventional microscopy) was sent to Laboratory of Dipterous, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil to identification. After that, the genetic material of *Culicoides*, extracted of 10 whole macerate insects, was sent for ADN analysis. This material was placed in Eppendorf of 1.5 mL, containing 100 µL of Chelex 6% (dissolved in H₂O), agitated in vortex and centrifuged at 5°C, until to reach 13,000 rpm. Following centrifugation, it was incubated in a water bath at 57°C for 15 minutes agitated in vortex and centrifugated at 5°C, until to reach 13,000 rpm. After, the material

was incubated in a water bath at 99°C for 8 minutes, agitated again, and centrifugated at 5°C and 13,000 rpm by 5 minutes. The intermediary phase of this solution was extracted and conserved in freezer at -20°C. The genic region COI (Cytochrome Oxidase I) was amplify using primer LCO1490 and the reverse HCO2198. The amplification by electrophorese in agarose gel at 1.2% was verified, after the addition of mixture containing 5 µL of sample with 2 µL of bromofenol blue on amplification dish. These sample have sent to Humanizing Genomics Macrogen, Seoul, South Korea, for ADN sequencing. After the sequencing, the software Codon Code® was used to clearing and alignment, and after the alignment concluded, the identification of species was confirmed by the comparison with the dataset GenBank [17].

RESULTS AND DISCUSSION

The results of laboratory analyses of identification confirmed the classification as to the genus *Culicoides* and the species *C. insignis* Lutz, 1913 (Figures 1 and 2), being this study, the first formal relate of occurrence this insect in Alagoas State, Brazil. According to [14], until the year of 2016, the *Culicoides* have been identified on almost all the Brazilian states, except of Alagoas, Tocantins, Rio Grande Norte, Sergipe and Distrito Federal states. The amount of genetic material used in the ADN extraction protocol was enough to perform the PCR analysis. The method used in PCR was enough for amplification of ADN, confirmed by the results of electrophoresis. The genomic sequence comparison obtained with the database of sequencing available on GenBank, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and the barcode database (BOLD) interface [17], showed similarity greater than 90%.



Fig. 1. Wing *Culicoides insignis*, and female *Culicoides insignis*



Fig. 2. *Culicoides insignis* Lutz, 1913 insects in alcohol 70% solution

CONCLUSION

This was the first formal report of *Culicoides insignis* occurrence in Alagoas State, Brazil northeast.

Acknowledgments

The authors thank the Research Support Foundation from the State of Alagoas - FAPEAL and Coordination of Improvement of Higher-Level Personnel - CAPES for its financial assistance in carrying out this research.

Author contributions

RRSR, AEGS, ABF developed the study, RRSR, NCS, VRVS, JMS, BAM, SGMS collected data, RRSR, NCS, VRVS, JMS, BAM, SGMS performed all analyses, and RRSR, ABF led manuscript preparation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Nunes, M.R.T., Martins, L.C., Rodrigues, S.G., Chiang, J.O., Azevedo, R.S. S., Travassos da Rosa, A.P.A. & Vasconcelos, P.F.C. Oropouche Virus Isolation, Southeast Brazil. *Emerging Infect Dis.* **2005**, 11, 1610-1613.

2. Walker, A.R. & Davies, F.G. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Kenya. *J Hyg.* **1971**, 69, 47–60.
3. Hoffmann, B., Scheuch, M., Hoper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., Eschbaumer, M., V. Goller, K., Wernike, K., Fischer, M., Breithaupt, A., C. Mettenleiter, T. & Beer, M. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerging Infect Dis.* **2012**, 18, 469-472.
4. Henning, M.W. African horsesickness, perdesiekte, pestis equorum. *Animal diseases of South Africa*. 3th ed.; Central News Agency Ltd., Pretoria, 1956; pp. 785-808.
5. Mellor, P.S., Boorman, J. & Baylis, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **2000**, 45, 307-340.
6. Veggiani Aybar, C.A., Juri, M.J.D., Santana, M., Grosso, M.S.L., Spinelli, G.R. New records of Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) for the Yungas and Chaco ecorregions of Argentina. *Fla. Entomol.* **2012**, 95, 808–809.
7. Felipe-Bauer, M.L., Sternheim, U.S. *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae) infestations in cities of the Itapocú River Valley, Southern Brazil. *Entomol. News.* **2008**, 119, 185–192.
8. Carpenter, S., Groschup, M.H., Garros, C., Felipe-Bauer, M.L., Purse, B.V. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res.* **2013**, 100, 102–113.
9. Legisa, D., Gonzalez, F., De Stefano, G., Pereda, A., Dus Santos, M. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. *J. Gen. Virol.* **2013**, 94, 652–662.
10. Mardulyn, P., Goffredo, M., Conte, A., Hendrickx, G., Meiswinkel, R., Balenghien, T., Sghaier, S., Lohr, Y., Gilbert, M. Climate change and the spread of vector-borne diseases: using approximate Bayesian computation to compare invasion scenarios for the bluetongue virus vector *Culicoides imicola* in Italy. *Mol. Ecol.* **2013**, 22, 2456–2466.
11. Samy, A.M. & Peterson, A.T. Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of Bluetongue Virus. *PLoS One* **2016**, 11, 1-12.
12. Costa, J.C., Lorosa, E.S., Moraes, J.L.P. & Rebelo, J.M.M. Espécies de Culicoides (Diptera; Ceratopogonidae) e hospedeiros potenciais em área de ecoturismo do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* **2013**, 4 (3), 11-19.
13. Oliveira, C.A., Silva, A.O.F., Cerqueira, V.D., Scofield, A., Almeida, M.B., Riet-Correa, F., Felipe-Bauer, M. L. & Riet-Correa, G. Allergic dermatitis caused by *Culicoides* in Texel sheep in the state of Pará, Brazil. *Pesqui Vet Bras.* **2017**, 37, 301-306.

14. Santarém, M.C.A. & Felipe-Bauer, M.L. Brazilian species of biting midges, **2018** [accessed 2020 February 23].
http://www.fiocruz.br/ioc/media/especies_maruins_brasil_2018_publicacoes.pdf.
15. Tatem, A.J., Baylis, M., Mellor, P.S. Purse, B.V., Capela, R., Pena, I. & Rogers, D.J. Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and north Africa using satellite imagery. *Vet. Microbiol.* **2003**, 97, 13-29.
16. Veggiani Aybar, C.A., Gómez, R.D., Juri, M.J.D., Grosso, M.S. L. & Spinelli, G.R. Potential Distribution Map of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae), Vector of Bluetongue Virus, in Northwestern Argentina. *J Insect Sci.* **2016**, 16 (1), 1-7.
17. Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes.* **2007**, 7, 355–364.

3.2 CAPÍTULO 3. ARTIGO DE REVISÃO- SUBMETIDO AO PERIÓDICO: VETERINÁRIA ITALIANA (A4)

Culicoides insects: A threat to human and animal health

Raisa Rodrigues Santos Rios^a, Breno Araujo de Melo^a, Sybelle Georgia Mesquita da Silva^a, Neuriane Cavalcante da Silva^b, Vitória Regina Viana dos Santos^b, Antônio Euzébio Goulart Santana^b, Angelina Bossi Fraga^b

^aRede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)/Universidade Federal de Alagoas, Brazil; ^bCentro de Ciência Agrárias/ Universidade Federal de Alagoas, Brazil

Abstract

Culicoides biting midges are tiny hematophagous insects, widely disseminated in the world, and transmit a great number of important pathogens affecting human, and domestic and wild animal. These pathogens cause several diseases of concern for public health and animal health causing a great economic impacts and damage to social development. There are some techniques available of *Culicoides* control. Some of them are the light traps, the chemical compounds, the biological and genetic control. The outbreaks of disease, which etiological agents are transmitted by *Culicoides*, in general occur in favorable region for these insect's development. This make important this insect control for indirect control of disease. In this review, an attempt has been made to present information about the taxonomic classification, lifecycle, human and animal health damage, and occurrence area to provide updates, predict risks, and support new guidelines for *Culicoides* insects control.

Keyword: Bluetongue, Diptera, Hematophagous insects, Ruminant parasite

1. Introduction

The insect genus *Culicoides* Latreille, 1809, belongs to the family Ceratopogonidae in the order Diptera, and its species are widespread and found in almost part of the world. These dipterans are the smallest and the most important hematophagous insects in this family. Females of *Culicoides* species, through their bites, transmit the causative agents of important veterinary diseases, including Bluetongue (Du Toit, 1944), Schmallenberg (Hoffmann et al., 2012), and African Horse Sickness (Henning, 1956), as well as the causative agents of human diseases, such as Oropouche (Nunes et al., 2005) and *Elizabethkingia* infection (Mee et al., 2017). Furthermore, they also transmit Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD), Equine Encephalosis (EE), Akabane (AKA), Bovine Ephemeral Fever (BEF), Mellor (2000). The main symptoms of these diseases include edema, fever, and ulceration, among others (Sperlova and Zendulkova, 2011). These diseases have important economic impacts, causing a lot of damage to economic and social development.

Currently, there are some techniques available of *Culicoides* control to attempt of reduce or extinguish the prejudice caused by this pest. Amongst them, the light traps to catch insects (Goffredo and Meiswinkel, 2004), and the chemical compounds in trap for repel *Culicoides* (Braverman and Chizov-ginzburg, 1997; Page et al., 2009). As a biological control example, the *Cardinium* and *Wolbachia* bacteria also was investigated to control these insects (Lewis et al., 2014; Mee et al., 2015). Also, genetic control strategies are studying using techniques for *Culicoides* combat (Mills et al., 2015). However, despite these control practices of *Culicoides*, many factors may be involved in the occurrence of disease caused by the vectors transmitted for them, therefore limiting potentially their effectiveness.

The outbreaks of disease, which etiological agents are transmitted by *Culicoides*, in general occur in favorable region for these insect's development (Acevedo et al., 2016). The prevalence these diseases, occur seasonally and in warm climates, and are relationship with the edaphoclimatic factors that contribute insect survival, such as temperature, humidity and soil characteristics.

In this review, an attempt has been made to present information about the taxonomic classification, lifecycle, human and animal health damage, and occurrence area to provide updates, predict risks, and support new guidelines for *Culicoides* insects control.

2. *Culicoides*: Taxonomic classification, lifecycles, and behavior

The genus *Culicoides* belongs to order Diptera and family Ceratopogonidae. This genus includes 1300 species classified in 32 subgenera and 38 unclassified species. However, Augot et al. (2017) using molecular markers techniques showed that *Culicoides* classification needs to be revisited with modern tools. These authors suggested that the integrative taxonomy (including morphological, mitochondrial and other markers) and modern morphometric analysis (based on wing characteristics including type specimens) can help to clarify the taxonomy classification. These authors, revealed the subgenera *Monoculicoides*, *Culicoides*, *Haematomyidium*, *Hoffmania*, *Remmia* and *Avaritia* were monophyletic, whereas the subgenus *Oecaeta* was paraphyletic.

These dipterans are known for their small size, measuring approximately 1.5 to 5 mm in length, and for having crepuscular (more active at twilight) habits. The head faces downward (ventrally), with a rounded back part, and bears long and segmented antennae. The antennae are important for sex identification, as in female insects they have a hairy

appearance, while in male insects they are feathery. The chest (thorax) region is slightly arched, without hairs or scales.

Generally, the wings of species of *Culicoides* flies have spots, which aid in species identification. The male's wings are narrower and thinner, with less obvious spots, than those of the female. Females lay eggs in humid places that are rich in organic matter, which is considered to be a fundamental environmental feature for the development of these insects' immature phase. After mating, females need to obtain a blood meal, which is essential for the maturation and development of the eggs. The period from mating to oviposition is called the pre-ovulation period. The females lay cylindrical or banana-shaped eggs in several sites (Purse et al., 2005).

The period from egg laying to larval hatching is called the egg incubation period and lasts from two to eight days under favorable temperatures and environmental conditions. The immature aquatic phase comprises four larval stages. These larvae move around constantly in a sinuous manner and feed on decaying plant material. The larval development period has a duration of 21 days on average (in warm regions) and can be extended to up to seven months (in temperate regions). Pupae are found on the surface or at the water's edge and also exhibit mobility, although they are less active than the larvae. This phase lasts approximately three to 10 days, and then the adult flies emerge, which are then able to initiate reproductive activity and restart the lifecycle (Purse et al., 2005).

Meteorological and geographic parameters are the main factors impacting *Culicoides* propagation (Carpenter et al., 2009). Rain can promote such insect activities as mating, among others. Some studies have pointed out that soil moisture can be important in regulating the growth and activity of these insects. In temperate regions, the populations of *Culicoides* species decline after very hot and dry summers or very cold winters (Wittman and Baylis, 2000). On hot days, the adult insects become more active

than on colder days, and their reproduction is inhibited by very low temperatures (Sellers and Mellor, 1993).

3. Diseases transmitted by *Culicoides*

3.1. Bluetongue

Bluetongue (BT) is a viral and non-contagious disease, caused by a virus of the genus *Orbivirus*, belonging to the family Reoviridae, being transmitted to all ruminants, including domestic and some wild animals. There are 27 recognized viral serotypes of the Bluetongue. The three last of them, 25th, 26th and 27th, were identified by (Hofmann et al., 2008) in goats, (Maan et al., 2011) in goats and sheep, and (Zientara et al., 2014) in goats, respectively. Each one of these serotypes can have different virulence and mortality rates.

The main clinical signs of BT disease in sheep are fever, hemorrhages and ulcerations of the oral and nasal tissue, excessive salivation, nasal discharge and swelling of lips and tongue, lameness, weakness, depression, weight loss, 'blue' tongue as a result of cyanosis (rare), abort, partial or complete loss of wool. The appearance of clinical signs in cattle will depend on the strain of virus, and other domestic ruminants, such as goats, generally show few or no clinical signs. The diagnosis of BT requires the typical clinical signs, prevalence of insect vectors and particularly in areas where the disease is endemic (OIE, 2020).

Regarding to economic losses due to bluetongue, the costs estimate consider the direct losses, such as death, abortion, weight loss, reduced milk production, and reduced meat production efficiency, as well as indirect losses, such as restrictions to the export of live animals, semen, and some other products (Sperlova and Zendulkova, 2011). The

Europe Union funding for the control and eradication BT had amounted to € 92,007,724 in 2002. In period from 2005 to 2009, the 23 Member States of Europe Union have benefited, which values varying between them, depending on whether vaccination, as well as the size of the ruminant population of each of them. The recipients of the largest amounts of funding were: Spain (€30,546,721), France (€27,668,316), Germany (€10,187,305), Italy (€5,257,443), Belgium (€4,435,105), and Portugal (€3,688,087), (SANCO, 2011). Bluetongue is one of the main concerns in animal health, being studied in order to clarify its epidemiology, pathogenesis and to control its spreading (Acevedo et al., 2016).

This disease occurs most commonly in tropical, subtropical, and temperate countries, where there are favorable conditions for *Culicoides* vector propagation (Purse et al., 2005). So, the central role of flying insects in bluetongue epidemiology, means that the prevalence of the disease is governed by ecological factors that favors insect survival. Bluetongue outbreaks generally occur seasonally and in warm climates. This disease has a wide geographic distribution due to the high adaptability of its vectors to varying climatic conditions (Sanco, 2011).

It is important highlight that live animal trade and globalization could also have facilitated the introduction of the BT virus through the export of viremic cattle to new places, where the local vector population could have then spread the virus and led to subsequent BT outbreaks. BT is a commonly cited example of a disease with a distribution believed to have recently expanded in response to global warming. The BT virus is transmitted to animals by biting midges in the genus *Culicoides*, and it has been hypothesized that the emergence of BT in Mediterranean Europe was a consequence of the recent colonization of the region by *Culicoides imicola*, which has been linked to climate change (Mardulyn et al., 2013).

Since 2000, the Europe Union commanded measures for the establishment of protection and surveillance zones, aiming the combat of bluetongue. There are some available BT control techniques, such as serological and virological monitoring, entomological monitoring by capturing midges through special traps, and vaccination specific for each circulating serotype, (Sanco, 2011). Also, the prevention of Bluetongue in the livestock requires the quarantine of animals and serological diagnosis. In case the disease confirmation in the animals, these should be sacrificed. The culling of infected animals is indispensable to avoiding the spread of the disease, although entails a great economic loss for farmers.

3.2. Schmallenberg

At the end of 2011 a new viral disease in ruminant called Schmallenberg (SB) was reported in Germany and Netherlands. The virus causing this disease belongs to the genus *Orthobunyavirus* within the family Bunyaviridae, and infection with this virus is characterized by a few days initial of viremia. Animals with SB can develop fever, reduced milk yield, diarrhea, fetal malformation, and stillbirths (Hoffmann et al., 2012). Diagnostic procedures for the detection of SB infections included: real-time reverse transcriptase (RT)-PCR; neutralization tests and indirect immunofluorescence assays; and SBV antibody ELISAs allowing mass screening (Corin et al., 2012).

Economic losses due to SB in livestock production at the farm level are malformed congenital, milk yield reduction, return to service rates, dystocia, and nervous symptoms in offspring. Outbreaks of SB had a major impact on international trade of susceptible animals and animal products such as semen and embryos. Regarding to occurrence, in 2012 was revealed the spread of SB epidemic showing the confirmed cases in Europe affecting cattle, goat and sheep. The countries affected were France, Belgium, The

Netherlands, Luxembourg, UK, Italy, Spain, Denmark, Switzerland and Germany. Veterinary diagnostics in Europe has proved to be prepared for this kind of outbreak situation, and it has been shown that there is a very effective network of institutions working on epizootic diseases within the EU. Strategies to improve veterinary and public health protection with regard to emerging pathogens have focused on improvements in monitoring and surveillance to allow the detection of new or unexpected diseases. Strengthening the concept of syndromic surveillance may be a possible approach to achieve this goal (Beer et al., 2013).

3.3. African Horse Sickness

The earliest historical reference to disease resembling African Horse Sickness (AHS) was reported in Yemen in 1327 (Henning, 1956). AHS is a non-zoonotic, a non-contagious disease, insect-transmitted disease of equids caused by AHS virus. Currently, AHS virus (AHSV) is only endemic in Africa, however, can exist outside this area, and infected animals or vectors may carry the virus into AHS-free regions (Cfsp, 2015). Nine serotypes of AHS are recognized (Howell, 1962).

Like BT, AHS virus is biologically transmitted by *Culicoides* spp. (Meiswinkel et al., 2000; Cfsp, 2015). Also, mosquitoes have been implicated as possible biological vectors, and biting flies (*Stomoxys* and *Tabanus*) may be able to transmit the virus mechanically. Other arthropods might also be capable of transmitting AHS virus. There are four different symptoms forms of AHS: the peracute (pulmonary), the subacute edematous (cardiac), the acute (mixed), and AHS fever. Sudden death can also occur without preceding signs (Cfsp, 2015). In horses, the disease is usually acute, and after they have become weakened by the disease, and more than 90% of the affected animals

die. Mules are less susceptible to AHS than horses and donkeys, and zebras rarely show clinical signs of the disease (Zientara et al., 2015).

The diagnosis of AHS can be made by clinical evolution, post-mortem examination, epidemiological factors (seasonal abundance of vectors) and laboratory diagnosis will allow for refinement of diagnostic hypotheses (Zientara et al., 2015). According to Cfsp (2015), the diagnosis by virological methods, should be used to diagnose an outbreak. AHS virus can be isolated from the blood of live animals, or from tissue samples, especially spleen, lung and lymph nodes, collected at necropsy. The isolate should be serotyped using virus neutralization or other methods, to allow the selection of an appropriate vaccine strain. AHS virus antigens can be detected in the blood and tissues (e.g., spleen) with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Also, serology test can be used to diagnose this disease, with antibodies usually detected within 8 to 14 days after infection.

The disease has a seasonal occurrence and its prevalence is influenced by climatic and other conditions that favour the breeding of *Culicoides* spp. Although, other insects have been suggested as possible vectors of AHS. The only recorded introduction of AHS from an enzootic to a free region that occurred as the result of legal trade in equids was the outbreak on the Iberian Peninsula in the 1980s. This was associated with import of zebra from Namibia without application of appropriate sanitary conditions. The European Union has now harmonized import conditions and other veterinary administrations are acutely aware of risks associated with import of exotic species and, therefore a reoccurrence is unlikely (Maclachlan and Guthrie, 2010). AHS outbreaks have occurred outside Africa in the Middle East, the Mediterranean region of Europe and parts of Asia (e.g., the Indian subcontinent). Although all outbreaks, to date, were eventually eradicated, AHS was able to persist for years in some areas (Cfsp, 2015). The effects of

climate change may alter the distribution of the known vectors of AHS virus (Robin et al., 2016).

As a control procedure, the quick information of suspicion of the AHS virus should be made to veterinary authorities to containing outbreaks in AHS-free regions. Although vaccines are available, cross-protection between serotypes is limited, and the introduction of a new serotype into an area may result in outbreaks. Live attenuated vaccines (monovalent or polyvalent) are used to control AHS in endemic regions. Horses can safely be moved into AHSV-free regions regardless, but only with adherence to testing and quarantine practices. Thus, there is no specific treatment for AHS, other than supportive care, and treatment may also be needed for secondary infections. (Cfsp, 2015). A summary of prevention and control plan is provided by Robin et al. (2016).

3.4. Oropouche

Oropouche fever (ORO) is an emerging zoonotic disease, caused by the etiological agent, Oropouche virus (OROV) transmitted mainly by *Culicoides paraensis* (ROMERO-AVAREZ and ESCOBAR, 2018). This virus is an arbovirus belonging of *Orthobunyavirus* genus, Peribunyaviridae family and Bunyavirales order. The OROV was isolated in 1955, for the first time, from the blood of a forest worker in Vega de Oropouche, Trinidad and Tobago (Anderson et al., 1961). To date, according to Cardoso et al., (2015), the Oropouche occurrence was detected in Brazilian Amazon, and the Northern, Southeast and Central-West regions of Brazil. The last register of this disease in Brazil was in 2017, notified by Health Surveillance Strategic Information Center through informative report at the region near Salvador city, Bahia (Cievs, 2017).

This disease affects humans by causing an acute fever, similar to that caused by dengue, with other common clinical symptoms. Among them, headache, muscle aches, joint pain, and rashes, which can then progress to meningitis or encephalitis (Cardoso et al., 2015). Clinical diagnosis this disease is difficult. The laboratory analyses have shown marked leukopenia, but in general, common blood tests, such as the basic metabolic panel are inconclusive. The combination of compatible symptoms plus one positive serum sample of IgM, detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), should be considered positive for an acute Oropouche fever case, until virus detection can be established. The treatment is based on fever management and pain relief, as in acute Dengue fever, but in case of relapse episodes the treatment of Oropouche should be repeated (Romero-Avarez and Escobar, 2018).

The recommendations for Oropouche control made by Cievs (2017) were: communication with the local residential Sanitary District; request for case care data for the health units; identification of the notified case; elaboration of an epidemiological investigation questionnaire; epidemiological investigation of the case and active search in the area of residence; and interview and sample collection of suspected cases.

3.5. *Elizabethkingia* infections

Of the many diverse *Culicoides* midge species, some transmit human pathogens, which detailed study are need. The *Elizabethkingia* infection have been recognized as the cause of emerging nosocomial infections, neonatal sepsis, and infections in immunocompromised persons. According to Lau et al. (2016), the most common diagnosis of *Elizabethkingia* like bacteremia was pneumonia, followed by catheter-related bacteremia, neonatal meningitis, nosocomial bacteremia, and neutropenic fever.

In Australia, Mee et al. (2017) related that *Culicoides brevitarsis* midges are capable to transmit *Elizabethkingia*. These authors highlight that, because *Culicoides* midges are widespread and can be displaced great distances by wind currents, the potential for them to transport the bacterium warrants further investigation.

4. Control

Currently, there are several methodologies attempt to control *Culicoides*. These approaches can be classified in four methods: mechanical, chemical, biological, and genetic (Harrup et al., 2016). Mechanical control involves techniques or tools that inhibit or hinder the development and survival of insects, such as traps that aim to capture parasites. In addition, soil management techniques aim at destroying eggs and other phases of free life, preventing parasites' life cycle.

Light traps are the standard sampling method for collecting *Culicoides* midges when conducting epidemiological investigations and much of the evidence supporting the vector roles of certain *Culicoides* species is based on associations between disease occurrence and species abundance as measured by light trapping (Carpenter et al., 2008). In this case, the captured insects must be counted and carefully examined, using their morphological traits to identify them to the genus level. This identification should be fast and accurate in the surveilled areas (Goffredo and Meiswinkel, 2004). The alternate methods including CO²-baited traps and aspiration from hosts require further investigation (Scheffer et al., 2012).

Chemical control is involved in different methods, the most common of which is the use of pesticides on the market to kill pests. However, there are other chemical approaches with great potential for controlling insect populations, such as chemical

ecology techniques. These techniques recommend intervention in communication between insects using volatile organic compounds. The use of endosymbiotic bacteria, when present in *Culicoides*, has been investigated as a potential control of these (Lewis et al., 2014; Mee et al., 2015).

5. *Culicoides* occurrence and factors affecting this occurrence

Culicoides spp. inhabit almost all regions of the planet, and 1,355 species of this genus have been described thus far (Borkent, 2016), Table 1. The success of *Culicoides* midges as arbovirus vectors is related to the vast population sizes that can be reached under appropriate climatic conditions and to their means of dispersal. Consequently, the epidemiologies of *Culicoides*-borne viral diseases are strongly linked to climate and weather. Recently, progress in our understanding of how climate affects midges, and the newer technologies of remote sensing and GIS, have allowed climate-driven risk models for *Culicoides* to be produced for the first time. High rates of activity, low rates of dispersal, rapid larval development, low adult mortality, and year-round breeding will all favor high abundance at a given site. As with seasonality, however, in different places meteorological variables are likely to have different strengths of effect (Mellor, 2000).

In Kenya, rainfall is the major extrinsic factor affecting the populations of local dominant species. Peak rainfall in April-May facilitates high larval survival and consequent rapid expansion of adult numbers that reaches a peak in May, June and July (Walker and Davies, 1971). In the Iberian Peninsula and Morocco, distribution models developed for *Culicoides* spp. showed that the number of months with average temperatures above 12.5 °C has an important effect on whether and by how much the numbers of insects increases in a particular year (Tatem et al., 2003).

Table 1 – Occurrence of *Culicoides* species, county or continent and author

Species	Region	Source
<i>C. paraensis, C. insignis</i>	Brazil	Felippe-Bauer and Sternheim (2008)
<i>C. paraensis, C. lahillei, C. debilipalpis, C. insignis, C. venezuelensis</i>	Argentina	Veggiani Aybar et al. (2012)
<i>C. imicola</i>	Italy, France, Tunisia, Algeria, Morocco	Mardulyn et al. (2013)
<i>C. filariferus, C. ignacioi, C. insignis, C. leopoldoi, C. boliviensis, C. foxi, C. paucienfuscatus, C. aitkeni, C. fernandoi, C. guyanensis, C. paraensis, C. travassos</i>	Brazil	Costa et al. (2013)
<i>C. insignis, C. paucienfuscatus, C. diabolicus, C. leopoldoi, C. duartei, C. foxi, C. ignacioi, C. lutzi, C. paraensis, C. pusillus, C. limai, C. ruizi, C. flavivenula, C. lahillei, C. neoparaensis</i>	Brazil	Carvalho et al. (2014)
<i>C. dewulfi, C. newsteadi, C. pulicaris, C. punctatus, C. imicola</i>	Italy	Goffredo et al. (2015)
<i>C. sonorensis</i>	USA	Mcdermott et al. (2015)
<i>C. brevitarsis</i>	East Asia and Australia	Samy and Peterson (2016)
<i>C. variipennis, C. sonorensis</i>	North and Central America	Samy and Peterson (2016)
<i>C. occidentalis</i>	Southern United States of America and Central America	Samy and Peterson (2016)
<i>C. insignis</i>	Northern and Southern America	Samy and Peterson (2016)
<i>C. imicola</i>	East Asia to West Africa	Samy and Peterson (2016)
<i>C. plaumanni, C. carsiomelas, C. ocumarensis, C. foxi, C. insignis, C. maruim, C. guttatus</i>	Brazil	Oliveira et al. (2017)

In a study of the spread of *Culicoides*-borne animal diseases by wind, Elbers et al. (2015) found that several diseases (Ephemeral fever, African Horse Sickness, Bluetongue, Thimiri virus, Akabane, and Epizootic hemorrhagic disease virus) were spread in Africa, Asia, Europe, North and Central America, and Oceania by these insects. Studies conducted in Southern California; USA reported the occurrence of *Culicoides* insects carrying the BT virus. It was also observed that most of them infected belonged to the species *C. sonorensis*, and showed signs of visual impairment due to the patterns in their capture in light traps (Mcdermott et al., 2015). According to Mardulyn et al. (2013), the emergence of vectors of BT in Mediterranean Europe during the last two decades is a consequence of the recent colonization of the region by *C. imicola*, which may be linked to climate change. Studies in Italy showed that abundant rains and mild winters were associated with increases in *Culicoides* populations. Interestingly, *Culicoides* showed a long survival when kept between 17 and 25 °C in the laboratory in Italy, even without blood feeding (Goffredo et al., 2016).

In a study carried out in Salta, northwestern Argentina, researchers caught 918 specimens belonging to five species, being the most abundant were *C. paraensis*, *C. lahillei* and *C. debilipalpis*. The highest seasonal abundances of these three species occurred during the spring and summer (Veggiani Aybar et al., 2012).

Entomological studies showed that environmental factors influence the population dynamics of *Culicoides* spp., and that increased precipitation favors increases in their population sizes and geographic distributions. Since *Culicoides* sp. are disease vectors of great sanitary importance, it is necessary to continuously update our knowledge of their ecology and distributions at different scales, especially within the context of climate change. These updates are very important for the development of risk profiles for the diseases that are transmitted by them (Veggiani Aybar et al., 2016).

5. Conclusion

Culicoides are small insects with twilight and nocturnal habits. They are very important because they transmit veterinary and human diseases, such as bluetongue, which affect ruminants. These diseases cause a lot of negative effects to the affected regions with big impact economic. *Culicoides* have a short lifecycle, around a month, being this factor favorable for their dissemination. These insects are present in most part of the world due to their high ability to adaptation in several climate conditions. The most important technic of control is the use of insecticides, which implies in high cost and prejudice of environmental.

6. References

- Augot, D. et al., 2017. Molecular phylogeny of 42 species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from three continents. *Parasite*. 24, 23
- Acevedo, M.A et al. 2016. Bluetongue virus: a known virus, a current threat. *Revista Salude Animal*. 38 (1):52-59.
- Anderson, C.R., Spence, L., Downs, W.G. & Aitken, T.G., 1961. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10, 574–578.
- Beer, M; Conraths, F. J.; van der poel, W. H. M. 2013a. ‘Schmallenberg virus’ – a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol. Infect.* 141, 1–8.
- Borkent, A., 2016. The Subgeneric Classification of Species of *Culicoides* – Thoughts and a Warning. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA. Available at: <http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/CulicoidesSubgenera.pdf>
- Braverman, Y. & Chizov-Ginzburg, A., 1997. Repellency of synthetic and plant-derived preparations for *Culicoides imicola*. *Med. Vet. Entomol.* 11, 355–360.
- Cardoso, B.F., Serra, O.P., Heinen, L.B., Zuchi, N., de Souza, V.C., Naveca, F.G., dos Santos, M.A.M. & Shessarenko, R.D., 2015. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 745–754.
- Carpenter, S., Szmaragd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S., Mellor, P. 2008

- An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *J. Appl. Ecol.* 45,1237-1245.
- Carpenter, S., Wilson, J.A.& Mellor, S.P., 2009. Bluetongue virus and *Culicoides* in the UK: the impact of research on policy. *Outlook. Pest Manage.* 20, 161-164.
- Carvalho, L.P.C., Silva, F.S. 2014. Seasonal abundance of livestock-associated *Culicoides* species in northeastern Brazil. *Med. Vet. Entomol.* 28, 228–231.
- Corin et al. 2012. Evidence of seroconversion to SBV in camelids. *Veterinary Record.* 170: 603.
- CFSP. 2015. The Center for Food Security e Public Health, (<http://www.cfsph.iastate.edu>)
Acesso em 10 de Abril de 2020.
- Costa, J.C., Lorosa, S.E., Moraes, J.L.P.& Rebelo, J.M.M., 2013. *Culicoides* species (Diptera; Ceratopogonidae) and potential hosts in ecotourism area of Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. *Rev Pan-Amaz. Saude* 4, 11–18.
- Du toit, M. 1944. The Transmission of Bluetongue and Horse Sicknes by *Culicoides*. *J of Vet. Sci. and Anim. Ind.* 19, 2.
- Elbers, A.R.W., Koenraadt, C.J.M.& Meiswinkel, R., 2015. Mosquitoes and *Culicoides* biting midges: vector range and the influence of climate change. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 34, 123–137.
- Felippe-Bauer, M.L.& Sternheim, U.S., 2008. *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae) infestations in cities of the Itapocú River Valley, Southern Brazil. *Entomol. News.* 119, 185–192.
- Goffredo, M.& Meiswinkel, R., 2004. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet. Ital.* 40, 260–265.
- Goffredo, M., Catalani, M., Federici, V., Portanti, O., Marini, V., Mancini, G., Quaglia, M., Santilli, A., Teodori, L.& Savini, G., 2015. Vector species of *Culicoides* midges implicated in the 2012-2014 bluetongue epidemics in Italy. *Vet. Ital.* 51, 131–138.
- Goffredo, M., Meiswinkel, R., Federici, V., Di Nicola, F., Mancini, G., Ippoliti, C., Di Lorenzo, A., Quaglia, M., Santilli, A., Conte, A.& Savini, G., 2016. The ‘*Culicoides obsoletus* group’ in Italy: relative abundance, geographic range, and role as vector for Bluetongue virus. *Vet. Ital.* 52, 235–241.
- Harrup, L.E., Miranda, M.A.& Carpenter, S., 2016. Advances in control techniques for *Culicoides* and future prospects. *Vet. Ital.* 52, 247–264.

- Henning, M.W., 1956. African horse sickness, perdesiekte, pestis equorum, in: Henning, M.W., Animal Diseases of South Africa, third ed. Central News Agency Ltd., Pretoria, South Africa, pp. 785–808.
- Hofmann, A.M., Renzullo, S. Mader, M., Chaignat, V., Worywa, G. & Thuer, B., 2008. Genetic characterization of Toggenberg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1855–1861.
- Hoffmann, B., Scheuch, M., Höper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., Eschbaumer, M., Goller, K.V., Wernike, K., Fischer, M., Breithaupt, A., Mettenleiter, T.C. & Beer, M., 2012. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 469–472.
- Howell P.G. 1962. The isolation and identification of further antigenic types of African horsesickness virus, Onderstepoort J. Vet. Res. 29:139–149.
- Lau et al., 2016. *Elizabethkingia anopheles* bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality. *Sci. Reports.* 6:26045 | DOI: 10.1038/srep26045 1
- Lewis, S.E.; Rice, A.; Hurst, G.D.D.; Baylis, M. 2014. First detection of endosymbiotic bacteria in biting midges *Culicoides pulicaris* and *Culicoides punctatus*, important Palaearctic vectors of bluetongue virus. *Med and Vet Entom.* doi: 10.1111/mve.12055.
- Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Batten, C., Antony, F., Belaganahalli, M.N., Samy, A.M., Reda, A.A., Al-Rashid, S.A., Batel, M.E., Oura, C.A.L. & Mertens, P.P.C., 2011. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 886–889.
- MacLachlan, N.J. & Guthrie, A.J., 2010. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet. Res.* 41, 35.
- Mardulyn, P., Goffredo, M., Conte, A., Hendrickx, G., Meiswinkel, R., Balenghien, T., Sghaier, S., Lohr, Y. & Gilbert, M., 2013. Climate change and the spread of vector-borne diseases: using approximate Bayesian computation to compare invasion scenarios for the bluetongue virus vector *Culicoides imicola* in Italy. *Mol. Ecol.* 22, 2456–2466.
- McDermott, E.G., Mayo, C.E., Gerry, C.A., Laudier, D., Maclachlan, N.J. & Mullens, B. A., 2015. Bluetongue virus infection creates light-averse *Culicoides* vectors and serious errors in transmission risk estimates. *J. Paras. Vect.* 8, 460.
- Mee, P.T; Weeks, A.R; Walker, P.J; Hoffmann, A.A; Duchemin, J.B. 2015. Detection of low-level *Cardinium* and *Wolbachia* infections in *Culicoides*. *Appl Environ Microbiol.* 81:6177–88. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01239-15>

- Mee P.T et al. 2017. Detection of *Elizabethkingia* spp. in *Culicoides* Biting Midges, Australia. *Emerging Infectious Diseases* 23, 8.
- Meiswinkel R., Baylis M., Labuschagne K. 2000. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness, *Bull. Entomol. Res.* 90:509–515.
- Mellor, P.S., Boorman, J. & Baylis, M., 2000. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 307–340.
- Mills, M. K.; D. Nayduch; K. 2015. Michel. Inducing RNA interference in the arbovirus vector, *Culicoides sonorensis*. *Insect Molecular Biology* .24 (1), 105–114
- Nunes, M.R.T., Martins, L.C., Rodrigues, S.G., Chiang, J.O., Azevedo, R.S.S, Rosa, A.P.A. & Vasconcelos, P.F.C., 2005. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1610–1613.
- OIE. OIE Technical factsheet. May 2012. 1. Bluetongue virus (http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmalenberg_virus.pdf). Acesso em 4 de Abril de 2020.
- Oliveira, C.A., Silva, A.O.F., Cerqueira, V.D., Almeida, M.B., Correa, F.R., Felipe Bauer, M.L. & Correa, G. R., 2017. Allergic dermatitis caused by *Culicoides* in Texel sheep in the state of Pará, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 37, 301–306.
- Page, C.P., Labuschagne, K., Nurton, J.P., Venter, G.J. & Guthrie, A.J., 2009. Duration of repellency of N,N-diethyl-3-methylbenzamide, citronella oil and cypermethrin against *Culicoides* species when applied to polyester mesh. *Vet. Parasit.* 163, 105–109.
- Purse, B.V., Mellor, P., Rogers, D., Samuel, A., Mertens, P. & Baylis, M., 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Rev. Microbiol.* 3, 171–181.
- Robin, M; Page, P; Archer, D; Baylis, M. 2016. African Horse Sickness: the potential for an outbreak in disease-free regions and current disease control and elimination techniques. *Eq Vet J.* 5, 659-69.
- Romero, D.A., Escobar, L.E. 2018. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas, *Microbes and Infect.* doi: 10.1016/j.micinf.2017.11.013.
- Samy, A.M. & Peterson, A.T., 2016. Climate change influences on the global potential distribution of Bluetongue virus. *PLoS ONE* 11, e0150489.

- Sanco, D.G., 2011. Report on the Outcome of the EU Co-financed Animal Disease Eradication and Monitoring Programmes in the MS and the EU as a Whole. Agra CEAS Consulting, Brussels, Belgium.
- Scheffer, E.G. et al. 2012. Comparison of two trapping methods for *Culicoides* biting midges and determination of African horse sickness virus prevalence in midge populations at Onderstepoort, South Africa. *Vet Parasit.* 185, 265–273.
- Sellers, R. & Mellor, P., 1993. Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides* spp. during adverse conditions. *Rev. Sci. Tech.* 12, 733–755.
- Sperlova, A. & Zendulkova D., 2011. Bluetongue: a review. *Vet. Med.* 56, 430–452.
- Tatem, A.J., Baylis, M., Mellor, P.S., Purse, B.V., Capela, R., Pena, I. & Rogers, D.J., 2003. Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and North Africa using satellite imagery. *Vet. Microbiol.* 97, 13–29.
- Veggiani Aybar, C., Dantur Juri, M., Stein, G., Oria, M., Lizarralde de Grosso, S.M. & Spinelli, G., 2012. New records of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) for the Yungas and Chaco ecoregions of Argentina. *Fla. Entomol.* 95, 808–809.
- Veggiani Aybar, C., Diaz Gómez, A.R., Dantur Juri, J.M., Lizarralde Grosso, S.M. & Spinelli, G., 2016. Potential distribution map of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae), vector of Bluetongue virus, in Northwestern Argentina. *J. Insect Sci.* 16, 65.
- Walker, A.R. & Davies, F.G., 1971. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Kenya. *J. Hyg.* 69, 47–60.
- Wittmann, E. & Baylis, M., 2000. Climate change: effects on *Culicoides*-transmitted viruses and implications for the UK. *Vet. J.* 160, 107–117.
- Zientara, S., Sailleau, C., Viarouge, C., Höper, D., Beer, M., Jenckel, M., Hoffmann, B., Romey, A., Bakkali-Kassimi, L., Fablet, A., Vitour, D. & Bréard, E., 2014. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 2123–2132.
- Zientara, S., Weyer, C.T., Lecollinet, S., 2015. African Horse Sickness. *Rev. Sci. Tech.* 34, 315–327.

3.4 CAPÍTULO

Extração e caracterização de compostos orgânicos voláteis em Ovinos (*Ovis aries*) com potencial para o controle dos insetos *Culicoides*

RESUMO

O uso da ecologia química para o controle de pragas, tem ganhado mais espaço no âmbito científico em virtude dos vários benefícios que proporciona para a saúde pública humana, animal e do meio ambiente. Entre os benefícios, o conhecimento das interações entre os seres vivos pode ser usado para minimizar os prejuízos causados pelo uso excessivo e indiscriminado de alguns fármacos na busca de soluções para os problemas da vida cotidiana. O objetivo dessa pesquisa foi coletar os semioquímicos liberados por ovinos e caracterizar os compostos orgânicos voláteis (COV's) para subsidiar pesquisas visando ao controle dos insetos *Culicoides*. Esses insetos são considerados os menores insetos hematófagos e responsáveis por transmitir diversos tipos de doenças para humanos e animais, em geral algumas arboviroses de extrema importância para saúde pública. Os COV's foram coletados em 12 ovinos (machos e fêmeas), pelo método da aeração e, analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Após a caracterização dos COV's foram realizados os bioensaios comportamentais para testar o potencial das substâncias frente aos insetos como proposto no objetivo. Dentre os compostos coletados, após as análises, foram caracterizados quanto ao índice de retenção de Kóvats, e análise de espectro, 22 COV's nos ovinos machos e, 20 COV's nos ovinos fêmeas. Foram identificados 17 compostos em comum para os dois sexos, sendo que esses COV's, são em sua maioria constituídos por hidrocarbonetos. As diferenças dos COV's entre machos e fêmeas, foi a presença de naftaleno, acetato, tetradecano nos machos. As análises cromatográficas mostraram que os COV's provenientes dos ovinos machos apresentaram as maiores concentrações de compostos. Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que os compostos caracterizados não apresentaram poder de atração ou repulsão dos insetos *Culicoides* sp com as concentrações utilizadas e delineamento experimental empregado.

Palavras chave: análise cromatográfica, ecologia química, índice de Kóvats, insetos hematófagos

INTRODUÇÃO

O controle de pragas que afetam animais e plantas, em geral tem sido limitado aos tratamentos mecânicos, químicos, biológicos e genéticos. O uso da ecologia química para controlar pragas está em constante evolução e, essas abordagens, incluem as áreas de neuroetologia de insetos, ecologia comportamental, bioquímica de insetos e plantas, síntese de produtos e as tecnologias naturais para a utilização na agricultura (GOULART et al., 2015).

As substâncias liberadas pelos seres vivos são chamadas de semioquímicos, que mediam as interações entre os organismos. Alguns dípteros hematófagos se beneficiam de compostos orgânicos voláteis (COV's), os quais são os sinais químicos liberados por seus hospedeiros vertebrados (SCHOFIELD e BRADY, 1997). Vários estudos elucidaram o importante papel dos COV's na identificação do hospedeiro apropriado para um determinado parasita, sendo uma ou mais variedades e espécies, ou mesmo dentro de um grupo de indivíduos da mesma espécie. Os insetos usam esses sinais em busca de seus hospedeiros, na maioria das vezes, como fonte de alimento. Esses COV's são denominados de cairomônios e são encontrados na pele dos vertebrados, nas secreções glandulares, excrementos (fezes e urina) e outros. Em geral, para a captura desses compostos, a aeração tem sido a metodologia mais utilizada, visando ao controle de parasitas (MORAES et al., 2003; LOGAN e BIRKETT, 2007; VIANA et al., 2018).

Os insetos do gênero *Culicoides* Latreille, 1809 são considerados os menores insetos hematófagos e responsáveis por transmitir doenças por meio de suas picadas. São responsáveis pela transmissão das doenças de importância veterinária: doença da Língua Azul (DU TOIT, 1944); Schmallenberg (HOFFMANN et al., 2012) African Horse Sickness (HENNING, 1956) e das doenças de importância humana: Oropouche (NUNES et al., 2005) e infecção por *Elizabethkingia* (MEE et al., 2017). Essas doenças têm importante impacto econômico, causando prejuízos para a economia, saúde e desenvolvimento social.

Esta pesquisa objetivou a coleta e caracterização de compostos orgânicos voláteis oriundos de ovinos (Santa Inês × Dorper) para dar subsídios ao desenvolvimento de técnicas eficazes para o controle de *Culicoides* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da UFAL e foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA, sob protocolo 52/2017. Foram utilizados 12 ovinos adultos (4 machos e 8 fêmeas), mestiços (Santa Inês × Dorper), criados em manejo semi extensivo, pertencentes ao Instituto Federal de Alagoas (IFAL/SATUBA).

Os COV's liberados pelos ovinos foram coletados individualmente, mantendo-se cada animal na baia de contenção durante o procedimento. A coleta, foi feita por meio do método da aeração, utilizando um tubo coletor de vidro contendo 60 mg de adsorvente Porapak Q (50-80 Mesh, Supelco) e lã de vidro. Uma das extremidades desse tubo coletor estava afixada na região dorsal do ovino com fita adesiva para a captura dos COV's. A outra extremidade desse tubo estava conectada à uma mangueira de silicone e, que por sua vez conectava-se à bomba de sucção. A aeração foi realizada com um fluxo de ar de 1000 mL/min, por animal.

Após a coleta dos COV's, as amostras foram levadas ao laboratório de pesquisas em recursos naturais (LPqRN) da Universidade Federal de Alagoas, para a extração dos compostos, utilizando 1 mL de hexano (Sigma- Aldrich®, HPLC) como solvente. Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer a - 20°C para análises posteriores. As análises dos extratos (COV's) foram realizadas usando um cromatógrafo a gás (GC-2010, Shimadzu) com um detector de ionização de chama (CG-FID), equipado com coluna RTX-5 (30 m de comprimento; 0,25 mm d.i; 0,25 µm de espessura, Restek®), sendo o hidrogênio usado como gás de arraste. O programa de temperatura do forno foi iniciado a 50°C por 5 min, com velocidade de aquecimento de 8°C por minuto até 250°C, e o tempo de espera de 10 minutos, finalizando a análise, aos 40 minutos. A amostra foi injetada em modo “splitless”, com a temperatura do injetor em 200°C, e a temperatura do detector em 270°C. Essas análises foram realizadas para todas as amostras, entretanto, para a apresentação nos resultados dessa pesquisa, foram escolhidos apenas os resultados de um macho e uma fêmea que apresentarem as maiores intensidades de compostos.

A caracterização dos COV's foi realizada pelo cálculo dos seus índices de retenção de Kóvats (KI) e, as consultas subsequentes, nas bases de dados Pherobase (www.pherobase.com) e NIST (www.nist.gov). Os KI's foram determinados usando séries homólogas de n-alcenos normais, C7-C30 (Sigma Chemical® Co., St. Louis, MO) em uma análise de CG com temperatura programada, como descrito acima. Para análise qualitativa, os extratos voláteis selecionados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CG/EM quadrupolo Shimadzu (QP-2010, Ultra), com coluna DB-5 (30m de comprimento; 0,25 mm.d.i.; 0,25 μ m de espessura, J&W Scientific®) usando o modo de injeção “splitless”, sendo o gás hélio o gás de arraste e, o programa de temperatura como o descrito acima para a análise GC-FID. A ionização foi realizada por impacto eletrônico (70 eV; temperatura da fonte = 200°C). Os dados foram coletados usando o CG/EM editor de análises.

A caracterização dos compostos voláteis extraídos foi realizada por meio da comparação visual dos espectros das amostras com o espectro literário. As características do íon molecular, do pico base e fragmentações das amostras, fornecidas pelos bancos de dados computacionais do equipamento (Wiley 229, NIST 08, NIST 147) foram tomadas como importantes critérios de comparação com os espectros literários disponíveis nas bases de dados (NIST, Pub Chem). Da mesma forma, esses procedimentos foram realizados para as análises dos índices de retenção de Kóvats (KI). Os KI's foram determinados usando as séries homólogas de n-alcenos normais, C7-C30 (Sigma Chemical® Co., St. Louis, MO) em uma análise de CG programada em temperatura, como descrito anteriormente. A caracterização foi assumida positiva, quando o espectro de massa e KI foram alcançadas. Os dados obtidos também foram comparados com várias fontes da literatura. Após as caracterizações, foi obtida a abundância dos compostos liberados por cada animal.

Os ensaios biológicos para testar o efeito dos COV's obtidos (machos e fêmeas) frente aos insetos *Culicoides*, infestantes naturalmente em ovinos, foram conduzidos na fazenda Pratagy, localizada no bairro do Benedito Bentes. Quatro tratamentos foram utilizados, sendo eles: 10 μ L do extrato do macho no qual foi caracterizado um maior número de compostos voláteis; 10 μ L do extrato da fêmea no qual foi caracterizado um maior número de compostos voláteis; 10 μ L de hexano (HPLC) e ausência de composto. Esses tratamentos (extratos) eram disponibilizados em chumaços de algodão afixados em armadilhas adesivas do tipo delta e, alocadas nas baias dos animais, Figura 1. Os testes foram executados no mês de março de 2020, em quatro dias consecutivos, a concentração dos extratos eram de 1% para cada amostra.

Figura 1- Armadilhas adesivas com os chumaços de algodão embebidos com os tratamentos (COV's) para os ensaios biológicos alocadas nas baias dos ovinos, Fazenda Pratagy, Maceió-AL



RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas por CG/FID revelaram todos os compostos liberados pelos ovinos (machos e fêmeas) e, quatro animais foram excluídos das análises futuras, uma vez que a captura dos seus voláteis não foi efetiva. Os resultados das análises CG/EM dos extratos voláteis dos ovinos machos, apresentaram 22 compostos com maiores concentrações, Tabela 1. Os perfis dos extratos de ovinos machos apresentaram, em sua maioria, os hidrocarbonetos como sendo a maior parte de sua constituição. Dentre esses, os hidrocarbonetos ramificados, insaturados e lineares (>C₁₀). Além disso, apresentaram dois compostos acetato, um composto aldeído e um composto aromático (Naftaleno).

Tabela 1- Caracterização dos compostos orgânicos voláteis emitidos pelos ovinos machos

	Compostos	K.I. cal.		K.I. ref.	Abundância (%)
1	(Z)-2-Deceno	1016	1013	Zaikin e Borisov (2002)	1,51
2	2,2,8-Trimetildecano	1025	1022	Gómez et al. (1993)	3,44
3	4-metildecano	1060	1059	Zaikin e Borisov (2002)	19,28
4	2-metildecano	1065	1063	Zaikin e Borisov, 2002	3,30
5	Hidrocarboneto	1080	-	-	2,21
6	(E)-2-Undeceno	1103	1104	Zaikin e Borisov (2002)	4,65
7	Nonanal	1104	1107	Isberg et al. (2016)	7,55
8	Hidrocarboneto	1108	-	-	2,02
9	Naftaleno	1187	1184	<u>Zhu et al. (2008)</u>	2,21
10	(Z)-2-Dodeceno	1214	1213	-	3,18
11	Hidrocarboneto	1222	-	-	2,41
12	2-metildodeceno	1264	1263	Zaikin e Borisov (2002)	4,32
13	Hidrocarboneto	1279	-	-	11,33
14	Tridecano	1300	1300	Adams (1995)	3,77
15	Hidrocarboneto	1325	-	-	2,83
16	Acetato	1371	-	-	3,74
17	Tetradecano	1400	1399	Adams (1995)	2,32
18	Acetato	1425	-	-	6,45
19	Hidrocarboneto	1493	-	-	2,62
20	(E)-2-Pentadeceno	1507	1507	Zaikin e Borisov (2002)	1,26
21	-	1650	-	-	7,43
22	(E)-2-Heptadeceno	1707	1708	Zaikin e Borisov (2002)	2,17

Os índices de Kóvats calculados foram comparados com aqueles disponíveis na literatura. Dos 22 compostos presentes nas amostras de COV's coletadas nos ovinos machos, 13 compostos já haviam sido caracterizados (Gómez et al.,1993; Adams, 1995; Zaikin e Borisov, 2002; Zhu et al., 2008; Isberg et al., 2016), apresentando valores de índice de Kóvats, corroborando com a presente pesquisa. Os valores de abundância correspondem à média das amostras para um determinado composto. É importante ressaltar que o composto majoritário dos COV's dos ovinos machos foi 4-metildecano.

As análises CG/EM dos extratos voláteis dos ovinos fêmeas, apresentaram 20 compostos com maiores intensidades, Tabela 2. Os perfis dos extratos de fêmeas, foram caracterizados, principalmente, por serem constituídos em grande parte por hidrocarbonetos, sendo alguns ramificados, insaturados e outros lineares ($>C_{10}$). Além desses, apresentaram um composto aldeído. Desses 20 compostos presentes nas amostras de COV's das fêmeas, 14 compostos já haviam sido caracterizados (Gómez et al.,1993; Adams, 1995; Zaikin e Borisov, 2002; Vanícková et al., 2012; Isberg et al., 2016) apresentando índices de Kóvats, os quais corroboraram com os resultados da presente pesquisa. O valor percentual de abundância do composto 4-metildecano, como nas amostras de COV's dos ovinos machos, também foram destaque para as análises nas fêmeas, sendo essa similaridade de valores entre machos e fêmeas, corroborada por Zaikin e Borisov (2002).

Tabela 2- Caracterização dos compostos orgânicos voláteis emitidos pelos ovinos fêmeas

	Compostos	K.I. cal.		K.I. ref.	Abundância (%)
1	(Z)-2-Deceno	1016	1013	Zaikin e Borisov (2002)	0,54
2	2,2,8-Trimetidecano	1025	1022	Gómez et al. (1993)	1,67
3	4-metildecano	1060	1059	Zaikin e Borisov (2002)	20,17
4	2-metildecane	1065	1063	Zaikin e Borisov (2002)	3,21
5	Hidrocarboneto	1080	-	-	1,10
6	(E)-2-Undeceno	1103	1104	Zaikin e Borisov (2002)	5,68
7	Nonanal	1104	1107	Isberg et al. (2016)	3,65
8	Hidrocarboneto	1108	-	-	1,68
9	(Z)-2-Dodeceno	1214	1213	-	1,72
10	Hidrocarboneto	1222	-	-	1,13
11	2-metildodecano	1264	1263	Zaikin e Borisov (2002)	1,39
12	Hidrocarboneto	1279	-	-	15,69
13	Tridecano	1300	1300	Adams (1995)	2,10
14	Hidrocarboneto	1325	-	-	5,25
15	Hidrocarboneto	1493	-	-	10,46
16	(E)-2-Pentadeceno	1507	1507	Zaikin e Borisov (2002)	1,88
17	9-metilpentadecano	1538	1534	Vanícková et al. (2012)	4,09
18	(E)-2-Heptadeceno	1707	1708	Zaikin e Borisov (2002)	8,89
19	5-metilheptadecano	1750	1752	Zaikin e Borisov (2002)	2,84
20	(Z)-2-Nonadeceno	1920	1921	Zaikin e Borisov (2002)	6,84

A relação de todos os compostos liberados pelos ovinos machos e fêmeas, abundâncias médias e as diferenças das funções orgânicas são apresentadas na Tabela 3. Foram identificados 17 compostos em comum para os dois sexos, sendo que esses COV's, são em sua maioria constituídos por hidrocarbonetos. As diferenças dos COV's entre machos e fêmeas, quanto às funções orgânicas, foi a presença de naftaleno, acetato, tetradecano e um composto não identificado (KI=1650) apenas nos machos. Além disso, foram detectados apenas nas fêmeas três compostos não identificados (KI= 1538, KI=1750 e KI=1920).

Em estudo visando ao controle de insetos *Culicoides* infestantes de mamíferos, Bhasin et al. (2000), coletaram e identificaram os compostos orgânicos 1-octen-3-ol; acetona; butanona; Ácido L (+) - láctico; fenol; 3-n-propilfenol; 3-metilfenol; 4 metilfenol e 4 etilfenol. Na presente pesquisa, não foram encontrados nenhum desses compostos citados.

Tabela 3 – Compostos caracterizados, em ovinos machos e fêmeas

	Compostos	K.I. cal.	Abundância Machos (%)	Abundância Fêmeas (%)
1	(Z)-2-Deceno	1016	1,51	0,54
2	2,2,8-Trimetildecano	1025	3,44	1,67
3	4-metildecano	1060	19,28	20,17
4	2-metildecano	1065	3,30	3,21
5	Álcool ou hidrocarboneto	1080	2,21	1,10
6	(E)-2-Undeceno	1103	4,65	5,68
7	Nonanal	1104	7,55	3,65
8	Hidrocarboneto	1108	2,02	1,68
9	Naftaleno	1187	2,21	-
10	(Z)-2-Dodeceno	1214	3,18	1,72
11	Hidrocarboneto	1222	2,41	1,13
12	2-metildodecano	1264	4,32	1,39
13	Hidrocarboneto	1279	11,33	15,69
14	Tridecano	1300	3,77	2,10
15	Hidrocarboneto	1325	2,83	5,25
16	Acetato	1371	3,74	-
17	Tetradecano	1400	2,32	-
18	Acetato	1425	6,45	-
19	Hidrocarboneto	1493	2,62	10,46
20	(E)-2-Pentadeceno	1507	1,26	1,88
21	-	1538	-	4,09
22	-	1650	7,43	-
23	(E)-2-Heptadeceno	1707	2,17	8,89
24	-	1750	-	2,84
25	-	1920	-	6,84

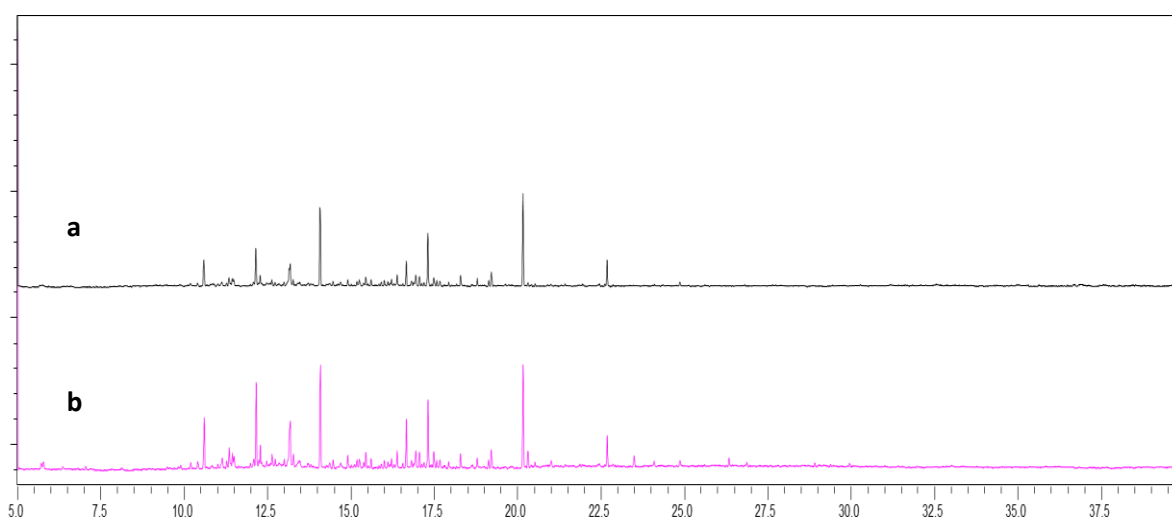
Isberg et al. (2016) estudando o potencial de compostos voláteis no controle de *Culicoides nubeculosos*, por meio de aeração, coletaram os COV's oriundos do pêlo e urina dos animais identificando 23 compostos, dos quais 17 eram octanos. Os compostos eram: Decanal; 2-feniletano; 1-octen-2-ol; 2 etil-hexanol; 3-metilindol; fenol; 3-etilfenol; heptanal; octanal; 3-propilfenol; 4 propilfenol; 6-metil-5-hepten-2-ona; 3-metilfenol e 4-etilfenol. Nenhum desses compostos foram identificados na presente pesquisa.

Por outro lado, o composto nonanal identificado no presente estudo, também foi previamente reportado por Gikonyo et al. (2002), Birkett et al. (2004), Logan et al. (2009) e Tchouassi et al. (2013) em estudos de COV's extraídos de mamíferos.

As análises cromatográficas apresentaram diferenças nos cromatogramas entre as amostras de ovinos machos e fêmeas, sendo apresentado apenas um resultado comparativo das amostras de ambos os sexos com as maiores intensidades de COV's, Figura 2. Os resultados

dessas análises mostram que os compostos liberados pelos ovinos machos apresentaram maior intensidade, quando comparados com a intensidade dos compostos liberados pelas fêmeas. Além disso, os machos apresentaram dois compostos a mais comparados com as fêmeas. Essas diferenças entre indivíduos machos e fêmeas quanto aos compostos emitidos, podem estar relacionadas às diferenças de dimorfismo sexual. A composição dos COV's liberados pelos machos apresentou, aproximadamente, 70% de hidrocarbonetos, enquanto que a composição dos COV's liberados pelas fêmeas apresentou 90% de hidrocarbonetos.

Figura 2- Perfis cromatográficos das análises CG/EM dos COV's liberados em ovinos (Santa Inês×Dorper) macho e fêmea



Legenda - a- Perfil cromatográfico (CG/EM) de ovino fêmea; b- Perfil cromatográfico (CG/EM) de ovino macho

Após a obtenção dos compostos caracterizados foram realizados os ensaios biológicos à campo. Os resultados mostraram que, de acordo com o delineamento experimental preconizado (4 tratamentos: 10mL COV's machos; 10mL COV's fêmeas; 10mL COV's hexano e 10mL COV's branco, com duas repetições) os compostos não apresentaram poder de atração ou repulsão dos insetos *Culicoides* sp. Acredita-se que novos testes, diferentes concentrações dos compostos e novos delineamentos são necessários para maior esclarecimentos das respostas biológicas obtidas. De acordo com Isberg et al. (2016), as concentrações dos compostos influenciam diretamente sobre o potencial da resposta dos insetos.

Em estudo objetivando-se o controle de *Culicoides* por meio da identificação de COV's de mamíferos, Bhasin et al. (2000) testaram nove compostos por meio de análises EAG e testes de olfatométrica Y e concluíram que todos os compostos foram atrativos para os *Culicoides*, com destaque para o composto 1 octen3-ol, que foi o mais atrativo. Isberg et al. (2016), em estudo de COV's oriundos de mamíferos para modular as respostas de insetos *Culicoides nubeculosos*

identificaram 23 compostos. Após as identificações, os testes de atratividade usando EAG mostraram que os compostos Decanal; 2-feniletano; 1-octen-2-ol; 2 etil-hexanol; 3-metilindol; fenol e 3-etilfenol, causaram a atração de *Culicoides nubeculosos*. Enquanto os COV's heptanal; octanal; 3-propilfenol e 4 propilfenol, inibiram a atração de insetos. E, os compostos 6-metil-5-hepten-2-ona; 3-metilfenol e 4-etilfenol desencadearam, simultaneamente, as ações de atração e repulsão, dependendo da quantidade testada.

CONCLUSÃO

Foram caracterizados 22 COV's nos ovinos machos e 20 COV's nos ovinos fêmeas, dos quais, 17 foram comuns para os dois sexos. O composto majoritário dos COV's, tanto em ovinos machos como em fêmeas, foi o 4-metildecano.

As análises cromatográficas mostraram que os COV's provenientes dos ovinos machos apresentaram as maiores intensidades de compostos. Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que os compostos caracterizados não apresentaram poder de atração ou repulsão dos insetos *Culicoides* sp., havendo, portanto, a necessidade de realização de testes em campo para esclarecimento das respostas dos insetos.

REFERENCES

Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. 1995.

Bhasin, A; Mordue (Luntz), A.J;Mordue, W.Electrophysiological and behavioural identification of host kairomones as olfactory cues for *Culicoides impuctatus* and *C. nubeculosus*. *Physiological Entomology*. 25, 6-16, 2000.

Birkett, M.A.; et al. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 18, p. 313–322, 2004.

De Simon, B.F., Estruelas, E., Munoz, A.M., Cadahia, E., and Sanz, M. Volatile compounds in acacia, chestnut, cherry, ash, and oak woods, with a view to their use in cooperage. *J. Agric. Food Chem.* 57:3217-3227, 2009.

Du toit, M. The Transmission of Bluetongue and Horse Sicknes by *Culicoides*. *Journal of Veterinary Science and Animal Industry*.,19, 2, 1944.

Goulart, H.F et al. Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. *Revista Virtual de Química*, 7 (4), 1205-1224, 2015.

Gómez, E., Ledbetter, C.A., and Hartsell, P.L. Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids. *J. Agric. Food Chem.* 41:1669-1676, 1993.

Gikonyo, N. K.; et al. Odor composition of preferred (Buffalo and Ox) and nonpreferred (Waterbuck) hosts of some Savanna TseTse flies. *Journal of Chemical Ecology*, v. 28, n. 5, p. 969-981, 2002.

Henning M.W., African horsesickness, perdesiekte, pestis equorum, *Animal diseases of South Africa*, 3th ed., Central News Agency Ltd., Pretoria,785-808,1956.

Hoffmann, B et al. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 469-472, 2012.

Isberg, E; Bray, D. P.; Birgersso, G.; Hillbur, Y.; Ignell, R. Identification of cattle-derived volatiles that modulate the behavioral response of the biting midge *Culicoides nubeculosus*. *J Chem Ecol* 42, 24–32, 2016.

Karlosn, P.; Lusher, M. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, v.183 p.55- 56,1959.

Logan, J. G.; Birkett, M. A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest Management Science*, v. 63, p. 647–657, 2007.

Mee P. T et al. Detection of *Elizabethkingia* spp. in *Culicoides* Biting Midges, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 23, 8, 2017.

Moraes, M. C. B.; et al. Metodologia para estudos de semioquímicos e a sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitoide *Telenomus podisi*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

Nunes, M.R.T. et al. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 11, 1610-1613, 2005.

Schofield, S.; Brady, J. Effects of carbon dioxide, acetone and 1 -octen-3-ol on the flight responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in a wind tunnel. *Physiological Entomology*, v. 22, p. 380-386, 1997.

Tchouassi, D. P.; Sang, R.; Sole, C. L.; Bastos, A. D. S.; Teal, P. E. A.; Borgemeister, C.; Torto, B. Common Host-Derived Chemicals Increase Catches of Disease-Transmitting Mosquitoes and Can Improve Early Warning Systems for Rift Valley Fever Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7, 2013.

Vanícková, L., Svatoš, A., Kroiss, J., Kaltenpoth, M., Do Nascimento, R.R., Hoskovec, M., Brízová, R., and Kalinová, B. Cuticular hydrocarbons of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age. *J. Chem. Ecol.* 38:1133-1142, 2012.

Viana, A.C et al. Validation of analytical method for Rhynchophorol quantification and stability in inorganic matrix for the controlled release of this pheromone. *Chemistry Central Journal* <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0426-1>, 2018.

Zaikin, V.G., and Borisov, R.S. Chromatographic-mass spectrometric analysis of Fischer-Tropsch synthesis products. *J. Anal. Chem.* 57:544-551, 2002.

Zhu, M.; Li, E.; He, H., *Determination of volatile chemical constituents in tea by simultaneous distillation extraction, vacuum hydrodistillation and thermal desorption*, **Chromatographia**. 68, 7/8, 603-610, 2008. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0732-1> .

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da ecologia química nos processos que objetivam o controle das pragas e patógenos dos seres vivos tem se revelado em estratégias promissoras para o combate de doenças em plantas, animais e humanos. Em geral, esses processos propõem o controle de organismos indesejáveis, sob o ponto de vista da agropecuária e da saúde pública.

Essa pesquisa propôs o emprego da ecologia química para controlar os insetos *Culicoides*, principal transmissor da doença da Língua Azul, a qual acomete a maioria dos ruminantes. Ao longo da realização dessa pesquisa, vários desafios foram enfrentados. O primeiro deles foi o contato com o principal personagem dessa tese, o inseto *Culicoide*, cujo nome vulgar é maruim. Esses insetos, são dípteros e, são os menores insetos hematófagos da família Ceratopogonidae. Estão amplamente distribuídos no mundo inteiro e, existem mais de 1.300 espécies conhecidas até os dias atuais. No Brasil, poucos grupos têm trabalho com esses insetos e, eu tive a oportunidade de trocar informações e realizar algumas atividades com um desses. Esse grupo é liderado pela Dr^a Maria Luiza Felipe-Bauer, com expertise na identificação de insetos *Culicoides*, Curadora da coleção de Ceratopogonidae, do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Além desse produtivo contato, também tive a oportunidade de trocar de informações e obter algumas orientações do Dr^o Simon Carpenter, entomologista com expertise em biologia e ecologia de *Culicoides*, do Pirbright Institute, em Londres no Reino Unido.

Inicialmente, o objetivo era a coleta de *Culicoides*, nas três mesorregiões do Estado de Alagoas, entretanto, após várias expedições no Sertão e Agreste sem sucesso, por questões logísticas, tive que concentrar o foco da pesquisa na região da zona da Mata, próximo de Maceió. Após, várias tentativas de captura com as armadilhas luminosas convencionais sem sucesso, foram necessárias algumas modificações para a efetiva captura dos *Culicoides*, o que resultou no depósito de uma patente. Após as coletas, foi necessária a identificação da espécie, a qual foi realizada pelas Dr^a Maria Luiza Felipe-Bauer e Dr^a Maria Clara Alves Santarém do Instituto Oswaldo Cruz. A espécie identificada foi a *Culicoides insignis*, sendo o primeiro registro dessa espécie no Estado de Alagoas. Também foi realizada a identificação genética da espécie, sendo que o processo de depósito no Genbank está em andamento.

A importância dos insetos *Culicoides*, não se restringe apenas à uma ameaça da saúde animal. Esses insetos, transmitem vários arbovírus, que causam doenças de grande impacto para a sociedade. Dentre as doenças mais estudadas, são elas, a doença da Língua Azul, Schmallenberg, African Horse Sickness, Oropouche e Elizabethkingia. Essas doenças têm

importante impacto econômico, difícil controle, pois são causadas em sua maioria por vírus, cujo principal vetor são os *Culicoides*. Diante disso, o controle desses insetos se torna de suma importância para a prevenção dessas doenças, pois resultados de pesquisas mostraram que a ocorrência dos surtos dessas doenças coincide com os locais precedidos da infestação pelos *Culicoides*.

Dada a importância do controle dos *Culicoides*, da doença da Língua Azul no cenário mundial, a chegada dessa doença no Brasil e o reduzido número de pesquisas que abordam essa temática, objetivou-se a busca de técnicas de controle desses importantes parasitas com as abordagens da ecologia química. Para tanto, a pesquisa propõe a elaboração de armadilhas, munidas de compostos orgânicos voláteis, com potencial poder de atração ou repulsão desses insetos, para serem afixadas nos locais de maior concentração desses maruins. A exemplo, regiões de criação animal como os currais, casas com proximidades das fazendas ou sítios e, áreas afins.

A partir de então, foram realizadas coletas de compostos voláteis orgânicos (COV's) em ovinos machos e fêmeas, nas zonas rurais próximas a Maceió, com a comprovada presença de *Culicoides*. Essas coletas foram realizadas pelo método da aeração com bomba de sucção para as posteriores análises cromatográficas CG/FID e CG/EM. Os resultados dessas análises indicaram a presença de 22 e 20 compostos em ovinos machos e fêmeas, respectivamente. Os compostos nos machos foram mais intensos que nas fêmeas. Desses compostos, 14 já haviam sido identificados na literatura, apresentando índices de Kóvats passíveis de comparação. As análises cromatográficas mostraram que os COV's provenientes dos ovinos machos apresentaram as maiores intensidades de compostos. Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que os compostos caracterizados não apresentaram poder de atração ou repulsão dos insetos *Culicoides*. Provavelmente, as concentrações utilizadas e o delineamento experimental empregado não foram eficazes para a obtenção de resultados conclusivos. Portanto, para maior acurácia desses resultados se faz necessária a realização de outros ensaios biológicos, adotando-se maior número de repetição e concentração dos compostos.

Essa caminhada foi de muito aprendizado e reflexão, principalmente no que diz respeito à importância das doenças causadas pelas arboviroses, que têm vetores com grande potencial de ampla distribuição. Portanto, o controle dos insetos vetores pode ser a estratégia mais indicada de combate à essas doenças. Nesse sentido, a ecologia química tem muito a contribuir na obtenção de técnicas de controle desses vetores sem causar impactos negativos para a saúde humana, dos animais e do meio ambiente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, M.A. et al. Bluetongue virus: a known virus, a current threat. **Revista Saúde Animal**, 38,1, 52-59, 2016.

ANDERSON, C.R. et al. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **Animal Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 10, 574-578, 1961.

ANDRADE, A.J. Avaliação de cairomônios na atratividade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Brejo do Mutambal, município de Varzelândia, MG. 2006. 176 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

ASHRAF, M.; EL-SAYED. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals 50 Years of Pheromone Research (1959-2009). **Plant & Food Research**, 2009.

ANON. Evidence of seroconversion to SBV in camelids. **Veterinary Record**, 170,603, 2012.

BEER, M; CONRATHS, F. J.; VAN DER POEL, W. H. M. ‘Schmallenberg virus’ – a novel Orthobunyavirus emerging in Europe. **Epidemiology Infection**, 141, 1–8, 2013.

BRATTOLI, M. et al. Odour Detection Methods: Olfactometry and Chemical Sensors. **Sensors**, 11, 5290-5322, 2011.

BRAVERMAN, Y.; CHIZOV-GINZBURG, A. Repellency of synthetic and plant-derived preparations for *Culicoides imicola*. **Medical Veterinary Entomology**, 11, 355–360, 1997.

CARDOSO, B.F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* 110, 745–754, 2015.

CFSP. The Center for Food Security e Public Health, disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/>.

CIEVS- Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde. Salvador, Bahia, 2017.

DEL GRANDE, M. 2008. Princípios básicos de cromatografia gasosa. disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/eventos/seminariodequimica/1%B0%20Minicurso%20Pradu%E7%E3o%20e%20Qualidade%20de%20Biodiesel/cromatografiagasosa.pdf>

DICKE, M.; SABELIS, M.W. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. **Function Ecology**, 2, 131-139, 1988.

DU TOIT, M. The Transmission of Bluetongue and Horse Sicknes by *Culicoides*. **Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, 19, 2, 1944.

E. KÓVATS, V. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1 Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. **Helvetica**, 41,7, 1915-1932, 1958.

EIRAS, A.E.; MAFRA NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M. Feromônio de insetos: biologia, química e emprego no manejo de praga, 2 ed., Ribeirão Preto-SP: Holos, 3, 27-39, 2001.

FERREIRA, E.V.; DELLA LUCIA, T.M.C. Feromônio de insetos: biologia, química e empregos no manejo de pragas, 2 ed., Ribeirão Preto-SP: Holos, 206, 2001.

GIKONYO, N.K. et al. Odor composition of preferred (Buffalo and Ox) and nonpreferred (Waterbuck) hosts of some Savanna Tse Tse flies. **Journal of Chemical Ecology**, 28 (5), 969-981, 2002.

GIKONYO, N.K. et al. Responses of *Glossina morsitans morsitans* to blends of electroantennographically active compounds in the odors of its preferred (Buffalo and Ox) and nonpreferred (Waterbuck) hosts. **Journal of Chemical Ecology**, 29 ,10, 2331-2345, 2003.

GOFFREDO, M.; MEISWINKEL, R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. **Veterinaria Italiana**, 40, 260–265, 2004.

GOULART, H.F. et al. Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. **Revista virtual de química**, 7 ,4, 1205-1224, 2015.

GOULART, H.F. et al. Uso de uma Nova Mistura de Composição Química, de Fontes Atrativas, para Controlar o Inseto Praga *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) em Areáceas: um estudo prospectivo. *Cadernos de Prospecção*, 12, 825-834, 2019.

HARRUP, L.E.; MIRANDA, M.A.; CARPENTER, S. Advances in control techniques for *Culicoides* and future prospects. *Veterinaria Italiana*, 52, 247–264., 2016.

HENNING M.W. African horse sickness, perdesiekte, pestis equorum, *Animal diseases of South Africa*, 3 ed., Central News Agency Ltd., Pretoria, 785-808,1956.

HOFFMANN A.A.; ROSS P.A.; RASIC G. *Wolbachia* strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. *Evolution Applied*, 8, 751-768, 2015.

HOFMANN, M.A. et al. Genetic characterization of Toggenberg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, 14,1855–1861, 2008.

HOFFMANN, B. et al. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerging Infection Diseases*, 18, 469-472, 2012.

JELVEZ SERRA, N.S. et al. Identification of stable fly attractant compounds in vinasse, a byproduct of sugarcane-ethanol distillation. *Medical and Veterinary Entomology*, 8, 1223, 2017.

KARLSON, P.; LUSHER, M. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 55- 56,1959.

LAU, S.K. et al. *Elizabethkingia anopheles* bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality. *Science Reports*, 6, 26045, 2016.

LEWIS, S.E. et al. First detection of endosymbiotic bacteria in biting midges *Culicoides pulicaris* and *Culicoides punctatus*, important Palaearctic vectors of bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, 2014.

LOGAN, J. G.; BIRKETT, M.A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest Management Science*, 63,647–657, 2007.

MAAN, S. et al. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerging Infection Diseases*,17, 886–889, 2011.

MACLACHLAN, N.J.; GUTHRIE, A.J. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. **Veterinary Research**, 41,6, 35,2010.

MARDULYN, P. et al. Climate change and the spread of vector-borne diseases: using approximate Bayesian computation to compare invasion scenarios for the bluetongue virus vector *Culicoides imicola* in Italy. **Molecular Ecology**, 22, 9, 2456-2466, 2013.

MC-LAFFERTY F. W.; TURECEK, F. Interpretation of Mass Spectra Ed. **University Science Book**, 4ed., 1993.

MEE, P.T. et al. Detection of low-level *Cardinium* and *Wolbachia* infections in *Culicoides*. **Applied Environment Microbiology**, 81, 6177–88, 2015.

MEE P.T. et al. Detection of *Elizabethkingia* spp. in *Culicoides* Biting Midges, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, 23, 8, 2017.

MEISWINKEL, R.; BAYLIS, M.; LABUSCHAGNE, K. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness, Bull. **Entomology Research**, 90,509–515, 2000.

MELLOR, P.S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. **Annual Review of Entomology**, 45, 307-340, 2000.

MELLOR, P.S.; WITTMANN, E. J. Bluetongue Virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. **The Veterinary Journal**, 164, 20- 37, 2002.

MELLOR, P.S. et al. Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006. **Preventive Veterinary Medicine**, 87, 4-20, 2008.

MILLS, M.K.; D, NAYDUCH.; K, MICHEL. Inducing RNA interference in the arbovirus vector, *Culicoides sonorensis*. **Insect Molecular Biology**, 24 (1), 105–114, 2015.

MORAES, M.C.B. et al. Metodologia para estudos de semioquímicos e a sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitoide *Telenomus podisi*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

NETO, F.R.A.; NUNES, D. S. S. Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins. Editora Interciência, 5, 71-83, 2003.

NORDLUND, D.A.; LEWIS, W.J. Terminology of chemical- releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal Chemical Ecology**, 2,211-220,1976.

NUNES, M.R.T. et al. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 11, 1610-1613, 2005.

OIE. OIE Technical factsheet. May 2012. 1. Bluetongue virus (http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmallenberg_virus.pdf). Acesso em 4 de Abril de 2020.

PAGE, C.P. et al. Duration of repellency of N,N-diethyl-3-methylbenzamide, citronella oil and cypermethrin against *Culicoides* species when applied to polyester mesh. **Veterinary Parasitology**, 163, 105–109, 2009.

PICKETT C.; BUGG, R.L. Enhancing biological control: habitat management to promote natural enemies of agricultural pests. California, Berkeley, University California Press, 422, 1998.

PINILLA, E.C.; OLIVARES, J.C.; JABBAR, T. et al. Recombinant vaccines against bluetongue virus. Elsevier, **Virus Research**, 182, 78-86, 2014.

PURSE, B.V. et al. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. **Nature reviews: Microbiology**, 3, 171-181, 2005.

ROBIN, M. et al. African Horse Sickness: the potential for an outbreak in disease-free regions and current disease control and elimination techniques. **Equine Veterinary Journal**, 5, 659-69, 2016.

ROMERO, D.A.; ESCOBAR, L.E. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas, **Microbes and Infection**, 2018.

SANCO, D. Report on the Outcome of the EU Co-financed Animal Disease Eradication and Monitoring Programmes in the MS and the EU, 2011.

SANT'ANA, J.; STEIN, K. Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos. In: FERREIRA, J.T.B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. Produtos naturais no controle de insetos. Editora da UFSCar, 3, 47-74, 2001.

SBARBATI, A.; OSCULATI, F. Allelochemical Communication in Vertebrates: Kairomones, Allomones and Synomones. **Cells Tissues Organs**, 183, 206–219, 2006.

SCHOFIELD, S.; BRADY, J. Effects of carbon dioxide, acetone and 1 -octen-3-01 on the flight responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in a wind tunnel. **Physiological Entomology**, 22, 380-386, 1997.

SKOOG, D.A. et al. Fundamentos de Química Analítica. v. 1, São Paulo: Cengage Learning, cap. 31, 899-920, 2006.

SOARES, A.M.L. et al. Identification of -6-unsaturated, monoenyl type I pheromone compounds from the cashew stem borer *Anthistarcha binocularis* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Pest Management Science**, 1, 1, 2019.

SPERLOVA, A.; ZENDULKOVA D. Bluetongue: a review. **Veterinary Medicine**, 56, 430–452, 2011.

TORR, S.J.; MANGWIRO, T.N.C.; HALL, D.R. The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) to cattle. **Bulletin of Entomological Research**, 96, 71 – 84, 2006.

VIANA, A.C. et al. Validation of analytical method for rhynchophorol quantification and stability in inorganic matrix for the controlled release of this pheromone. **Chemistry Central Journal**, 12, 1, 54, 2018.

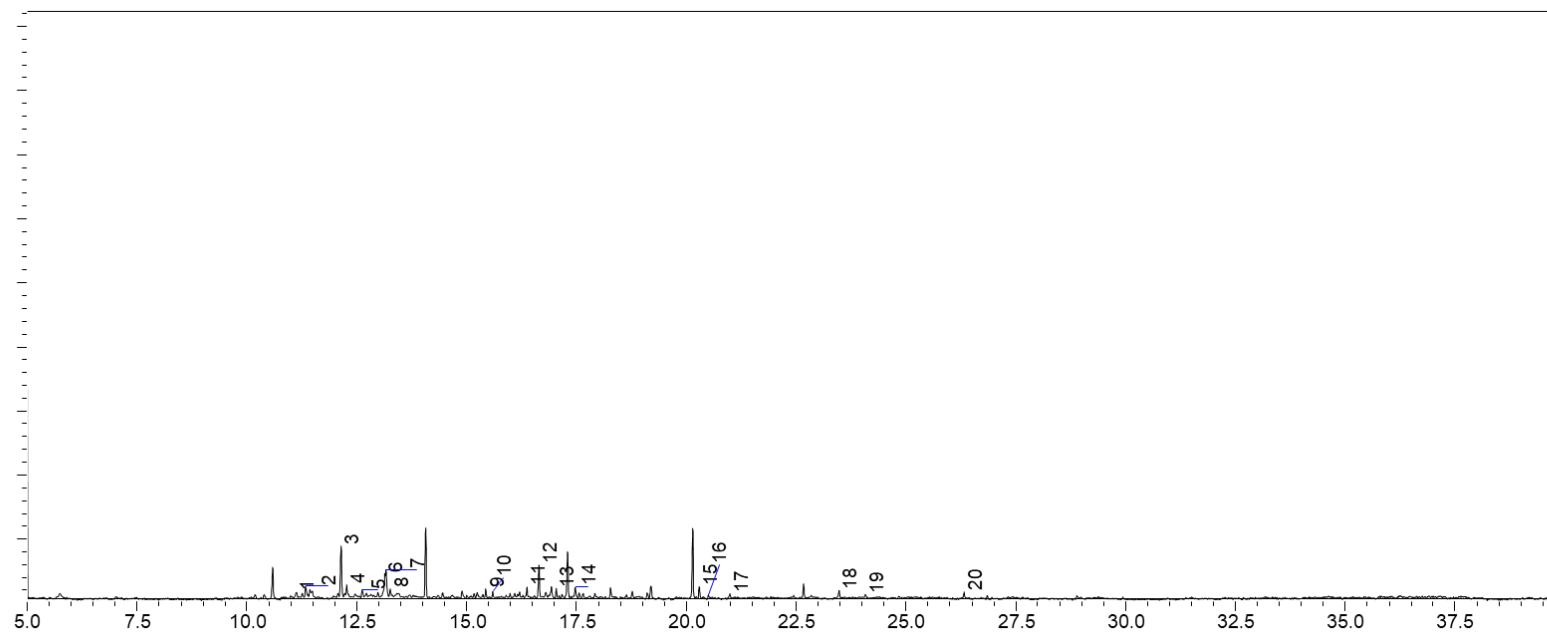
ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; LEAL, W.S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, 22, 1, 263-268, 1999.

ZIENTARA, S.; WEYER, C.T.; LECOLLINET, S. African Horse Sickness. **Revue Scientific Technique Office Epizootic**, 34, 315–327, 2015.

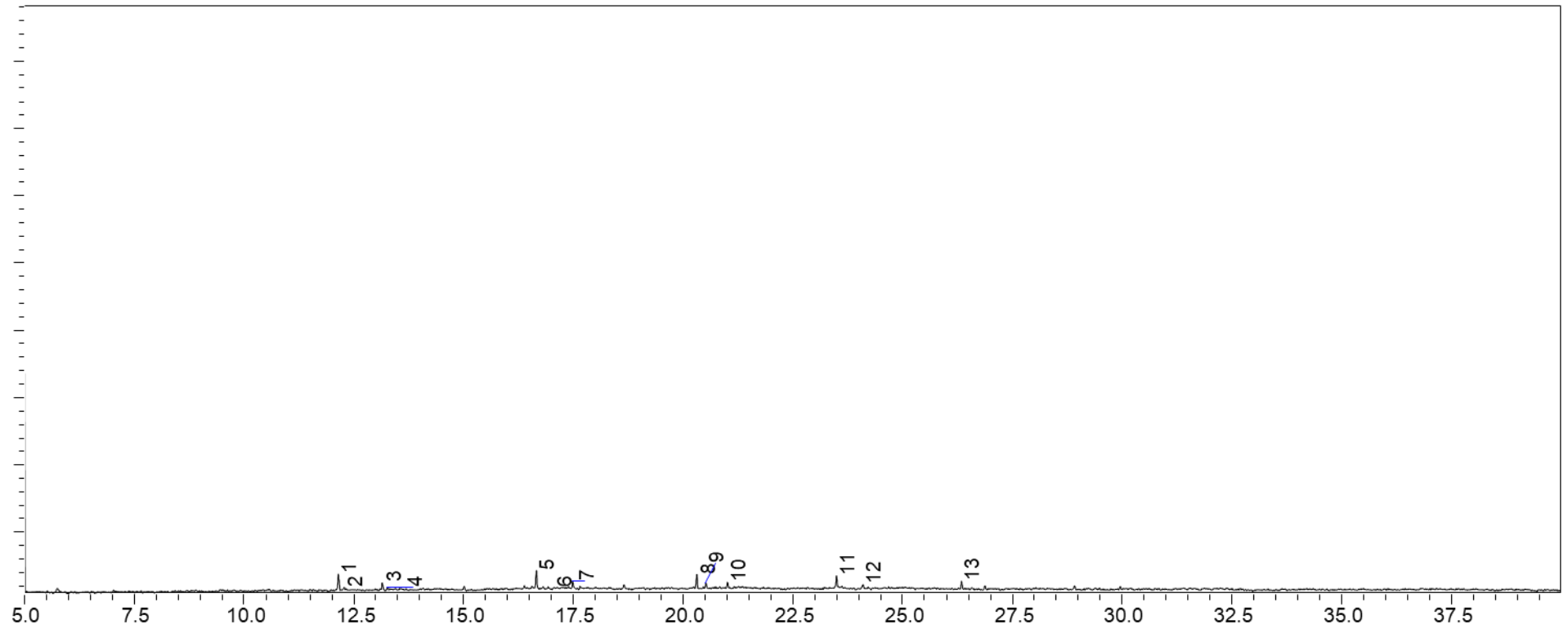
ZIENTARA, S. et al. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. **Emerging Infection Diseases**, 20, 2123–2132, 2014.

APÊNDICE

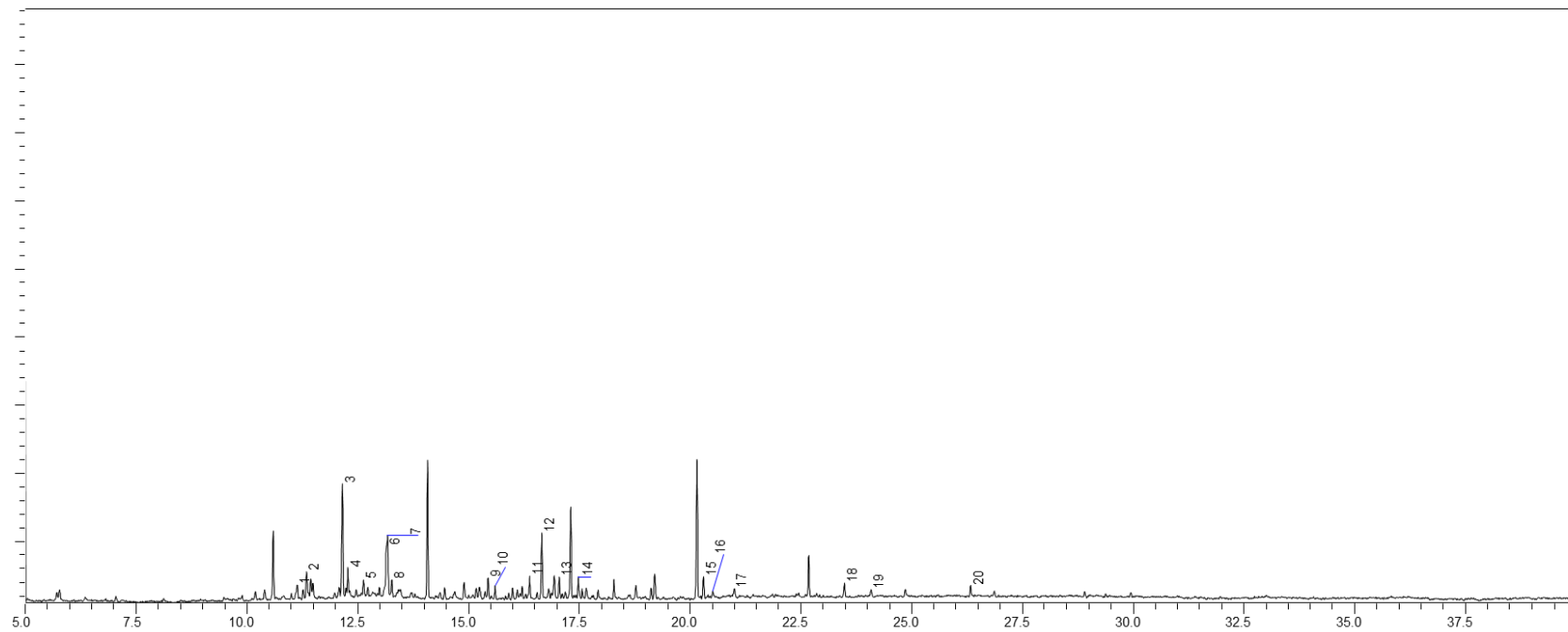
CROMATOGRAMAS



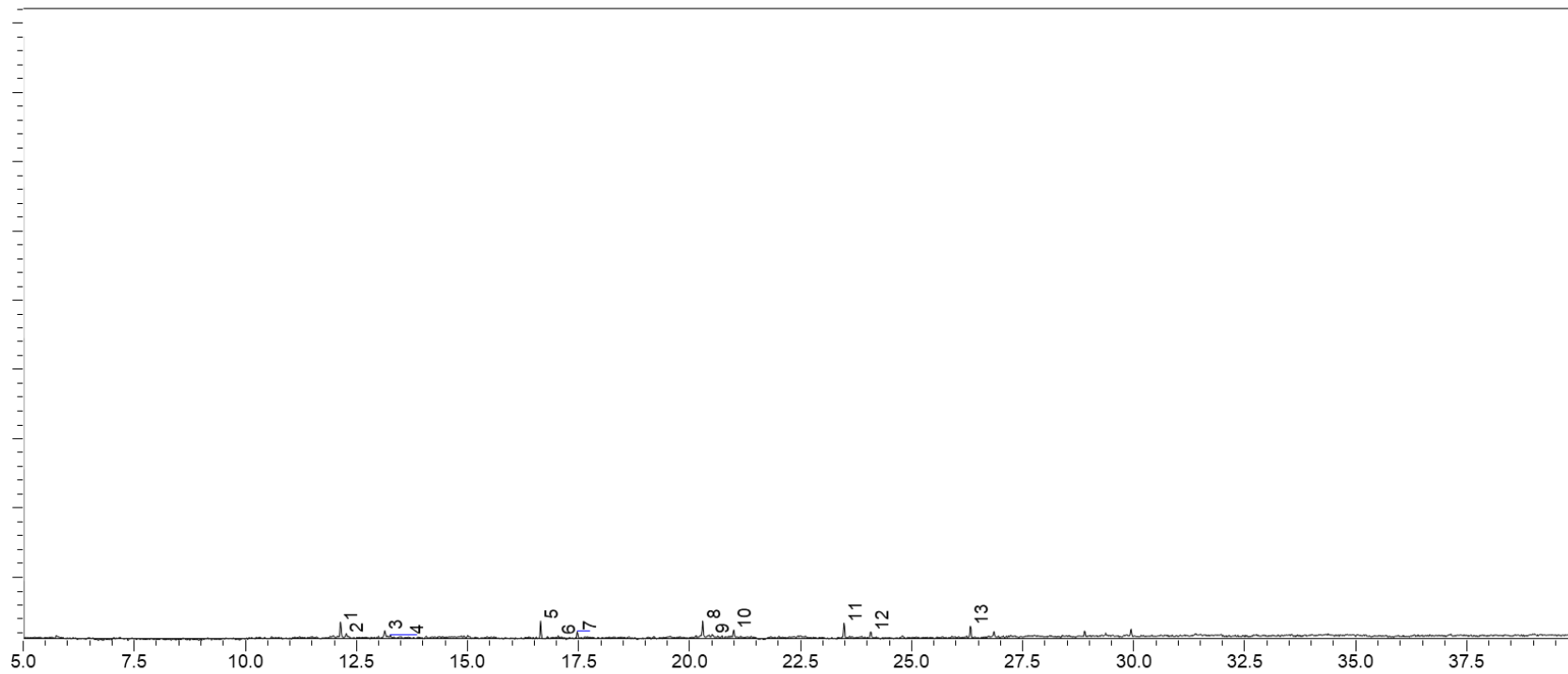
Cromatograma emitido pelo animal 281



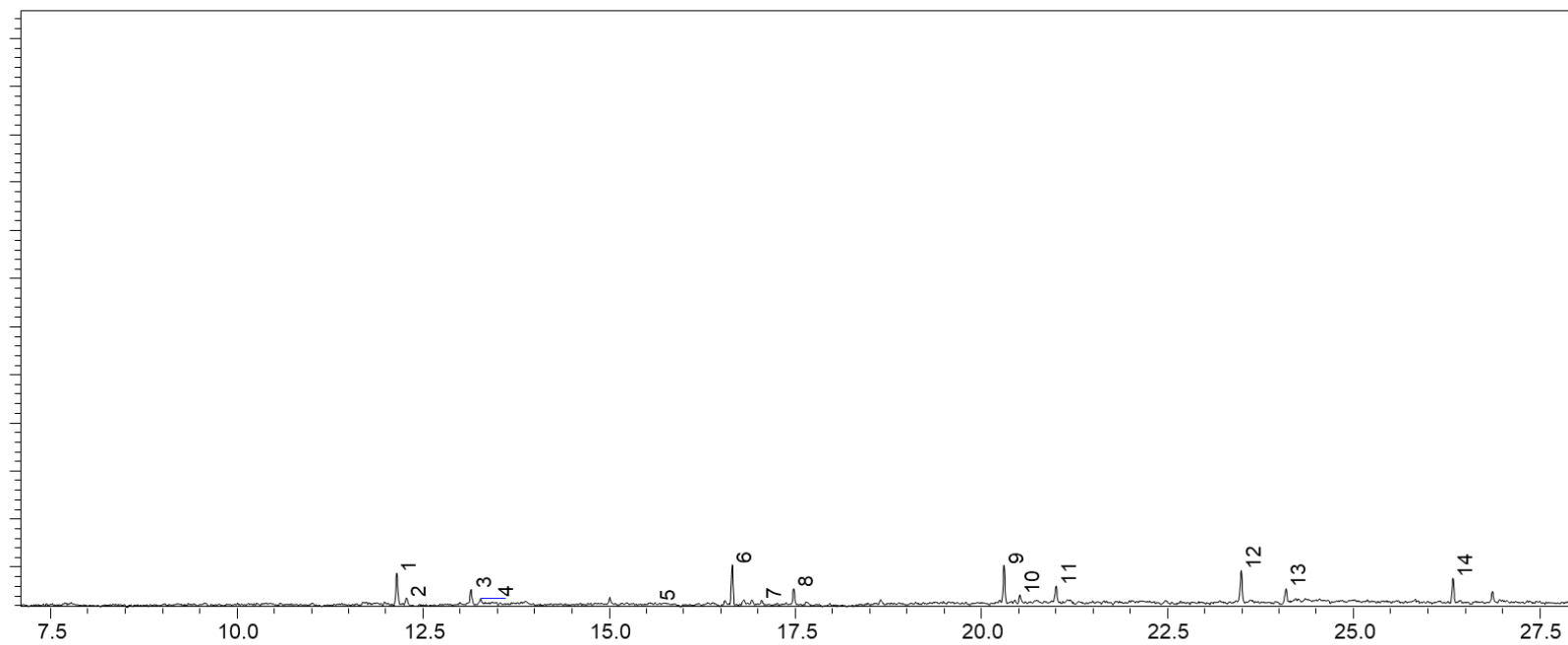
Cromatograma emitido pelo animal 283



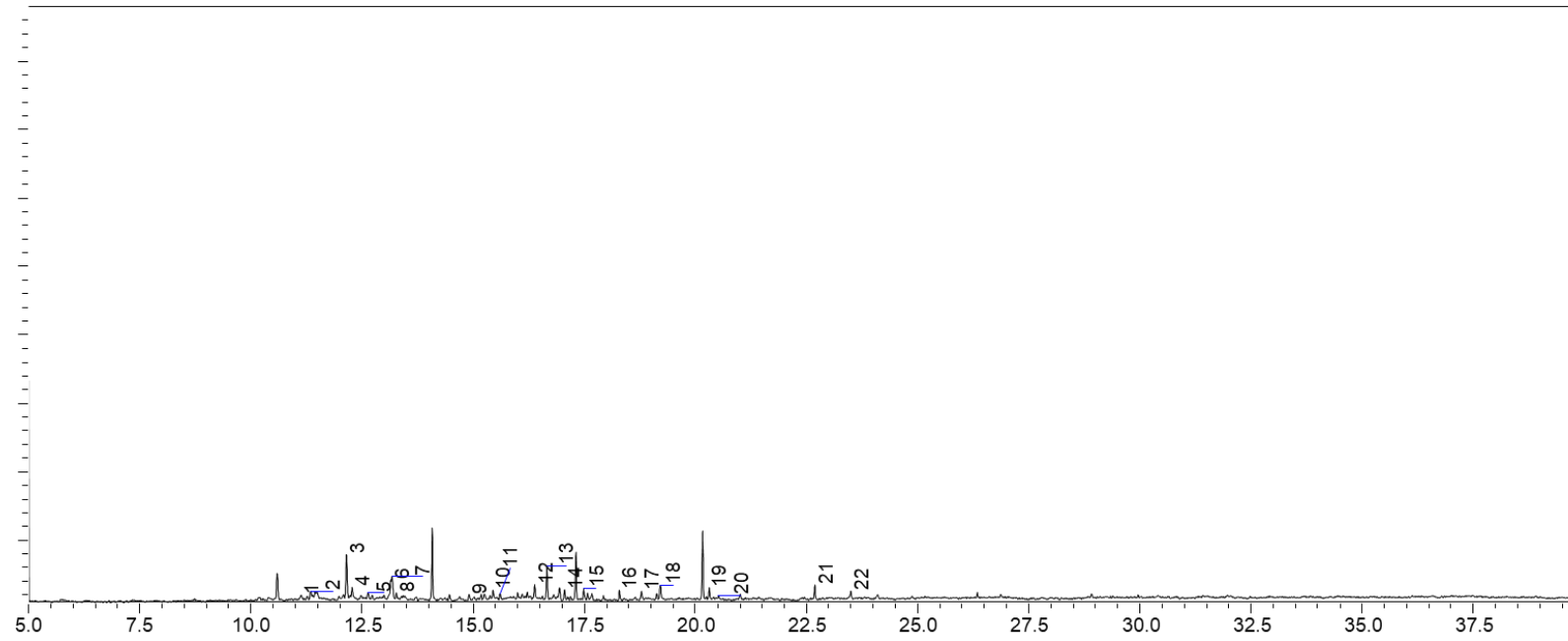
Cromatograma emitido pelo animal 284



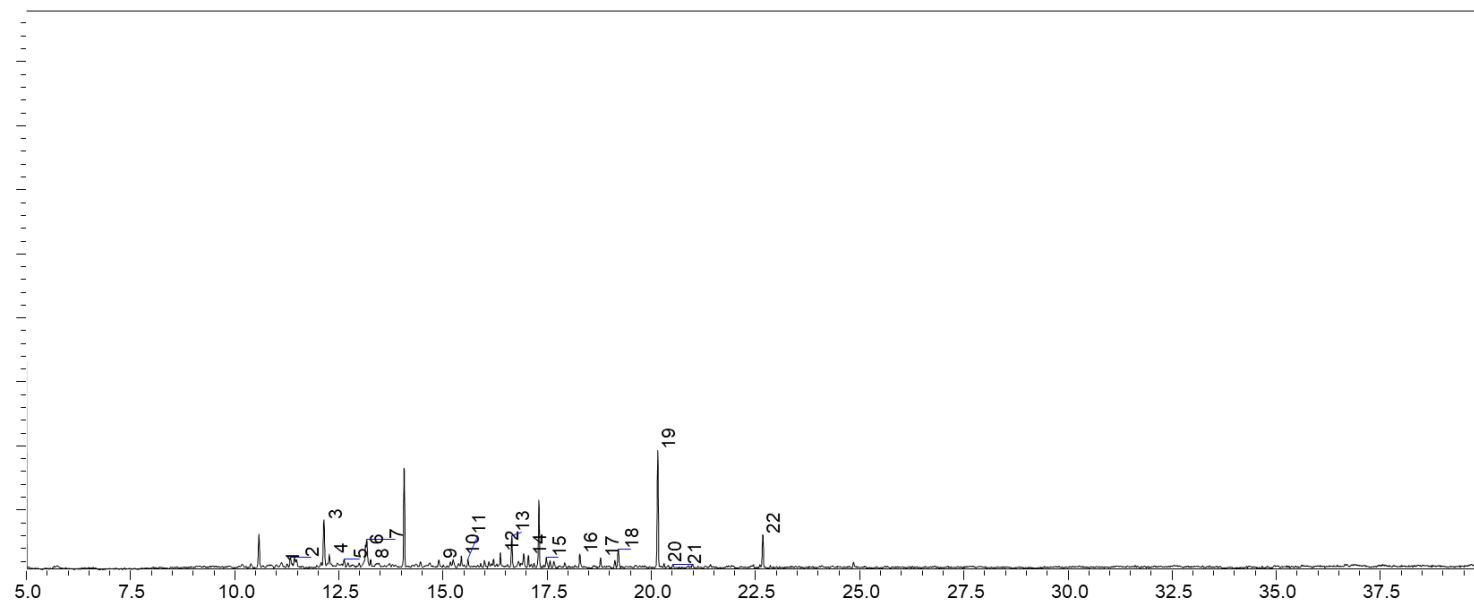
Cromatograma emitido pelo animal 37



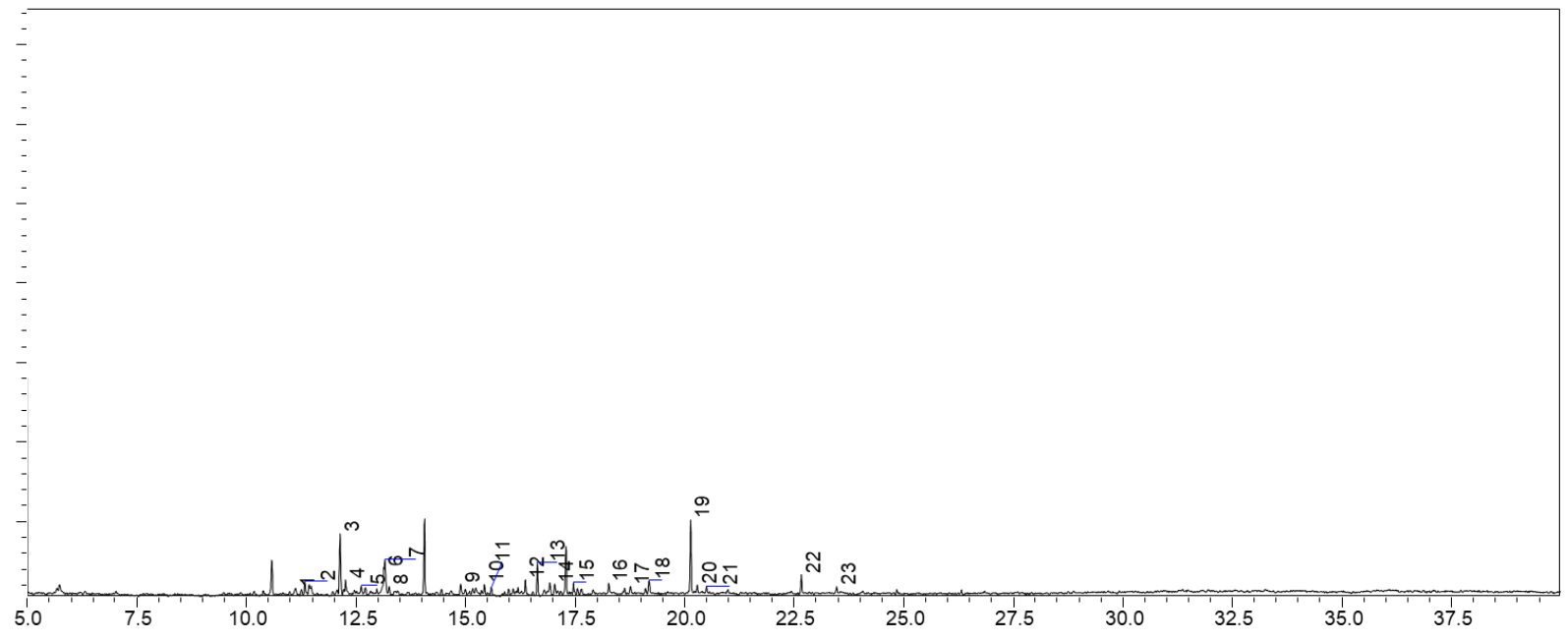
Cromatograma emitido pelo animal 393



Cromatograma emitido pelo animal 427



Cromatograma emitido pelo animal 437



Cromatograma emitido pelo animal 500

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PATENTE



12/03/2020 870200033488
15:39
29409161916693376

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 004976 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/03/2020 às 15:39, Petição 870200033488

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA NOTA TÉCNICA PARA O PERIÓDICO INSECTS.



Angelina Fraga <angelina.fraga@gmail.com>

[Insects] Manuscript ID: insects-772109 - Submission Received

Editorial Office <insects@mdpi.com> 28 de março de 2020 12:54
Responder a: insects@mdpi.com
Para: ANGELINA FRAGA <angelina.fraga@gmail.com>
Cc: Raisa Rodrigues Santos Rios <raisa.rios@hotmail.com>, Breno Araujo de Melo <breno_melo13@hotmail.com>, Sybelle Georgia Mesquita da Silva <belle_mesquita21@hotmail.com>, Neuriane Cavalcante da Silva <neurianecavalcante@gmail.com>, Vitória Regina Viana dos Santos <vihfirmino@gmail.com>, Jakeline Maria dos Santos <jackbilu@hotmail.com>, Antônio Euzébio Goulart Santana <aegsal@gmail.com>, Angelina Bossi Fraga <angelina.fraga@gmail.com>

Dear Professor FRAGA,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Insects
Manuscript ID: insects-772109
Type of manuscript: Communication
Title: Culicoides insignis Lutz, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in northeast of Brazil
Authors: Raisa Rodrigues Santos Rios, Breno Araujo de Melo, Sybelle Georgia Mesquita da Silva, Neuriane Cavalcante da Silva, Vitória Regina Viana dos Santos, Jakeline Maria dos Santos, Antônio Euzébio Goulart Santana, Angelina Bossi Fraga *
Received: 28 March 2020
E-mails: raisa.rios@hotmail.com, breno_melo13@hotmail.com, belle_mesquita21@hotmail.com, neurianecavalcante@gmail.com, vihfirmino@gmail.com, jackbilu@hotmail.com, aegsal@gmail.com, angelina.fraga@gmail.com
Vector-Microbe Interactions
https://www.mdpi.com/journal/insects/special_issues/vector_microbe

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):
https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/b0a2726c372a5b77a20a37b80dbc2129

The following points were confirmed during submission:

1. Insects is an open access journal with publishing fees of 1400 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/insects/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO DE REVISÃO PARA O PERIÓDICO VETERINARIA ITALIANA



Angelina Fraga <angelina.fraga@gmail.com>

[VetIt] Submission Acknowledgement

Laura Ambrogi <l.ambrogi@izs.it>
Para: Professor Angelina Bossi FRAGA <angelina.fraga@gmail.com>

10 de outubro de 2019 15:06

Dear Dr Professor Angelina Bossi FRAGA,

Thank you for submitting the manuscript "Culicoides insects: A threat to human and animal health" to Veterinaria Italiana. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:
<https://www.veterinariaitaliana.izs.it/index.php/VetIt/author/submission/2009>
Username: angelina

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Best regards,

Laura Ambrogi
Veterinaria Italiana

--

Dr Laura Ambrogi
Associate editor - Veterinaria Italiana
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G.
Caporale'
Campo Boario
64100 Teramo, Italy
http://www.izs.it/vet_italiana/index.htm