



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE PRODUTOS BIOCIDAS NO PROCESSO DE  
AUTORIZAÇÃO PARA COMERCIALIZAÇÃO, E SUA APLICAÇÃO NO CONTROLO  
DE *Culicoides* EM SURTOS DE LÍNGUA AZUL**

RUI MANUEL SANTANA CEPEDA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca de Sampaio  
Professor Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas  
Professora Doutora Marília Catarina Leal Ferreira

ORIENTADOR

Professor Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

2010

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE PRODUTOS BIOCIDAS NO PROCESSO DE  
AUTORIZAÇÃO PARA COMERCIALIZAÇÃO, E SUA APLICAÇÃO NO CONTROLO  
DE *Culicoides* EM SURTOS DE LÍNGUA AZUL**

RUI MANUEL SANTANA CEPEDA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca de Sampaio  
Professor Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas  
Professora Doutora Marília Catarina Leal Ferreira

ORIENTADOR

Professor Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

2010

LISBOA

**Esta dissertação é dedicada ao avô Santana e ao Tio Zé. Ainda que já não estejam conosco foram e serão sempre uma fonte de inspiração assim como exemplo de dedicação e trabalho contribuindo de forma marcante para o meu sucesso acadêmico e pessoal.**

## **Agradecimentos**

Esta dissertação surge como corolário do período iniciado em 2002. No primeiro dia que entrei na Faculdade de Medicina Veterinária não poderia imaginar sequer uma ínfima parte do que se iria passar nos anos seguintes. Nestes 8 anos vivi algumas das maiores alegrias da minha vida, como também passei pelos mais exigentes desafios que me foram colocados. Se dos bons momentos ficarão alegrias gravadas profundamente na memória, das dificuldades vão ficar aqueles que me deram a mão e o crescimento pessoal que daí adveio.

Foram muitos os que tiveram um contributo decisivo para chegar onde estou, a lista de gratidão é grande e o simples facto de enumerar alguns será injusto para outros, no entanto é impossível não o fazer.

Os pilares que sustentam o meu desenvolvimento estão seguramente fundeados na minha família, e a sua ajuda, compreensão e por vezes sacrifício são o principal motivo pelo momento em que me encontro, em especial os meus pais e irmãos.

O Professor Fernando Boínas, com a sua disponibilidade, conselhos sábios e grande paciência tem sido sem dúvida um grande mestre.

À Dr.<sup>a</sup> Ines Almeida, que desde o primeiro momento esteve receptiva à ideia do estágio tendo sido, em conjunto com a Dr.<sup>a</sup> Cristina Costa, a minha bússola no complexo mundo dos biocidas. Os seus ensinamentos e apoio foram preciosos, sendo excelentes modelos profissionais para o meu futuro. Agradeço à Dr.<sup>a</sup> Helena Ponte e restantes elementos da Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário, pela possibilidade de aprendizagem que me proporcionaram e por toda a simpatia com que fui sempre tratado. Tenho a certeza que estes quatro meses vão ficar marcados positivamente durante o resto da minha vida.

Dizem que um Homem rico é um Homem que tem bons amigos, eu já ganhei o euro milhões várias vezes! Muitos têm sido marcantes, com grandes ou pequenos gestos, inesquecíveis. A lista é grande havendo outros que gostaria de referir também, mas o Isaac, Ana Eduarda, João, Vasco, Miguel, André, Rita, Carlota, Tiago, Alcobaça, Mariazinha e a Mafalda são incontornáveis. A Associação dos Estudantes da Faculdade de Medicina Veterinária e quem por lá passou deixa saudades e boas recordações.

## **Avaliação de eficácia de produtos biocidas no processo de autorização para comercialização, e sua aplicação no controlo de *Culicoides* em surtos de Língua Azul**

### **Resumo**

Os recentes surtos de Língua Azul na Europa e a crescente ocorrência de outras doenças transmitidas por *Culicoides* e outros vectores levaram a reequacionar recentemente medidas de controlo de insectos vectores de modo a minimizar os riscos de doenças nos animais.

Actualmente é realizada a utilização massiva de compostos com actividade insecticida e repelente na União Europeia. No entanto, a maior parte destes produtos está aprovado para utilização como insecticida ou repelente, mas não está demonstrado possuírem eficácia no controlo das espécies de *Culicoides* vectores do vírus da Língua Azul presentes na Europa.

A autorização de comercialização de um produto biocida é dada pela autoridade competente após a avaliação da informação submetida pela empresa requerente. A Direcção Geral de Veterinária é a autoridade competente no caso dos biocidas de uso veterinário em Portugal.

Esta dissertação resultou de um estágio profissionalizante na Direcção Geral de Veterinária, sendo a principal actividade desenvolvida a avaliação de eficácia de biocidas de uso veterinário.

Nos vinte e nove produtos submetidos à Direcção Geral de Veterinária e avaliados, todos continham erros na sua fundamentação processual. Em onze itens avaliados no âmbito da eficácia, o autor contabilizou 97 erros. Os itens onde se detectaram maior número de erros foram o Mecanismo de acção (17,5%), Limitações à eficácia (18,5%) e Dados relativos à eficácia (29,9%). Os erros detectados foram agrupados em três tipos, Rótulo (quando considerado que a informação deveria ser especificamente incluída no rótulo), representando 5% do total, Alteração (quando foi proposta a alteração da informação apresentada), representando 18% do total e Dados insuficientes (quando os dados apresentados são insuficientes na justificação de todas as propriedades alegadas do produto), representando 77% do total.

Foi possível concluir que a indústria apresenta dificuldades significativas na compreensão da legislação e dos requisitos técnicos, no seu cumprimento, assim como na fundamentação da eficácia dos seus produtos. O decurso de um período europeu de transição relativamente aos produtos biocidas até 2014, assim como um processo de revisão das substâncias activas autorizadas minora a gravidade dessas falhas. Para facilitar os procedimentos elaborou-se um documento incorporando a legislação e normativos existentes à data, facilmente actualizável no futuro, a disponibilizar pela Direcção Geral de Veterinária.

**Palavras-chave:** Biocida, Avaliação de Eficácia, Insecticidas, Repelentes, *Culicoides*, Língua Azul



## **Efficacy Assessment of biocide products on their authorization for market placing and their application in the control of *Culicoides* on Bluetongue**

### **Abstract**

The recent Bluetongue outbreaks in Europe and the arising occurrence of *Culicoides* and other diseases vector transmitted have led to rethink the control measures applied to minimizing disease risk in animal.

Presently, in the European Union, are being used massively compounds with insecticidal or repellent activity. Most of those products are approved for insecticidal or repellent use but their efficiency in controlling Bluetongue vectors *Culicoides* is not demonstrated on most of them.

The authorization for commercialization of a biocide product is given by the competent authority, after assessing the information submitted by the applying company. Direcção Geral de Veterinária is the competent authority for veterinary use biocide products in Portugal.

This dissertation results of a professionalizing internship in Direcção Geral de Veterinária, being the assessment of efficacy of veterinary use biocide products the main activity.

In the twenty nine products submitted to Direcção Geral de Veterinária and assessed, all contained errors in the data submitted. The eleven items evaluated for the efficacy assessment, were had 97 errors. The items where more errors were found were the mechanism of action (17,5%), limitations to efficacy (18,5%) and in the data related to efficacy (29,9%). These errors were grouped in three categories: Label (when was considered that data should be specifically included in the label) accounting for 5%, Change (when was proposed changes in the submitted data) accounting for 18% and Insufficient data (when the data submitted was not considered enough to justify the product efficacy) accounting for 77%.

It was possible to conclude that the industry has severe difficulties in understanding the legislation and the technical requirements, achieving their goals and on justifying the efficacy of their products. The ongoing transitional period in the European Union, valid until 2014, as well as the reviewing program of the active substances authorized minimises these faults. To facilitate the industry with the submission protocols, was made a document using all the existing legislation, easily updatable, to be provided by Direcção Geral de Veterinária to the interested parts.

**Key words:** Biocide, Efficacy Assessment, Insecticide, Repellent, *Culicoides*, Bluetongue



## Índice geral

1 – Introdução.....	1
2 – Insectos do género <i>Culicoides</i> .....	4
2.1 – Morfologia .....	4
3.2 – Ciclo de vida .....	5
2.3 – Importância patogénica .....	8
2.4 – Controlo.....	10
2.4.1 – Aplicação de Insecticidas no ambiente .....	11
2.4.2 - Utilização de redes ou de telas impregnadas de insecticidas .....	11
2.4.3 - Aplicação de insecticidas nos animais .....	11
2.4.4 - Utilização de insecticidas larvicidas .....	12
2.4.5- Utilização de repelentes ou chamarizes .....	13
2.4.6 - Utilização de métodos de controlo biológico.....	13
2.4.7 - Estabulação .....	13
2.4.8 - Destruição dos locais de criação.....	13
3 – Doença da Língua Azul.....	15
3.1 – Etiologia .....	15
3.2 – Epidemiologia .....	15
3.3 – Patogénese.....	16
3.4 – Sinais Clínicos e Lesões .....	16
3.5 - Diagnóstico .....	17
3.6 – Tratamento.....	18
3.7 – Controlo e profilaxia.....	18
3.8 Língua Azul na Europa .....	19
3.9 – Língua Azul em Portugal .....	22
3.10 – Impacto económico.....	24
4 – Biocidas .....	25
4.1 - Enquadramento Legal .....	25
4.2 - Biocidas de Uso Veterinário e Tipos de Produto .....	26

4.3 - Substâncias activas e período de revisão .....	27
4.4 - Substâncias activas dos tipos de produto 18 e 19 .....	27
4.4.1 Insecticidas .....	28
4.4.1.1 Piretrinas e Piretróides.....	28
4.4.1.2 Organoclorados.....	29
4.4.1.3 Organofosforados .....	30
4.4.1.4 Carbamatos.....	30
4.4.1.5 Lactonas.....	31
4.4.1.6 Outros.....	31
4.4.2 Repelentes .....	32
4.5 Produtos de uso Veterinário e Medicamentos de Uso Veterinário.....	33
5 - Resultados.....	36
5.1 - Avaliação de eficácia de produtos Biocidas .....	36
5.2 - Período de Revisão .....	40
6 - Conclusões.....	42
7 - Bibliografia.....	45

## Índice de Figuras

Figura 1 - Comparação entre as dimensões de mosca, mosquito e <i>Culicoides</i> .....	4
Figura 2 - Aspectos morfológicos de <i>Culicoides</i> .....	5
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Culicoides</i> .....	6
Figura 4 - Esquema de armadilha utilizando luz ultra violeta.....	7
Figura 5 - Distribuição mundial das espécies de <i>Culicoides</i> envolvidos na transmissão do vírus da Língua Azul e dos seus serótipos .....	9
Figura 6 - <i>C. imicola</i> .....	9
Figura 7 – <i>C. obsoletus</i> .....	10
Figura 8 - Zonas de restrição à movimentação animal na Europa .....	18
Figura 9 - As três principais rotas de introdução de Língua Azul na Europa.....	20
Figura 10 - Mapa com localização dos surtos de Língua Azul na Europa entre 1 de Janeiro de 2008 e 31 de Dezembro de 2009 .....	21
Figura 11 - Mapa com localização dos surtos de Língua Azul na Europa entre 1 de Janeiro de 2010 e 25 de Março de 2010 .....	22
Figura 12 - Distribuição dos produtos avaliados por tipo de produto.....	37
Figura 13 - Distribuição das não conformidades por categoria.....	38
Figura 14 - Distribuição do número de não conformidades por ponto avaliado .....	39
Figura 15 - Distribuição dos tipos de erro por ponto .....	39

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Espécies de <i>Culicoides</i> com competência para transmissão do vírus da Língua Azul.....	8
Tabela 2 - Resumo das rotas de introdução do Vírus da Língua Azul nas incursões pela Europa entre 1998 e 2007.....	20
Tabela 3 – Exemplos de Piretrinas e Piretróides notificados como tipo de produto 18 na União Europeia.....	29
Tabela 4 – Exemplos de Organofosforados notificados como tipo de produto 18 na União Europeia.....	30
Tabela 5 – Exemplos de Carbamatos notificados como tipo de produto 18 na União Europeia.....	31
Tabela 6 – Exemplo de Avermectina notificada como tipo de produto 18 na União Europeia.....	31
Tabela 7 – Exemplos de substâncias activas de outros tipos, notificadas como tipo de produto 18 na União Europeia.....	31
Tabela 8 – Exemplos de substâncias activas notificadas como tipo de produto 19 na União Europeia.....	33
Tabela 9- Progressão das associações entre Substâncias Activas e Tipos de Produto.....	40

## Índice de abreviaturas e Símbolos

AC	Autoridade Competente
ADNS	<i>Animal Disease Notification System</i>
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
AGID	<i>Agar Gel Immunodiffusion</i>
BUV	Biocida de Uso Veterinário
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
cELISA	<i>Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEET	N,N-Dietil-m-toluamida
DIVA	<i>Differentiating Infected from Vaccinated Animals</i>
DISC	<i>Disabled Infectious Single Cycle Vaccine</i>
DGV	Direcção-Geral de Veterinária
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
GABA	Ácido Gama-aminobúterico
LA	Língua Azul
MUV	Medicamento de Uso Veterinário
OIE	Organização Mundial das Epizootias
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PT	Tipo de Produto
PUV	Produto de Uso Veterinário
®	Marca Registada
RT-PCR	<i>Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SA	Substância Activa
TNsG	<i>Technical Notes for Guidance</i>
UE	União Europeia
VLA	Vírus da Língua Azul
VLP	<i>Virus-like particle</i>

## 1 – Introdução

Esta dissertação surge na sequência do estágio curricular, parte integrante do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. O estágio realizado foi de carácter profissionalizante, na Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário da Direcção-Geral de Veterinária (DGV) e decorreu entre 3 de Dezembro de 2009 e 2 de Abril de 2010. As actividades realizadas na DGV foram supervisionadas pela Dr.<sup>a</sup> Cristina Costa e pela Dr.<sup>a</sup> Inês Almeida, sendo elas as responsáveis pelos assuntos referentes a produtos biocidas.

O estágio teve como objectivo principal inicial o acompanhamento do processo de autorização de biocidas insecticidas e repelentes.

Inicialmente procedeu-se à familiarização com os documentos legais em vigor, assim como os documentos técnicos de suporte como seja a elaboração de um resumo técnico da norma orientativa provisória *Product type 18 and 19 - insecticides, acaricides and products to control other arthropods, draft guideline to replace part of appendices to chapter 7 (page 187 to 200) from TNSG on product evaluation*, sendo que este documento se encontra em fase de discussão final na União Europeia (UE). De seguida colaborou-se com os técnicos responsáveis da DGV na elaboração de um parecer de avaliação que contribuiu, juntamente com os pareceres das restantes autoridades competentes (AC) nacionais, para o documento final da posição Portuguesa, junto da UE.

Para além desta vertente de regulamentação e harmonização de procedimentos europeus, foram ainda realizados trabalhos de avaliação técnica, nomeadamente da eficácia, de vinte e nove produtos biocidas de uso veterinário no âmbito do seu processo de autorização, com a produção do respectivo relatório. Por motivos didácticos, estudou-se a informação submetida de produtos biocidas insecticidas e repelentes já aprovados, e discutindo-se criticamente os processos com os técnicos responsáveis por essas avaliações de eficácia. Procedeu-se da mesma forma relativamente a insecticidas anteriormente classificados como Produtos de Uso Veterinário (PUV), assim como insecticidas classificados como Medicamentos de Uso Veterinário (MUV).

Tendo em conta o processo de revisão das substâncias activas a nível Europeu, realizou-se a avaliação de eficácia de quatro substâncias activas, produção dos respectivos relatórios e discussão com os técnicos responsáveis. Essas substâncias activas referiam-se a três insecticidas, um com acção sobre térmitas, outro sobre formigas, sendo o terceiro um insecticida de largo espectro e um repelente de traças.

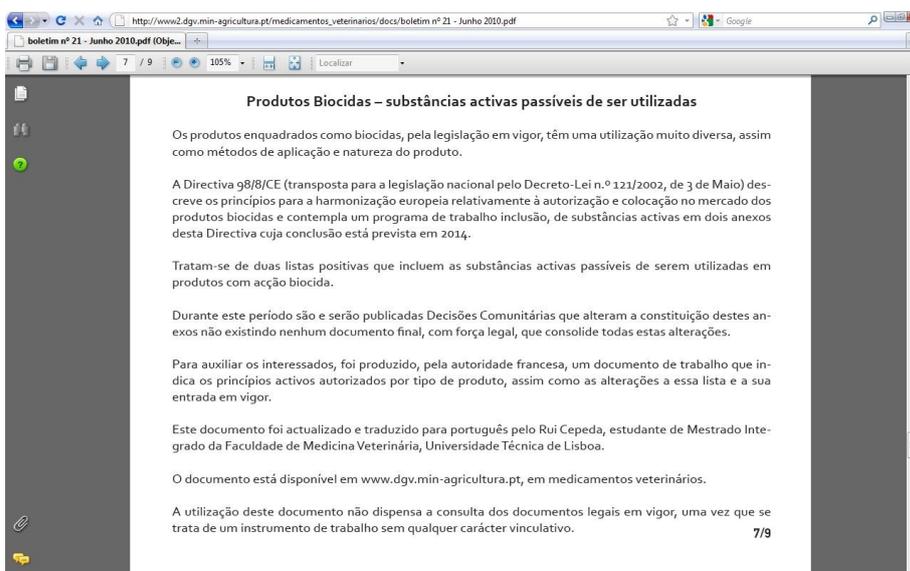
Procedeu-se à adaptação de uma tabela produzida pela autoridade competente francesa, onde estão listadas as substâncias activas notificadas para utilização como biocidas, a sua distribuição por tipo de produto e ainda informações relativas à sua autorização definitiva ou

revogação. Seguidamente actualizaram-se os dados nela contidos tendo por base todas as Decisões Comunitárias de revogação ou Directivas Europeias de inclusão das substâncias activas emitidas até à data de Fevereiro, 12 de 2010.

Alguém interessado em saber se determinada substância pode ser utilizada em produtos biocidas e em que tipos de produtos, tem que consultar dezenas de documentos dispersos, relativamente à inclusão ou revogação de substâncias activas (SA).

A tabela agora actualizada fornece uma ferramenta de trabalho e uma fonte de informação acessível e rápida para os interessados, mais vantajosa do que as alternativas anteriormente disponíveis. Este documento não se restringe aos biocidas de uso veterinário (BUV), abrangendo todos os biocidas e encontra-se disponível para consulta pelos interessados em: [http://www2.dgv.min-agricultura.pt/medicamentos\\_veterinarios/docs/Produtos%20Biocidas%20-%20subst%C3%A2ncias%20activas%20pass%C3%ADveis%20de%20ser%20utilizadas.xls](http://www2.dgv.min-agricultura.pt/medicamentos_veterinarios/docs/Produtos%20Biocidas%20-%20subst%C3%A2ncias%20activas%20pass%C3%ADveis%20de%20ser%20utilizadas.xls). As 97 páginas que compõe esta tabela impedem a sua colocação em anexo nesta dissertação, conforme o autor gostaria, no entanto é facultado no cd-room fornecido junto com a dissertação.

Encontra-se publicado no Boletim Informativo da Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário, nº 21, de Junho, 2010 uma referência a este trabalho, disponível em: [http://www2.dgv.min-agricultura.pt/medicamentos\\_veterinarios/docs/boletim%20n%C2%BA%2021%20-%20Junho%202010.pdf](http://www2.dgv.min-agricultura.pt/medicamentos_veterinarios/docs/boletim%20n%C2%BA%2021%20-%20Junho%202010.pdf)



Acompanharam-se várias reuniões com representantes de empresas, acerca de produtos biocidas.

Frequentou-se um seminário organizado pela DGV sobre Língua Azul (LA), no seu centro de formação na Venda Nova e o curso "Controlo de Culicoides em explorações pecuárias",

organizado pela Faculdade de Medicina Veterinária, que decorreu nas suas instalações e numa exploração pecuária.

O estágio decorreu sob uma cláusula de confidencialidade, condicionando a discussão do trabalho realizado a temas gerais, não constando qualquer menção específica a produtos, substâncias activas ou a dados que se encontrem protegidos. Este termo de confidencialidade tem em conta as actividades da Direcção-Geral de Veterinária, a Informação Confidencial e os Documentos Confidenciais bem como a utilização dos mesmos para gerar material confidencial.

Nessa perspectiva, na revisão bibliográfica sobre produtos biocidas, a sua estrutura reflecte aspectos dos insectos nos quais estes produtos actuam e a relação deles com a Língua Azul, doença de enorme impacto económico em Portugal e na União Europeia. Apresenta-se inicialmente uma revisão sobre *Culicoides*, suas características morfológicas, ciclo de vida, importância patogénica e estratégias para o seu controlo. Segue-se um capítulo de revisão sobre Língua Azul, doença transmitida por *Culicoides* com um impacto muito significativo quer em Portugal quer na Europa nos últimos anos e para cujo controlo contribuem alguns produtos biocidas. É abordada a sua etiologia, epidemiologia, patogénese, sinais clínicos e lesões, diagnóstico, tratamento, controlo e profilaxia, impacto económico e caracterizado o cenário Europeu e nacional. No capítulo relativo a biocidas, é apresentado o enquadramento legal dos produtos biocidas ao que se segue uma explicação sobre biocidas de uso veterinário, tipos de produtos biocidas, substâncias activas e sobre o período de revisão europeu dos produtos biocidas. São referidas as substâncias activas dos tipos de produto relativos aos insecticidas e aos repelentes, terminando com uma breve referência aos medicamentos de uso veterinário com acção insecticida.

É apresentado o trabalho desenvolvido, no âmbito do estágio curricular na Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário da Direcção Geral de Veterinária, e seus resultados. Por fim é apresentada a conclusão desta dissertação, abordando os resultados obtidos, aspectos salientes da aprendizagem e expectativas *versus* realização.

## 2 – Insectos do género *Culicoides*

Os culicídeos pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Ceratopogonidae. Esta família engloba mais de 60 géneros e mais de 4000 espécies, mas apenas o género *Culicoides* tem interesse para a Medicina Veterinária. Os artrópodes deste género são dos insectos hematófagos mais abundantes no Mundo, distribuindo-se por mais de 1000 espécies, que se alimentam em aves ou mamíferos, aos quais infligem uma picada dolorosa (Wall & Shearer, 2001).

### 2.1 – Morfologia

Estes insectos tem entre 1 e 4 mm de comprimento, sendo mais pequenos que outros insectos, como as moscas e mosquitos, com os quais lidamos quotidianamente (Figura 1). As suas pernas são relativamente curtas, especialmente as dianteiras, têm cor cinzenta ou de tom acastanhado a preto e com brilho (Wall & Shearer, 2001).

Figura 1 - Comparação entre as dimensões de mosca, mosquito e *Culicoides*

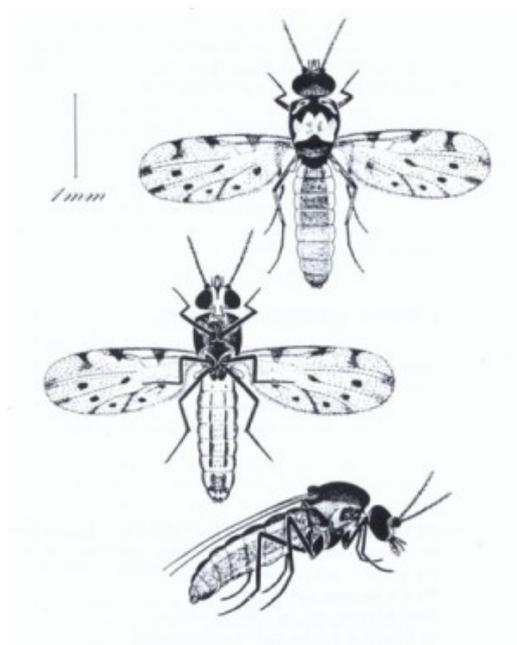


Nota: a escala encontra-se em centímetros

Fonte: Cedido por Boínas, FMV-UTL

Possuem o tórax curvado sobre a cabeça, de pequeno tamanho; as antenas longas são plumosas nos machos, enquanto as fêmeas possuem apenas pêlos curtos nos segmentos. A probóscide é curta e perfurante, sendo o seu aparelho bucal constituído por um labro pontiagudo, duas maxilas, duas mandíbulas, uma hipofaringe e um lábio que não penetra na pele durante a alimentação da fêmea (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1998). As suas asas encontram-se dobradas uma sobre a outra quando estão em repouso, sobre o abdómen (Figura 2) (Wall & Shearer, 2001).

Figura 2 - Aspectos morfológicos de *Culicoides*



Fonte: <http://www.butox-info.com/images/culicoides-sketch.gif>

A maioria dos insectos do género *Culicoides* possui um padrão de manchas cinzentas e brancas nas asas. Esse padrão apenas permite diferenciar os insectos até ao seu complexo, dentro do subgénero. Para uma diferenciação fiável entre espécies é necessário recorrer a análises morfológicas mais complexas (Meiswinkel, Venter & Nevill, 2004), como a microscopia electrónica de varredura ou a utilização de técnicas de biologia molecular como o *PCR multiplex* (Alexandre-Pires, Diaz, Meireles, Boinas & Pereira da Fonseca, 2009).

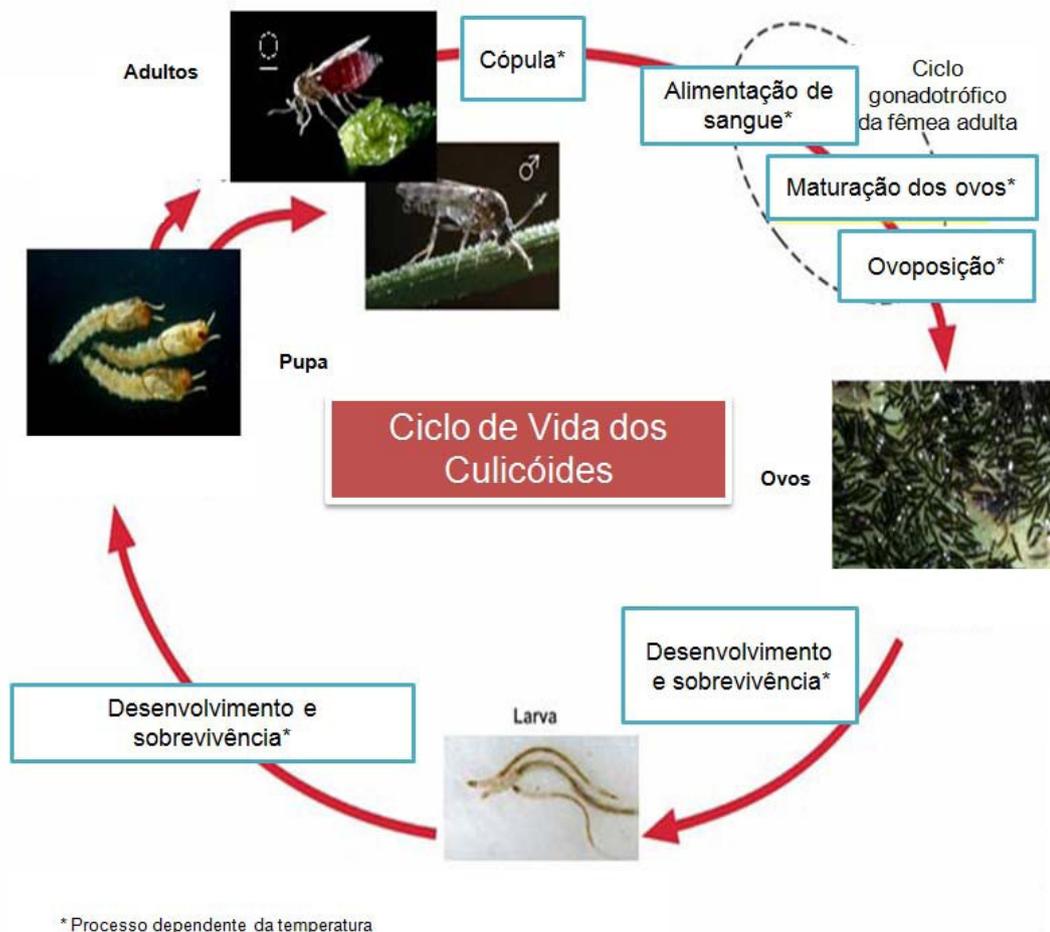
### 3.2 – Ciclo de vida

No seu ciclo de vida os insectos do género *Culicoides* atravessam vários estádios (Figura 3). O ciclo inicia-se com os ovos, pequenos, cilíndricos e escuros, sendo depositados em massas de 25 a 300 unidades, geralmente em terreno húmido, pantanoso ou em vegetação em decomposição (Wall & Shearer, 2001). Existe diversidade quanto aos locais de criação preferenciais das várias espécies, no entanto muitas delas não estão ainda devidamente estudadas (Carpenter, Mellor & Torr, 2008).

A eclosão ocorre em dois a nove dias, dependendo da espécie e da temperatura, no entanto as espécies das regiões temperadas podem resistir ao Inverno na forma de ovos. Há quatro estádios larvares, que se caracterizam por ter cabeça pequena e escura, corpo segmentado e brânquias anais terminais. Apresentam movimentos natatórios na água e alimentam-se de vegetação em decomposição, completando o desenvolvimento larvar em 14 a 25 dias em regiões quentes ou até 7 meses em regiões temperadas (Urquhart et al., 1998).

As pupas são menos activas, têm entre 2 a 4 mm de comprimento, encontram-se à superfície ou nas margens de água e caracterizam-se por um par de sífões respiratórios no cefalotórax e um par de cornos terminais que permitem o movimento. Os adultos emergem das pupas em 3 a 10 dias (Urquhart et al., 1998).

Figura 3 - Ciclo de vida de *Culicoides*



Fonte: Purse, et al. (2005)

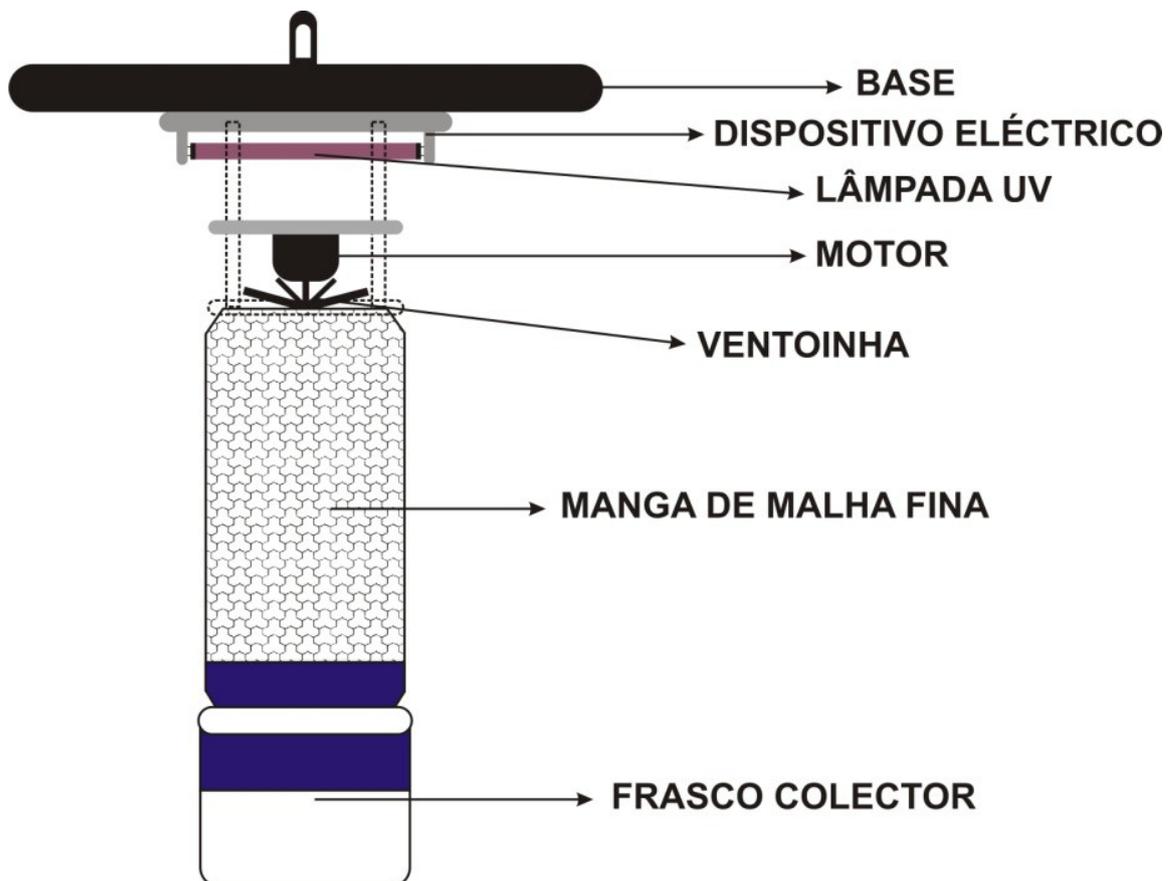
Apenas as fêmeas adultas são hematófagas e infligem uma mordedura dolorosa nos hospedeiros. Os culicídeos não são muito eficazes a voar e geralmente encontram-se perto dos seus habitats larvares em pequenos enxames imperceptíveis (Wall & Shearer, 2001). Estes insectos evitam voar quando os ventos se tornam fortes, no entanto existem evidências que eles podem ser arrastados pelo vento por distâncias de centenas de quilómetros (Meiswinkel et al., 2004). Existem espécies de *Culicoides* predominantemente endofílicas e espécies predominantemente exofílicas, havendo indícios que, em algumas espécies, a preferência varia de acordo com factores climáticos (Carpenter et al. 2008).

Os culicídeos alimentam-se ao crepúsculo ou durante a noite e as fêmeas são atraídas pelo odor e calor dos seus hospedeiros, existindo vários graus de especificidade quanto ao

hospedeiro, nas várias espécies de *Culicoides* (Wall & Shearer, 2001). No caso do *C. imicola*, o ciclo gonadotrófico (período que vai desde a procura de uma refeição de sangue, até à ovoposição) dura quatro dias, sendo que uma fêmea pode ingerir refeições de sangue com intervalos de 3,3 a 4,6 dias. Uma geração dura aproximadamente 23 dias, podendo existir 11 gerações por ano (Meiswinkel et al., 2004).

O estudo do comportamento de *Culicoides* reveste-se de algumas dificuldades. Existem vários métodos de captura destes insectos, como armadilhas luminosas, armadilhas para captura de larvas, aspiradores e armadilhas montadas em veículos, que são utilizados em função do objectivo do estudo. Para avaliar a quantidade de adultos, o método utilizado mais frequentemente é a armadilha com luz ultravioleta (Figura 4) (Carpenter et al., 2008). Estes métodos possuem limitações significativas na compreensão do comportamento destes insectos, não permitindo quantificar o número de insectos atraídos pelo odor dos hospedeiros, ou que entrariam num estábulo e até mesmo quantos pousariam nos hospedeiros. No entanto, o seu reduzido tamanho impede a utilização de vários métodos de observação habituais no estudo de insectos, como a utilização de câmaras de filmar (Carpenter et al., 2008).

Figura 4 - Esquema de armadilha utilizando luz ultra violeta



Fonte: Rodrigues (2008)

### 2.3 – Importância patogénica

É provável que o Homem observe manifestações de doença transmitidas por *Culicoides* desde que iniciou a domesticação de animais, há cerca de 10 mil anos. De facto, existem evidências de que os insectos do género *Culicoides* estiveram envolvidos em duas das dez pragas bíblicas do Antigo Egipto (Meiswinkel et al., 2004).

Os culicídeos são responsáveis, nos equídeos, pela dermatite sazonal recorrente, causada apenas pela irritação devido à mordedura dos insectos. São também responsáveis pela transmissão de vários tipos de agentes patogénicos como:

- Nemátodes, existindo mais de 20 espécies transmitidas a ruminantes, equídeos e primatas.
- Protozoários, com pelo menos 30 espécies diferentes transmitidas a primatas, esquilos e aves, sendo a mais relevante para a produção animal *Leucocytozoon caulleryi*.
- Vírus, apesar de existir também a transmissão por também outros atropododes, 45% desses vírus apenas se transmitem por *Culicoides*.
  - Bunyaviridae, existindo varias espécies que afectam os ruminantes, domésticos e selvagens, sendo o mais relevante o vírus Akabane.
  - Reoviridae, família que contém o vírus da Língua Azul (LA), Peste Equina Africana, Encefalite Equina, Doença Hemorrágica do Veado e ainda do serogrupo Palyam.
  - Rhabdoviridae, sendo o mais relevante o vírus da Febre Efémera Bovina.

De todas as doenças transmitidas por *Culicoides*, no contexto nacional e europeu, destaca-se nos últimos anos a LA, estando várias espécies deste insecto associadas à sua transmissão (Tabela 1).

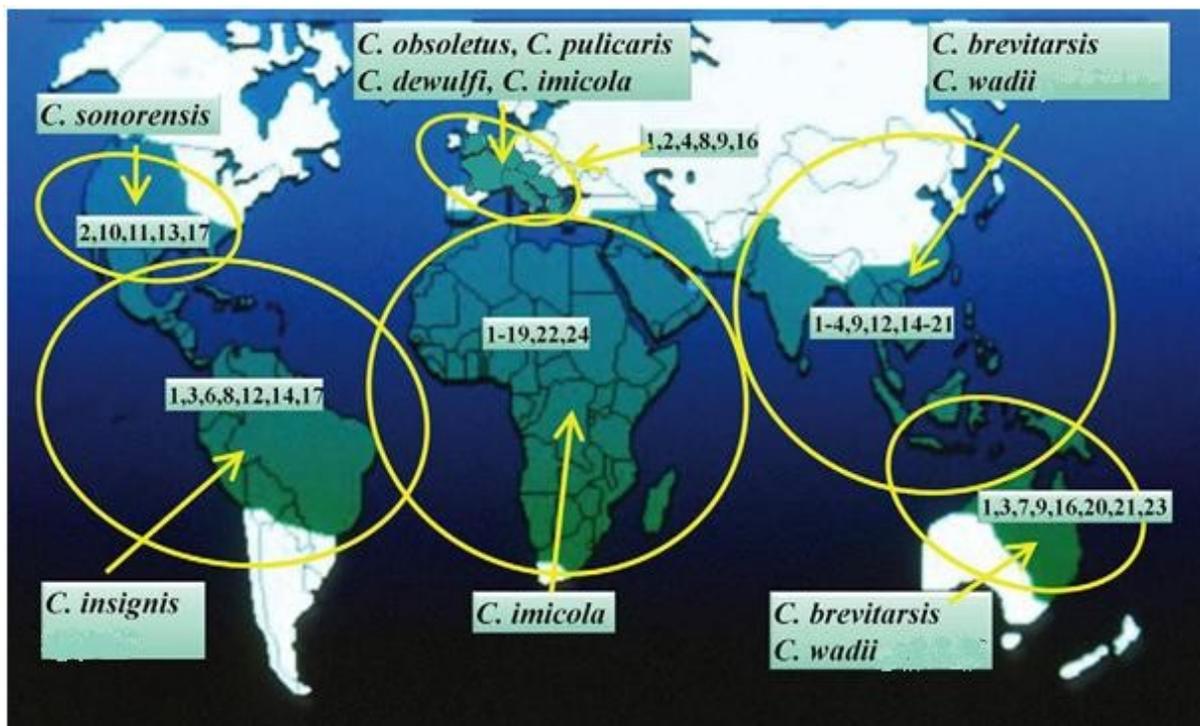
Tabela 1 - Espécies de *Culicoides* com competência para transmissão do vírus da Língua Azul

Subgénero	Espécie
<i>Avaritia</i>	<i>C. bolitinos</i>
	<i>C. brevitarsis</i>
	<i>C. fulvus</i>
	<i>C. imicola</i>
	<i>C. pusillus</i>
	<i>C. obsoletus</i>
	<i>C. toroensis</i>
<i>Hoffmania</i>	<i>C. insignis</i>
	<i>C. milnei</i>
<i>Meijerehelea</i>	<i>C. pycnostictus</i>
<i>Monoculicoides</i>	<i>C. variipennis</i>
<i>Similis</i>	<i>C. expectator</i>
<i>Sylvicola</i>	<i>C. cockerellii</i>
Não atribuído	<i>C. filarifer</i>

Fonte: Meiswinkel et al., 2004

Os principais responsáveis pela transmissão da LA na Europa são *C. obsoletus*, *C. pulicaris*, *C. dewulfi* e *C. imicola*, envolvidos nos surtos pelos serótipos 1, 2, 4, 8, 9 e 16 (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição mundial das espécies de *Culicoides* envolvidos na transmissão do vírus da Língua Azul e dos seus serótipos



Fonte: Tabachnick (2010).

Em Portugal, por colocação de armadilhas luminosas, concluiu-se que a espécie mais frequente é *C. imicola* (Figura 6), com 81,7% do total de capturas tendo sido o pico de capturas no mês de Setembro, seguido de *C. obsoletus* (Figura 7), com 4,4% do total de capturas tendo sido o pico de capturas entre Maio e Julho (Nunes et al., 2009).

Figura 6 - *C. imicola*



Fonte: <http://www.butox-info.com/images/imicola.jpg>

Figura 7 – *C. obsoletus*



Fonte: <http://blog.midgeforecast.co.uk/wp-content/uploads/2008/09/c.jpg>

## 2.4 – Controlo

O controlo de *Culicoides* não é fácil, sobretudo devido ao seu grande número. Ainda que chegando a ser capturados mais de um milhão de espécimes apenas utilizando uma armadilha com luz ultravioleta, sabe-se que estas armadilhas somente capturam cerca de 1% dos insectos encontrados nas redondezas (Meiswinkel et al., 2004). Os sistemas produtivos actuais, com elevada concentração de animais, assim como o recurso frequente a rega, levam a um aumento da quantidade de *Culicoides* na proximidade dos animais domésticos (Meiswinkel et al., 2004).

Em produção animal consideram-se varias estratégias para o controlo das populações de *Culicoides*:

- Utilização de insecticidas adulticidas
  - Aplicação de insecticidas no ambiente
  - Utilização de redes ou de telas impregnadas de insecticidas
  - Aplicação de insecticidas nos animais
- Utilização de insecticidas larvicidas
- Utilização de repelentes ou chamarizes
- Utilização de métodos de controlo biológicos
- Estabulação
- Destruição dos locais de criação

A grande variedade de culicídeos existente, mostra diferentes comportamentos perante as estratégias de controlo. Essa variabilidade, tal como os culicídeos em geral, encontra-se pouco estudada e torna muito difícil a comparação fidedigna entre testes laboratoriais ou de campo utilizando diferentes espécies (Carpenter et al., 2008).

#### **2.4.1 – Aplicação de Insecticidas no ambiente**

Substâncias do grupo dos organoclorados como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) foram testadas e utilizadas com sucesso, no controlo de *Culicoides*, através da aplicação no ambiente, no entanto essas substâncias não estão presentemente autorizadas para esse fim (Carpenter et al., 2008). Por outro lado, estudos de campo levados a cabo por Satta et al. (2004), utilizando cipermetrina, esbiotrina, butóxido de piperonilo e sinérgicos de piretróides, por aplicação espacial, não registaram qualquer diminuição no número de *Culicoides* capturados posteriormente à aplicação.

#### **2.4.2 - Utilização de redes ou de telas impregnadas de insecticidas**

Tendo em conta o reduzido tamanho destes insectos, a utilização de redes como barreira física não é possível, uma vez que a sua trama demasiado fechada tem um impacto significativo na circulação de ar. A utilização de redes de alumínio impregnadas com organofosforados revelou eficácia em laboratório no controlo de *Culicoides* (Carpenter et al. 2008). De acordo com Calvete et al. (2010) a utilização de redes impregnadas com cipermetrina revelaram-se eficazes na redução do número de *Culicoides* capturados, quer em espaços abertos, quer em estábulos.

#### **2.4.3 - Aplicação de insecticidas nos animais**

Foram realizados estudos de semi-campo, baseados na recolha de pelos ou lã dos animais tratados em intervalos de tempo pré-estabelecidos. A utilização de deltametrina *pour-on* (Butox® 7.5) levou à paralisia e morte dos culicídeos colocados em contacto com o pêlo ou lã, até 28 dias após a aplicação (Mehlhorn, Schmahl, D'Haese & Schumacher, 2008a). Estudos realizados utilizando o mesmo procedimento determinaram 21 dias de eficácia para a ciflutrina *pour-on* (Bayofly®) (Mehlhorn et al., 2008b), 35 dias de eficácia para a deltametrina *pour-on* (Butox® 7.5 e Versatrine®) (Schmahl et al., 2009a), 35 dias para a permetrina *pour-on* (Flypor®) e o fenvalerate *pour-on* (Acadrex® 60 e Arkofly®) (Schmahl et al., 2009b). Este protocolo tem o inconveniente de não fornecer informação sobre se os insectos se alimentariam ou não antes da sua morte (Mehlhorn et al., 2008a).

Estudos laboratoriais utilizando piretróides e organofosforados, em formulações para aplicação *pour-on*, brincos ou para aspersão, demonstraram acção destas substâncias sobre *Culicoides* (Carpenter et al., 2008).

As avermectinas injectáveis são frequentemente utilizadas pelas suas propriedades endectocidas, no entanto a quantidade que é necessário administrar para se obterem efeitos significativos no controlo de *Culicoides* é impraticável (Holbrook & Mullens, 1994).

Bauer, Jandowsky, Schein, Mehlitz & Clausen (2009), conduziram um teste de campo em que foram combinadas medidas dos tipos referidos, como a utilização de redes impregnadas com deltametrina, aplicação de brincos impregnados com permetrina, aplicação de deltametrina *pour-on* e por fim fumigação das instalações com cipermetrina e diclorfos. Verificaram a redução do número de capturas de *Culicoides*, sem nunca se conseguir o controlo absoluto. Foram sempre capturadas fêmeas engurgitadas. As reduções mais significativas no número de capturas observaram-se quando ocorreram alterações climáticas, para temperaturas menos favoráveis a estes insectos. O controlo proporcionado pelas combinações de todas estas medidas foi considerado insuficiente e manifestamente inferior ao sugerido pelos testes laboratoriais.

Ainda que a aplicação de insecticidas nos animais e nas suas instalações não obtenha um controlo completo da população de *Culicoides*, a utilização de piretróides com efeito residual prolongado reduz a aproximação dos insectos, mostrando-se muito útil durante o transporte dos ruminantes para o matadouro (Carpenter et al. 2008).

Está em curso um estudo multicêntrico utilizando o protocolo de testagem de sensibilidade a insecticidas, da World Health Organization, adaptado a *Culicoides* (R. Venail, comunicação pessoal, Março 20, 2009) que poderá permitir, no futuro, conhecer de forma mais aprofundada a eficácia comparativa de várias substâncias sobre estes insectos, em condições de teste padronizadas.

#### **2.4.4 - Utilização de insecticidas larvicidas**

A utilização de insecticidas larvicidas é mais frequentemente realizada para controlo de insectos que causam incómodo em Humanos do que para o controlo de vectores de arbovirus, existindo um impacto ambiental muito negativo que desaconselha a utilização de vários tipos de moléculas (Carpenter et al., 2008).

#### **2.4.5- Utilização de repelentes ou chamarizes**

Os repelentes não são utilizados com frequência para protecção de ruminantes contra *Culicoides*, uma vez que os ensaios realizados em Humanos apenas demonstravam níveis de eficácia com, pelo menos, uma aplicação diária (Carpenter et al., 2005). Existe também o inconveniente de a maior parte dos repelentes não terem sido avaliados relativamente aos resíduos na carne ou leite (Carpenter et al, 2008).

Page, Labuschagne, Nurton, Venter & Guthrie (2009) avaliaram o efeito de repelência de N,N-Dietil-m-toluamida (DEET), óleo de citronella e cipermetrina em *Culicoides*, concluindo que destes compostos, apenas o DEET revelou repelência significativa.

A utilização de chamarizes como o CO<sub>2</sub> junto das armadilhas para captura de *Culicoides* revelou não ter impacto na transmissão viral ou no número de mordeduras (Carpenter et al., 2008).

#### **2.4.6 - Utilização de métodos de controlo biológico**

Não existem estudos de campo sobre a eficácia da aplicação de métodos de controlo biológico em *Culicoides* (Carpenter et al, 2008). Os reguladores de crescimento de insectos como o dimilin e o methoprene obtiveram resultados positivos no controlo destes insectos (Takahashi, Yagi & Hattori, 1985), assim como o fungo *Metarhizium anisopliae* (Ansari, Carpenter & Butt, 2010).

#### **2.4.7 - Estabulação**

A eficácia desta medida depende essencialmente da capacidade das instalações em impedir a entrada de *Culicoides*, e do comportamento mais ou menos endofílico ou exofílico da espécie de culicíide em questão, não existindo até ao momento um método padronizado para avaliação desse comportamento (Carpenter et al., 2008).

Ainda que esta medida não seja geralmente praticável em produção animal, para os animais saudáveis, pode ter sucesso no isolamento dos animais infectados e impedir a propagação da doença, especialmente se usado em conjunto com redes impregnadas com insecticida.

#### **2.4.8 - Destruição dos locais de criação**

A manipulação dos locais de criação pode ter dimensões muito variáveis, que vão desde a introdução de boas práticas numa exploração pecuária, à drenagem de pântanos. Tendo em conta que geralmente os culicíides se encontram perto dos seus hospedeiros, deve ser

evitada a acumulação de água na exploração, como acontece com mais frequência a partir de bebedouros a extravasar, canalizações corrompidas e torneiras mal fechadas (*Carpenter et al., 2008*).

### 3 – Doença da Língua Azul

#### 3.1 – Etiologia

A Língua Azul (LA) é uma doença não contagiosa dos ruminantes domésticos e selvagens, transmitida por *Culicoides* e cujo agente etiológico é o Vírus da Língua Azul (VLA). O nome da doença deriva da existência de cianose da língua, um dos sinais clínicos que resultam das lesões vasculares mediadas pelo vírus (Verwoerd & Erasmus, 2004).

O VLA é um vírus do género *Orbivirus*, família *Reoviridae* (Borden, Shope & Murphy, 1971). São conhecidos 24 serótipos do VLA (OIE, 2009), estando em discussão a existência de um vigésimo quinto serótipo, o vírus Toggenburg (Hofmann, 2008).

O género *Orbivirus* é bastante abrangente e inclui vários vírus sem importância médica ou veterinária (Coetzer & Tustin, 2004). Este género é o mais importante da família relativamente à saúde animal, causando doenças como a LA, a Encefalite Equina, a Peste Equina Africana e a Doença Hemorrágica Epizootica, que afecta veados, ainda que já tenham sido reportados casos em bovinos (Coetzer & Tustin, 2004; Temizel et al., 2009). Cada espécie é dividida em serótipos, com base em ensaios de neutralização em placa e estudos de protecção cruzada (Coetzer & Tustin, 2004).

Quanto à resistência aos agentes físicos e químicos, o VLA é inactivado após 3 horas a 50°C ou 15 minutos a 60 °C e é sensível a pH inferior a 6,0 e superior a 8,0. O vírus é inactivado por  $\beta$ -propiolactona, iodóforos e compostos fenólicos e mantém-se bastante estável na presença de proteínas (OIE 2009).

A primeira descrição desta doença foi efectuada na África do Sul, por Hutcheon em 1880, sendo provavelmente endémica nos ruminantes selvagens desde a antiguidade (Verwoerd & Erasmus, 2004)

#### 3.2 – Epidemiologia

A LA não é contagiosa por contacto entre os animais e a sua transmissão é feita por insectos do género *Culicoides*, que se infectam quando se alimentam em animais virémicos, transmitindo o VLA entre os ruminantes susceptíveis (OIE 2009).

O VLA está presente nas regiões entre 40°N e 35°S onde os *Culicoides* vectores estão presentes, o que inclui todos os continentes excepto a Antárctica (DG SANCO, 2010).

A morbidade em ovinos pode atingir os 100%, variando a mortalidade entre 0 e 10%, podendo excepcionalmente atingir os 50%, dependendo do serótipo em causa. Os animais que sobrevivem recuperam em poucos dias, até duas semanas (Coetzer & Tustin, 2004).

O período de replicação do vírus nas glândulas salivares dos culicídeos varia entre 6 a 8 dias, ficando infectados para o resto da sua vida. Considerando que os insectos são o único transmissor da LA com significado, a distribuição e prevalência da doença é dependente de factores ecológicos como a pluviosidade, a temperatura, a humidade ou as características do solo, tendo por isso uma ocorrência sazonal em várias partes do mundo (OIE, 2009).

A quantidade de vírus presente nas secreções e excreções dos animais infectados é muito reduzida, sendo portanto muito improvável a transmissão oral ou por aerossóis (Verwoerd & Erasmus, 2004).

O serótipo 8 constitui uma excepção relativamente aos restantes serótipos da LA, já que além de afectar os ovinos também afecta de forma importante os bovinos, apresentando transmissão transplacentária e oral nos neonatos (Backx, Heutink, van Rooij & van Rijn, 2009).

### **3.3 – Patogénese**

A patogénese do VLA é similar nos ovinos, bovinos e, muito provavelmente, em todas as espécies de ruminantes (Darpel, Monaghan, Anthony, Takamatsu & Mertens, 2009). No entanto existem diferenças marcadas na severidade da doença apresentada pelas várias espécies de ruminantes, em diferentes raças (Verwoerd & Erasmus, 2004). Após a inoculação por via cutânea o vírus dirige-se ao linfonodo regional, onde ocorre a replicação inicial (Maclachlan, Drew, Darpel & Worwa, 2009). O vírus dissemina-se em vários tecidos ao longo do corpo, sendo que a multiplicação ocorre principalmente nas células fagocitárias mononucleares e endotélio (Darpel et al., 2009).

### **3.4 – Sinais Clínicos e Lesões**

Os sinais clínicos da LA nos ovinos incluem congestão, edema e hemorragia como consequência de lesões vasculares mediadas pelo vírus (Verwoerd & Erasmus, 2004). Os animais apresentam febre, descarga nasal serosa a hemorrágica com crostas à volta das narinas, dispneia, edema pulmonar severo, erosões orais e úlceras com cianose da língua, claudicação com hiperémia do bordo coronal e fraqueza secundária à necrose muscular (Maclachlan et al., 2009).

Nas infecções subagudas ocorrem sinais isolados como cordeiros débeis, aborto, anomalias congénitas (ataxia, hidrocefalia), ocorrendo um baixo índice de mortalidade (Verwoerd & Erasmus, 2004).

No exame *post-mortem* de ovinos infectados podem estar presentes lesões como hiperémia, hemorragias, erosão e ulceração da mucosa do tracto gastrointestinal superior (cavidade oral, esófago e compartimentos gástricos); edema e hemorragia dos linfonodos; hemorragia subcutânea; hemorragia da camada sub-íntima da artéria pulmonar (lesão patognomónica); edema pulmonar; efusão pleural e/ou pericárdica; edema facial ou sub-mandibular; edema entre as fáscias dos músculos da parede abdominal e do pescoço, particularmente à volta do ligamento nugal; necrose do músculo esquelético e cardíaco, sendo o músculo papilar do ventrículo esquerdo um local característico (Verwoerd & Erasmus, 2004; Maclachlan et al., 2009).

As alterações histológicas reflectem as alterações macroscópicas, com algumas variações dependendo da duração da lesão. As lesões do músculo-esquelético ou cardíaco vão desde a necrose muscular aguda com hemorragia, a lesões crónicas com fibrose e infiltração de células mononucleares inflamatórias. As alterações nos vasos sanguíneos na pele e adjacentes a lesões como úlceras orais são frequentemente subtis; os vasos afectados de forma aguda podem exhibir apenas hipertrofia endotelial com edema perivascular e/ou hemorragia e subsequentemente uma acumulação variável de linfócitos e macrófagos (Maclachlan et al., 2009).

Os animais com sinais clínicos severos podem recuperar completamente, desenvolver doença crónica com perda de produção ou morrer (Maclachlan et al, 2009). Os animais que desenvolvem doença crónica têm usualmente perda de massa muscular severa, que se manifesta por fraqueza extrema, prostração e torcicolo, assim como quebras da lã e têm um prolongado processo de recuperação (Verwoerd & Erasmus, 2004).

### **3.5 - Diagnóstico**

É frequentemente possível fazer um diagnóstico presuntivo de LA através dos sintomas e lesões em ovinos afectados, especialmente em zonas endémicas. Noutras espécies de ruminantes em que a doença ocorre de forma subclínica é necessário a confirmação laboratorial, quer por isolamento viral quer por serologia (Verwoerd & Erasmus, 2004).

De acordo com a OIE (2009) o método de identificação do agente recomendado para comércio internacional é o PCR por transcriptase reversa (Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR). Quanto a testes serológicos, recomenda-se a realização de ELISA

de competição (Competitive enzyme-linked immunosorbent assay, cELISA) ou Imunodifusão em agar gel (Agar gel immunodiffusion, AGID), este pouco específico para LA (OIE, 2009).

### 3.6 – Tratamento

Só existe tratamento paliativo de modo a minimizar os sintomas, as lesões da doença e as respectivas consequências económicas (Verwoerd & Erasmus, 2004).

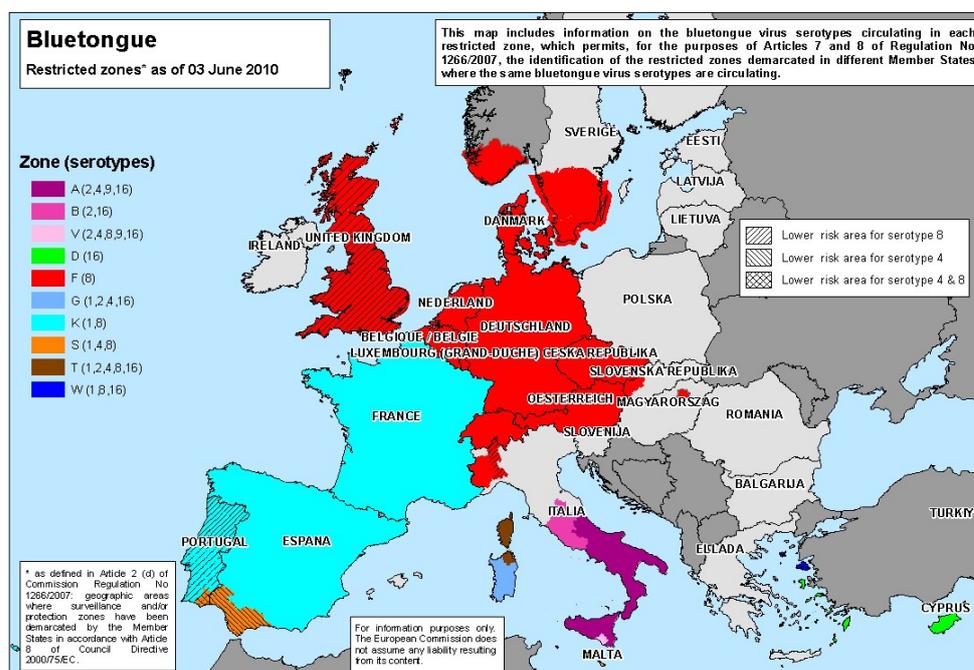
### 3.7 – Controlo e profilaxia

A adopção de medidas de controlo da doença difere nas zonas endémicas e nas zonas onde geralmente não existe LA; nas zonas endémicas pretende-se apenas limitar a ocorrência de doença e minimizar as perdas económicas, enquanto nas outras se pretende a erradicação (Verwoerd & Erasmus, 2004).

Em termos de profilaxia sanitária, nas zonas sem doença procede-se ao controlo das movimentações de animais, à quarentena e vigilância serológica e ao controlo de vectores. Nas zonas infectadas pratica-se principalmente o controlo de vectores (OIE 2009).

Na Europa, afectada por diferentes serótipos, estão em vigor medidas de restrição à movimentação animal (Figura 8).

Figura 8 - Zonas de restrição à movimentação animal na Europa



Fonte: [http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bt\\_restrictedzones-map.jpg](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bt_restrictedzones-map.jpg)

Em termos de profilaxia médica, realiza-se a vacinação (OIE, 2009). Existem vacinas para a LA há já cerca de 20 anos, utilizando vírus vivos atenuados e, mais recentemente, vírus inactivados. As vacinas que utilizam vírus vivos podem causar efeitos teratogénicos e podem infectar vectores. Todos os tipos de vacinas possuem duas grandes limitações:

- impossibilidade de diferenciar animais vacinados de animais infectados - *Differentiating Infected from Vaccinated Animals* (DIVA), não permitindo a realização de testes de pré ou pós movimentação em efectivos vacinados, o que é especialmente problemático no caso dos bovinos, que frequentemente se encontram assintomáticos ainda que virémicos;
- são serótipo específicas, conferindo apenas protecção imunitária para o serótipo utilizado (Noad & Roy, 2009).

Existem vacinas atenuadas polivalentes, que contêm uma mistura de vários serótipos, sendo utilizado um máximo de 5 serótipos por vacina. No protocolo habitualmente seguido na África do Sul utilizam-se 3 vacinas diferentes, aplicadas num certo intervalo de tempo entre elas, e contendo cada uma 5 serótipos, contando obter no final do programa vacinal imunidade para 15 serótipos diferentes (Verwoerd & Erasmus, 2004)

Estão em estudo vacinas com base em proteínas da cápside, criando uma partícula idêntica ao vírus – *Virus-like particle* (VLP) assim como a utilização de um poxvirus para vector de material genético do VLA. Em ambas as hipóteses supera-se o problema da DIVA, sendo necessária a administração de, pelo menos, duas doses da vacina (Noad & Roy, 2009). Existem perspectivas futuras sobre a viabilidade de *disabled infectious single cycle vaccine* (DISC), que ao utilizar vírus em que foram deletados um ou mais genes necessários para a sua replicação, se promove um nível de protecção imunitária suficiente, aplicando apenas uma dose da vacina e mantendo a característica de DIVA (Noad & Roy, 2009).

### **3.8 Língua Azul na Europa**

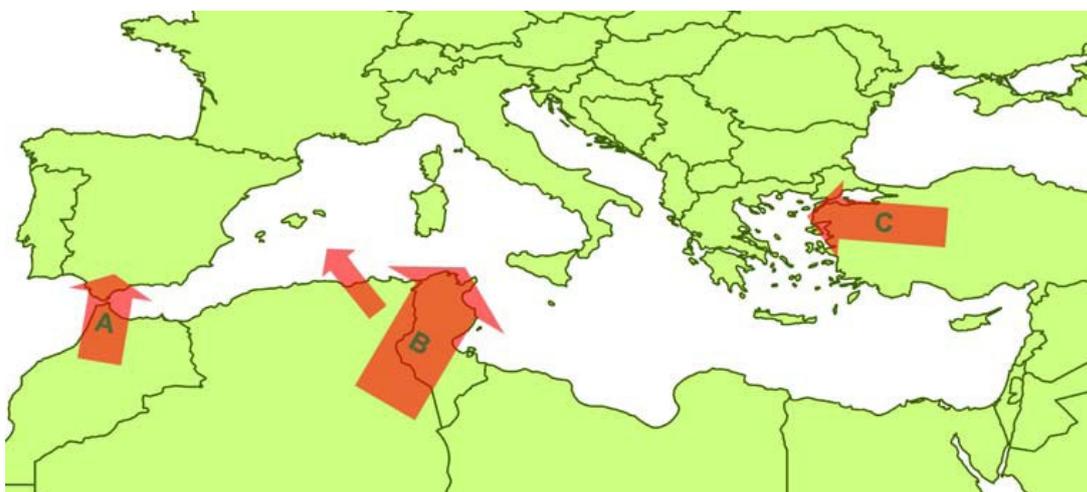
A LA tem ocorrido regularmente no Chipre, desde pelo menos 1924 mas, apesar disso, apenas ocorreram dois surtos na Europa anteriormente a 1998: um grande surto do serótipo 10 na Península Ibérica entre 1956 e 1960 e um pequeno surto do serótipo 4 em algumas ilhas Gregas, entre 1979 e 1980. Esta situação mudou drasticamente a partir de 1998 (Wilson & Mellor, 2008), podendo-se observar na Tabela 2 a cronologia da ocorrência dos diferentes serótipos, o país de proveniência da amostra e a provável via de introdução. Na Figura 9 são apresentadas as rotas de entrada prováveis dos vários serótipos na Europa (exceptuando as vacinais).

Tabela 2 - Resumo das rotas de introdução do Vírus da Língua Azul nas incursões pela Europa entre 1998 e 2007

Ano	Proveniência da amostra	Serótipo	Via de introdução provável (ver figura 4)
1998	Grécia, Bulgária, Turquia, Bósnia, Kosovo, Servia	9	C
1999	Sardenha, Córsega, Sicília, Itália continental e Ilhas Baleares	2	B
1999	Grécia	4	C
1999	Grécia	16	C
2001	Grécia	1	C
2001	Córsega, Sardenha e Sicília	2	B
2002	Itália continental	16	Origem vacinal
2003	Córsega, Menorca	4	B
2004	Espanha e Portugal	4	A
2004	Córsega, Sardenha e Sicília	16	Origem vacinal
2004	Chipre	16	C
2006	Bélgica, Holanda, Alemanha, França, Luxemburgo, Reino Unido, Dinamarca e Suíça	8	Desconhecida
2006	Bulgária	8	Desconhecida
2006	Sardenha	1	B
2007	Espanha	1	A
2007	Portugal	1	A

Fonte: Wilson & Mellor (2008)

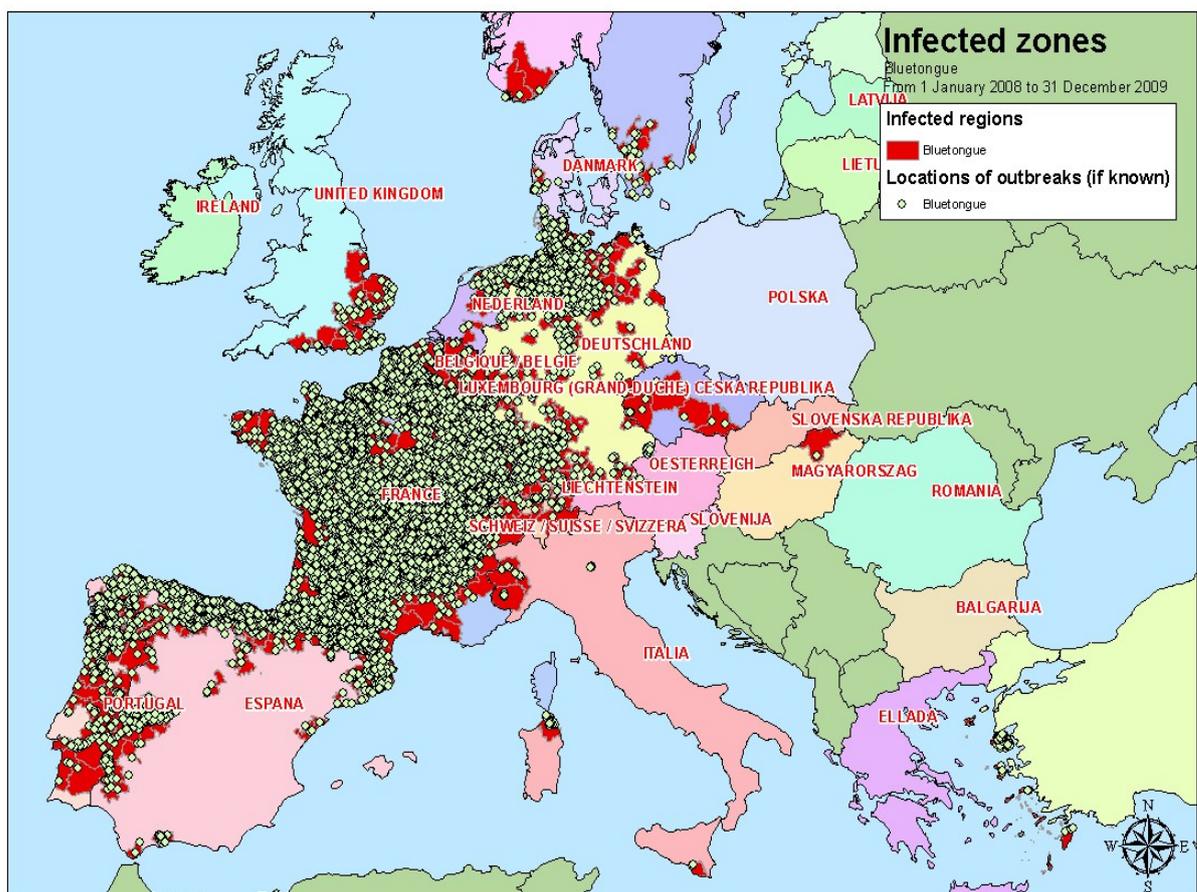
Figura 9 - As três principais rotas de introdução de Língua Azul na Europa



Fonte: Wilson & Mellor (2008)

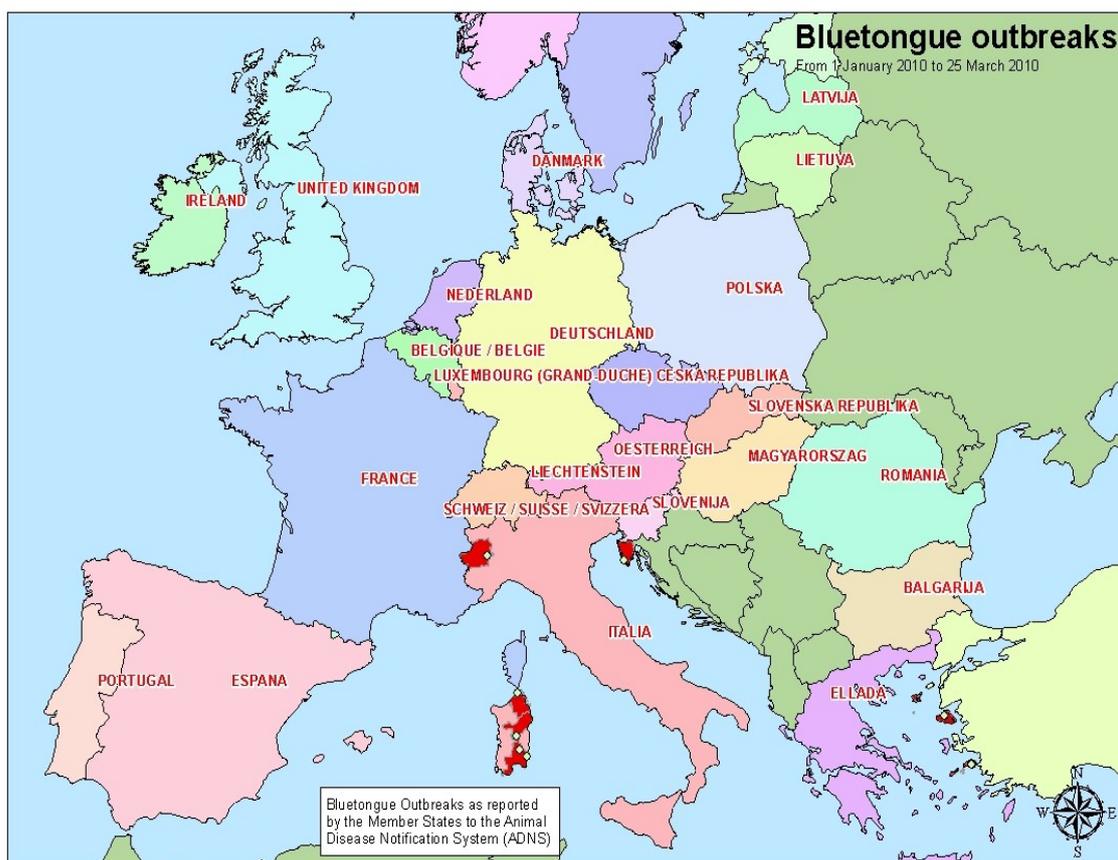
Nas Figuras 10 e 11 são apresentadas as localizações dos surtos de LA, na Europa, notificados ao *Animal Disease Notification System* (ADNS) durante o período em que ocorreram mais notificações de doença (de 1 de Janeiro de 2008 a 31 de Dezembro, 31 de 2009), assim como o período mais recente (de 1 de Janeiro de 2010 a 25 de Março de 2010). Ainda que o número de surtos seja diminuto não foi ainda possível concluir sobre o controlo efectivo da doença em 2010, considerando que a época principal de ocorrência de doença ainda não tinha iniciado.

Figura 10 - Mapa com localização dos surtos de Língua Azul na Europa entre 1 de Janeiro de 2008 e 31 de Dezembro de 2009



Fonte: <http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/BT-2008-2009.jpg>

Figura 11 - Mapa com localização dos surtos de Língua Azul na Europa entre 1 de Janeiro de 2010 e 25 de Março de 2010



Fonte: <http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/BT-2010.jpg>

A notificação ao ADNS por parte dos Estados-Membros é obrigatória para várias doenças, incluindo a LA (Directiva 82/894/CEE, de 21 de Dezembro, Decisão da Comissão 2008/650/CE, de 30 de Julho).

### 3.9 – Língua Azul em Portugal

Em Portugal, a LA ocorreu pela primeira vez em 1956, causada pelo serótipo 10 do vírus da LA, tendo-se depois difundido para Espanha. Este surto que ocorreu na Península Ibérica causou a morte de aproximadamente 179.000 ovinos (Manso-Ribeiro et al., 1957; Lopez & Botija, 1958). Após a implementação de uma campanha massiva de vacinação em ovinos, o país foi declarado livre da doença quatro anos depois.

Em Outubro de 2004, a DGV, através do Edital da LA n.º 1, comunicou que devido à suspeita de doença em Espanha, na região da Estremadura, se iriam iniciar medidas destinadas à protecção do efectivo ruminante nacional, sendo elas:

- A implementação de uma zona de protecção, com um raio de 100 km dos focos registados em Espanha.

- A implementação de uma zona de vigilância, com um raio de 50 km para além dos limites da zona de protecção.
- Medidas de restrição à movimentação animal, com proibição de entrada e saída de animais nas referidas zonas, com excepção do envio para matadouro, devendo o veículo de transporte ser selado e possuir certificado de desinsectização
- Desinsectização dos equídeos e seus veículos de transporte, para poderem circular entre zonas diferentes.
- Dotação dos matadouros das zonas de restrição e de vigilância da capacidade de desinsectização de veículos de transporte de animais, após a descarga dos mesmos.
- Implementação de um plano de epidemiovigilância, utilizando animais sentinela, assim como o estudo das populações de *Culicoides*.

Posteriormente foram publicados vários editais, sucessivamente revogados por outros, implementando medidas adicionais ou alterações, especialmente geográficas. Destaca-se o Edital n.º 3, de 3 de Dezembro de 2004, em que são estabelecidas a desinsectização dos animais e veículos de transporte, anteriormente à movimentação, assim como a realização de análises pré-movimentação dos animais para exploração em vida, com recurso a ELISA e RT-PCR, e o Edital n.º 6, de 22 de Abril de 2005, em que é referido o início da obrigatoriedade de vacinação dos ovinos reprodutores. Do momento vigora o Edital n.º 25, de 31 de Maio de 2010.

Em Março de 2010, Portugal declarou-se livre do serótipo 4, que se encontrava em circulação desde Novembro de 2004. Mantém-se a vacinação no Sul do país para evitar a reintrodução via Norte de África onde o serótipo está presente (Edital n.º 25, de 31 de Maio de 2010).

Relativamente ao serótipo 1, presente desde Setembro de 2007, a totalidade de Portugal continental está sujeita a restrições mantendo-se a obrigatoriedade de vacinação dos ovinos, assim como outras medidas como a desinsectização dos animais e veículos de transporte (Edital n.º 25, de 31 de Maio de 2010).

Ainda que nunca tenha sido detectado o serótipo 8 em Portugal, pelo risco que ele apresenta, está em curso um programa de vacinação, facultativo, de ovinos e de bovinos (Edital n.º 25, de 31 de Maio de 2010).

### **3.10 – Impacto económico**

O impacto económico da LA inclui as perdas directas, as perdas indirectas e ainda os custos dos sistemas de vigilância e prevenção. A sua aferição é complexa e existem poucos estudos realizados, sendo referidos alguns, a título explicativo.

Estima-se que o surto de BTV-8 em França causou perdas de 1,4 mil milhões de dólares, em 2007. No mesmo ano, também um surto de BTV-8, na Holanda, causou perdas de 85 milhões de dólares (Tabachnick, Smartt & Connelly, 2008)

O impacto económico estimado desta doença nos Estados Unidos da América é de 100 milhões de dólares, anualmente (Wall & Shearer, 2001).

Realizou-se um estudo presuntivo, utilizando vários cenários, para estimar o impacto económico da LA na Escócia. As perdas anuais hipotéticas estimadas, devido à LA, foram de 100 milhões de libras (30 milhões nas perdas directas e 70 milhões nas indirectas). Já o custo da prevenção da doença, vigilância e de limitação de danos foi de 141 milhões de libras para um plano com a duração de 5 anos. A vacinação de 80% do efectivo de bovinos e de ovinos na Escócia tem um custo estimado de 2,3 milhões de libras (SAC, 2008)

## 4 – Biocidas

### 4.1 - Enquadramento Legal

Os produtos biocidas encontram-se regulamentados pelo Decreto-Lei n.º 121/2002, que estabelece o regime jurídico da colocação no mercado de produtos biocidas, transpondo a Directiva n.º 98/8/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Fevereiro. Esta Directiva visa, entre outros, a harmonização dos procedimentos de autorização nacional de produtos biocidas nos vários Estados Membros da União Europeia.

Entende-se por produto biocida a preparação que contem uma ou mais substâncias activas que se destinam, por mecanismos químicos ou biológicos, a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a acção de um organismo prejudicial. Uma substância activa é uma substância ou microrganismo, com uma acção sobre ou contra organismos prejudiciais (Decreto-lei n.º 121-2002).

Existem três Autoridades Competentes (AC) nacionais responsáveis pela autorização de produtos biocidas: a Direcção-Geral de Saúde, a DGV e a Direcção-Geral de Protecção das Culturas. Cada uma delas tem um âmbito de actuação diferente. A Direcção-Geral de Protecção das Culturas é a AC nacional para produtos biocidas preservadores da madeira, a DGV para biocidas de uso veterinário (BUV) e a Direcção-Geral de Saúde pelos restantes produtos. Nas atribuições das autoridades competentes está o procedimento de autorização de colocação no mercado de biocidas, a revisão das autorizações concedidas e a fiscalização do cumprimento das disposições legais. A Direcção-Geral de Saúde é também a autoridade de coordenação nacional. Às funções anteriormente descritas acrescem a coordenação das autoridades competentes e a articulação com as instâncias comunitárias e Estados-Membros.

À comercialização de um produto biocida precede a autorização de colocação no mercado, que é atribuída pela AC. Para a obtenção de autorização de colocação no mercado a empresa requerente fornece à AC um conjunto de informações técnico - científicas de suporte, que são requeridas por lei e que incluem propriedades físico-químicas do produto, métodos de identificação e análise, utilizações previstas e respectiva eficácia, dados toxicológicos, dados eco - toxicológicos, medidas necessárias à protecção do ser humano, animais e ambiente e ainda informação relativa à classificação, embalagem e rotulagem do produto.

Existem vários documentos elaborados a nível europeu como a *Technical Notes for Guidance in support of annex VI of Directive 98/8/EC of the European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market - common principles and practical procedures for the authorization and registration of products (TNsG on product*

*evaluation*), que orienta os candidatos à autorização dos produtos na compreensão de como a avaliação de risco e eficácia são feitas, e como se chega às decisões e conclusões, incluindo a necessidade de apresentação de mais dados. Esse mesmo documento auxilia a AC na avaliação administrativa e científica dos pedidos de autorização e no cumprimento do seu papel em determinar se os padrões de utilização propostos são aceitáveis, assim como assegurar que as decisões são transparentes e fundamentadas.

#### **4.2 - Biocidas de Uso Veterinário e Tipos de Produto**

Consideram-se BUV os produtos biocidas destinados a ser aplicados nos animais, suas instalações e ambiente que os rodeia, ou em actividades relacionadas com estes, com os seus alimentos ou com produtos de origem animal até à sua transformação para alimentação humana (Decreto-lei n.º 121-2002).

Existem 23 tipos de produtos (PT) biocidas, que se dividem em quatro grupos (Decreto-lei n.º 121-2002):

- Desinfectantes e produtos biocidas gerais (PT 1 a 5)
- Produtos de protecção (PT 6 a 13)
- Produtos de controlo de animais prejudiciais (PT 14 a 19)
- Outros produtos biocidas (PT 20 a 23).

Tendo em conta a definição de BUV, o enquadramento dos mesmos nos diferentes PT vai depender das respectivas indicações. Geralmente consideram-se como BUV produtos dos seguintes tipos:

- Tipo de produto 3: produtos biocidas utilizados na higiene veterinária (incluindo produtos utilizados nos locais onde os animais são alojados, guardados ou transportados).
- Tipo de produto 4: desinfectantes das superfícies em contacto com os géneros alimentícios e alimentos para animais. São produtos utilizados na desinfeção de equipamentos, contentores, utensílios de consumo, superfícies ou condutas associadas à produção, ao transporte, à armazenagem ou ao consumo de géneros alimentícios, alimentos para animais ou bebidas (incluindo a água de consumo) destinadas aos seres humanos e aos animais;
- Tipo de produto 5: desinfectantes para água de consumo. Produtos utilizados na desinfeção de água de consumo (destinada tanto a seres humanos como a animais).
- Tipo de produto 14: rodenticidas.

-Tipo de produto 18: insecticidas, acaricidas e produtos destinados a controlar outros artrópodes.

-Tipo de produto 19: repelentes e chamarizes. Produtos utilizados no controlo de organismos prejudiciais (invertebrados, como moscas, ou vertebrados, como pássaros), afastando-os ou atraindo-os, incluindo os produtos aplicados quer directa quer indirectamente na higiene humana ou animal.

#### **4.3 - Substâncias activas e período de revisão**

A Directiva n.º 98/8/CE inclui três anexos relativos a substâncias activas (SA) e substâncias de base, sendo que apenas podem ser comercializados produtos biocidas com substâncias activas incluídas nesses anexos. No Anexo I estão listadas as substâncias activas cujos requisitos foram decididos a nível comunitário para inclusão em produtos biocidas. O Anexo I-A contém a lista de substâncias activas cujos requisitos foram decididos a nível comunitário para inclusão em produtos biocidas de baixo risco. O Anexo I-B é a lista de substâncias de base cujos requisitos foram decididos a nível comunitário.

Na Directiva n.º 98/8/CE, é definido um período de 10 anos (a partir de 1998) para a revisão das substâncias activas constantes nos Anexos I, IA e IB. A partir desse período apenas podem ser autorizados produtos biocidas que contenham substâncias activas incluídas nesses anexos. Se durante o período de avaliação for demonstrado que uma SA tem efeitos inaceitáveis no Homem, nos animais ou no ambiente, será feita uma proposta de restrição da comercialização dessa substância ou a sua remoção dos anexos.

O programa de revisão das substâncias activas teve o seu término adiado várias vezes, por legislação comunitária, devidamente transportas na lei nacional. Actualmente vigora o Decreto-lei n.º13/2010, que adia o final do prazo do programa de análise até 14 de Maio de 2014.

Ao longo do processo de revisão são emitidos documentos legais com as decisões tomadas relativamente às substâncias activas, tipos de produto que podem ser utilizados, e prazos de introdução ou retirada do mercado.

#### **4.4 - Substâncias activas dos tipos de produto 18 e 19**

Um BUV PT 18 ou 19 será um biocida com acção sobre insectos e outros artrópodes destinado a ser aplicado nos animais, suas instalações e ambiente que os rodeia, ou em actividades relacionadas com estes, com os seus alimentos ou com produtos de origem animal até à sua transformação para alimentação humana. Ainda de acordo com as

definições já apresentadas, um BUV do tipo 18 causa a morte ou inactividade de artrópodes, enquanto um do tipo 19 actuará como repelente ou atractivo de artrópodes.

O seu âmbito de aplicação é muito diverso, assim como é particularmente difícil quantificar a sua importância. Ainda assim, Drummond, George & Kunz (1988), estimaram que a perda anual causada por artrópodes na produção animal é superior a 3 mil milhões de dólares (sem considerar os custos de controlo dos artrópodes).

Ao longo do processo de avaliação de um pedido de autorização de comercialização de um produto biocida, a avaliação dos dados toxicológicos, dados eco toxicológicos e medidas necessárias à protecção do ser humano, animais e ambiente tem como objectivo garantir que um produto, quando utilizado conforme é autorizado, não representa perigo para o Homem ou para o ambiente, quer directamente, quer através dos seus resíduos.

Existem hoje na União Europeia 61 substâncias activas que podem ser utilizadas como biocidas PT18, e 19 substâncias activas como PT19.

As SA, assim como a generalidade dos compostos químicos, possuem números de identificação únicos, atribuídos por várias entidades. Para sua identificação nesta dissertação, é utilizado o número do Chemical Abstract Service (CAS), da American Chemical Society, sendo o sistema de identificação de substâncias mais utilizado pela comunidade científica, indústria e entidades reguladoras.

Apresentam-se seguidamente os principais grupos de substâncias activas e uma descrição sumária do seu mecanismo de acção.

#### **4.4.1 Insecticidas**

##### **4.4.1.1 Piretrinas e Piretróides**

As piretrinas são um conjunto de seis ésteres naturais derivados da flor de *Crysanthemum cinerariaefolium* e algumas espécies relacionadas. Possuem excelentes propriedades de neutralização (*knockdown*) e baixa toxicidade para os mamíferos, o que tornou a sua utilização bastante popular (Blagburn & Lindsay, 2001).

Os piretróides sintéticos possuem a mesma actividade que as piretrinas, mas são moléculas mais estáveis, o que aumenta o seu efeito residual (Blagburn & Lindsay, 2001).

Estas substâncias actuam pela modelação da actividade dos canais de sódio nos nervos, causando uma estimulação contínua que leva à morte dos artrópodes (Hart, 1986). Segundo

Narahasi (1992) também inibem os receptores GABA, e os canais de cálcio. É o grupo com mais substâncias activas autorizadas como PT18.

Na Tabela 3 encontram-se os exemplos de SA deste grupo notificadas para utilização como PT18.

Tabela 3 – Exemplos de Piretrinas e Piretróides notificados como tipo de produto 18 na União Europeia

<b>Substância Activa</b>	<b>Número CAS*</b>
Piretrinas e Piretróides	8003-34-7
Permetrina	52645-53-1
Cipermetrina	52315-07-8
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> , extracto	89997-63-7
Deltametrina	52918-63-5
$\alpha$ -Cipermetrina	67375-30-8
$\lambda$ -cialotrina	91465-08-6
d-Aletrina	-
Ciflutrina	68359-37-5
Tetrametrina	7696-12-0
d-trans-Tetrametrina	1166-46-7
Praletrina	23031-36-9
Transflutrina	118712-89-3
Esbiotrina	-
Esfenvalerato	66230-04-4
Imiprotrina	72963-72-5

\* Nota: CAS – Chemical Abstract Service

#### 4.4.1.2 Organoclorados

A substância deste grupo de insecticidas mais conhecida é o controverso DDT. No auge da sua utilização, durante a década de 60, era aplicado anualmente na ordem das 400 000 toneladas. Actualmente existem outras substâncias deste grupo que não possuem persistência prolongada no ambiente e, portanto, continuam a ser utilizadas (Blagburn & Lindsay, 2001).

O seu modo de acção não é completamente conhecido, no entanto sabe-se que actua sobre o sistema nervoso dos insectos, particularmente nos canais de sódio (Hart, 1986).

Não existe nenhuma SA deste grupo notificada para utilização como PT18.

#### 4.4.1.3 Organofosforados

Os organofosforados compreendem uma vasta gama de produtos químicos com actividade insecticida, acaricida, helminticida e alguns com acção herbicida e até fungicida (Blagburn & Lindsay, 2001). Os organofosforados já foram o grupo de insecticidas mais utilizado, com uma produção anual superior a 45 milhões de toneladas (Chambers, 1992). Apesar da sua utilização ter diminuído, continuam a ser um elemento essencial no arsenal pesticida (Blagburn & Lindsay, 2001).

O seu mecanismo de acção principal é a ligação e inibição da acetilcolinesterase, uma enzima existente nos nervos, músculos e fluidos, cuja função é regular a neurotransmissão nas sinapses por destruição do neurotransmissor acetilcolina. A sua ligação à enzima promove a fosforilação e é o grau de fosforilação que determina o nível de actividade destes compostos. Apesar de actuar também nos receptores colinérgicos, é a reacção com a acetilcolinesterase que determina o seu efeito letal (Blagburn & Lindsay 2001).

Na Tabela 4 encontram-se os exemplos de SA deste grupo notificadas para utilização como PT18.

Tabela 4 – Exemplos de Organofosforados notificados como tipo de produto 18 na União Europeia

<b>Substância Activa</b>	<b>Número CAS*</b>
Diclorvos	62-73-7
Fenitrotião	122-14-5
Naledo	300-76-5

\* Nota: CAS – Chemical Abstract Service

#### 4.4.1.4 Carbamatos

Os primeiros insecticidas carbamatos eram derivados do ácido ditiocarbámico. De acordo com Kuhr e Dorough (1976), a síntese de metilcarbamatos foi um marco fundamental no desenvolvimento de químicos insecticidas. Apesar de terem sido sintetizados centenas de metilcarbamatos, apenas algumas dezenas se desenvolveram com sucesso em produtos comerciais (Ivie & Rowe, 1986).

Os carbamatos inibem a acetilcolinesterase mas de forma diferente dos organofosforados. A sua ligação à enzima leva ao bloqueio desta mas sem a alterar estruturalmente (Blagburn & Lindsay, 2001). Na Tabela 5 encontram-se os exemplos de SA deste grupo notificadas para utilização como PT18.

Tabela 5 – Exemplos de Carbamatos notificados como tipo de produto 18 na União Europeia

<b>Substância Activa</b>	<b>Número CAS*</b>
Propoxur	114-26-1
Bendiocarbe	22781-23-3

\* Nota: CAS – Chemical Abstract Service

#### 4.4.1.5 Lactonas

As avermectinas enquadram-se no grupo das lactonas, algumas das quais com potentes propriedades ectoparasitícidas (Blagburn & Lindsay, 2001).

Actuam pela ligação aos canais de cloro, mais especificamente aos subtipos que são  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) mediados (Shoop, Mrozik & Fisher, 1995).

Este tipo de substâncias, pelas suas propriedades é habitualmente registado como Medicamento de Uso Veterinário (MUV).

Na Tabela 6 inclui-se a única SA deste grupo notificada para utilização como PT18.

Tabela 6 – Exemplo de Avermectina notificada como tipo de produto 18 na União Europeia

<b>Substância Activa</b>	<b>Número CAS*</b>
Abamectina	71751-41-2

\* Nota: CAS – Chemical Abstract Service

#### 4.4.1.6 Outros

Existem também notificados para utilização como PT18 bactérias, produtos obtidos a partir de microrganismos, extractos de plantas e ainda substâncias de outros grupos químicos que não os citados. Exemplos destas SA estão listados na Tabela 7.

Tabela 7 – Exemplos de substâncias activas de outros tipos, notificadas como tipo de produto 18 na União Europeia

<b>Substância Activa</b>	<b>Número CAS*</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> Serotipo H14	
<i>Bacillus sphaericus</i>	143447-72-7
Espinosade	-
Geraniol	106-24-1
Extracto de Amargoseira	84696-25-3
Dióxido de carbono	124-38-9

\* Nota: CAS – Chemical Abstract Service

#### 4.4.2 Repelentes

Os repelentes são substâncias que visam a protecção da pele humana, animal ou de um espaço contra artrópodes. Têm como objectivo impedi-los de se deslocarem em sua direcção e/ou contactar com superfícies e/ou infligir picadas na pele. Estas substâncias podem ter acção local ou à distância (Blackwell, Stuart & Estambale, 2003; Choochote et al., 2007).

Geralmente os repelentes de insectos actuam pela criação de uma barreira de vapor que impede os artrópodes de ficar em contacto com a superfície (Brown & Hebert, 1997).

A pesquisa de novos repelentes foi muito incentivada pela perda de eficácia das formulações utilizadas pelos militares na Segunda Guerra Mundial. Desde então têm sido testadas centenas de substâncias e desenvolvidos repelentes sintéticos (Dethier, 1956).

Actualmente, a aplicação de repelentes tem aumentado com o objectivo de evitar perdas de produção quer de cereais e frutos armazenados quer de outros materiais celulósicos infestados por várias pestes, nomeadamente por artrópodes. A aplicação destes produtos para a protecção da saúde humana e pública poderá tomar o mesmo sentido, uma vez que se tem assistido ao desenvolvimento crescente de resistências dos insectos vectores de doenças a determinadas substâncias insecticidas (Nerio, Olivero-Verbel, & Stashenko, 2010).

O repelente sintético mais utilizado para a protecção da pele humana é o DEET por se tratar de um repelente de largo espectro, pela sua eficácia e persistência na pele (Isman, 2006). Os repelentes naturais são utilizados com alguma frequência, em substituição dos sintéticos, devido à sua baixa toxicidade, eficácia equiparável e preferência dos consumidores por este tipo de produto (Katz, Miller & Hebert, 2008).

Os óleos essenciais, são misturas complexas de compostos voláteis isolados de um grande número de plantas, que têm demonstrado acção contra vários artrópodes hematófagos, sendo alguns deles a base de formulações repelentes (Curtis, Lines, Lu & Renz, 1989).

Ainda que a actividade repelente dos óleos essenciais seja geralmente atribuída a alguns dos seus componentes, a existência de fenómenos sinérgicos faz com que a bioactividade de um óleo essencial seja superior à soma dos componentes isolados (Hummelbrunner & Isman, 2001; Gillij, Gleiser & Zygadlo, 2008). Este efeito sinérgico é também observado com misturas de óleos, no entanto os mecanismos envolvidos não são, por enquanto, conhecidos (Liu e al., 2006; Nerio et al., 2010).

A utilização de formulações em cremes, misturas de polímeros e microcápsulas de libertação controlada resultam num aumento da duração dos efeitos de repelência (Sharma & Ansari, 1994; Nentwig, 2003; Chang, Tak, Kim, Lee & Ahn, 2006).

Na Tabela 8 encontram-se os exemplos de SA notificadas para utilização como PT19.

Tabela 8 – Exemplos de substâncias activas notificadas como tipo de produto 19 na União Europeia

<b>Substância activa</b>	<b>Número CAS*</b>
Linalol	78-70-6
Geraniol	106-24-1
Ácido nonanóico	112-05-0
Metilnonilcetona	112-12-9
Dióxido de carbono	124-38-9
Antranilato de metilo	134-20-3
N,N-Dietil-m-toluamida	134-62-3
Ácido láurico	143-07-7
Ácido decanóico	334-48-5
Oct-1-en-3-ol	3391-86-4
Piretrinas e piretróides	8003-34-7
cis-Tricos-9-eno	27519-02-4
Acetato de (Z,E)-tetradeca-9,12-dienilo	30507-70-1
Citriodiol	42822-86-6
N-acetil-N-butil-b-alaninato de etilo	52304-36-6
Amargoseira, extracto	84696-25-3
Alfazema, <i>Lavandula hybrida</i> , extracto / Óleo de lavandina	91722-69-9
Metilneodecanamida	105726-67-8
Icaridina	119515-38-7

\* Nota: CAS – Chemical Abstract Service

#### **4.5 Produtos de uso Veterinário e Medicamentos de Uso Veterinário**

A definição de PUV é dada pelo Decreto-Lei nº 237/2009, considerando-se como PUV a substância ou mistura de substâncias, sem indicações terapêuticas ou profiláticas, destinada:

- aos animais, para promoção do bem-estar e estado higio-sanitário, coadjuvando acções de tratamento, de profilaxia ou de manejo zootécnico, designadamente o da reprodução;
- ao ambiente que rodeia os animais, designadamente às suas instalações;

- ao diagnóstico médico-veterinário.

Esse mesmo Decreto-Lei, no seu artigo 2º exclui do âmbito dos PUV:

a) Os produtos destinados à alimentação animal, designadamente os alimentos compostos e os alimentos para animais com objectivos nutricionais específicos, também designados como dietéticos;

b) Os produtos de efeito biocida para uso veterinário, designadamente:

i) Desinfectantes para a pele intacta dos animais (incluindo a dos tetos e do úbere) e para as instalações, transportes de animais e equipamentos, designadamente pedilúvios e rodilúvios;

ii) Insecticidas para instalações e transportes dos animais ou para o ambiente que os rodeia.

c) Os medicamentos veterinários, incluindo os de acção insecticida nos animais, contra os endo e os ectoparasitas.

Qualquer produto destinado ao controlo de artrópodes em animais domésticos e no seu ambiente circundante terá que ser portanto enquadrado como BUV ou MUV.

O Decreto-Lei n.º 314/2009, estabelece como Medicamento toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma acção farmacológica, imunológica ou metabólica, que restaure, corrija ou modifique funções fisiológicas.

Por Medicamento Veterinário entende-se toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no animal com vista a estabelecer um diagnóstico médico veterinário ou, exercendo uma acção farmacológica, imunológica ou metabólica, que restaure, corrija ou modifique funções fisiológicas (Decreto-Lei n.º 314/2009).

Os produtos biocidas só necessitam de autorização de venda, já os medicamentos de uso veterinário carecem de autorização de introdução no mercado (AIM).

A eficácia de um medicamento de uso veterinário tem que ser comprovada através da apresentação de ensaios clínicos. De acordo com o Decreto-Lei n.º 314/2009, o ensaio clínico é o estudo sistemático de uma substância ou medicamento veterinário experimental a realizar em animais para experiências, saudáveis ou doentes, com o objectivo seguinte:

- a) Confirmar, em momento julgado oportuno, os efeitos farmacodinâmicos ou recolher informação referente à absorção, distribuição, metabolismo e excreção no organismo do animal;
- b) Estabelecer a sua eficácia para uma indicação terapêutica, profilática ou curativa determinada;
- c) Conhecer o perfil das suas reacções adversas para estabelecer a segurança e tolerância, em condições normais de utilização, ou outros estudos.

## 5 - Resultados

### 5.1 - Avaliação de eficácia de produtos Biocidas

A avaliação da eficácia é um passo fundamental no processo de autorização de um biocida. Os dados apresentados devem evidenciar o benefício que advém da utilização de um biocida, frente aos seus perigos relativos ao Homem e ao Ambiente.

A avaliação da eficácia é feita pela AC e deve basear-se nas propriedades que o produto reclama, quer no rótulo quer na literatura anexa. Devem portanto ser submetidos dados relativos à eficácia que consubstanciem as indicações do produto. A AC irá, após avaliação dos dados submetidos, considerar ou não que o produto biocida é eficaz perante os organismos alvo, quando utilizado de acordo com as condições propostas pelo requerente. Se a AC considerar a informação submetida insuficiente o produto não será autorizado até serem submetidos dados que o comprovem ou, em alternativa, as indicações de utilização modificadas para valores ou métodos considerados eficazes.

Para a avaliação de eficácia de produtos biocidas, foi utilizada a informação submetida pelo requerente da ACM, a legislação em vigor e os documentos técnicos de apoio, dos quais se destacam:

- Decreto-lei n.º 121-2002, do Ministério da Saúde.

- *Technical Notes for Guidance in support of Annex VI of Directive 98/8/EC of the European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market - common principles and practical procedures for the authorisation and registration of products (TNsG on product evaluation, 2008)*

- *Product type 18 and 19 - insecticides, acaricides and products to control other arthropods, draft guideline to replace part of appendices to chapter 7 (page 187 to 200) from TNsG on product evaluation (PT18 e 19 draft efficacy guideline, 2009)*

Realizou-se a avaliação de eficácia de vinte e nove produtos (Figura 12), com a produção do respectivo relatório. Os produtos avaliados são BUVs:

PT 3 - produtos biocidas utilizados na higiene veterinária, 12 produtos (40%);

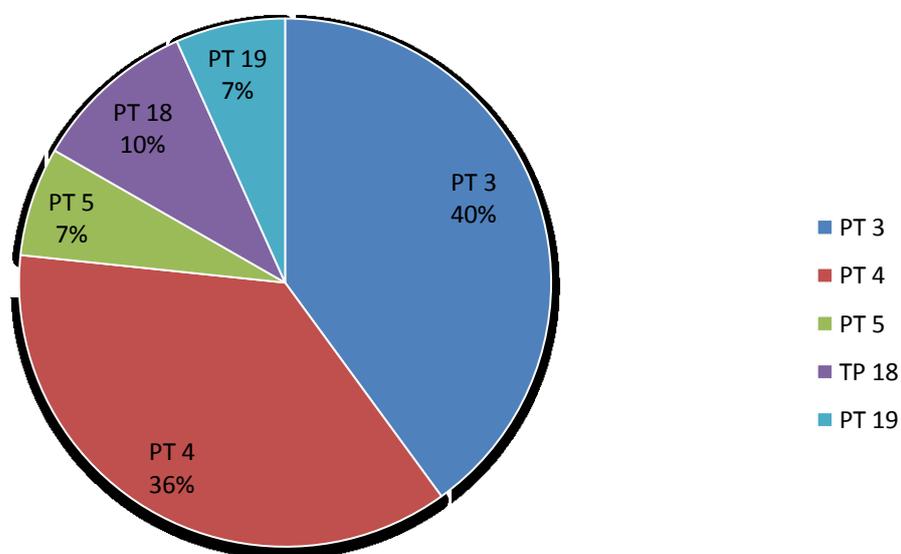
PT 4 - desinfetantes das superfícies em contacto com os géneros alimentícios e alimentos para animais, 11 produtos (36%);

PT 5 - desinfetantes para água de consumo, 2 produtos (7%);

PT 18 - insecticidas, acaricidas e produtos destinados a controlar outros artrópodes, 3 produtos (10%);

PT 19 - repelentes e chamarizes, 2 produtos (7%);

Figura 12 - Distribuição dos produtos avaliados por tipo de produto



Todos os requerentes da ACM apresentaram a informação sobre eficácia organizada de acordo com a legislação em vigor, que inclui onze pontos e, em alguns casos, documentos anexos (como cópias dos relatórios de testes e bibliografia publicada), sendo realizada uma validação administrativa anterior á avaliação técnica.

Por motivos de avaliação quantitativa, agruparam-se as não conformidades detectadas e as anotações efectuadas em três categorias e que se apresentam por ordem crescente de relevância crítica.

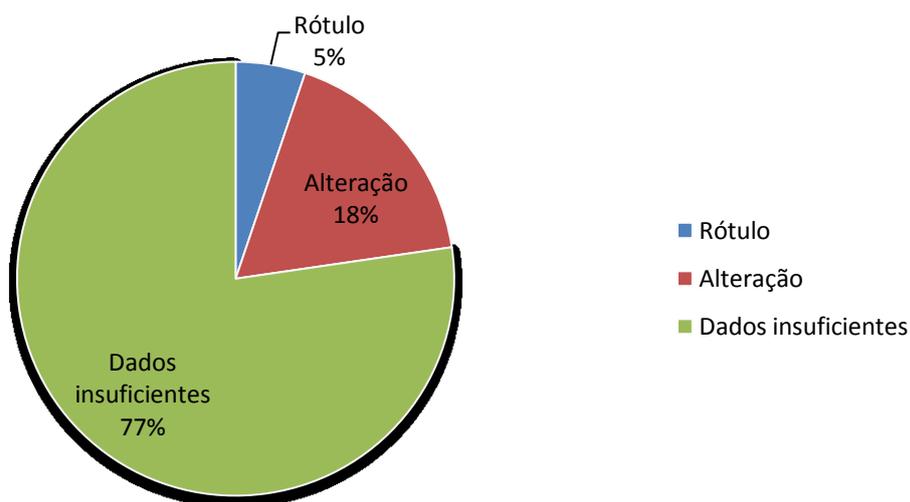
- Rótulo: quando foi considerado que determinada informação deveria ser especificamente incluída no rótulo do produto, por ter um impacto significativo na eficácia do produto, independentemente do cumprimento dos requisitos relativamente ao rótulo do produto e sua avaliação (constantes de outro capítulo do dossiê), (falha de natureza administrativa);

- Alteração: quando é proposta a alteração da informação apresentada pelo requerente (falha de natureza técnica);

- Dados insuficientes: quando os dados apresentados são insuficientes na justificação de todas as propriedades alegadas do produto (falha de natureza técnica).

Contabilizaram-se 97 não conformidades (Figura 13), 5 da categoria Rótulo (5%), 17 da categoria Alteração (18%) e 75 da categoria Dados insuficientes (77%).

Figura 13 - Distribuição das não conformidades por categoria



Foram também contabilizadas as não conformidades por cada um dos pontos que devem constar no capítulo da eficácia (figura 14), obtendo-se os seguintes resultados:

5.1 — Tipo de produto e domínio de utilização previsto – 0 (0%)

5.2 — Método de aplicação, incluindo descrição do sistema utilizado – 4 (4%)

5.3 — Taxa de aplicação e, eventualmente, concentração do produto biocida e da substância activa no sistema em que a preparação irá ser utilizada, por exemplo, água para refrigeração, águas superficiais, água utilizada para aquecimento – 2 (2%)

5.4 — Número e calendário de aplicações, bem como, se pertinentes, quaisquer dados específicos relativos a variações geográficas ou climáticas, ou aos períodos de quarentena necessários à protecção dos seres humanos e dos animais – 5 (5%)

5.5 — Função (por exemplo, fungicida, rodenticida, insecticida, bactericida) – 1 (1%)

5.6 — Organismos prejudiciais a controlar e produtos, organismos ou objectos a proteger – 12 (12%)

5.7 — Efeitos nos organismos a que se destina – 6 (6%)

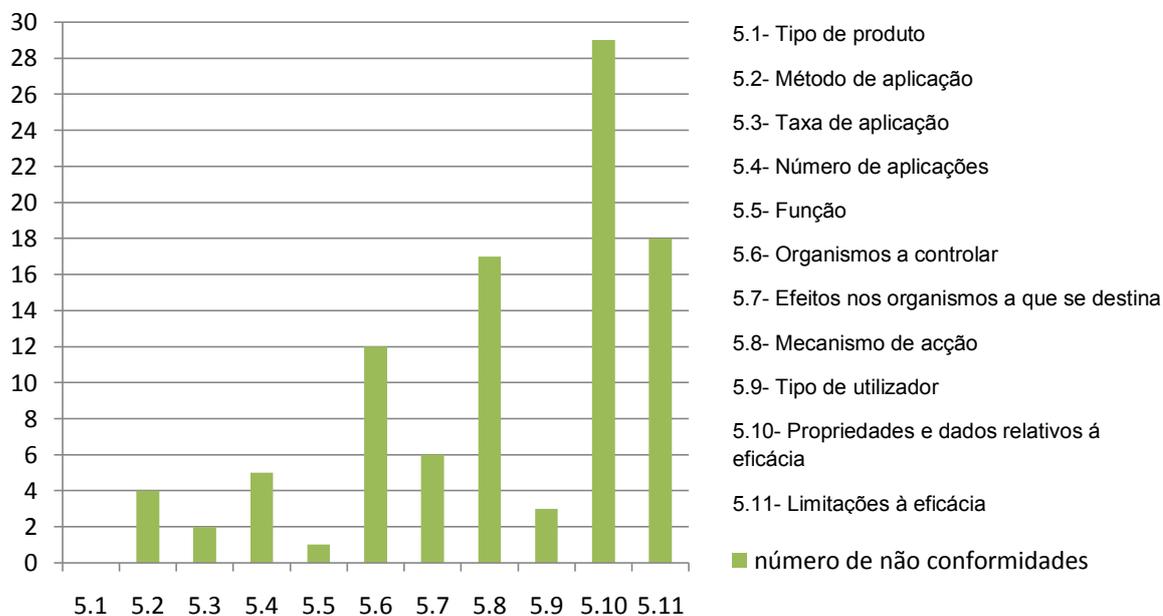
5.8 — Mecanismos de acção (incluindo tempo de reacção) – 17 (17%)

5.9 — Utilizador: industrial, profissional, público em geral (não profissional) – 3 (3%)

5.10 — Propriedades de que o produto se reclama e dados relativos à eficácia em abono dessas alegações, incluindo qualquer protocolo normalizado utilizado, testes de laboratório ou ensaios de campo, se for caso disso – 29 (29%)

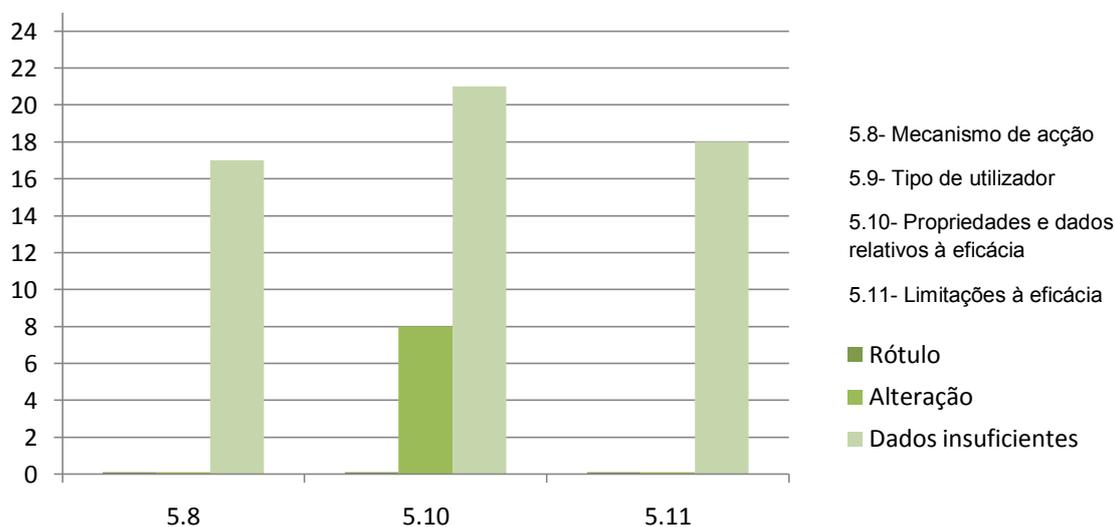
5.11 — Quaisquer outras limitações conhecidas em relação à eficácia, incluindo resistência  
 – 18 (18%)

Figura 14 - Distribuição do número de não conformidades por ponto avaliado



O ponto 5.10 – Dados relativos à eficácia, considerado o ponto mais relevante, foi onde maior número de erros se encontraram. Os pontos 5.11 e 5.8 foram, respectivamente, o segundo e o terceiro ponto com mais falhas detectadas. Torna-se pertinente a análise dos tipos de erro encontrados em cada um destes pontos (Figura 15).

Figura 15 - Distribuição dos tipos de erro por ponto



Nestes pontos mantém-se a tendência geral, de dados insuficientes ser o erro mais frequente. Nenhum dos pontos teve menções para o rótulo, e apenas no 5.10 foram propostas alterações. De salientar que no ponto 5.10, em dois produtos ocorreu simultaneamente a proposta de alteração dos dados assim como dados insuficientes, existindo portanto 3 produtos em conformidade com as exigências e 26 produtos com erros detectados.

## 5.2 - Período de Revisão

Decorre há já mais de 10 anos o processo comunitário de revisão das SA para utilização em produtos biocidas. Partindo de uma base de SA notificadas para utilização como biocida pretende-se chegar às SA autorizadas para determinados tipos de produto. Com o processo de revisão em curso até 2014, considerou-se pertinente contabilizar a diferença entre as SA notificadas para utilização no Regulamento 1451, 2007 e as actualmente aceites (Tabela 9).

Tabela 9- Progressão das associações entre Substâncias Activas e Tipos de Produto

Tipo de Produto (PT)	Associações SA-PT no Regulamento 1451/2007	Associações SA-PT a 12-02-2010	Diferença (%)
1	106	64	-42 (-40%)
2	184	113	-71 (-38%)
<b>3</b>	<b>123</b>	<b>82</b>	<b>-41 (-33%)</b>
<b>4</b>	<b>127</b>	<b>82</b>	<b>-45 (-35%)</b>
<b>5</b>	<b>52</b>	<b>26</b>	<b>-26 (-50%)</b>
6	160	60	-100 (-62%)
7	106	53	-53 (-50%)
8	64	60	-4 (-0,06%)
9	152	69	-83 (-55%)
10	112	56	-56 (-50%)
11	143	82	-61(-43%)
12	136	6	-130 (-97%)
13	121	40	-81 (-67%)
<b>14</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>0 (0%)</b>
15	2	1	-1 (-50%)
16	6	0	-6 (-100%)
17	4	1	-3 (-75%)
<b>18</b>	<b>95</b>	<b>61</b>	<b>-34 (-36%)</b>
<b>19</b>	<b>40</b>	<b>19</b>	<b>-21 (-52%)</b>
20	25	9	-16 (-64%)
21	32	10	-22 (-69%)
22	25	15	-10 (-40%)
23	4	5	1( 25%)
<b>Total</b>	<b>1835</b>	<b>930</b>	<b>-905 (-49%)</b>

(Nota: os PT habitualmente utilizados como BUV estão marcados a negrito)

Deixaram de ser consideradas válidas 905 associações entre SA e PT, representando uma diminuição de 49%, quando comparando com as aceites no Regulamento 1451/2007. Durante o actual processo de revisão está a ocorrer uma significativa restrição na utilização de SA em vários PT.

À data em que os dados anteriores foram obtidos, só 18 associações entre SA e PT estavam já autorizadas, representando apenas cerca de 0,1 % das previstas no Regulamento 1451/2007 e cerca de 0,2 % do total daquelas com utilização permitida. É portanto expectável que a redução continue até ao fim do processo.

É possível observar mais informações relativas às SA notificadas, autorizadas e não autorizadas na tabela actualizada que se encontra como ficheiro no cd-rom anexo a esta dissertação, assim como no site da DGV: [http://www2.dgv.min-agricultura.pt/medicamentos\\_veterinarios/docs/Produtos%20Bicidas%20-%20subst%C3%A2ncias%20activas%20pass%C3%ADveis%20de%20ser%20utilizadas.xls](http://www2.dgv.min-agricultura.pt/medicamentos_veterinarios/docs/Produtos%20Bicidas%20-%20subst%C3%A2ncias%20activas%20pass%C3%ADveis%20de%20ser%20utilizadas.xls).

## 6 - Conclusões

De um total de vinte e nove produtos biocidas avaliadas, apenas 5 produtos (17 % do total) eram insecticidas ou repelentes, classificados como PT18 e 19. Este número é relativamente baixo tendo em conta que o principal objectivo do estágio seria a avaliação de eficácia destes produtos. A proporção de cada tipo de produto avaliado deveu-se à submissão dos pedidos de ACM por parte da indústria, factor que se veio a revelar imprevisível. Para minorar este problema relativamente às expectativas iniciais, reavaliaram-se os processos dos biocidas insecticidas e repelentes autorizados previamente ao período de estágio. A comparação entre a avaliação realizada agora e a realizada quando o produto foi autorizado, assim como a explicação dada pelos seus responsáveis foi considerada de elevado valor para a aprendizagem.

A proporção relativa dos PTs avaliados reflecte uma tendência da indústria na submissão de dossiês para avaliação, sendo essa proporção concordante com a distribuição dos produtos já autorizados.

O elevado número de erros encontrados (97 em 29 produtos) reflectem a dificuldade das empresas na interpretação da legislação, assim como no tipo de informação a submeter e sua qualidade. Esta observação é também fundamentada pela maior frequência dos erros relativos a dados insuficientes (77%), considerada a falha mais importante dos três tipos estabelecidos.

A ocorrência do maior número de deficiências nos pontos 5.8 (mecanismo de acção), 5.10 (propriedades do produtos) e 5.11 (limitações à eficácia) é preocupante, tendo em conta que esses são os pontos mais relevantes na avaliação de eficácia. O erro mais frequente é, tal como no geral, dados insuficientes.

Actualmente a diminuição considerável das substâncias activas passíveis de utilização em produtos biocidas verificada nos últimos anos e, sendo esta tendência também expectável nos próximos anos, vai exigir uma adaptação significativa da indústria, com um reduzido número das substâncias activas utilizadas.

É clara a dificuldade dos requerentes da ACM em fundamentar devidamente a eficácia dos seus produtos. Esta evidência não representa qualquer perigo, uma vez que os produtos não recebem a autorização de comercialização enquanto não os corrigirem. No entanto levam ao atraso do processo de autorização, causando sobrecarga de trabalho às ACs, potenciais perdas económicas aos proponentes e perdas indirectas hipotéticas pela não utilização de produtos mais adequados que os actualmente autorizados.

Existe uma diferença real sobre os tipos de teste e sua execução para demonstrar a eficácia em termos de aceitação pela comunidade científica em geral e na fundamentação exigida para a aprovação dessa mesma utilização pelas AC. É evidente a existência de um fosso entre as AC, indústria e investigadores, que muitas vezes leva a trabalho repetido ou inconclusivo.

Este facto é observável no Capítulo 2, uma vez que são realizados estudos utilizando protocolos muito diferentes, sendo a comparação dos vários resultados muitas vezes impossível. Assim, verifica-se uma grande dificuldade na realização de testes de campo fidedignos, ainda que sejam indispensáveis para determinados tipos de biocidas insecticidas ou repelentes.

Relativamente à avaliação de eficácia de produtos biocidas, a existência de estudos comparativos entre várias espécies pode permitir a extrapolação de resultados e assim dispensar a realização de alguns testes, facilitando a obtenção da ACM.

O estudo multicêntrico utilizando o protocolo de testagem de sensibilidade a insecticidas, da Organização Mundial de Saúde adaptado a *Culicoides* (Capítulo 2), poderá vir a ser muito útil para a comparação fidedigna entre a eficácia de vários insecticidas. Poderá também permitir observar a diferença de resultados de várias espécies de *Culicoides* quando em contacto com a mesma substância activa.

Algumas das utilizações mais eficientes de insecticidas para o controlo de *Culicoides* são a sua aplicação nos veículos de transporte dos animais para o matadouro, assim como na sua utilização em redes impregnadas para protecção de animais estabulados, sendo que estes dois tipos de aplicação se enquadram no âmbito dos BUV.

Ainda que no processo de concessão de ACM sejam avaliados vários parâmetros relativos ao impacto ambiental dos produtos biocidas (Capítulo 4), a sua utilização massiva, a sua utilização fora do âmbito para o qual foram aprovados ou sua utilização incorrecta podem contribuir para ocorrência de problemas relacionados com toxicidade ambiental, resíduos nos produtos de origem animal, assim como na perda de biodiversidade.

Presentemente verifica-se uma preocupante falta de informação sobre o controlo de vectores hematófagos de doenças exclusivas dos animais, sendo a esmagadora maioria da investigação realizada sobre doenças do Homem ou zoonoses. Não existem dados relativos às substancia activa utilizadas no controlo de doenças dos animais e, especialmente, a quantidade utilizada anualmente.

Certamente uma maior proximidade e coordenação entre as autoridades governamentais, a indústria e a comunidade académica conduziria a maior eficiência, assim como à mais

rápida progressão do conhecimento e talvez este trabalho possa dar um pequeno contributo para esse fim.

## 7 - Bibliografia

- ADNS (2010). Animal Disease Notification System. Acedido em 26 de Agosto, 2010, disponível em: [http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index_en.htm).
- Alexandre-Pires, G., Diaz, S., Meireles, J., Boinas, F., & Pereira da Fonseca, I. (2009) The past and the future: crossing morphological studies and molecular biology in que approach of *Culicoides* studies. *Abstracts Book – Medreonet third annual meeting, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2-4 December 2009*.
- Ansari, M., Carpenter, S. & Butt, T, (2010). Susceptibility of *Culicoides* biting midge larvae to the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*: Prospects for bluetongue vector control. *Acta Tropica*, 113, 1-6.
- Backx, A., Heutink, R., van Rooij, E. & van Rijn, P. (2009). Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, 138, 235-243.
- Bauer, B., Jandowsky, A., Schein, E., Mehlitz, D. & Clausen, P. (2009). An appraisal of current and new techniques intended to protect bulls against *Culicoides* and other haematophagous nematocera: the case of Schmergow, Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, 105, 359-365.
- Blackwell, A., Stuart, A. & Estambale, B. (2003). The repellent and antifeedant activity of oil of *Myrica gale* against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. *Proceedings of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 33, 209–214.
- Blagburn, B. & Lindsay, D. (2001). Ectoparasiticides. In: R. Adams, *Veterinary pharmacology and therapeutics* (8th edition) (1017-1039). Iowa: Blackwell Publishing Professional.
- Borden, E., Shope, E. & Murphy, F. (1971). Physicochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to bluetongue virus – a new taxonomic group. Physicochemical and serological studies. *Journal of General Virology*, 13, 261-271.
- Brown, M. & Hebert, A., 1997. Insect repellents: an overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 36, 243–249.
- Carpenter, S., Eyres, K., McEndrick, I., Smith, L., Turner, J., Mordue, W. & Mordue, A. (2005) Repellent efficiency of BayRepel® against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, 95, 427-429.
- Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M., Del Rio, R., Borràs, D., Beldron, F., Calvo, A. & Lucientes, J. (2010). Protection of livestock against bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 169-175.
- Carpenter, S., Mellor, P. & Torr, S. (2008). Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaeartic. *Medical and Veterinary Entomology*, 22, 175-187.
- Chambers, H. (1992). Organophosphorus compounds: na overview. In: J. Chambers & P. Levi (Eds), *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects* (3-17). New York: Academic Press.
- Chang, K.S., Tak, J.H., Kim, S.I., Lee, W.J. & Ahn, Y.J., 2006. Repellency of Cinnamomum cassia bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera:

- Culicidae) under laboratory and indoor conditions. *Pest Management Science*, 62, 1032–1038.
- Choochote, W., Chaithong, U., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Tuetun, B., Champakaew & D., Pitasawat, B. (2007). Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 78, 359–364.
- Coetzer, J. & Tustin, R., (2004). *Infectious Diseases of Livestock*. (2nd edition). Cape Town: Oxford University Press.
- Curtis, C., Lines, J., Lu, B. & Renz, A., (1989). Natural and synthetic repellents. In: Curtis, C.F. (Ed.), *Appropriate Technology in Vector Control*. Florida: CRC Press.
- Darpel, K.; Monaghan, P.; Anthony S; Takamatsu, H. & Mertens, P. (2009) Bluetongue virus in the mammalian host and the induced immune response. In: P. Mellor, M. Baylis & P. Mertens, *Bluetongue*, pp. 265-284. London: Elsevier.
- Decisão da Comissão 2008/650/CE, de 30 de Julho de 2008. Jornal Oficial nº L 213. Bruxelas.
- Decreto-lei n.º 121/2002 de 3 de Maio. Diário da República n.º 102 I Série-A. Ministério da Saúde. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 237/2009 de 15 de Setembro. Diário da República n.º 179 I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 314/2009 de 29 de Outubro. Diário da República n.º 209 I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Decreto-lei n.º 13/2010, de 24 de Fevereiro. Diário da República n.º 38 I Série. Ministério da Saúde. Lisboa
- Dethier, V., (1956). Repellents, *Annual Review of Entomology*, 1, 181–202.
- DG SANCO (2010). Bluetongue. Acedido em Agosto, 26, 2010, disponível em: [http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue\\_en.htm#desc](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm#desc).
- Directiva 82/894/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1982, relativa à notificação de doenças dos animais na Comunidade. Jornal Oficial nº L 378. Bruxelas.
- Directiva 98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Fevereiro de 1998. Jornal Oficial das Comunidades Europeias L. 123. Bruxelas.
- Directiva 2009/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Setembro de 2009. Jornal Oficial da União Europeia L. 262. Estrasburgo.
- Drummond, R., George, J. & Kunz, S. (1988). *Control of Arthropod Pests on Livestock: A review of technology*. Boca Raton: CRC Press.
- Edital Língua Azul, n.º 1 de 25 de Outubro de 2004. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa.
- Edital Língua Azul, n.º 3 de 13 de Dezembro de 2004. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa.
- Edital Língua Azul, n.º 6 de 22 de Abril de 2005. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa.
- Edital Língua Azul, n.º 25 de 31 de Maio de 2010. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa.
- Gillij, Y., Gleiser, R & Zygadlo, J., (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*, 99, 2507– 2515.

- Hart, R. (1986). Mode of action of agents used against arthropod parasites. In: W. Campel & R. Rew (Eds.) *Chemotherapy of Parasitic Diseases*, (585-601). New York: Plenum Press.
- Holbrook, F. & Mullens, B. (1994). Effects of ivermectin on the survival, fecundity and egg fertility in *Culicoides variipennis* (Diptera, Ceratopogonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*. 10, 70-73.
- Hofmann, M. (2008). Toggenburg Orbivirus (TOV): A 25th Serotype of Bluetongue Virus, Detected in Swiss Goats. Acedido em Setembro, 16, 2010, disponível em: [http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal\\_health/presentations/to\\_v\\_12112008.pdf](http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/presentations/to_v_12112008.pdf).
- Hummelbrunner, L. & Isman, M., (2001). Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep. Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 715–720.
- Isman, M. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45–66.
- Ivie, G. & Rowe, L. (1986). Drugs used against arthropods parasites. In W. Campel & R. Rew (Eds.) *Chemotherapy of Parasitic Diseases*, (507-529). New York: Plenum Press.
- Katz, T., Miller, J. & Hebert, A., (2008). Insect repellents: historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58, 865–871.
- Khur, R. & Dorough (1976). Development and use. In: R. Khur & H. Dorough (Eds), *Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*, (1-13). Cleveland: CRC Press.
- Liu, H., Mishra, A., Tan, R., Tang, C., Yang, H. & Shen, Y., (2006). Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource. Technology*, 97, 1969–1973.
- Lopez, A. & Botija, C. (1958). Epizootie de fièvre catarrhale ovine en Espagne (bluetongue). *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, 50, 65-93.
- Maclachlan, N., Drew, C., Darpel, K. & Worwa, G. (2009). The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *Journal of Compared Pathology*, 141, 1-16.
- Manso-Ribeiro, J., Rosa-Azevedo, J., Noronha, F., Braço-Forte, M., Grave-Pereira, C. & Vasco-Fernandez, M. (1957). Fièvre catarrhale du mouton (bluetongue). *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, 48, 350-367.
- Meiswinkel, R., Venter, G. & Nevill, E. (2004). Vectors: *Culicoides* spp. In J. Coetzer & R. Tustin, *Infectious Diseases of Livestock* (Vol. 2, pp. 93-136). Cape Town: Oxford University Press.
- Mehlhorn, H., Schmahl, G., D'Haese, J. & Schumacher, B. (2008a). Butox® 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, 102, 515-518.
- Mehlhorn, H., Schmahl, G., Schumacher, B., D'Haese, J., Walldorf, V. & Klimpel, S. (2008b). Effects of Bayofly® on specimens of *Culicoides* species when incubated in hair taken from the feet of previously treated cattle and sheep. *Parasitology Research*, 102, 518-522.
- Narahashi, T. (1992). Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 236-241.

- Nerio, L., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101, 372–378.
- Nentwig, G., (2003). Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitology Research*, 90, 40-48.
- Noad, R. & Roy, P. (2009). Bluetongue vaccines. *Vaccine*, 27, 86-89.
- Nunes, T., Fonseca, I., Batista, F., Martins, H., Agrela Pinheiro, C., Luciente, J. & Boinas, F. (2009). Bluetongue in Portugal and *Culicoides* sp distribution between 2005-2008. *Abstracts Book – Medreonet third annual meeting, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2-4 December 2009*.
- OIE (2009). *Technical disease cards – Bluetongue*. Acedido em Agosto, 26, 2010, disponível em: [http://www.oie.int/eng/maladies/Technical%20disease%20cards/BLUETONGUE\\_FINAL.pdf](http://www.oie.int/eng/maladies/Technical%20disease%20cards/BLUETONGUE_FINAL.pdf).
- Page, P., Labuschagne, K., Nurton, J., Venter, G. & Guthrie, A. (2009) 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.
- Product type 18 and 19 - insecticides, acaricides and products to control other arthropods, draft guideline to replace part of appendices to chapter 7 (page 187 to 200) from TNsG on product evaluation (PT18 e 19 draft efficacy guideline, 2009)*. Documento em fase de discussão e ainda não publicado.
- Purse, B., Mellor, P., Rogers, D., Samuel, A., Mertens, P. & Baylis, M. (2005). Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature reviews: Microbiology*, 3, 171-181.
- Regulamento da Comissão EC 1451/2007 de 4 de Dezembro de 2007. Jornal Oficial da União Europeia L. 325. Estrasburgo.
- Rodrigues, L. (2008). *Epidemiologia e estudo entomológico dos potenciais vectores do vírus da Língua Azul na região do Vale do Tejo*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- SAC, 2008. *Assessing the Economic Impact of Different Bluetongue Virus (BTV) Incursion Scenarios in Scotland: Summary of Research Findings*. Acedido em Setembro 13, 2010, disponível em: <http://www.scotland.gov.uk/Resource/Doc/241130/0066946.pdf>.
- Sata, G., Goffredo, M., Sanna, S., Vento, L., Cubedu, G. & Mascherpa, E. (2004). Field disinfestation trials against *Culicoides* in north-west Sardinia. *Veterinaria Italiana*, 40, 329-335.
- Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Al-Quraishy, S., Schumacher, B., Jatzlau, A. & Mehlhorn, H. (2009a). Pilot study on deltamethrin treatment (Butox® 7.5, Versatrine®) of cattle and sheep against midges (*Culicoides* species, Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, 104, 809-813.
- Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Schumacher, B., Jatzlau, A., Al-Quraishy, S. & Mehlhorn, H. (2009b). Effects of permethrin (Flypor®) and fenvalerate (Acadrex® 60, Arkofly®) on *Culicoides* species – the vector of bluetongue virus. *Parasitology Research*, 104, 815-820.
- Sharma, V.P., Ansari, M.A., 1994. Personal protection from mosquitoes (Diptera: Culicidae) by burning neem oil in kerosene. *Journal of Medical Entomology*, 31, 505–507.

- Shoop, W., Mrozik, H., Fisher, M.(1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, 59:139-56.
- Tabachnick, W. (2010). Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. *The Journal of Experimental Biology*, 213, 946-954.
- Tabachnick, W., Smartt, C. & Connelly, C. (2008). *Bluetongue*. Acedido em Setembro, 10, 2010, disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN76800.pdf>.
- Takahashi, K., Yagi, K. & Hattori, K. (1985). The effects of two insect growth regulators on the biting midge *Culicoides circumscriptus* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 36, 353-355.
- Technical Notes for Guidance in support of annex VI of Directive 98/8/EC of the European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market - common principles and practical procedures for the authorisation and registration of products (TNsG on product evaluation), ECB (Fevereiro de 2008), acedido a Agosto, 15, 2010, disponível em: [http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Biocides/TECHNICAL\\_NOTES\\_FOR\\_GUIDANCE/TNsG\\_PRODUCT\\_EVALUATION/TNsG-Product-Evaluation.pdf](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Biocides/TECHNICAL_NOTES_FOR_GUIDANCE/TNsG_PRODUCT_EVALUATION/TNsG-Product-Evaluation.pdf).
- Temizel, E., Yesilbag, K., Batten, C., Senturk, S., Maan, N., Mertens, P. & Batmaz, H. (2009) Epizootic Hemorrhagic Disease in Cattle, Western Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 15, No. 2, 317-319.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A. & Jenings, F. (1998). *Parasitologia Veterinária*. (Segunda Edição). São Paulo: Guanabara Koogan.
- Verwoerd, D. & Erasmus, B. (2004). Bluetongue. In J. Coetzer, & R. Tustin, *Infectious Diseases of Livestock* (Vol. 2, pp. 1201-1220). Cape Town: Oxford University Press.
- Wall, R. & Shearer, D. (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology Pathology and Control*. (Second Edition). Oxford: Blackwell Science.
- Wilson, A. & Mellor, P. (2008). Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitology Research*, 103, 69-77.