

RESISTÊNCIA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* AO TEMEFÓS E
INTERAÇÃO DO LARVICIDA COM O FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

CÁTIA OLIVEIRA DE PAULA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2010

RESISTÊNCIA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* AO TEMEFÓS E
INTERAÇÃO DO LARVICIDA COM O FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

CÁTIA OLIVEIRA DE PAULA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
OUTUBRO – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 030/2011

Paula, Cátia Oliveira de

Resistência de larvas de *Aedes aegypti* ao temefós e interação do larvicida com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* / Cátia Oliveira de Paula. – 2010.

74 f. : il.

Orientador: Richard Ian Samuels

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.

Bibliografia: f. 50 – 74.

1. *Aedes aegypti* 2. *Metarhizium anisopliae* 3. Resistência 4. Temefós 5. Fungos entomopatogênicos I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 614.4323
595.7

RESISTÊNCIA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* AO TEMEFÓS E
INTERAÇÃO DO LARVICIDA COM O FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

CÁTIA OLIVEIRA DE PAULA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Campos dos Goytacazes, 22 de outubro de 2010.

Comissão examinadora:

Prof. José Oscar Gomes de Lima (Ph.D. Entomologia) – UENF

Prof. Milton Erthal Jr. (D.Sc. Produção Vegetal) – ISTCA/FAETEC

Prof. Cláudio Luiz Melo de Souza (D.Sc. Produção Vegetal) – ISTCA/FAETEC

Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D. Patologia de Insetos) – UENF
(Orientador)

*Á Deus pela força,
orientação e vitórias
concedidas,
Aos meus pais Ailton e
Jacira pelo amor, apoio,
confiança e dedicação,
Aos meus irmãos Geraldo,
Gerson e Isac pelo
incentivo e entusiasmo,
Ao meu namorado
Eduardo pelo carinho e
companheirismo, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela orientação, ajuda nos dias de adversidade, pois tudo posso nEle que me fortalece!!!

À UENF, pela oportunidade de realização deste curso de pós-graduação e pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Richard Ian Samuels, pela orientação, compreensão, preocupação, ajuda nos momentos de dificuldade e persistência.

Ao meu pai Ailton, minha mãe Jacira, meus irmãos Geraldo, Gerson, Isac, minhas cunhadas Gisele, Mirian e Jaqueline, meus sobrinhos Gabriel, Sophia e Giovana, ao meu namorado Eduardo que, incentivaram, apoiaram e mantiveram ao meu lado em todos os momentos.

A Vigilância Ambiental de Alegre pela oportunidade de pertencer à equipe e experiência obtida, a coordenadora, Flávia Beraldo, por toda ajuda concedida.

Às amigas Laerciana Pereira Vieira e Josimar Souza Andrade, pelo companherismo, amizade, compreensão, conversas e alegrias.

Aos amigos de laboratório Aline Teixeira Carolino, Simone de Azevedo Gomes, Adriano de Paula, pela ajuda nos experimentos, orientações e amizade.

Aos amigos Denise Moreira, Arli de Fátima Nogueira da Silva, pelas conversas, incentivo e toda alegria e amizade.

À secretária do LEF, Rita Maria Guimarães da Silva, por toda ajuda e paciência.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Dengue.....	4
2.1.1 Dengue no mundo.....	6
2.1.2 Dengue no Brasil.....	6
2.2 Bioecologia do <i>Aedes aegypti</i>	7
2.3 Controle <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	11
2.3.1 Controle mecânico.....	12
2.3.2 Controle legal.....	13
2.3.3 Controle biológico.....	13
2.3.4 Controle químico.....	14
2.3.4.1 Temefós no controle de <i>Aedes aegypti</i>	14
2.4 Resistência de dípteros a inseticidas	16
2.4.1 Resistência de populações de <i>Aedes aegypti</i> aos inseticidas.....	17
2.4.2 Métodos de detecção da resistência.....	18

2.4.2.1 Técnicas de estudo da resistência.....	19
2.4.3 Mecanismos de resistência.....	20
2.5 Uso de <i>Metarhizium anisopliae</i> para o controle de mosquitos vetores de doenças.....	24
3. OBJETIVO.....	27
3.1 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Criação das larvas.....	28
4.2 Bioensaios de suscetibilidade.....	31
4.3 Efeito do temefós na virulência do <i>Metarhizium anisopliae</i> a larvas de <i>Aedes aegypti</i>	32
4.3.1 Produção do isolado <i>Metarhizium anisopliae</i>	32
4.3.2. Preparo da suspensão dos conídios.....	33
4.3.3 Infecção das larvas.....	33
4.3.4 Efeito do temefós na germinação do <i>Metarhizium anisopliae</i>	33
4.3.5 Exposição das larvas ao temefós e fungo.....	34
4.4 Análise de resultados.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Suscetibilidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> ao temefós.....	36
5.2 Sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com <i>Metarhizium anisopliae</i>	39
5.3 Efeito do temefós na germinação do <i>Metarhizium anisopliae</i>	40
5.4 Sobrevivência de larvas de <i>Aedes aegypti</i> após tratamento com <i>Metarhizium anisopliae</i> e temefós.....	41
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

RESUMO

O organofosforado temefós é amplamente utilizado no controle de larvas de mosquitos. No Brasil, sua utilização no controle de larvas de *Aedes aegypti* é datada desde 1967. Entretanto, seu uso contínuo tem proporcionado o desenvolvimento de populações resistentes. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um dos agentes de controle biológico mais utilizado para o controle de pragas agrícolas, mas também com potencial para o controle de mosquitos. No presente trabalho, populações de *A. aegypti* de quatro bairros de Campos dos Goytacazes (Jardim Carioca- JC, Parque Gonçalves Vicente Dias - VD, Parque São José- SJ e Parque Califórnia- PC) foram avaliados quanto à suscetibilidade ao temefós através de bioensaios com dose diagnóstica e análise de curva de sobrevivência. A mortalidade de larvas oriundas de dois bairros, que apresentaram “status” diferenciados de resistência ao temefós, e larvas da linhagem Rockefeller foram avaliadas nas concentrações de 10^5 e 10^6 conídios mL^{-1} de *M. anisopliae* durante um período de 6 dias. Os efeitos do temefós sobre a germinação dos conídios de *M. anisopliae* foram investigados, com a finalidade de combinar o inseticida com *M. anisopliae* visando um aumento na mortalidade de larvas de *A. aegypti*. No experimento de monitoramento de resistência, a concentração diagnóstica de $0,0060 \text{ mg L}^{-1}$ demonstrou que nos bairros de JC, VD, SJ ocorrem populações resistentes, enquanto a população de PC apresentou “status” incipiente. As curvas de sobrevivência nesse experimento foram estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$). Os valores de S_{50} foram 2 dias em VD e 4 dias em JC e 1 dia em SJ e PC. Na concentração de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$, as curvas de sobrevivência se apresentaram estaticamente diferentes ($P < 0,0001$). Em 2 dias de exposição as larvas Rockefeller apresentaram índice de sobrevivência de 18%

e as larvas de todos os bairros investigados apresentaram sobrevivência maior que 85%. Na concentração de 0,012 mg L⁻¹, as curvas de sobrevivência foram estatisticamente semelhantes (P= 0,4963) com mortalidade maior que 89% em todas as populações. No experimento com o fungo, a mortalidade média foi de 8,3% em PC e 66,7% em VD e para larvas Rockefeller na concentração de 10⁵ conídios mL⁻¹, porém na concentração de 10⁶ conídios mL⁻¹ a mortalidade média foi de 29,2, 62,5 e 83,3% para VD, PC e Rockefeller, respectivamente. A S₅₀ foi de 5 dias com 10⁵ conídios mL⁻¹ e de 4 dias com 10⁶ conídios mL⁻¹ para Rockefeller e 5,5 dias na concentração de 10⁶ conídios mL⁻¹ para PC, porém na concentração de 10⁵ conídios mL⁻¹ este índice não foi alcançado. Em VD o valor de S₅₀ não foi obtido com nenhuma das concentrações analisadas. No estudo do possível sinergismo entre o fungo e inseticida, não houve efeito do temefós sobre a germinação do *M. anisopliae*, entretanto as curvas de sobrevivência foram estatisticamente diferentes (P<0.0001). A formulação com o fungo sozinho proporcionou maior mortalidade que o fungo combinado com inseticida às larvas de *A. aegypti*, porém a S₅₀ foi de 4 dias para ambas as formulações. Portanto, houve antagonismo entre os dois agentes e não deveriam ser usados em conjunto.

Palavras-chave: Resistência, temefós, *Aedes aegypti*, fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

The organophosphate temephos is of great importance in controlling mosquito larvae. Its use in the combat of *Aedes aegypti* in Brazilian municipalities dates back to 1967. However, its continued use has caused the development of resistant populations. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is a biological control agent currently used for the control of agricultural pest species and it also has a potential for the control of disease vector mosquito. In this study *A. aegypti* from four neighborhoods of Campos dos Goytacazes: Jardim Carioca (JC); Vicente Gonçalves Dias (RV); São José (SJ) and Parque California (PC) were used to study the susceptibility to a diagnostic dose of temephos and survival curve analysis. The mortality of larvae from two different neighborhoods was classified as resistant to temephos and larvae of the Rockefeller strain were exposed to concentrations of 10^6 and 10^5 conidia ml^{-1} of *M. anisopliae*. Effects of temephos on the germination of *M. anisopliae* were investigated, as well as the combined action of temephos and *M. anisopliae* on larvae of *A. aegypti*. In the experiment to determine susceptibility, a diagnostic concentration of 0.0060 mg L^{-1} showed the presence of resistant mosquitoes in JC, RV, SJ and demonstrated the incipient status in PC. The survival curves were statistically different ($P < 0.0001$). The values of S_{50} were two days in RV, four days in JC and 1 day in SJ and PC. At a concentration of 0.003 mg L^{-1} , the survival curves were statistically different ($P < 0.0001$). Following two days of exposure, Rockefeller larvae had a survival rate of 18% and the larvae from the field displayed survival greater than 85%. At a concentration of 0.012 mg L^{-1} , the survival curves were statistically similar ($P =$

0.4963) with mortality greater than 89% in all field populations. In the experiment with *M. anisopliae*, the average mortality was 8.33% in PC and RV. Rockefeller larvae showed 66.67% mortality at a concentration of 10^5 conidia mL⁻¹. When using 10^6 conidia mL⁻¹, the average mortality was 29.17%, 62.5% and 83.33% in the RV, PC and Rockefeller, respectively. The S₅₀ value was 5 days using 10^5 conidia mL⁻¹ and 4 days when using 10^6 conidia mL⁻¹ for Rockefeller larvae and 5.5 days at a concentration of 10^6 conidia mL⁻¹ for PC. The combined action of the fungus + insecticide was tested. Temephos had no effect on the germination of *M. anisopliae in vitro*, but the larval survival curves were statistically different (P < 0.0001). The formulation with the fungus alone caused a higher mortality than the fungus combined with insecticide, although values S₅₀ were equal (4 days) for both formulations. The results indicated that these two agents should not be combined for the control of *A. aegypti* larvae.

Key-words: Resistance, temephos, *Aedes aegypti*, entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é a mais importante arbovirose que afeta o homem. (Silva-Júnior e Pimenta Júnior, 2007). Seu quadro clínico é caracterizado por febre aguda e o agente etiológico é o vírus do gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (Ministério da Saúde, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram anualmente 50 milhões de casos de dengue em todo o mundo (WHO, 2008). No Brasil, já foram registrados no primeiro trimestre do ano de 2010, 447.769 casos, dos quais 38,7% concentram-se na região sudeste (Ministério da Saúde, 2010).

O mosquito *Aedes aegypti* é a principal espécie responsável pela transmissão do vírus da dengue. Este inseto desenvolve-se por metamorfose completa, com o ciclo de vida compreendido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. (FUNASA, 2001; Tauil, 2002).

Devido à ausência de vacina tetravalente eficaz, o combate vetorial é o único método disponível até a presente data para a prevenção e o controle da dengue e febre hemorrágica da dengue (WHO, 2010).

Atualmente, o Programa Nacional de Controle da Dengue tem fundamentado sua estratégia no controle integrado do inseto vetor, onde os níveis aceitáveis de infestação vetorial são obtidos por meio de agentes químicos, físicos, biológicos e atividades de educação que visam à redução dos criadouros. Contudo, o controle químico ainda assume papel importante na estratégia desenvolvida, na qual se destacam os inseticidas organofosforados e piretróides utilizados para o controle de larvas e adultos, respectivamente (FUNASA, 2001).

O organofosforado temefós tem grande destaque no controle de larvas de *A. aegypti*, é recomendado pela OMS até para uso em água potável, quando necessita de tratamento (Donalísio e Glasser, 2002; Carvalho et al., 2004; Luna et al., 2004). Este larvicida tem bom efeito residual, por isso é utilizado bimestralmente nos domicílios (FUNASA, 2001). Ele atua inibindo irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase, importante na regulação dos níveis de acetilcolina (Maddrell, 1980; Braga e Valle, 2007). Porém, seu uso continuado tem proporcionado o desenvolvimento de populações resistentes em vários países (Rawlins e Wan 1995; Wirth e Georghiou 1999), inclusive o Brasil (Carvalho et al. 2001, 2004; Campos e Andrade, 2001; Lima et al., 2003, Braga et al., 2004; Lima et al., 2006; Beserra et al., 2007).

A rápida evolução da resistência de artrópodes aos produtos químicos é basicamente, fruto da intensidade e frequência das doses aplicadas (Campanhola, 1990), porém, aplicações adequadas de inseticidas químicos aliados a formas alternativas de controle dentro de táticas de manejo integrado podem reduzir a pressão de seleção para a resistência (Guedes et al., 1995).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um agente de controle biológico com grande chance de ser inserido nos programas de controle de vetores, visto que seu potencial já foi apresentado em vários estudos (Alves et al., 2002; Scholte et al., 2004, 2005, 2007). Paula et al. (2008) demonstraram o efeito patogênico e virulento de isolados de *M. anisopliae* sobre adultos do mosquito *A. aegypti* e Pereira et al. (2009) obtiveram 90% de mortalidade em larvas usando *M. anisopliae*.

Dentro desse contexto, uma forma alternativa para o controle de insetos vetores pode ser a associação de concentrações subletais de produtos químicos com entomopatógenos. Isso diminuirá a quantidade de inseticidas, reduzindo, conseqüentemente a possibilidade de contaminação do meio ambiente, além de minimizar os riscos de surgimento de insetos resistentes aos princípios ativos dos produtos químicos e reduzir consideravelmente os custos do controle (Alexandre et al., 2008). Para tanto, é notório verificar a eficiência dos entomopatógenos, avaliando as possíveis interações de sinergismo, antagonismo ou aditivismo (Alves, 1998).

Assim, o monitoramento e o manejo da resistência, como a busca por métodos alternativos de controle, são elementos de suma importância nos

programas de controle de vetores (Ferrari, 1996a). No atual trabalho a resistência de diferentes populações foi estudada e a associação de baixas concentrações de inseticidas em conjunto com fungos entomopatogênicos, visando o controle do mosquito *A. aegypti*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dengue

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, endêmica na Ásia, nas Américas, no oriente Mediterrâneo e no Pacífico ocidental (Silva-Júnior e Pimenta Júnior, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que dois quintos da população mundial, cerca de 2,5 bilhões de pessoas, são suscetíveis ao vírus da dengue, podendo ocorrer anualmente 50 milhões de casos, 550 mil internações e pelo menos 20 mil óbitos em consequência da doença (WHO, 2008).

O agente etiológico desta endemia é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, com quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, cujo genoma consiste em uma fita simples de RNA (Ministério da Saúde, 2009, WHO, 2009).

A transmissão do arbovírus ao homem ocorre pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *A. aegypti*, considerado seu principal vetor (OPAS, 1992; Edman et al., 1998; Ligon, 2004) e após o período de incubação de 4 - 10 dias, a infecção por qualquer dos quatro sorotipos pode produzir um amplo espectro da doença, embora a maioria das infecções seja assintomática ou subclínica (Ministério da Saúde, 2009).

O vírus circula no sangue humano durante a viremia, que se inicia um dia antes do aparecimento da febre e permanece até o sexto dia da enfermidade (OMS, 1987), caracterizando estado febril agudo que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresente. Clinicamente a dengue é

apresentada como: dengue clássica, ou febre da dengue (sintomática ou assintomática), febre hemorrágica da dengue, e, às vezes, como síndrome de choque da dengue (Ministério da Saúde, 2009).

A dengue clássica, em geral, se inicia abruptamente com febre alta (39° a 40°), seguida de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retro orbitária, náuseas, vômitos, exantema, prurido cutâneo, hepatomegalia, dor abdominal generalizada. Pequenas manifestações hemorrágicas como petéquias, epistaxe, gengivorragia, sangramento gastrointestinal, hematúria e metrorragia podem ocorrer. Este quadro clínico tem duração média de cinco a sete dias, quando há regressão dos sinais e sintomas. Na febre hemorrágica e síndrome do choque da dengue, os sintomas iniciais são semelhantes aos da dengue clássica, mas no terceiro ou quarto dia o quadro se agrava com dor abdominal, sinais de debilidade profunda, agitação ou letargia, palidez de face, pulso rápido e débil, hipotensão com diminuição da pressão diferencial, manifestações hemorrágicas espontâneas, derrames cavitários, cianose e diminuição brusca da temperatura (Ministério da Saúde, 2009).

A infecção primária induz imunidade permanente para o sorotipo infectante, mas a proteção cruzada para outro sorotipo é apenas passageira, de 2 a 3 meses, o que torna possível ocorrer uma infecção seqüente por outro sorotipo (Monath, 1994; Schatzmayr, 2000; Derouich et al., 2003; Ministério da Saúde, 2009; WHO, 2009).

A dinâmica para transmissão do vírus inclui o homem, vírus, vetor e, principalmente, as condições ambientais e climáticas, políticas, econômicas e culturais, que permitem o estabelecimento da cadeia de transmissão (Marzochi, 1994). Os fatores climáticos, como a temperatura e precipitação, influenciam diretamente a biologia dos vetores e, assim, a sua abundância e distribuição, é, conseqüentemente, importante determinante das epidemias (Bentley e Day, 1989; Githeko et al., 2000; Natal, 2002). O crescimento urbano desordenado propicia grande fonte de indivíduos suscetíveis e infectados concentrados em áreas restritas, associado às condições precárias de saneamento básico, moradia inadequada e fatores culturais e educacionais proporcionam condições ecológicas favoráveis à transmissão do vírus (Lines et al., 1994, Barata et al., 2001).

2.1.1 Dengue no mundo

Os primeiros registros da dengue no mundo foram feitos no fim do século XVIII, no Sudoeste Asiático, em Java, e nos Estados Unidos, na Filadélfia (Martinez-Torres, 1990).

Entre o final do século XVIII até as duas primeiras décadas do século XX, ocorreram oito pandemias e/ou surtos isolados de dengue, com duração de três a sete anos, que atingiram Américas, África, Ásia, e Austrália (Howe, 1977).

Acredita-se que 1,8 bilhões (mais de 70%) da população em risco de dengue vivem no Sudeste Asiático e na região do oeste do Pacífico ocorrem cerca de 75% dos casos da doença (WHO, 2009). A cada ano milhares de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas, Austrália e Oceania adoecem com dengue. Tem-se observado que novas regiões e diversos países, antes não atingidos, vêm apresentando atividade epidêmica, com a circulação simultânea ou sucessiva de vários sorotipos virais, indicando crescente disseminação da dengue no mundo (Halstead, 1990).

Nas Américas, durante a década de 60 e início dos anos 70, houve um silêncio epidemiológico, resultado de campanhas de erradicação do *A. aegypti* coordenado pela Organização Pan-Americana. No entanto, a vigilância vetorial e as medidas de controle não foram suficientes para evitar re-infestações posteriores do mosquito e surtos de dengue no Caribe, na América Central e do Sul (PAHO, 2007), desta forma, epidemias cíclicas ocorrem a cada 3 a 5 anos. O maior surto no continente ocorreu em 2002 com mais de um milhão de casos notificados (WHO, 2009).

2.1.2 Dengue no Brasil

As áreas urbanas do Brasil permaneceram livres do *A. aegypti* até 1976. Com o ressurgimento do mosquito nas Américas, deu-se início a uma onda de epidemias começando em 1981 em Roraima e, após seis anos, no Rio de Janeiro e algumas capitais da região Nordeste, resultando na circulação endêmica e epidêmica do vírus por todo o país. Na década de 90 do século passado, as regiões Sudeste e Nordeste foram responsáveis pela maior parte dos casos

notificados. Em 2002, foi observada a maior incidência da doença, quando foram confirmados cerca de 697.000 casos (Ministério da Saúde, 2009).

No ano de 2009 foi registrado 529.237 casos suspeitos de dengue, sendo 2.271 casos confirmados e 154 óbitos por Febre Hemorrágica da Dengue, e 5.952 casos de dengue com complicação, com 144 óbitos (Ministério da Saúde, 2010).

No corrente ano, a Secretaria de Vigilância em Saúde, em trabalho conjunto com as Secretarias Municipais e Estaduais de Saúde registraram 447.769 casos notificados de suspeita de dengue até a semana 13 de 2010 em todo país, dos quais 173.307 (38,7%) concentram na região sudeste e o Rio de Janeiro apresentou 4200 casos notificados (Ministério da Saúde, 2010).

Os surtos/epidemias ocorridos no território brasileiro foram devidos à circulação heterogênea dos sorotipos DENV-1, 2, 3, no entanto cabe destacar a presença do sorotipo DENV-4, recentemente isolado em Boa Vista, Roraima, após único registro ter ocorrido há mais de 25 anos (Secretaria Vigilância em Saúde, 2010).

2.2 Bioecologia do *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti*, pertencente ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família *Culicidae* e Gênero *Aedes* (Consoli e Oliveira, 1998) é o principal vetor do vírus da febre amarela urbana e da dengue no Brasil e no mundo (Cheng et al., 1982; OPAS, 1992; Edman et al., 1998; FUNASA, 2001; Ministério da Saúde, 2009).

Proveniente da África, onde está localizado seu centro endêmico original, o *A. aegypti* foi originalmente descrito no Egito (Crovello e Hacker, 1972; Pessoa e Martins, 1982; OMS, 1987; Donalísio e Glasser, 2002). Relatos constam que sua introdução no Brasil ocorreu no período colonial, provavelmente durante o tráfico negreiro, por via marítima (OPAS 1992, Consoli e Oliveira, 1994).

Na atualidade, possui ampla distribuição geográfica, predominando nas áreas tropicais e subtropicais situadas entre os paralelos de latitudes 35° Norte e 35° Sul e nas zonas isotermas de 10°C em latitudes norte e sul (WHO, 2009), porém projeções de elevação de 2° C da temperatura no final do século XXI

indicam que provavelmente aumentarão a extensão da distribuição deste vetor no planeta (Githeko et al., 2000).

Besserra et al. (2006) observaram que a temperatura favorável ao ciclo de vida do *A. aegypti*, em condições de laboratório estava entre 22°C e 30°C, enquanto que extremos de $\leq 18^\circ\text{C}$ e $\geq 34^\circ\text{C}$ apresentaram efeitos negativos sobre o desenvolvimento e a fecundidade do inseto.

O desenvolvimento deste díptero ocorre por metamorfose completa, passando pelos estágios ovo, larva, pupa e adulto (Marzochi, 1994; Gubler, 1998; Silva et al., 1999; FUNASA, 2001; Silva et al., 2002; Forattini e Brito, 2003).

Os ovos medem, aproximadamente, 1 mm de comprimento e têm o contorno alongado e fusiforme (Forattini, 1965). Inicialmente são brancos, mas, rapidamente, adquirem a cor negra brilhante. São depositados pela fêmea, individualmente, fora do meio líquido, mas próximo a esse ou em locais potencialmente inundáveis, nas paredes internas dos depósitos artificiais ou naturais, que servem de criadouros, tendo como preferenciais pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos de plantas, caixas de água, tonéis, latões e cisternas destampadas, ou mesmo os lagos artificiais, piscinas e aquários abandonados, ou seja, pequenas coleções de água limpa e parada, localizadas nas proximidades das casas (FUNASA, 2001). Contudo, Silva et al. (1999) e Clements (1999) demonstraram que o *A. aegypti*, também, se desenvolveu em água poluída.

Seus ovos são resistentes à dessecação, podendo permanecer viáveis no campo, por mais de um ano, sendo observado eclosão com até 450 dias de quiescência (FUNASA, 2001). Em condições de laboratório sua viabilidade foi demonstrada até 492 dias após a postura (Silva e Silva, 1999). A fecundação ocorre durante a postura e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura (FUNASA, 2001).

Após o desenvolvimento embrionário do ovo, em contato com a água, ocorre a eclosão da larva, que passa por quatro estádios evolutivos (L1, L2, L3, L4). Seu corpo é composto de cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é dividido em oito segmentos, a parte posterior e anal possui quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água. O período larval varia de quatro a sete dias (Forattini, 2002).

Na fase subsequente, têm-se as pupas, que possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen, com um par de tubos respiratórios ou trompetas. Neste período, geralmente de dois a três dias, não ocorre alimentação e há metamorfose para estágio adulto (FUNASA, 2001).

Os adultos apresentam tórax enegrecido, ornamentado com desenho em forma de lira no mesonoto e faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais. O macho se distingue da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos (OPAS, 1986; Consoli e Oliveira, 1994; FUNASA, 2001; Taveira et al., 2001). Permanecem vivos em laboratório durante meses, mas, na natureza, vivem em média de 30 a 35 dias (FUNASA, 2001).

Ambos, machos e fêmeas, alimentam-se de seiva de vegetais. No entanto, as fêmeas necessitam das proteínas presentes no sangue do hospedeiro para a maturação dos ovos. (Clements, 2000). A oviposição ocorre no terceiro dia, após o repasto sangüíneo (Gomes et al., 2006). Em cada postura são liberados cerca de 50 a 70 ovos (Bentley e Day, 1989).

O repasto sangüíneo ocorre quase sempre durante o dia, nas primeiras horas do período matutino (7:00 e 10:00h) e vespertino (16:00 e 18:00h) (Silva et al., 2002; FUNASA, 2001). Constitui fonte de repasto a maior parte dos vertebrados, inclusive o homem, picando-os, preferencialmente, nos pés e nas partes inferiores das pernas (Eiras, 2005).

O mosquito se infecta ao ingerir sangue de um indivíduo durante o período de viremia e pode transmitir a doença para um indivíduo suscetível depois de um período de incubação extrínseca de 8 a 12 dias (Monath, 1994; Gubler 1998). Uma vez infectado, transmite o vírus pelo resto de sua vida (Halstead, 2008). A transmissão transovariana do vírus tem sido demonstrada em laboratório, mas raramente em condições de campo (WHO, 2009).

A dispersão do mosquito ocorre, principalmente, de maneira passiva, por via terrestre e/ou aérea, através de ovos depositados em pneus usados e adultos que se abrigam dentro de veículos (Eiras, 2005).

A capacidade de dispersão do *A. aegypti* pelo vôo (dispersão ativa) é variável, sendo guiada pela busca de sítios de oviposição apropriado, geralmente o alcance não excede os 100 metros, porém, já foi demonstrado até 3 km, quando não havia recipientes para oviposição nas proximidades (Reiter et al. 1995; FUNASA, 2001).

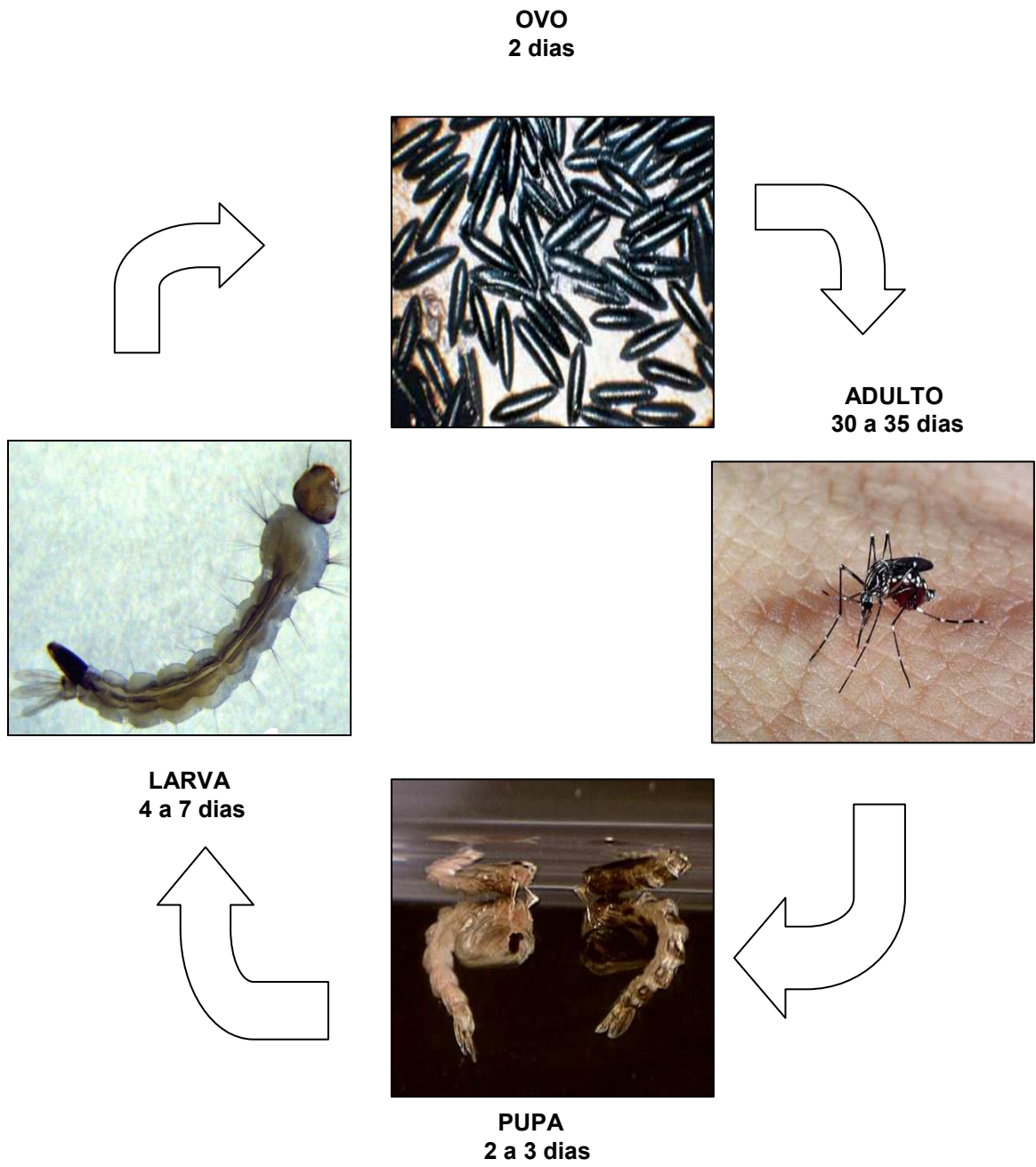


Figura 1 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

2.3 Controle *Aedes aegypti* no Brasil

A partir do século XX, após a ocorrência de diversas epidemias de febre amarela no Brasil, que levaram milhares a morte, o combate ao mosquito *A. aegypti* foi institucionalizado de forma sistematizada (Franco, 1976; FUNASA, 2001).

Com o incentivo da Fundação Rockefeller, nas décadas de 30 e 40 foram executadas intensas campanhas de erradicação do mosquito *A. aegypti* nas Américas. Entre os anos de 1923 e 1940, essa Fundação atuou contra a febre amarela nas cidades litorâneas do Nordeste, através de acordos firmados com Departamento Nacional de Saúde Pública, foram realizadas campanhas que tinham a responsabilidade exclusiva pela eliminação do vetor (Löwy, 1999).

Em 1947, a Organização Pan-Americana e a Organização Mundial da Saúde coordenaram a erradicação do *A. aegypti* no continente, por intermédio do Programa de Erradicação do *A. aegypti* (Soper, 1965). O Brasil participou deste programa e no ano de 1958, na XV Conferência Sanitária Pan-Americana, em Porto Rico, declarou oficialmente a erradicação (FUNASA, 2002), mas devido à falta da sustentabilidade das ações, em 1976 houve a reintrodução e não mais conseguiu eliminá-lo (Teixeira e Barreto, 1996). Porém, foi com a extensa epidemia de dengue em 1986 no Rio de Janeiro e a disseminação para regiões vizinhas que as ações de vigilância e controle dos vetores do dengue tornaram-se prementes no Brasil, com uso intensivo dos organofosforados para controle de larvas e adultos do *A. aegypti* (Schatzmayr et al., 1986; Dletz et al., 1990, Ministério da Saúde, 1996).

Em 1996, o Ministério da Saúde elaborou o Plano de Erradicação do *A. aegypti*, um projeto com esforços em várias frentes, cujo objetivo era novamente a erradicação do vetor. O projeto incluía intervenções em políticas urbanas, combate químico, estratégias e metas nas áreas de saneamento ambiental, educação, informação e ampla mobilização social (Teixeira e Barreto, 1996). Entretanto, entraves políticos, administrativos e financeiros impossibilitaram a sua execução.

Em seu lugar, um segundo projeto, Plano Ajustado de Erradicação do *A. aegypti*, foi implementado, que não incluía os mesmos princípios anteriores, ficando reduzido ao combate vetorial químico, o que ocasionou a continuidade da

expansão da área habitada pelo vetor, elevados níveis de infestação domiciliar, especialmente nos maiores e mais complexos centros urbanos (Teixeira et al., 1999).

Diante desse cenário, em 2002, o Ministério da Saúde enfatizou uma estratégia mais eficiente de controle, que estabeleceu a meta de redução dos índices de infestação dos domicílios para níveis inferiores a 1%, aumentou os recursos financeiros do programa e descentralizou as ações, ficando essa sobre responsabilidade dos municípios (Barreto e Teixeira, 2008). Nesta atual estratégia, o controle é baseado na recomendação do manejo integrado, envolve o poder público, a sociedade e a política de intersetorialidade, tendo como principal objetivo a redução das populações do *A. aegypti*, em níveis que não representem risco para a saúde pública (PAHO, 1995; Braga e Valle, 2007; Ministério da Saúde, 2009).

O Programa Nacional de Controle da Dengue implantado em 2002, inclui nas atividades de controle vetorial os métodos de controle mecânico, legal, biológico e químico (FUNASA, 2002) e está em vigência até o momento (Ministério da Saúde, 2010).

2.3.1 Controle mecânico

O controle mecânico visa diminuir a proliferação do *A. aegypti* através de medidas como proteção, destruição ou a destinação adequada de criadouros, dificultando a oviposição das fêmeas. Neste tipo de controle ficam inseridas medidas como: coleta de resíduos sólidos, coleta seletiva de materiais recicláveis, cobertura de áreas de depósitos de materiais que acumulam água, sistema de drenagem, obras de engenharia em habitações (Ministério da Saúde, 2009).

Silva e Gomes (2008) demonstraram que medidas mecânicas, como aplicações de palha de madeira e de casca de árvores entre as folhas de bromélias ornamentais, foram eficazes para evitar que larvas do mosquito *A. aegypti* desenvolvessem nos exemplares estudados, visto que, as plantas da família *Bromeliaceae* constituem criadouros naturais de várias espécies de culicídeos.

2.3.2 Controle legal

O controle legal está relacionado com o uso de instrumentos legais de apoio às ações de controle da dengue (leis e portarias), que podem ser instituídas no âmbito dos municípios, estado ou federação, visando, principalmente responsabilizar o proprietário do imóvel pela manutenção e limpeza de terrenos baldios, assegurar a vistoria domiciliar do profissional responsável pelo controle do vetor aos imóveis fechados, abandonados e onde exista recusa à inspeção, além de regulamentar algumas atividades comerciais consideradas críticas, do ponto de vista sanitário (Ministério da Saúde, 2009).

2.3.3 Controle biológico

O controle biológico pode ser definido como qualquer atividade envolvendo manipulação de inimigos (predadores, parasitas, parasitóides ou patogénos) naturais ou modificados, e genes para reduzir ou suprir uma população de animal ou vegetal que representa uma praga (National Academy of Science, 1987; Melo e Azevedo, 1998).

Este método é uma alternativa vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, custo, à especificidade e desenvolvimento de resistência, não afetando populações de artrópodes, como inimigos naturais de pragas ou que são ecologicamente importantes (Alves, 1998).

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) era usada exclusivamente no controle de insetos pragas na agricultura, mas com a descoberta de um isolado patogênico a dípteros chamado *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) (Becker, 2000; Polanczyk et al., 2003) foi possível sua utilização no controle de vetores de doenças, e atualmente, em vários municípios, o programa nacional de controle da dengue a tem como alternativa no controle de larvas do *A. aegypti* (Araújo et al., 2007; Ministério da Saúde, 2009).

2.3.4 Controle químico

O controle químico tem papel importante na estratégia de controle do *A. aegypti*, inclusive em períodos interepidêmicos, pela rapidez e facilidade com que atua. Este método consiste no tratamento focal, perifocal dos criadouros do vetor e aplicação espacial com equipamento ultra baixo volume (UBV) (Ministério da Saúde, 2009).

O tratamento focal é direcionado ao controle das larvas, com aplicação periódica de larvicidas em recipientes que possam atuar como criadouros, quando a sua eliminação mecânica não é viável (PAHO, 1995; FUNASA, 2001, 2002; sendo mais empregados para essa modalidade de tratamento os larvicidas pertencentes ao grupo dos organofosforados (Ministério da Saúde, 2009).

No Brasil o larvicida de maior utilização para o controle do *A. aegypti* é o temefós (Ministério da Saúde, 1968). Entretanto, seu uso contínuo tem selecionado populações de mosquitos resistentes (Brown, 1986; Rawlins e Wan 1995; Macoris et al., 1999; Wirth e Georghiou 1999; Rodríguez et al 2001; Campos e Andrade 2001; Carvalho et al. 2001, 2004; Lima et al. 2003; Braga et al., 2004; Lima et al., 2006; Beserra et al. 2007).

Para o controle químico adulticida são empregados duas modalidades: a aplicação de inseticida de ação residual denominada de tratamento perifocal, indicada para uso rotineiro específico em imóveis que, além de concentrarem muitos recipientes em condições que favorecem a proliferação de formas imaturas, contribuem para a dispersão passiva do vetor; e a aplicação espacial de inseticida com UBV, indicado para situações de surto e epidemias (PAHO, 1995, FUNASA 2001, Ministério da Saúde, 2009). Os inseticidas empregados são os piretróides, cipermetrina e deltametrina e o organofosforado malathion (Ministério da Saúde, 2009).

2.3.4.1 Temefós no controle de *Aedes aegypti*

Os organofosforados, também conhecidos por fosforados orgânicos, inseticidas fosforados, ésteres fosfóricos ou ésteres de ácido fosfórico, incluem todos os inseticidas que contenham fósforo. Possuem vários grupos segundo sua

estrutura, estando entre os mais numerosos os fosfatos (diclorvos), fosforotioatos (fenitrothion, temefós) e fosforoditioatos (malation, dimetoato) (Superintendência Controle Endemias, 2001).

Esta classe de inseticida atua inibindo irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase, que é importante na regulação dos níveis de acetilcolina, um neurotransmissor. Em condições normais, acetilcolinesterase catalisa a hidrólise da acetilcolina em ácido acético e colina, interrompendo a transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios. Porém, em insetos expostos aos organofosforados, ocorre o acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses) provocando uma hiperatividade nervosa, sinapses aleatórias, distorção muscular, colapso do sistema nervoso, paralisia e morte do inseto (Maddrell, 1980; Braga e Valle, 2007).

O temefós é um inseticida organofosforado utilizado desde 1967 nos municípios brasileiros para o tratamento químico de criadouros de *A. aegypti* (Ministério da Saúde, 1968). Ele é recomendado pela OMS para uso em água potável no controle de larvas de mosquitos. Sua adição em água para consumo humano tem como argumento baixa toxicidade aguda para mamíferos e a pouca persistência no ambiente (Taylor, 1991; Chavasse e Yap, 1997). Entretanto, sua moderada toxicidade para pássaros e alta toxicidade para determinados organismos aquáticos pode limitar sua utilização (HSDB, 2003).

Este composto apresenta DL_{50} oral em ratos de 4.000 a 13.000 mg/kg e para os camundongos é de 2.062 mg/kg. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2009).

A aplicação do temefós é realizada em ciclos bimestrais, em água estagnada e em reservatórios de água potável para uso doméstico, na concentração final de 1ppm e formulação granulada (Ministério da Saúde, 2009). Esta formulação caracteriza-se pela lenta liberação do ingrediente ativo na água do recipiente, o que prolonga o período residual do tratamento (Morris et al., 1996). O período residual de controle do temefós na água varia em função do volume de água, da dose aplicada (Camargo et al., 1998) e do material do recipiente (Pinheiro e Tadei, 2002).

2.4 Resistência de dipteros à inseticida

A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte (Braga e Valle, 2007). Segundo Georghiou e Mellon (1983), uma população de insetos é considerada resistente quando sua resposta a um inseticida em condições de campo ou em bioensaios diminui significativamente aquém da sua resposta normal. Crow (1957) define resistência como o marco na mudança da composição genética de uma determinada população em resposta à pressão de seleção.

O processo para população de insetos tornar-se resistente ocorre devido à evolução das respostas adaptativas determinadas pela seleção natural sobre a variação genética existente. A aplicação repetida de inseticidas do mesmo grupo químico e modo de ação favoreceram variantes genéticas específicas nas populações alvo, levando à substituição dos indivíduos suscetíveis pelos indivíduos resistentes. O gene para resistência que aumenta em frequência em uma população pode se espalhar para outras populações através do fluxo genético (Machado e Fiúza, 2009).

Deste modo, os fatores envolvidos na evolução da resistência podem ser agrupados em fatores genéticos inerentes ao número de genes envolvidos, dominância e expressividade da resistência; bioecológicos relacionados com as características do inseto como a duração do ciclo biológico e dispersão; e operacionais determinados pelas características do produto químico e intensidade da exposição da população no tempo e espaço e nas várias fases do ciclo biológico (Georghiou e Taylor, 1977).

Uma população de insetos pode desenvolver resistência cruzada contra dois produtos diferentes, mas próximos quimicamente, quando um deles causa seleção para um mecanismo de desintoxicação comum a ambos. Resistência múltipla ocorre quando a seleção é causada separadamente contra mecanismos de desintoxicação diferentes entre produtos químicos não relacionados (French et al., 1992). Bracco et al. (1997) relataram a ocorrência de resistência cruzada aos organofosforados malathion, fenitrothion e ao carbamato propoxur em população de *Culex quinquefasciatus*. Em Cuba, Rodriguez et al. (2002) registraram a resistência cruzada a piretróides induzida pela seleção com temefós em *A.*

aegypti. Tikar et al. (2009) mostraram variado grau de resistência cruzada aos fenthion, clorpirifós, malathion e DDT em *A. aegypti* com resistência induzida pelo temefós.

A ocorrência de resistência a inseticidas tem acarretado sérios problemas para o controle de mosquitos, como: aplicação mais freqüente de inseticidas; aumento na dosagem do produto; e substituição por um outro produto, geralmente de maior toxicidade (Georghiou, 1983). Estes fatores comprometem os programas de controle de vetores, devido à maior contaminação do meio ambiente, destruição de organismos benéficos, e elevação nos custos para obter os níveis aceitáveis de controle, ou seja, Índice de infestação predial menor que 1% (Ministério da Saúde, 2009).

2.4.1 Resistência de populações de *Aedes aegypti* aos inseticidas

A resistência a inseticidas é um fenômeno mundial e as estimativas indicam que mais de 500 espécies de artrópodes desenvolveram resistência a um ou mais pesticidas (Georghiou e Lagunes-Tejeda, 1991). Neste cenário, avanços importantes têm surgido no desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de mosquitos, entretanto, os inseticidas químicos ainda se mantêm como parte vital dos programas de controle integrado (Thatheyus, 2007).

Dessa forma, diversos casos de resistência têm sido registrados no mundo para espécies de mosquitos vetores (Brown, 1986; Mazzarri e Georghiou, 1995; Tikar, 2009), em particular para *A. aegypti*, cuja informação sobre o desenvolvimento de resistência a inseticidas data de 1950 e refere-se a uma população do mosquito originária do Caribe resistente a organofosforado (Slosek, 1986). Posteriormente, foram surgindo outros trabalhos mostrando a ocorrência de resistência de populações desse mosquito a organofosforados e piretróides em regiões tropicais e subtropicais (Georghiou e Taylor, 1977; Marzochi, 1994; Reyes-Villanueva, 1990; Rawlins e Wan, 1995).

No Brasil, os primeiros casos de resistência de populações de *A. aegypti* ao temefós foram relatados em 1999 (Macoris et al., 1995, FUNASA, 1999; Beserra et al., 2007; Montella et al., 2007). Neste mesmo ano o Ministério de Saúde iniciou a coordenação do programa para detecção de resistência do *A.*

aegypti a inseticidas (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas, MoReNAa) (FUNASA, 1999).

Em pouco tempo, outros casos de resistência ao temefós em diversas regiões do Brasil começaram a surgir, como no Distrito Federal (Carvalho et al. 2001, 2004), Campinas, SP (Campos e Andrade 2001), Espírito Santo, Rio de Janeiro, Sergipe, Alagoas (Lima et al. 2003, Braga et al., 2004), Ceará (Lima et al., 2006) e Paraíba (Beserra et al., 2007), entre outras. Alterações no estado de suscetibilidade a piretróides, usado para o controle de adultos, foram também detectadas (Luna, et al 2004; Cunha et al., 2005).

Devido aos casos de resistências detectados o Ministério da Saúde tem buscado alternativas, incluindo produtos à base de Bti e reguladores de crescimento como o diflubenzuron, quando a resistência ao temefós é comprovada por bioensaios laboratoriais e de campo (Ministério da Saúde, 2009). A substituição do temefós teve início no ano de 2001 em alguns municípios da federação (FUNASA, 2001). O município de Campos dos Goytacazes realizou o controle de larvas com temefós até 2004 que então foi substituído pelo Bti. (Comunicação Pessoal: Cardoso de Melo, diretora CCZ em 2004).

2.4.2 Métodos de detecção da resistência

As técnicas tradicionais de detecção/quantificação da resistência de insetos aos produtos químicos em todo o mundo podem ser divididas em: bioensaios “in vivo” utilizando indivíduos intactos, os quais são expostos aos produtos para a determinação da dose diagnóstica e/ou quantificação do nível de resistência, e ensaios “in vitro”, em que são utilizadas técnicas bioquímicas que avaliam a atividade enzimática, que determina o mecanismo de resistência via expressão de genes específicos de resistência (Scott, 1990, 1995).

2.4.2.1 Técnicas de estudo da resistência

Bioensaios dose diagnóstica/resposta

Dose diagnóstica é a dose predeterminada de um inseticida que apresenta e é letal para a maioria dos indivíduos suscetíveis, mas não afeta a maioria de indivíduos resistentes (Ferrari, 1996b).

No bioensaio é avaliada a mortalidade de uma amostra de determinada população a ser testada com a aplicação da dose diagnóstica, que, muitas vezes, já está determinada para várias espécies de artrópodes transmissores de doenças (WHO, 1991), a fim de estabelecer uma comparação com a população padrão para suscetibilidade.

Para teste de suscetibilidade, em que as formas imaturas desenvolvem-se na água (larvas/pupa), o inseticida é diluído em água até a concentração final da dose diagnóstica em estudo. Bioensaios em garrafas são utilizados quando o inseticida testado age nas formas adultas, sendo o inseticida aplicado na superfície do recipiente (Brogdon e Mcallister, 1998).

Nos bioensaios de dose-resposta, uma escala de diferentes doses de inseticidas é utilizada para se obter um espectro de respostas de mortalidade entre as amostras estudadas. A resposta obtida pode ser analisada, mediante a divisão da porcentagem de mortalidade da população referência de suscetibilidade pela população de campo testada na concentração em que a mortalidade foi diferente de zero e 100% (National Center for Infectious Diseases, 2010).

Ensaio bioquímico

Ensaio bioquímico são utilizados para identificar mecanismo de resistência em uma determinada população, fornecendo a relação entre atividade enzimática e qual o possível mecanismo de resistência presente no inseto analisado (Brogdon, 1989), através da quantificação de atividade de acetilcolinesterase, glutathione-S-transferases, esterases (α e β) e monooxigenases (Brogdon e Dickinson, 1983). Nos testes bioquímicos, procura-se

quantificar a atividade do grupo de enzimas em populações resistentes quando comparada com a atividade enzimática de uma população suscetível.

Ensaio moleculares

Ensaio moleculares de resistência a inseticidas em populações de artrópodes visam caracterizar variações genéticas em populações naturais com a detecção de alelos mutantes que podem conferir resistência. Estes ensaios são considerados mais precisos e diminuem a variabilidade associada com bioensaios, levando em consideração aspectos intrínsecos (estrutura genética) e extrínsecos (condições laboratoriais, tamanho da amostra) (Shah et al., 2002).

São utilizadas técnicas como PCR (Polymerase Chain Reaction), (Locali et al., 2003), análise genética através de uso de marcadores de isoenzimas (Tabachnick e Black IV, 1996) e marcadores de DNA e RNA (Antony et al., 1995; Ranson et al., 2002; Brengues et al., 2003; Diabate et al., 2004).

2.4.3 Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro categorias: redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto, mudanças comportamentais, alteração do sítio-alvo e resistência metabólica (Ferrari, 1996a).

Redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto

Os indivíduos resistentes, devido à redução na penetração cuticular, recebem uma menor quantidade de inseticidas no sítio de ação do produto em decorrência de mudanças na cobertura de quitina. Este mecanismo de resistência, associado a vários insetos, foi estudado principalmente em *Musca domestica*, sendo considerado de importância secundária (Oppenoorth, 1985). A base bioquímica da redução da taxa de penetração de um inseticida não está clara, embora tenha sido proposto que a composição protéica do tegumento tenha papel relevante (Braga e Valle, 2007), no entanto, geneticamente esse mecanismo está relacionado a genes secundários, como o gene pen da *M. domestica*, que se localiza no cromossomo III e é um gene recessivo. Mosquitos

que desenvolvem este tipo de mudança possuem pouca ou nenhuma resistência na ausência de outro mecanismo, mas quando associado a um outro mecanismo, o nível de resistência aumenta consideravelmente (Apperson e Georghiou, 1975; Roush e Daly, 1990).

Mudanças comportamentais

Estas mudanças ocorrem devido a efeitos irritantes e repelentes dos inseticidas, que outrora tinha ação letal, sobre indivíduos fisiologicamente resistentes, (Forattini, 2002), os quais alteram seu comportamento através de reconhecimento de superfícies tratadas com inseticidas, e apresentando maior tendência de não adentrar em áreas sob tratamento, reduzindo a taxa de invasão de domicílios ou modificando o horário de repasto sangüíneo (Mathenge et al., 2001).

Alteração do sítio-alvo

Resistência de uma população de insetos pode ser decorrente de alteração de sítios alvos, de forma a impedir ou dificultar a ligação com a molécula-alvo. Este tipo de resistência é ocasionado por mutações em genes que codificam para o sitio de ação do inseticida. Estas alterações podem comprometer parcialmente ou integralmente a atividade inseticida em questão. A enzima acetilcolinesterase, Receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) e os canais de sódio dependentes de voltagem, são exemplos de sítio-alvos envolvidos neste tipo de resistência (Hemingway et al., 2004).

Organofosforados e carbamatos são neurotóxicos, que agem inibindo a enzima acetilcolinesterase (Hemingway, 2000). A acetilcolinesterase finaliza o impulso nervoso pela catalisação da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Neste caso, a resistência está relacionada com a redução de sensibilidade da acetilcolinesterase pelo inseticida, o que permite a interrupção normal ou quase do estímulo nervoso (Guedes et al., 1995; Ferrari, 1996a; Ffrench-Constant et al., 1998; Hemingway e Ranson, 2000). Mutero et al. (1994) mostraram os efeitos combinados de mutações no gene responsável pela codificação da acetilcolinesterase acarretando o desenvolvimento de resistência a inseticidas

organofosforados em *Drosophila melanogaster*, como também em *Anopheles* e *Culex* (Mouchès et al., 1990; Guillemaud et al., 1997; Hemingway e Karunaratne, 1998; Brogdon et al., 1999).

Outro exemplo de alteração é promovido pela mutação no receptor GABA, sítio de ação dos inseticidas organoclorados, (ciclodienos e policloroterpenos). Estes inseticidas atuam sobre os receptores de GABA, impedindo a entrada de íons cloro para o meio intracelular e, com isso, provocam a emissão de impulsos espontâneos que levam à contração, convulsões, paralisia e morte. A resistência a inseticidas, ocasionada por insensibilidade de receptores GABA nos canais de cloro, já foi associada com mutação de único par de bases do receptor, ocasionando substituição de um aminoácido (alanina por serina) (Hemingway e Ranson, 2000). A insensibilidade do receptor GABA já foi bem estudada em várias espécies de insetos (Hemingway et al., 2004).

Os canais de sódio voltagem-dependentes na membrana do neurônio são sítios alvo de piretróide e alguns organoclorados. A ligação desses inseticidas mantém os canais de sódio na conformação aberta e, conseqüentemente, há propagação contínua do impulso nervoso, podendo levar o inseto à morte. Um outro padrão de alteração no sítio de ação acontece nesses canais. Essa alteração recebe o nome de “knockdown resistance” (kdr), que confere resistência aos inseticidas piretróides e aos organoclorados do grupo do DDT (Liu et al., 2000). O intenso uso de piretróides e DDT levaram populações de vários tipos de insetos, incluindo *Anopheles* e *Aedes*, a desenvolver este tipo de resistência (knockdown resistance) (Soderlund e Knipple, 2003), sendo este mecanismo bem caracterizado em *M. domestica*, para as quais diversas variantes de kdr são descritas (Farnham et al., 1987).

Resistência metabólica

A resistência metabólica é resultante da capacidade de metabolização de inseticidas, que leva à formação de produtos menos tóxicos. Esse mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente para prevenir a ação no sítio alvo. O incremento do metabolismo pode ser o resultado de alteração, seja da enzima existente, tornando-a mais eficaz na degradação dos inseticidas, seja dos mecanismos reguladores, que aumentam a produção de

moléculas de enzimas já disponíveis em insetos suscetíveis, embora em quantidades menores (Ferrari, 1996a; Hemingway, 2000).

Os principais grupos enzimáticos destoxicadores de inseticidas incluem as esterases, as glutathione-S-transferases e as monooxigenases (Cariño et al., 1994; Raymond et al., 1998; Scott, 1999).

As esterases são enzimas que, em insetos, desempenham papel no sistema nervoso central, regulação dos níveis de hormônio juvenil, processos digestivos, comportamento reprodutivo e degradação de inseticidas (Aldridge, 1953), pertencem a um grupo de isoenzimas que preferencialmente catalisam a hidrólise de ésteres. Vários inseticidas que contêm o grupamento éster na sua estrutura química (organofosforados, carbamatos e piretróides) são suscetíveis à sua ação. Podem gerar dois tipos de resistência a inseticidas químicos: uma resistência de grande amplitude através de uma rápida ligação ao inseticida (seqüestro) ou uma resistência de amplitude menor através da metabolização de uma variedade pequena de inseticidas que contenham uma ligação éster em comum (Karunaratne et al., 1995).

Em uma grande variedade de mosquitos, a atividade elevada das esterases tem sido reportada como o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados (Hemingway e Karunaratne, 1998; Hemingway, 2000), sendo relatado em *Simulium* (Andrade e Castello-Branco Jr., 1990) *Culex pipens* (Qiao et al., 1998) e *A. aegypti* (Paeporn et al., 2003; Saelim et al., 2005; Bisset et al., 2007; Dhang et al., 2008).

As glutathione-S-transferases pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas, e possuem um papel fundamental em mecanismos de detoxificação intracelular de compostos endo e xenobióticos (Chelvanayagam et al., 2001), no estresse fisiológico, estando também implicadas no transporte intracelular e cascatas biosintéticas (Wilce e Parker, 1994).

Em mosquito (Ketterman et al., 2001) e moscas (Wei et al., 2001) uma alta atividade de GST tem sido relacionada à resistência a inseticidas. Em outro díptero, *Chironomus tentans*, Rakotondravelo et al. (2006) também mostraram altos níveis de atividade de GST em resposta a diferentes inseticidas. Le Goff et al. (2006) mostraram que xenobióticos causam um aumento na expressão de genes de GSTs em *D. melanogaster*.

O metabolismo oxidativo aumentado foi implicado como o principal mecanismo de resistência para todas as classes de inseticidas, com exceção dos ciclodienos, e é um dos mecanismos mais comuns de resistência. As enzimas associadas com o metabolismo oxidativo aumentado são as monooxigenases dependentes de citocromo P450 (Bergé et al., 1998; Scott, 1999).

A resistência aos Inseticidas Inibidores de Crescimento (IGR) foi relacionada às monooxigenases (Brogdon e McAllister, 1998; Kotze et al., 1997) e foi detectada, principalmente, na *M. domestica* (Cerf e Georghiou, 1974; Zhang et al., 1998).

O envolvimento dessas enzimas na resistência metabólica pode ser verificado com a adição de inibidores em ensaios com os inseticidas. monooxigenases são bloqueadas pelo sinergista butóxido de piperonila, já as esterases têm sua ação anulada pelo composto trifenil fosfato. O sinergista dietil maleato age bloqueando as glutatona-S-transferases (Scott, 1990).

2.5 Uso de *Metarhizium anisopliae* para o controle de mosquitos vetores de patógenos

O fungo *M. anisopliae* (Ascomycota:Clavicipitacea) encontra-se amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos (Alves, 1998; Franceschini et al., 2001). Morfologicamente, é filamentososo com micélio hialino e septado, dotado de conidióforos dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas (Arruda et al., 2005).

Seu processo infeccioso inicia-se a partir da adesão e germinação dos conídios na cutícula do hospedeiro, e subsequente penetração (Alves, 1998; Castrilho et al., 2005). Após a penetração, ocorre a proliferação e colonização das hifas na cavidade do corpo do hospedeiro, com liberação de toxinas (dextruxinas e citocalasinas) quando então há interrupção dos processos fisiológicos (Laird et al., 1990; Muro et al., 2003), causando paralisação e/ou morte do inseto (Alves, 1998; Castrilho et al., 2005).

Após a morte do hospedeiro, as hifas crescem invadindo os diversos órgãos internos. O micélio emerge do corpo do inseto produzindo esporos que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos. No final da conidiogênese o cadáver apresenta coloração verde, caracterizando a muscardine verde (Alves, 1998).

O *M. anisopliae* tem apresentado patogênico a mais de 300 espécies de insetos (Alves, 1998; Roberts e St. Leger, 2004). Sua facilidade de produção, aplicação, especificidade e a ausência de toxicidade, aliada à associação destes organismos com outras táticas de controle, viabilizam sua utilização em grandes áreas (Alves, 1998), possibilitando o controle biológico de pragas agrícolas e vetores de patogénos.

Há mais de duas décadas ele foi testado com sucesso no controle de larvas dos mosquitos *Anopheles stephensi*, *A. quadrimaculatus*, *A. aegypti*, *Ochlerotatus atropalpus*, *O. taeniorhynchus*, *Culex pipiens*, *C. restuans* e *C. salinarius* (Roberts, 1970), *M. domestica* (Pereira et al., 1981). Estudos posteriores comprovaram sua virulência sobre *C. pipiens* e *A. aegypti* (Daoust et al., 1982).

Scholte et al. (2005) em estudo de campo, realizado na Tanzânia com o *M. anisopliae* demonstraram a patogenicidade do fungo contra *Anopheles* adultos vetores da malária e Mnyone et al. (2009) de *A. gambiae* e *A. arabiensis*, em laboratório.

O desenvolvimento pupal de *M. domestica*, com a diminuição da taxa de emergência, foi também afetado por este fungo (Bernardi et al., 2006).

M. anisopliae foi altamente virulento em adultos (Scholte et al., 2007; Paula et al., 2008) e larvas de *A. aegypti* (Silva et al., 2004, 2005; Pereira et al., 2009) e seu efeito ovicida foi mostrado (Luz et al., 2007, 2008). Desta forma, seu potencial no controle de todos os estágios de desenvolvimento do principal vetor da dengue, pode ser aprimorado e utilizado nos programas de controle de vetores em saúde pública.



Figura 2 – Larva de *Aedes aegypti* colonizada com o fungo *Metarhizium anisopliae*.

3. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a suscetibilidade de populações de *A. aegypti* de Campos dos Goytacazes ao larvicida temefós e investigar em condições de laboratório a germinação e virulência do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* na presença de temefós, visando aumentar a eficiência do fungo para o controle de larvas de *A. aegypti*.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a suscetibilidade de larvas *A. aegypti* pertencentes aos bairros de Jardim Carioca, Parque Gonçalves Vicente Dias, Parque São José e Parque Califórnia do município de Campos dos Goytacazes ao larvicida temefós;
- A partir da detecção do status de suscetibilidade, avaliar a virulência do fungo *M. anisopliae* (ESALQ 818) às larvas de *A. aegypti* provenientes de bairros com status de suscetibilidade diferente;
 - Investigar o efeito do temefós na germinação do *M. anisopliae*;
 - Avaliar a virulência do *M. anisopliae* combinado com temefós a larvas de *A. aegypti*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criações das larvas

Os ovos utilizados para os biensaaios de suscetibilidade foram coletados nos bairros Jardim Carioca, Parque Gonçalves Vicente Dias, Parque São José, Parque Califórnia, no município de Campos dos Goytacazes (RJ) (Figura 3), durante o período de novembro de 2009 a abril de 2010.

Na coleta dos ovos utilizou-se armadilhas ovitrampas. Essa armadilha foi constituída de um vaso plástico de coloração preta de 500 mL de volume, com água e em seu interior foi fixada com elástico verticalmente quatro paletas de madeira, nas quais as fêmeas do mosquito depositaram os ovos. As ovitrampas foram distribuídas nos intra e peridomicílios das residências nos bairros citados anteriormente, seguindo o padrão da FUNASA (FUNASA, 2001).

A criação das larvas de *A. aegypti* foi conduzida no Insetário da UENF em sala climatizada à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa $80 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

As armadilhas foram recolhidas sete dias após sua colocação nos domicílios. As paletas de madeira contendo os ovos foram encaminhadas para o laboratório para secagem e contagem. Para estimular a eclosão das larvas de *A. aegypti*, as paletas foram submersas em bandejas plásticas (10 cm x 30 cm x 20 cm) preenchidas com água potável. Para alimentação das larvas, adicionou-se 0,1g por bandeja de ração comercial para gato, triturada. Após 24 horas de

imersão, as paletas foram retiradas e as larvas foram mantidas nas bandejas até o estágio de L3 tardio/L4 inicial e nesse estágio realizado todos os bioensaios.

As larvas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller, conhecida por ser suscetível a todas as classes de inseticidas químicos (Ministério da Saúde, 2006) foram utilizadas como padrão de suscetibilidade. Essas larvas foram cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia (CBB/UENF).

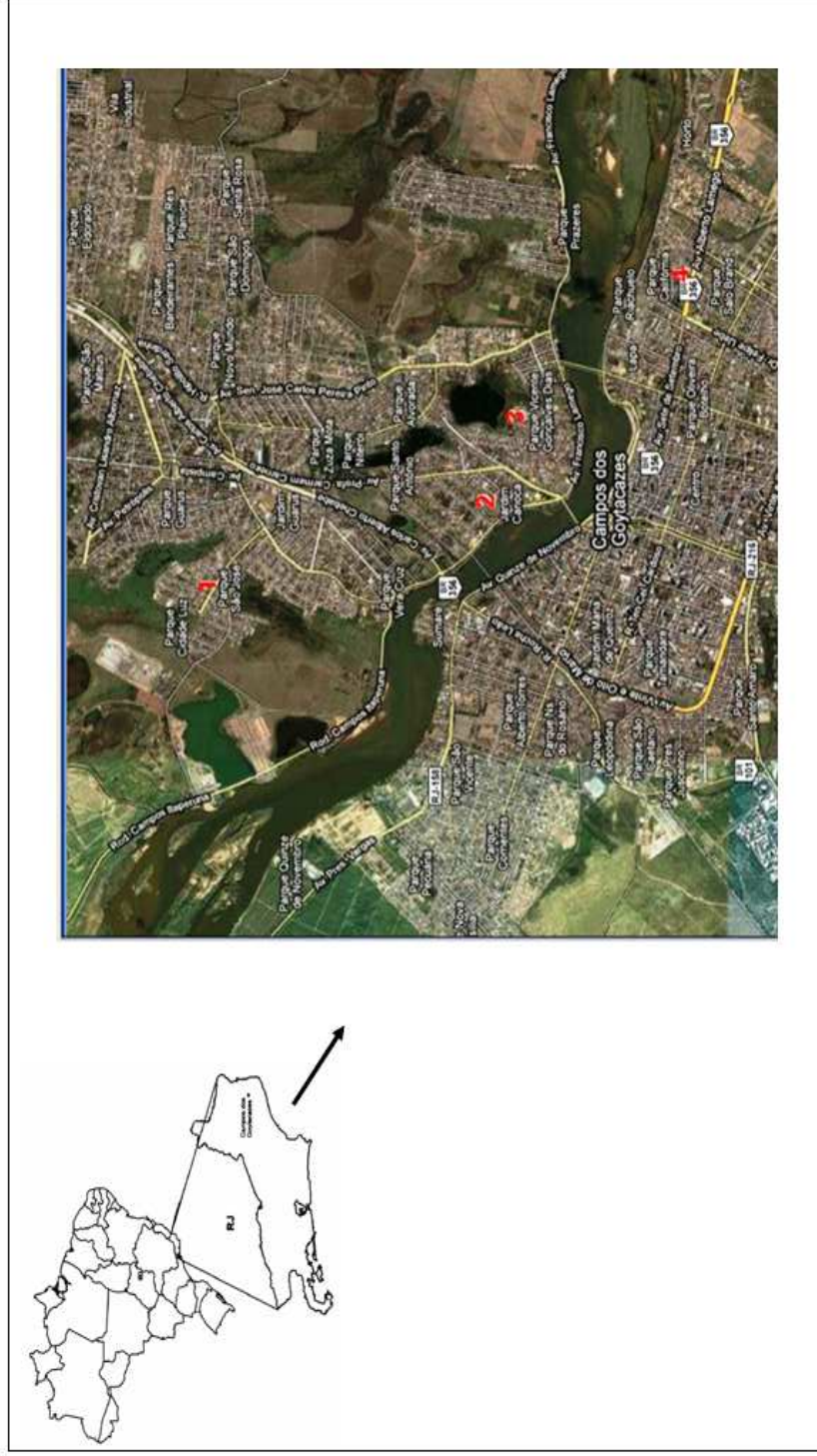


Figura 3 - Mapa do Brasil, destacando o município de Campos dos Goytacazes e foto de satélite com os bairros marcados onde foram coletados ovos (1-Parque Carioca; 2- Jardim São José; 3- Parque Vicente Gonçalves Dias; 4- Parque Califórnia).

4.2 Bioensaios de suscetibilidade

O inseticida utilizado foi o temefós (Abate® 1G). A calibração de toxicidade deste inseticida foi realizada com a população suscetível de *A. aegypti* linhagem Rockefeller.

Os bioensaios basearam no protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1981a, b; Lima et al. 2003; Braga et al. 2004). O protocolo compreende duas avaliações: resposta de mortalidade frente à exposição à concentração diagnóstico (CD) e resposta à exposição a um gradiente de concentrações (concentrações múltiplas - CM) para estabelecimento da linha-base de dose resposta (WHO, 1981a). Foi estabelecido como concentração diagnóstico (CD) 0,0060 mg L⁻¹, a concentração letal que causou 100% de mortalidade à linhagem suscetível.

Avaliaram-se a suscetibilidade das larvas oriundas de quatro bairros do município de Campos dos Goytacazes (RJ). Nos bioensaios foram utilizadas as larvas de terceiro estágio tardio e/ou quarto estágio inicial. Três réplicas de 24 larvas, totalizando 72 larvas por concentração, foram expostas a três concentrações (CM) de temefós. Procedeu-se da mesma forma com as larvas controle, porém foram expostas à água destilada (Figura 4).

O inseticida foi inicialmente diluído para obter uma solução estoque à concentração de 1 mg L⁻¹ i.a. em água destilada. A seguir, foram feitas diluições em água destilada para se chegar às concentrações de 0,003, 0,006 e 0,012 mg L⁻¹. As curvas de sobrevivência foram estabelecidas a partir dessas concentrações.

A mortalidade foi verificada durante 120h de exposição das larvas ao temefós. Larvas de baixa motilidade, ou seja, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas foram consideradas como mortas (WHO, 1981b).

Para a caracterização das populações quanto ao grau de resistência ao temefós, foi considerada a população de larvas *A. aegypti* linhagem Rockefeller como referência.

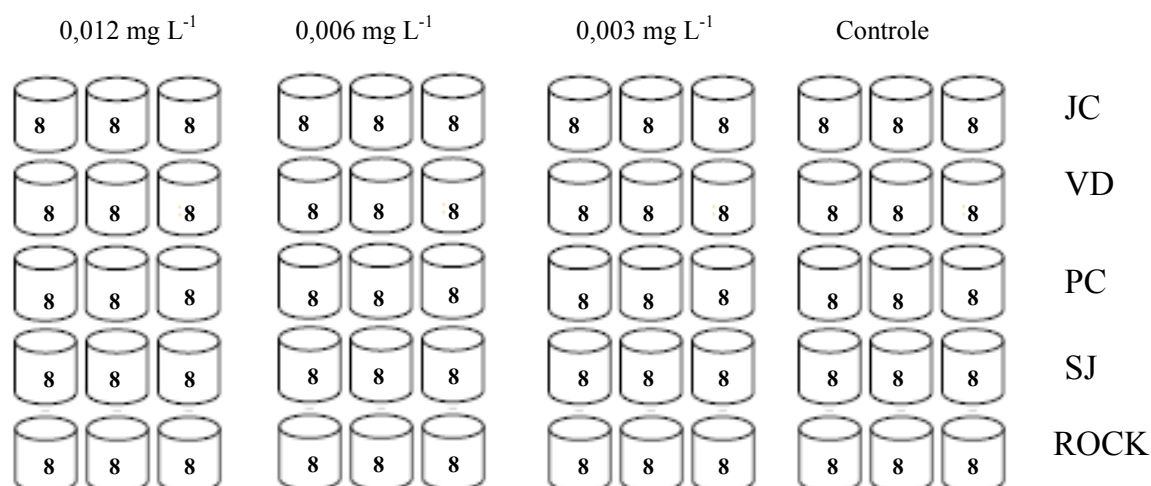


Figura 4 - Modelo de análise de suscetibilidade do *Aedes aegypti* ao temefós. Bioensaio realizado três vezes. JC-Jardim Carioca; VD-Parque Gonçalves Vicente Dias; PC-Parque Califórnia; SJ-São José; ROCK-Rockefeller.

4.3 Efeito do temefós na virulência do *Metarhizium anisopliae* a larvas de *Aedes aegypti*

4.3.1 Produção do isolado *Metarhizium anisopliae*

Foi utilizado o isolado de *M. anisopliae*, obtido da coleção da ESALQ (ESALQ 818) em Piracicaba, descrito como de alta virulência aos adultos e às larvas de *A. aegypti* (Paula et al., 2008; Pereira et al., 2009).

Os conídios de *M. anisopliae* foram semeados com auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura sólido (SDA) (10g de dextrose; 2,5g de peptona; 2,5g de extrato de levedura; 20g de ágar e 1000 mL de água destilada), previamente autoclavado a 121° C, por 15 minutos a 1 atm. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D, a 27° C; 80 ± 5% UR; sem fotofase durante um período de quinze dias para crescimento e esporulação do fungo.

Após este período, com o auxílio de uma colher estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados em Erlenmeyers de 250mL contendo 25g de arroz parboilizado e 10mL de água destilada, previamente autoclavados a

121° C por 15 minutos a 1 atm. Os Erlemeyers foram mantidos em B.O.D por quinze dias nas condições descritas anteriormente.

4.3.2. Preparo da suspensão dos conídios

Na câmara de fluxo laminar, com uma colher estéril, foram retirados do Erlemeyers os grãos de arroz contendo os conídios e misturados com o dispersante Tween 80 (0,05%) procedeu à separação dos conídios e posterior preparo da suspensão do fungo. A concentração dos conídios foi determinada em câmara de Neubauer. Foram realizadas diluições até obterem-se concentrações de 5×10^5 e 5×10^6 conídios viáveis mL⁻¹.

4.3.3 Infecção das larvas

O isolado *M. anisopliae* ESLQ 818 foi testado contra larvas de *A. aegypti* oriundas dos bairros Parque Califórnia, Parque Gonçalves Vicente Dias e larvas da linhagem Rockefeller.

Para esse bioensaio foram adicionados suspensões fúngicas em copos de plástico de 250mL contendo apenas 50 mL de água destilada com 8 larvas por copo. O experimento foi realizado três vezes. Cada copo foi inoculado com 1 mL de suspensão fúngica com 10^5 e 10^6 conídios mL⁻¹ (Tween 80 0,05%) resultando na concentração final de 2×10^3 e 2×10^4 conídios mL⁻¹, respectivamente. No tratamento controle foi adicionado Tween 80 (0,05%) a água destilada. A mortalidade larval foi avaliada diariamente por 6 dias.

4.3.4 Efeitos do temefós sobre a germinação do *Metarhizium anisopliae* “in vitro”

O temefós foi dissolvido em água destilada estéril, formando uma solução estoque, em seguida essa solução foi filtrada usando Acrodisc® PF 0,2µ (Gelman Sciences).

A solução estoque foi adicionada ao meio SDA estéril ainda em fase líquida, resultando na concentração final de 1mg L^{-1} de temefós. O meio foi, então, vertido em placas de Petri de plástico e após a solidificação, foram inoculados em cada placa dez μl de suspensão de conídios ($5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). Essas placas foram mantidas em câmara climatizada (B.O.D), a 26°C durante 12 e 24h, para verificar a taxa de germinação dos conídios.

Os conídios foram observados utilizando microscópio óptico, colocando a placa de Petri diretamente no microscópio. Cem conídios foram contados de forma aleatória em cada placa. O critério para a germinação de conídios foi a presença de tubo germinativo, com comprimento maior ou igual ao tamanho do próprio conídio.

O tratamento foi constituído de três placas de Petri inoculadas com conídios, para o controle procedeu da mesma forma, porém no meio não foi adicionado o temefós.

4.3.5 Exposição das larvas ao temefós e fungo

A suspensão de fungo foi preparada conforme anteriormente descrito. O larvicida temefós foi utilizado na concentração de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$, sendo essa dose determinada, a partir de experimentos anteriores como dose subletal. No tratamento de fungo + temefós, foram inoculados 1 mL de suspensão fúngica com 10^6 conídios mL^{-1} na diluição previamente preparada do temefós.

Em cada tratamento foram utilizados oito larvas distribuídas em três copos plásticos de 250mL com 50 mL de solução. Os tratamentos foram: fungo (10^6 conídios mL^{-1}) + temefós ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$) ; somente fungo e somente temefós.

O grupo controle foi tratado com água destilada. Foram realizadas três repetições e a mortalidade foi observada diariamente durante seis dias

4.4 Análise de resultados dos bioensaios

Considerou-se como indicador qualitativo de resistência o larvicida (presente ou ausente) quando a mortalidade ficou abaixo de 80%. Nessa classificação, seria suscetível quando esse percentual de mortalidade fosse acima de 98%, sendo os valores entre 80 e 98% inconclusivos (Davidson e Zahar, 1973).

A razão de resistência (RR) foi determinada, a partir dos percentuais de mortalidade obtidos na concentração de 0,003 mg L⁻¹, dessa forma, o percentual de mortalidade da linhagem Rockefeller foi dividido pelos percentuais de mortalidade das populações resistentes.

O critério proposto por Campos e Andrade (2003) foi usado para classificar a razão de resistência como tolerante se a $RR \leq 3$; de baixa resistência se a $RR > 3$ e ≤ 5 ; de moderada resistência se a $RR > 5$ e ≤ 10 ; de média resistência se a $RR > 10$ e ≤ 20 ; e altamente resistente se a $RR > 20$.

As curvas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência (S_{50}) foram comparados usando o teste de Log Rank em 95% de nível de significância. Este método foi conduzido pelo GraphPad Prism 4.0 Software (Motulsky, 2003). Primeiramente, foram analisadas as repetições de cada tratamento, com o objetivo de verificar se as curvas de sobrevivência entre as repetições não eram estatisticamente diferentes. Não ocorrendo diferenças significativas entre repetições, as três repetições de cada experimento foram juntadas ("pooled"), dando-se início à análise das curvas de sobrevivência entre os tratamentos.

Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas usando teste *post hoc* de Duncan, admitindo-se $\alpha = 0,05$. Para tanto, utilizou-se o programa SPSS for Windows (versão 11.0).

5. RESULTADOS

5.1 Suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao temefós

As populações de *A. aegypti* avaliadas neste trabalho responderam de formas distintas quanto à classificação de status de suscetibilidade ao organofosforado temefós. Os grupos controle apresentaram mortalidade média de 2,2%.

O “status” de suscetibilidade e razão de resistência das larvas foram estabelecidos após 24h de exposição ao temefós. Na concentração diagnóstico de 0,0060 mg L⁻¹ foi demonstrado que a resistência estava presente nas populações oriundas de Jardim Carioca, Parque Gonçalves Vicente Dias, Parque São José, porém em Parque Califórnia a resistência apresentou em desenvolvimento. As larvas oriundas de Jardim Carioca e Parque Gonçalves Vicente demonstraram os menores percentuais de mortalidade, como mostra a Tabela 1.

Nos bairros, os coeficiente de variação (CV) dos percentuais de mortalidade das larvas na dose diagnóstico (0,006 mg L⁻¹) variaram de 5,7% a 11,5%, sendo o menor coeficiente observado na população com maior percentual.

A razão de resistência calculada a partir da concentração de 0,003 mg L⁻¹ foram 8,4; 9,8 e 7,0 em Jardim Carioca, Parque Vicente Dias e Parque São José, respectivamente. Conforme classificação proposta por Carvalho e Andrade (2003) essas populações apresentaram resistência moderada.

Tabela 1 – Avaliação de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* provenientes de bairros de Campos dos Goytacazes usando três concentrações de temefós durante 24h

ORIGEM	MORTALIDADE (%)			CV (%)	“STATUS” SUSCETIBILIDADE
	0,012 mg L ⁻¹	0,006 mg L ^{-1*}	0,003 mg L ⁻¹	0,006 mg L ^{-1*}	
Rockefeller	100	100	82,2± 4,9	-	Suscetível
Pq. Califórnia	100	96,8 ± 5,5	8,3 ± 3,8	5,7	Incipiente
Jardim Carioca	82,5 ± 7,5	45,8 ± 4,2	9,8 ± 8,5	9,1	Resistente
Pq. Gonçalves Vicente Dias	82,1 ± 7,5	45,4 ± 3,8	8,4 ± 4,7	8,4	Resistente
Pq. São José	94,4 ± 5,1	61,8 ± 7,1	11,7± 6,6	11,5	Resistente

Dados referentes a média ± desvio padrão (n=24 larvas por repetição). Foram montadas 3 repetições.

* Dose diagnóstico para detectar resistência das larvas

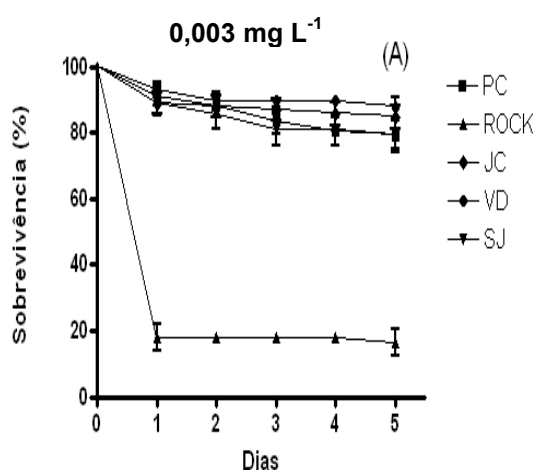
CV= Coeficiente de variação

Bioensaio realizado durante novembro de 2009 a abril de 2010.

A Figura 5 compara as curvas de sobrevivência das larvas tratadas com temefós durante cinco dias. Na Figura 5(A) as curvas de sobrevivência das larvas tratadas com a concentração de 0,003 mgL⁻¹, apresentaram estatisticamente diferentes (P<0,0001). Com 2 dias de exposição ao larvicida a linhagem Rockefeller apresentou índice de sobrevivência de 18% e as larvas dos bairros apresentaram média de sobrevivência maior que 85%. O valor de S₅₀ foi de 1 dia para linhagem Rockefeller.

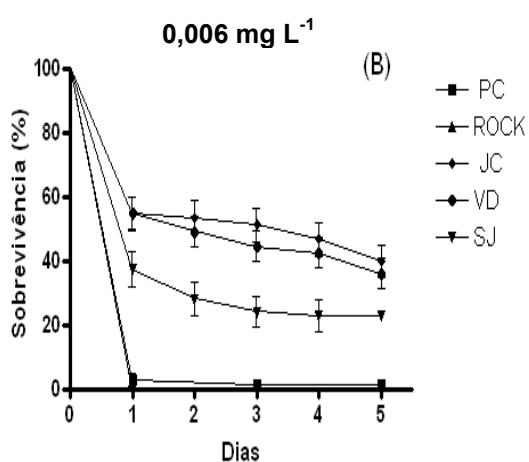
A Figura 5(B) mostra que as curvas de sobrevivência na concentração de 0,006 mg L⁻¹ foram estatisticamente diferentes (P<0,0001). O valor de S₅₀ foi igual a 2 dias para larvas do Parque Gonçalves Vicente Dias e 4 dias para larvas de Jardim Carioca, porém para Parque São José, Parque Califórnia e a linhagem Rockefeller esse valor foi obtido em apenas 24 h de exposição.

Na concentração de 0,012 mg L⁻¹, as curvas de sobrevivência foram estatisticamente semelhantes (P= 0,4963), como mostra a Figura 5(C). No primeiro dia de avaliação, a S₅₀ foi obtida em todas as populações testadas, com 100% de mortalidade para larvas de Parque Califórnia e linhagem Rockefeller. O percentual de sobrevivência das larvas provenientes de Jardim Carioca, Parque Gonçalves Vicente Dias e Parque São José em 2 dias de bioensaio foram 15%, 8% e 3%, respectivamente.



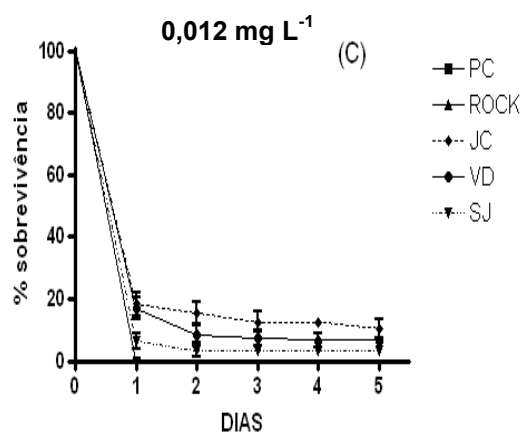
ORIGEM	*SOBREVIVÊNCIA (%)
ROCK - Rockefeller	16,7 ± 3,3
PC - Pq. Califórnia	79,0 ± 4,9
JC - Jardim Carioca	86,5 ± 12,0
VD - Pq. Gonçalves Vicente Dias	86,8 ± 5,2
SJ - Pq. São José	80,6 ± 7,7

Dados referentes a média ± desvio padrão
*Sobrevivência das larvas no final do 5º dia de exposição a 0,003 mg L⁻¹ temefós



ORIGEM	*SOBREVIVÊNCIA (%)
ROCK - Rockefeller	-
PC - Pq. Califórnia	1,6 ± 2,8
JC - Jardim Carioca	40,3 ± 4,8
VD - Pq. Gonçalves Vicente Dias	37,1 ± 6,9
SJ - Pq. São José	23,6 ± 16,3

Dados referentes a média ± desvio padrão
*Sobrevivência das larvas no final do 5º dia de exposição a 0,006 mg L⁻¹ temefós



ORIGEM	*SOBREVIVÊNCIA (%)
ROCK - Rockefeller	-
PC - Pq. Califórnia	-
JC - Jardim Carioca	10,6 ± 1,7
VD - Pq. Gonçalves Vicente Dias	7,1 ± 7,5
SJ - Pq. São José	3,1 ± 3,4

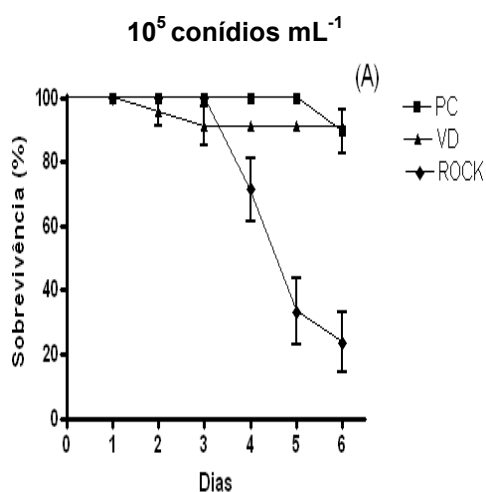
Dados referentes a média ± desvio padrão
*Sobrevivência das larvas no final do 5º dia de exposição a 0,012 mg L⁻¹ temefós

Figura 5 – Sobrevivência de *Aedes aegypti* tratado com temefós na concentração de 0,003 mg L⁻¹ (A), 0,006 mg L⁻¹ (B) e 0,012 mg L⁻¹ (C) por 5 dias. (n=24 larvas por repetição). Foram montadas 3 repetições. *Os dados sem barras de erro padrão tinham erros igual ao valor do dia anterior.

5.2 Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* tratado com *Metarhizium anisopliae*

As larvas dos bairros (Parque Califórnia e Parque Gonçalves Vicente Dias) apresentaram maiores percentuais de sobrevivência quando expostas às duas concentrações de conídios em comparação com a linhagem Rockefeller. No entanto, vale ressaltar que o tempo médio de sobrevivência (S_{50}) das larvas provenientes de Parque Gonçalves Vicente Dias não foi obtido durante o período experimental.

As curvas de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* tratadas com isolado ESALQ 818 (*M. anisopliae*) na concentração 10^5 conídios mL^{-1} , apresentaram-se estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$) (Figura 6A). Na concentração 10^6 conídios mL^{-1} as curvas de sobrevivência também foram estatisticamente diferentes ($P = 0,0018$) (Figura 6B).



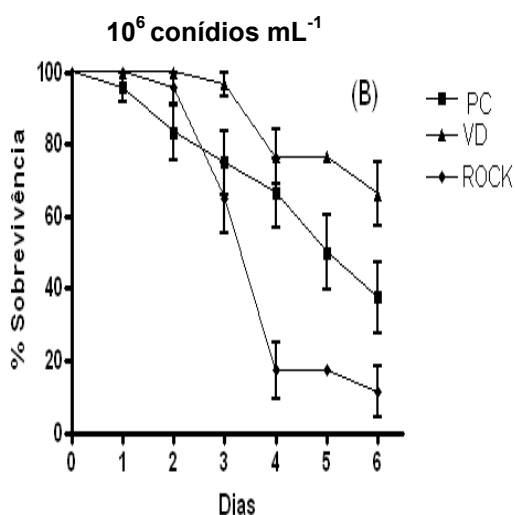
ORIGEM	10 ⁵ conídios mL ⁻¹	
	*Sobrevivência (%)	S ₅₀ (dias)
ROCK - Rockefeller	33,3 ± 7,2	5
PC - Pq. Califórnia	91,7 ± 7,2	NA
VD- Pq. Gonçalves Vicente Dias	91,7 ± 14,4	NA

Dados referentes a média ± desvio padrão.

NA = Não aplicado

S₅₀ = tempo médio de sobrevivência

*Sobrevivência das larvas no final do 6º dia de tratamento com fungo.



ORIGEM	10 ⁶ conídios mL ⁻¹	
	*Sobrevivência (%)	S ₅₀ (dias)
ROCK - Rockefeller	16,7 ± 9,1	4
PC - Pq. Califórnia	37,5 ± 0,0	5,5
VD- Pq. Gonçalves Vicente Dias	70,8 ± 7,2	NA

Dados referentes a média ± desvio padrão.

NA = Não aplicado

S₅₀ = tempo médio de sobrevivência

*Sobrevivência das larvas no final do 6º dia de tratamento com fungo.

Figura 6 – Sobrevivência de *Aedes aegypti* tratado com o *Metarhizium anisopliae* isolado ESALQ 818 na concentração 10⁵ conídios mL⁻¹ (A) e 10⁶ conídios mL⁻¹ (B) por 6 dias. (n=8 larvas por repetição). Foram realizadas 3 repetições. *Os dados sem barras de erro padrão tinham erros igual ao do dia anterior.

5.3 Efeitos do temefós na germinação de *Metarhizium anisopliae*

Os tratamentos foram semelhantes pelo teste *post-hoc* de Duncan. Não houve efeito do temefós na germinação do fungo tanto para 12h de germinação ($F_{4,5} = 0,128$; $P > 0,05$), quanto para 24h ($F_{4,5} = 3,872$; $P > 0,05$). Quando o fungo *M. anisopliae* (ESALQ818) foi exposto ao temefós na concentração de 1 mg L⁻¹, 82,7% dos conídios germinaram após 12h de incubação e 99,7% após 24h. A

germinação dos conídios sem a presença do temefós foi 81% e 92,3% após 12 e 24h de incubação, respectivamente (Figura 7).

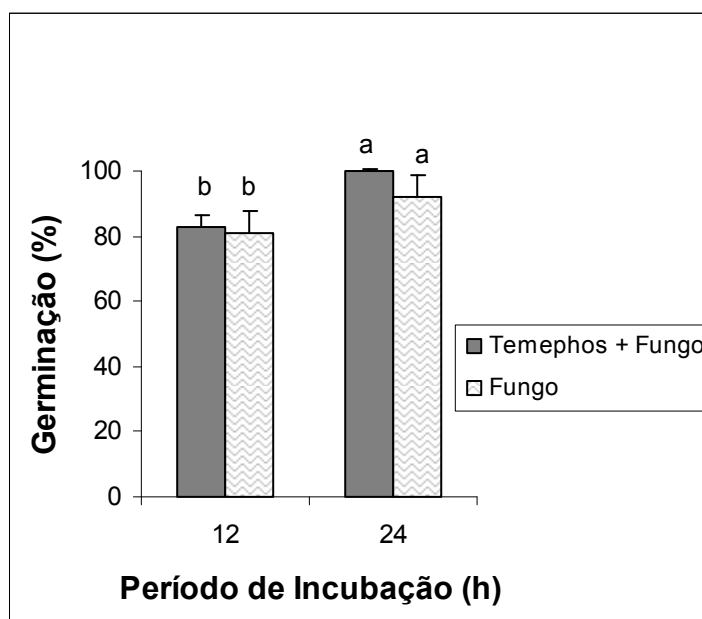


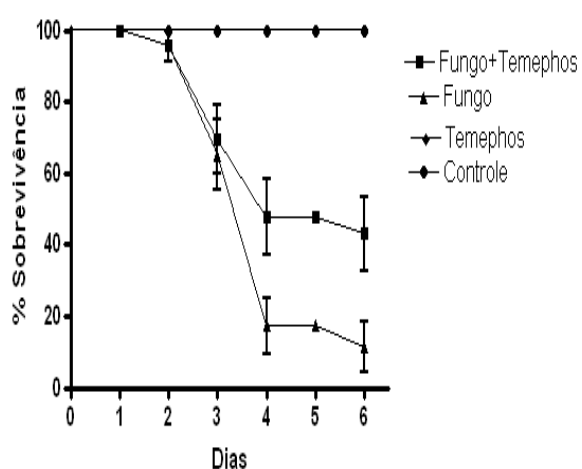
Figura 7 - Germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (isolado ESALQ 818) quando expostos a 1mg L^{-1} temefós.

5.4 Sobrevivência de larvas de *Aedes aegypti* após tratamento com *Metarhizium anisopliae* e temefós

O tratamento com 10^6 conídios mL^{-1} de *M. anisopliae* resultou em mortalidade significativamente maior do que a formulação do fungo na mesma concentração combinado com $0,001\text{ mg L}^{-1}$ temefós. O tratamento com $0,001\text{ mg L}^{-1}$ temefós sem adição do fungo e o grupo controle não apresentaram mortalidade no período da avaliação. Os tratamentos foram significativamente diferentes pelo teste *post-hoc* de Duncan ($F_{8, 11} = 49,458$; $P < 0,05$).

As curvas de sobrevivência das larvas tratadas com fungo, temefós e combinação de ambos foram também estatisticamente diferentes pelo teste de Log Rank ($P < 0,0001$), mas o valor de S_{50} foi de 4 dias para as formulações com

fungo (Figura 8). No 3º dia de avaliação havia 65% e 69% de larvas sobreviventes nos tratamentos com fungo e fungo com temefós, respectivamente.



TRATAMENTO	*SOBREVIVÊNCIA (%)
Fungo ¹ + temefós ²	16,7 ± 19,1
Fungo ¹	45,8 ± 7,2
Temefós ²	-
Controle	-

Dados referentes a média ± desvio padrão.

*Sobrevivência das larvas no final do 6º dia

¹Fungo - *M. anisopliae* (ESALQ 818) –
10⁶conídios mL⁻¹

²Temefós - 0,001 mg L⁻¹

Figura 8 – Sobrevivência de larvas de *A. aegypti* tratadas com o fungo *M. anisopliae*, larvicida temefós e combinação de ambos (n=8 larvas por repetição). Foram realizadas 3 repetições.*Os dados sem barras de erro padrão tinham erros igual ao do dia anterior.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram fortes evidências que *A. aegypti* coletadas nos bairros de Campos dos Goytacazes encontram-se resistentes ou em processo de evolução de resistência ao larvicida temefós, indicando, que provavelmente o “status” de suscetibilidade, tem sido alterado há vários anos.

As populações de larvas oriundas de Jardim Carioca, Parque Vicente Dias e Parque São José apresentaram menores percentuais de mortalidade nas concentrações testadas, enquanto Parque Califórnia apresentou maior percentual. As variações nos graus de resistência entre populações de *A. aegypti* são mais evidenciadas, quando o espaço amostral é maior, como registrado por Carvalho et al. (2001) no Distrito Federal, em que populações de *A. aegypti* foram oriundas de diferentes cidades. Porém, Carvalho et al. (2004) mostraram não haver correlação entre as distâncias das cidades e os níveis de suscetibilidade de suas populações.

As populações de Jardim Carioca e Vicente Dias mostraram resultados aproximados nos testes, desta forma as semelhanças nos padrões de resistência observados podem estar associadas ao histórico de uso do produto em cada localidade, como também inexistência de barreiras geográficas capazes de impedir a migração entre as populações de mosquito.

O padrão de resistência de Parque São José, foi diferente das demais localidades testadas, porém a resistência foi demonstrada pelo índice de mortalidade na concentração diagnóstico. O maior coeficiente de variação indica que essa população é heterogênea em termos de genes de resistência.

A população de *A. aegypti* do Parque Califórnia apresentou maior percentual de mortalidade, evidenciando o “status” de suscetibilidade ao temefós. O baixo coeficiente de variação sugere pequena variabilidade genética entre os indivíduos e menor migração de populações de *A. aegypti* dos bairros vizinhos para a localidade amostrada, visto que o mosquito se dispersa em raio de aproximadamente 500 metros do lugar onde emergiu (FUNASA, 2001), quando encontra ambiente necessário às suas atividades, levando a efeito, normalmente, vôos curtos e procurando, com freqüência, abrigos para pouso (Forattini, 1965), entretanto a dispersão passiva de ovos e larvas não pode ser desconsiderada (FUNASA, 1997).

A linhagem Rockefeller foi suscetível ao temefós validando os demais resultados. O menor coeficiente de variação indica a homogeneidade da população criada por vários anos em condições de laboratório (insetário).

Estudos realizados no estado do Rio de Janeiro mostraram resistência em populações de *A. aegypti* ao temefós em vários municípios. Lima et al. (2003) observaram maior grau de resistência na capital e cidades circunvizinhas, onde as mortalidades não ultrapassaram 35%. Em Campos dos Goytacazes a mortalidade atingida foi de 74%, contudo a dose diagnóstica utilizada era de 0,0012 mg L⁻¹ e os ovos foram coletados em 1999, quando o controle químico larval ainda era realizado com temefós em todo o estado. No presente estudo, na mesma concentração, as populações dos bairros apresentaram em 24h de exposição, mortalidade superior a 80%.

Em 2001, Braga et al. (2004) obtiveram mortalidade de 61,9% em Campos dos Goytacazes, dados que corroboram com o presente achado, visto que o bairro São José atingiu resultados semelhantes, porém nos demais bairros os índices diferiram.

As diferenças encontradas no percentual de mortalidade entre Lima et al. (2003), Braga et al. (2004) e o presente estudo podem ser atribuídas ao uso de temefós na época dos trabalhos. Durante os últimos seis anos o controle das larvas do *A. aegypti* em Campos dos Goytacazes foi realizado com Bti, sendo essa população com menor pressão de seleção comparada com trabalhos anteriores, em que ainda era usado o temefós. Outro fator que pode justificar as diferenças deve-se ao espaço amostral investigado, que não abrangeu todos os bairros do município de Campos.

A velocidade e o grau de desenvolvimento da resistência dependem da frequência do gene resistente (s) na população, o tipo de gene responsável pela resistência, da dose de inseticida aplicada e da frequência de aplicação (Nazni et al., 1998). Luz et al (2009), abordando este assunto, desenvolveram um modelo matemático da dinâmica populacional sazonal do *A. aegypti* para avaliar a eficácia das intervenções de inseticidas e prever trajetórias evolutivas de resistência em resposta à frequência de aplicação e ao método utilizado e puderam concluir que o aumento da frequência de aplicação de inseticidas não proporciona, necessariamente, avanços no controle do mosquito, porém aumento significativo na frequência do gene de resistência ao longo de 10 anos.

Tikar et al (2009) induziram a resistência em *A. aegypti* ao temefós e o decréscimo gradual mortalidade das larvas com a progressão das gerações foi atingido, obtendo no final do experimento uma resistência 20,3 vezes maior após 24 gerações. Estudos de resistência cruzada com *A. aegypti* resistentes ao temefós mostraram um grau variado de resistência cruzada com fenthion, malathion, clorpirifós e DDT.

Em virtude das constantes dificuldades enfrentadas no controle de mosquitos com inseticidas químicos em função do surgimento de resistência, tem sido dada uma crescente importância aos agentes de controle biológico com o objetivo de oferecer alternativas ao controle (WHO, 2009).

Dentre os agentes potenciais para o controle do *A. aegypti*, podem ser mencionados os fungos entomopatogênicos, com destaque para o *M. anisopliae*. Neste intuito, o presente estudo analisou as respostas das larvas de *A. aegypti* linhagem Rockefeller e as larvas oriundas de dois bairros de Campos dos Goytacazes ao isolado de *M. anisopliae* (ESALQ 818).

O *M. anisopliae* foi mais virulento às larvas da linhagem Rockefeller quando comparado com larvas de campo, fato coerente, visto que são larvas criadas em laboratório sem exposição às condições ambientais adversas.

Pereira et al (2009) obtiveram 88% de mortalidade em larvas de *A. aegypti* (linhagem Rockefeller) expostas ao isolado ESALQ 818 do *M. anisopliae* e S_{50} foi atingido com 2 dias. O presente trabalho alcançou percentuais aproximados quando as larvas Rockefeller foram tratadas com esse mesmo isolado, porém a concentração utilizada foi menor, por isso pode ser explicado o

valor de S_{50} de 5 na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} e de 4 dias usando 10^6 conídios mL^{-1} .

As larvas de campo apresentaram respostas diferenciadas conforme a concentração utilizada. Na concentração 10^5 conídios mL^{-1} o *M. anisopliae* foi pouco virulento às larvas do Parque Califórnia e Parque Gonçalves Vicente Dias. O percentual de mortalidade dessas larvas foi semelhante nessa concentração. Entretanto, quando as referidas larvas foram tratadas com esse fungo na concentração de 10^6 conídios mL^{-1} , a mortalidade aumentou, porém as larvas de Parque Gonçalves Vicente Dias tiveram o menor percentual.

A menor virulência do *M. anisopliae* às larvas do Parque Gonçalves Vicente Dias pode ser inferida ao estado de resistência dessas ao inseticida temefós. O mecanismo de resistência ao temefós, exibido em várias populações de *A. aegypti* resistente, consiste na elevação dos níveis de esterases (Mazzari e Georghiou, 1995; Vaughn e French-Constant, 1998). Entretanto, Pereira (2008) presumiu que outro mecanismo, além do aumento da atividade esterásica possa também estar envolvido na resistência dessas populações, visto que, o efeito sinérgico de butóxido de piperolina na toxicidade de temefós ocorreu parcialmente e a resistência não foi completamente suprimida.

Outro mecanismo de resistência, associado a vários insetos, é redução da penetração do inseticida pela cutícula, nesse mecanismo alteração na composição protéica do tegumento pode ocorrer (Apperson e Georghiou, 1975; Roush e Daly, 1990; Oppenoorth, 1985).

Dessa forma, se o mecanismo de resistência dessas larvas for, também, devido à modificação na cutícula, o fungo utilizado encontrará maior barreira física nas larvas resistentes, sendo isso a provável causa da baixa virulência, visto que, os fungos entomopatogênicos iniciam seu processo infeccioso pela cutícula do inseto (Alves, 1998; Castrilho et al., 2005).

Alguns inseticidas têm a capacidade de diminuir o metabolismo e afetar o comportamento dos insetos, o que pode aumentar o desempenho de entomopatógenos, para isso deve ser investigado o efeito do inseticida em questão sobre os processos infecciosos e viabilidade do microorganismo (Santos et al., 2007). Na atual pesquisa o temefós não influenciou a germinação do *M. anisopliae* na concentração testada. Contudo, Mohamed et al (1987) mostraram que o temefós foi altamente tóxico para a esporulação do *M. anisopliae*.

A ação combinada do *M. anisopliae* e temefós resultou em menor mortalidade que o fungo sozinho. A concentração subletal do inseticida influenciou a virulência do fungo, diminuindo sua ação sobre larvas do *A. aegypti*, evidenciando que na interação entre o inseticida e o fungo houve efeito antagônico. Esse tipo de efeito pode ocorrer quando interagem agentes de naturezas distintas (Benz, 1971).

Alves e Leucona (1998) afirmaram que os inseticidas podem ter uma variedade de efeitos sobre fungos entomopatogênicos, tais como a inibição da germinação, desenvolvimento do tubo germinativo e até mesmo mutações que podem alterar a virulência.

Benz (1971) cita que algumas das prováveis causas de antagonismo entre inseticidas e patógenos podem estar relacionadas com a capacidade do patógeno em degradar metabolicamente a molécula do inseticida, impedindo ou diminuindo sua ação sobre o inseto; a utilização de doses subletais do inseticida pode produzir no inseto um aumento nas taxas metabólicas e um conseqüente aumento na resposta imune ao patógeno; ou na incompatibilidade do produto (formulação) com entomopatógeno.

Apesar de o temefós diminuir a virulência do *M. anisopliae* a larvas do *A. aegypti*, vários inseticidas utilizados conjuntamente com fungos entomopatogênicos não proporcionaram efeito adverso, e na verdade têm efeitos positivos. Segundo, Mohamed et al. (1987), os piretróides (piretrina, permetrina e resmetrina) e os reguladores de crescimento de insetos (diflubenzuron e methoprene) não foram inibitórios para as várias fases de desenvolvimento do fungo *M. anisopliae*. Moino Jr. e Alves (1998) observaram que imidacloprid e fipronil foram compatíveis com *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*, quando utilizados nas concentrações médias recomendadas ou em concentrações subletais. Santos et al. (2007) mostraram que o inseticida imidacloprid aumenta a suscetibilidade de infecção de formigas *Atta sexdens rubropilosa* ao fungo *B. bassiana*.

Essas constatações remetem à necessidade futura de trabalhos complementares, em que possam determinar os fatores responsáveis pela interação entre patógenos e inseticidas, e de que modo esses fatores podem contribuir para uma melhoria nas abordagens do controle associado.

O monitoramento para detectar nas populações do mosquito, a resistência aos inseticidas deve ser realizado constantemente, dessa forma, é possível definir estratégias de manejo, como a troca de princípios ativos dos inseticidas e utilização de agentes de controle biológico, objetivando o controle de espécies vetores de doenças, como *A. aegypti*.

7. CONCLUSÕES

- A população de Parque Califórnia está em fase de desenvolvimento de resistência ao temefós;
- As populações de *A. aegypti* pertencentes aos bairros de Jardim Carioca, Parque Gonçalves Vicente Dias e Parque São José mostraram resistentes ao temefós;
- O fungo *M.anisopliae* (ESALQ 818) proporcionou na concentração de 10^6 conídios mL^{-1} maior mortalidade nas larvas provenientes do bairro com status incipiente resistência ao temefós (Parque Califórnia) do que no bairro com status de resistência estabelecida (Parque Gonçalves Vicente Dias);
- O temefós não afetou a germinação do *M. anisopliae*;
- *M. anisopliae* combinado com temefós causou menor mortalidade que o *M. anisopliae* sozinho a larvas de *A. aegypti*;
- O temefós combinado com fungo *M. anisopliae* para controle do *A. aegypti* não é viável;
- O desempenho do fungo *M. anisopliae* combinado com outros inseticidas deve ser estudado visando o controle de *A. aegypti* em campo.
- Estudos complementares devem ser realizados para detectar os fatores responsáveis pela interação antagônica entre temefós e o *M. anisopliae*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Temephos (CASNumber3383-96-8).

http://www.atsdr.cdc.gov/consultations/west_nile_virus/temephos.html.

Acessado em: 18/11/2010.

Aldridge, W.N. (1953) Serum esterases I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53: 110-117.

Alexandre, T.M., Neves, P.M.O.J., Santoro, P.H., Alves L.F.A. (2008) Controle associado de *Alphitobius diaperinus* com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e inseticidas químicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 75(4): 481-489.

Alves, S.B. (1998) Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed) *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 289-371.

Alves, S.B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R. M. Vieira, S. A. (2002) Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *Journal Entomology*, 126: 504-509.

- Alves S.B., Leucona R.E. (1998) Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves S.B. (ed) *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 97–169.
- Andrade, C.F.S., Castello-Branco Jr., A. (1990) Methods for field detection of resistance to temefós in simuliids. Larvae esterase level and topical application of the insecticide to adults. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85: 291-297.
- Anthony, N., Rocheleau, T., Mocelin, G., Lee H.J, Ffrench-Constant, R. (1995) Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Federation of European Biochemical Societies*, 368(3): 461-465.
- Apperson, C. S., Georghiou, G.P. (1975) Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *Journal of Economic Entomology*, 68 (2):153-157.
- Araújo, A.P., Melo-Santos, M.A.V., Carlos, S.O., Rios, E.M.M.M., Regis, L. (2007). Evaluation of an Experimental Product Based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biological Control*, 41: 339-347.
- Arruda, W., Lübeck, I., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37: 231-244.
- Barata, E.A.M.F., Costa, A.I.P., Chiaravalloti Neto, F., Glasser, C.M., Barata, J.M.S., Natal, D. (2001) População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Revista Saúde Pública*, 35(3): 237-42.
- Barreto, M.L., Teixeira, M.G. (2008) Dengue fever: a call for local, national, and international action. *Lancet*, 372(9634): 1-205.

- Becker N. (2000) Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J.F., Delécluse, A., LeRoux, C.N. (eds) *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 383-98.
- Bentley, M.D., Day, J.F. (1989) Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Annual Review of Entomology*, 34: 401-421.
- Benz, G. (1971) Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (eds.) *Microbial control of insects and mites*. Londres: Academic Press, p. 327-356.
- Bergé, J., Feyerensen, R., Amichot, M. (1998) Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions Royal Society London Series B. Biological Sciences*. 353: 1701-1705.
- Bernardi, E., Pinto, D.M., Nascimento, J.S., Ribeiro, P.B., Silva, C.I. (2006) Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L.(Diptera Muscidae) em laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, 73(1): 127-129.
- Beserra, E.B., Castro Jr, F.P., Santos J. W., Santos, T. S., Fernandes, C. R.M. (2006) Biologia e Exigências Térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35(6): 853-860.
- Beserra, E.B., Fernandes, C.R.M., Queiroga, M.F.C., Castro Jr, F.P. (2007) Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. *Neotropical Entomology*, 36(2): 303-307.
- Bisset, J.A., Rodriguez, M., Fernandez, D., Palomino, M. (2007) Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 59(3): 202-208.

- Bracco, J.E., Dalbon, M., Marinotti, O., Barata, J.M.S. (1997) Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. *Revista Saúde Pública*, 31(2): 182-183.
- Braga, I.A., Lima, J.B.P., Silva, S.S., Valle, D. (2004) *Aedes aegypti* resistance to temefós during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 199-203.
- Braga, I.A.E., Valle, D. (2007) *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16 (4): 179-293.
- Bregues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., Mccarroll, L., Duchon, S., P. Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J.C., Hemingway, J. (2003) Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 87-94.
- Brogdon, W.G. (1989) Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitology Today*, 5: 56-60.
- Brogdon, W.G., Dickinson, C.M. (1983) A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analytical Biochemistry*, 131: 499-503.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C. (1998) Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4): 605-613.
- Brogdon, W.G., Mcallister, J., Corwin, A.M., Cordon-Rosales, C. (1999) Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicinae). *Journal of Economic Entomology*, 92: 298-302.

- Brown, A.W.A. (1986) Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2: 123-40.
- Camargo, M.F., Santos, A.H., Oliveira, A.W.S., Abrão, N., Alves, R.B.N., Isac, E. (1998) Avaliação da ação residual do larvicida temephos sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. *Revista de Patologia Tropical*, 27(1): 65-70.
- Campanhola, C. (1990) Resistência de insetos a inseticidas: Importância características e manejo. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 45 p.
- Campos, J., Andrade, C.F.S. (2001) Suscetibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, 35(3): 232-236.
- Campos, J., Andrade, C.F.S (2003). Suscetibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, 37: 523-527.
- Cariño, F.A., Kopener, J.F., Plapp, F.W., Feyreisen, R. (1994) Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24: 411-418.
- Carvalho, M.S.L., Caldas, E.D., Yoshizawa, M.A.C., Degallier, N., Oliveira, C., Knox, M.B. (2001) Suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticida temefós no Distrito Federal em 2000. *Informe Epidemiológico SUS*, 10: 41-43.
- Carvalho, M.S.L., Caldas, E.D., Degallier, N., Vilarinhos, P.T.R., Souza, L.C.K.R., Yoshizawa, M.A.C., Knox, M.B., Oliveira, C. (2004) Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Revista Saúde Pública*, 38: 623-629.

- Castrillo, L.A., Roberts, D.W., Vandenberg, J.D. (2005) The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 46-56.
- Cerf, D.C., Georghiou, G.P. (1974) Cross resistance to juvenile hormone analogues in insecticide-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pesticide Science*, 5: 759-767.
- Chavasse, D.C., Yap, H.H. (eds.) (1997) Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: WHO, 129p.
- Chelvanayagam, G., Parker, M.W., Board, P.G. (2001) Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chemico-Biological Interactions*, 133: 256–260.
- Cheng, M.L., Ho, B.C., Barnett, R.E., Goodwin, N. (1982) Role of a modified ovitrap in the control of *Aedes aegypti* in Houston, Texas, USA. *Bulletin of the World Health Organization*, 60: 291-296.
- Clements, A.N. (1999). The Biology of Mosquitoes: Sensory, Reception, and Behaviour, 2 ed. Wallingford, Oxford: CABI Publishing, 752p.
- Clements, A.N. (2000) The biology of mosquitoes. Sensory reception and behavior. 2. ed. New York: CABI Publishing, 740p
- Consoli, R. A. G. B., Oliveira R. L. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, Reimpressão. 225p.
- Crovello, T.J., Hacker, C.S. (1972) Evolutionary strategies in life table characteristics among feral and urban strains of *Aedes aegypti* (L.). *Evolution*, 26:185-96.
- Crow, J. F. (1957) Genetics of resistance to chemicals. *Annual Review of Entomology*, 2:227-246.

- Cunha, M.P., Lima, J.B.P., Brogdon, W.G., Moya, G.E., Valle, D. (2005) Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 100: 441–444.
- Daoust, R.A., Ward, M.G., Roberts, D.W. (1982) Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 228-236.
- Davidson, G., Zahar, A.R. (1973) The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. *Bull WHO*, 49: 475-483.
- Derouich, M., Boutayeb, A., Twizell, E.H. (2003) A model of dengue fever. BioMedical Engineering OnLine. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-925x-2-4.pdf> Acessado em: 02/06/2010.
- Dhang, C.C., Ahmad, N.W., Lim, L.H., Benjamin, S., Sofian-Azirun, M. (2008) Biochemical detection of temefós resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) from dengue-endemic areas of Selangor State, Malaysia. *Congresso Tropical Medicina e Parasitologia*. v.3, p.6-20.
- Diabate, A., Brengues, C., Baldet, T., Dabiré, K.R., Hougard, J.M., Akogbeto, M., Kengne, P., Simard, F., Guillet, P., Hemingway, J., Chandre, F. (2004) The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic entroggression and de novo phenomena. *Tropical Medicine & International Health*, 9(12): 1267-1273.
- Dletz, V.J., Gubler, D.J., Rigau-Pérez, J.G., Pinheiro, F., Schatzmayr, H.G., Bailey, R., Gunn, R.A. (1990) Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: Evaluation of a clinically based dengue surveillance system. *American Journal of Epidemiology*, 131: 693–701.

- Donalísio, M.R., Glasser, C.M. (2002) Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Revista Brasileira Epidemiologia*. 5:259-72.
- Edman, J.D., Scott, T.W., Costero, A., Morrison, A.C., Harrington, L.C., Clark, G.G. (1998) *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. *Journal of Medical Entomology*, 35: 578-583.
- Eiras, A.E. (2005) Culicídeos. In: Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M. (eds.) *Parasitologia Humana*. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu I, p. 55-367.
- Etang, J., Fondjo, E., Chandre, F., Morlais, I., Brengues, C., Nwane, P., Chouaibou, M., Ndjemai, H., Simard, F. (2006) First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5): 795-797.
- Farnham, A.W., Murray, A.W.A., Sawicki, R.M., Denholm, I., White, J.C. (1987) Characterization of the structure activity relationship of kdr and two variants of super-kdr to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica*). *Pesticide Science*, p.19:209–220.
- Ferrari, J.A. (1996a) Insecticide resistance. In: Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (eds.) *The Biology of Disease Vectors*. Boulder: University Press of Colorado, 512–529.
- Ferrari, J.A. (1996b) Population genetics in vector biology. In: Marquardt, W.C., Beaty B.J. (eds) *The Biology of Disease Vectors*. Niwot: University Press of Colorado, p. 512-525.
- Ffrench-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Anthony, N. (1998) Why there so few resistance-associated mutation target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society London*. 353:1685-1693.

- Forattini, O.P. (1965). Entomologia Médica. São Paulo: Universidade de São Paulo, 506p.
- Forattini, O.P. (2002) Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: vol.2. São Paulo: EDUSP, Brasil, 860p.
- Forattini, O.P., Brito, M. (2003) Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Revista Saúde Pública*, 6: 6-7.
- Franceschini, M., Guimarães, A.P., Camassola, M., Frazzon, A.P., Baratto, C.M., Kogler, V., Silva, M.V., Dutra, V., Nakazato, L., Castro, L., Santi, L., Vainstein, M.H., Schrank, A. (2001) Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 23:32-37.
- Franco, O. (1976) História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: SUCAM/Ministério da Saúde.
- French, N.M., Heim, D.C., Kennedy, G.G. (1992) Insecticide resistance patterns among Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chryso-melidae), populations in North Carolina. *Pesticide Science*, 36:95-100.
- FUNASA (1997) Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Manual de Normas Técnicas. Brasília: Ministério da Saúde, 76p.
- FUNASA (1999) Reunião técnica para discutir status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde.
- FUNASA (2001) Dengue – Instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. Brasília: Ministério da Saúde, 84p.
- FUNASA (2002) Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília: Ministério da Saúde. 32p.

- Georghiou, G.P. (1983) Management of resistance in arthropods. In: Georghiou, G.P., Saito, T. (eds.) *Pest resistance to pesticides*. New York: Plenum, p. 769-792.
- Georghiou, G.P., Lagunes-Tejeda, A. (1991) The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Rome: FAO, 318 p.
- Georghiou, G.P., Mellon R.B. (1983) Pesticide Resistance in Time and Space. In: Georghiou, G.P., Saito, T. (eds) *Pest Resistance to Pesticides*. New York: Plenum Press, p. 1-19.
- Georghiou, G.P., Taylor, C.E. (1977) Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* , 70:319-23.
- Githeko, A.K., Lindsay, E.W., Confalonieri, E.U., Patz, J.A. (2000) Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ.* 78(9): 1136-1147.
- Gomes, A.S., Sciavico, C.J.S., Eiras, A.E. (2006) Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(4):327-332.
- Gubler, D.J. (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 480-496.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.L., Santos, J.P., Cruz, C.D. (1995) Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*,. 31:145-150.
- Guillemaud, T., Makate, M., Raymond, M., Hirst, B., Callaghan, A. (1997) Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology*, 6:319-27.

- Gunning, R.V., Moores, G.D., Devonshire, A.L. (1999) Esterases inhibitors synergise the toxicity pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 63:50-62.
- Halstead, S.P. (1990) Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 21: 636-41.
- Halstead, S.B. (2008) Dengue Virus-Mosquito Interactions. *Annual Review of Entomology*, 53: 273-291.
- Hemingway, J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1009–1015.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, . 34: 653-665.
- Hemingway, J., Karunaratne, S.H.P.P. (1998) Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* , 12:1-12.
- Hemingway, J., Ranson, H. (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*,. 45: 371–391.
- Howe, G.M. (1977) A world geography of human diseases. New York: Academic Press, p. 302-17.
- HSDB (2003) Hazardous Substances Databank: Temephos. National Library of Medicine, National Toxicology Program.
<http://www.toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. Acessado em 20/10/2010

- Karunaratne, S.H.P.P., Hemingway, J., Jayawardena, K.G.I., Dassanayaka, V., Vaughan, A. (1995) Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 31124-31128.
- Ketterman, A.J., Prommeenate, P., Boonchaay, C., Chanama, U., Leetachewa, S., Promtet, N., Prapanthadara, L. (2001) Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(1): 65–74.
- Kotze, A.C., Sales, N., Barchia, I.M. (1997) Diflubenzuron tolerance associated with monooxygenase activity in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Economic Entomology*, 90:15-20.
- Laird, M., Lacey, L.A., Davidson, E.W. (eds.) (1990) Safety of microbial insecticides. Boca Raton, Florida: CRC Press, 259p.
- Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., Ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R. (2006) Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8):674-682.
- Ligon, B.L. (2004) Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment, and prevention. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, New York, v.16, n.1, p. 60-65.
- Lima, E.P., Oliveira Filho, A.M., Lima, J.W.O., Ramos Júnior, A.N., Cavalcanti, L.P.G., Pontes R.J.S. (2006) Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(3): 259-263.
- Lima, J.B.P., Pereira, M.C., Silva Jr, R.C.S., Galardo, A.K.R., Soares, S.S., Braga, I.A., Ramos, R.P., Valle, D. (2003) Resistance of *Aedes aegypti* to

organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 329-333.

Lines, J., Harpham, T., Leake, C., Schofield, C. (1994) Trends, priorities and policy directions in the control of vector-borne diseases in urban environments. *Health Policy Plann*, 9: 113-29.

Liu, Z., Valles, S.M., Dong, K. (2000) Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.*, 30: 991-997.

Locali, E.C., Freitas-Astúa, J., Souza, A.A., Takita, M.A., Astúa-Monge, G., Antonioli, R., Kitajima, E.W., Machado, M. A. (2003) Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis a major treat to the citrus production in Americas. *Plant Disease*, 87:1317-1321.

Löwy, I. (1999) Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. *História, Ciências, Saúde Manguinhos*, 5(3):647-677.

Luna, J.E.D., Martins, M.F., Anjos, A.F., Kuwabara, E.F., Navarro-Silva, M.A. (2004) Suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefós e cipermetrina, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 38: 842-843.

Luz, C., Tai, M.H.H., Santos, A.H., Rocha, L.F.N., Albernaz, D.A.S., Silva, H.H.G. (2007) Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44: 799-804.

Luz, C., Tai, M.H.H., Santos, A.H., Silva, H.H.G. (2008) Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae*

- under laboratory conditions. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 103(2): 214-215.
- Luz, P. M., Codec, C. T., Medlock, J., Struchiner, J. C., Valle, D., Galvani, A. P. (2009) Impact of insecticide interventions on the abundance and resistance profile of *Aedes aegypti*. *Epidemiology and Infection*, 137:1203–1215.
- Machado, V., Fiúza, L.M. (2009) Evolução e manejo da resistência de insetos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 38:68-74.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Takaku, L., Glasser, C.M., Garbeloto, V.C., Cirino, V.C.B. (1999). Alteração da resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Revista. Saúde Pública*, 33(5): 521-522.
- Macoris, M.L.G., Camargo, M.F., Silva, I.G., Takaku, L., Andrighetti, M.T. (1995) Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temefós. *Revista de Patologia Tropical*, 24(1): 31-40.
- Maddrell, S.H.P. (1980) The insect neuroendocrine system as a target for insecticides. *Insect neurobiology and pesticide action*. London: Society of Chemical Industry, p. 329-334.
- Martinez-Torres, M.E. (1990) Dengue hemorrágico em crianças. Havana: José Martí, 180p.
- Marzochi, K.B.F. (1994) Dengue in Brazil: situation, transmission and control - a proposal for ecological control. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 235- 45.
- Mathenge, E.M., Gimnig, J.E., Kolczak, M., Ombok, M., Irungu, L.W., Hawley, W.A. (2001) Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 38(4): 531-536.

- Mazzari, M.B., Georghiou, G.P. (1995) Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11: 315-322.
- Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) (1998) Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 264p.
- Ministério da Saúde (1968) Endemias Rurais – Métodos de trabalho adotados pelo DNERu, Departamento Nacional de Endemias Rurais, Brasília, Brasil
- Ministério da Saúde (1996) Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil, Brasília, Brasil.
- Ministério da Saúde (2006) Fundação Oswaldo Cruz. Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Brasília: 128 p.
- Ministério da Saúde (2009) Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Brasília: Ministério da Saúde, 160 p.
- Ministério da Saúde (2010) Secretaria de Vigilância em Saúde, Informe Epidemiológico da Dengue. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_13_completo_final.pdf. Acessado em: 02/04/2010.
- Mnyone, L.L., Russell, T.L., Lyimo, I.N., Lwetoijera, D.W., Kirby, M.J., Luz, C. (2009) First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s.p and *A. arabiensis* (Diptera; Culicidae). *Parasites & Vectors*, 2:59-63.

- Mohamed, A.K.A., Pratt, J.P., Nelson, F.R.S. (1987) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathologia*, 99(2): 99-105.
- Moino Jr., A., Alves, S. B. (1998) Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no Comportamento de Limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais Sociedade de Entomologia Brasileira*, 27(4): 611-619.
- Monath, T.P. (1994) Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 2395-2400.
- Monnerat, R.G., Dumas, V.F., Rosa, F.R., Pimentel, L.W., Nunes, A.C., Medeiros, P.T., Sujii, E.R., Vilarinhos, P.T.R. (2006) Avaliação de diferentes larvicidas para controle do *Aedes Aegypti* em simulação das condições de campo. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 15p.
- Montella, I.R., Martins, A.J., Viana-Medeiros, A., Lima, J.B.P., Braga, I.A., Valle, D. (2007) Resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77:467-77.
- Morris, C.D., Dame, D. A., Robinson, J.W. (1996) Control of *Aedes albopictus* in waste tire piles with reduced rates of temephos-treated granules. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(3): 472-476.
- Motulsky, H. (2003) Survival curves. In: Motulsky, H. (ed.) *Prism 4 Statistics Guide- Statistical analyses for laboratory and clinical researchers*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, p.107 – 116.
- Mouchès, C., Pauplin, Y., Agarwal, M., Lemieux, L., Herzog, M., Abadon M, (1990) Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87:2574-8.

- Muro, M.A., Metha, S.; Moore, D. (2003) The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin, *FEMS Microbiology Letters*, 229:249-257.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., Fournier, D. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 5922-5926
- Natal, D. (2002) Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*, 64(2):205-207.
- National Academy of Science (1987) Report of the research briefing panel on biological control in managed ecosystems. Washington: National Academy Press, 206p.
- National Center for Infectious Diseases (2010) Establishing the diagnostic dosage. http://www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/interpretation/interp_1.htm.
Acessado em: 10/01/2010.
- Nazni, W.A., Lee, H.L., Sadiyah, I. (1998) Rate of resistance development in wild *Culex quinquefasciatus* (Say) selected by malathion & permethrin. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 29:849–855.
- OMS (1984) Manual de ordenamento del medio para l lucha contra los mosquitos. Publicación em offset 66.
- OMS (1987) Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamiento e controle. Genebra.
- Oppenoorth, F.J. (1985) Biochemical and genetic in insecticide resistance. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, p.731-773.
- OPAS (1986) *Aedes aegypti*: Biologia & Ecologia. Washington: D.C., 50p.

- OPAS (1992) El dengue y la fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: una vision general del problema. *Boletim Epidemiologico*, 13 (1).
- OPAS (2010) Prevenção e controle doenças – Dengue <http://www.opas.org.br/prevencao/t.cfm?id=49&area=Conceito>. Acessado em: 18/02/2010
- Paeporn, P., Komalamisra, N., Deesin, V., Rongsrivam, Y., Eshita. Y., Thongrunkiat, S. (2003) Temefós resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanisms. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 34:786-792.
- PAHO (1995) Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas – Guias para su Prevencion y Control, Pan American Health Organization, Publicación Científica, Washington: PAHO, 548p.
- PAHO (1997) Plan continental de ampliación e intensificación del combate al *Aedes aegypti*. Informe de un grupo de trabajo, Caracas, Venezuela. <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/doc407.pdf>. Acessado em 14/04/2010.
- Paula, A.R., Brito, E.S., Pereira, C.R., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of Adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue Vector Control. *Biocontrol Science and Technology*, 18:1017-1025.
- Pereira, B.B. (2008) Efeitos do butóxido de piperonila na toxicidade do organofosforado temefós e o envolvimento de esterases na resistência de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ao temefós. Tese (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Uberlândia – MG, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 36p.
- Pereira, C.R., Paula, A.R., Gomes, S.A., Pedra Jr., P.C.O., Samuels, R. I. (2009) The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for

- the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 19(8): 881- 886.
- Pereira, R.M., Alves, S.B., Nakano, O. (1981) Controle de larvas de mosca domestica *Musca domestica* L. 1758, pelo fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Congresso Brasileiro de Entomologia, 7, Fortaleza, Anais. Fortaleza, SBE, p.104.
- Pessôa, S.B., Martins, A.V. (1982) Parasitologia Médica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 872p.
- Pinheiro, V.C.S., Tadei, W.P. (2002) Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(6): 1529-1536.
- Polanczyk, R.A., Garcia, M.O., Alves, S.B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista Saúde Pública*, 37: 813-816.
- Qiao, C.L., Marquine, M., Pasteur, N., Raymond, M. (1998) A New esterase gene amplification involved in OP resistance in *Culex pipiens* mosquitoes from China. *Biochemical Genetics*, 36:417-426.
- Rakotondravelo, M.L., Anderson, T.D., Charlton, R.E., Zhu, K.Y. (2006) Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (diptera:chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3):360-366.
- Ranson, H., Nikou, D., Hutchinson, M., Wang, X., Roth, C.W., Hemingway, J., Collins, F.H. (2002). Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 11: 409-418.

- Rawlins, S., Wan, J.O.H. (1995) Resistance in some Caribbean population of *Aedes aegypti* to several insecticides. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 11: 59-65.
- Raymond, M., Chevillon, C., Guillemaud, T., Lenormand, T., Pasteur, N. (1998) An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 353:1707-11.
- Reiter, P., Amado, M.A., Anderson, R.A. Clark, G.G. (1995) Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52: 177-179.
- Reyes-Villanueva, F. (1990) El dengue. Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. *Ciência*, 41:45-55.
- Roberts, D.W. (1970) Coelomyces, Entomophora, Beauveria and Metarhizium as parasites of mosquitoes. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, 7:140-155.
- Roberts, D.W., St Leger, R.J. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54:1-70.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J., Ruiz, M., Soca, A. (2002) Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temefós in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology*, 39: 882-888.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J., Fernandez, D.M., Lauzá, L., Soca, A. (2001) Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 38(5): 623-628.

- Roush, R.T., Daly, J.C. (1990) The role of population genetics in resistance research and management. In: Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (eds.) *Pesticide resistance in arthropods*. London: Chapman and Hall, p.97-152.
- Saelim, V., Brogdon, W.G., Rojanapremsuk, J., Suvannadabba, S., Pandii, W., Jones, J.W., Sithiprasasna, R. (2005) Bottle and biochemical assays on temefós resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 36 (2) 417-425.
- Santos, A.V., Oliveira, B.L., Samuels, R.I. (2007) Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia*, 163:233–240.
- Schatzmayr, H.G. (2000) Dengue situation in Brazil by year 2000. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 95:179-181.
- Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M.R., Rosa, A.P.A.T. (1986) An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 245–246.
- Scholte, E., Ng`habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G. F., Knols, B. G. J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308:1641-1642
- Scholte, E.J., Knols, B.G.J., Samson, R.A., Takken, W. (2004) Entomopathogenic fungi for mosquito control: A Review'. *Journal of Insect Science*, 19:1-24.
- Scholte, E.J., Takken, W., Knols, B.G.J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102: 151-158.
- Scott, J.A. (1995) The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Florida Entomologist*, 78:399-414.

- Scott, J.C. (1990) Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (eds.) *Pesticide resistance in arthropods*. New York: Chapman and Hall, p.39-57.
- Scott, J.G. (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(9):757-777.
- Secretaria Vigilância em Saúde (2010) Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. Nota Técnica N.º110/2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_110_2010_denv_4_roraima.pdf. Acessado em 05/10/2010.
- Shah, R., Armstrong, K., Worner, S.P., Chapman, R.B. (2002) Investigation of a PCR-based methods for insecticide resistance monitoring. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(10):1070-1073.
- Silva, A.M., Gomes, A.C. (2008) Proteção de *Bromeliaceae* para evitar a formação de criadouros de *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). *Revista de Patologia Tropical*, 37 (1): 43-47.
- Silva, H.H.G., Silva, I.G. (1999) Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista de Medicina Tropical*, 32(4): 349-355.
- Silva, H.H.G., Silva, I.G., Oliveira, C.L.N.S., Elias, C.N. (1999) Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomologia y Vectores*, 6: 383-391.
- Silva, I.G., Silva, H.H.G., Guimarães, V.P., Elias, C.N., Lima, C.G. (2002) Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. *Entomologia y Vectores*, 9:15-24.

- Silva Júnior, J.B., Pimenta Júnior, F.G. (2007) Epidemiologia da dengue. In: Souza, L.J. (ed.) *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*, Rio de Janeiro: Rubio, p.11-35.
- Silva, R.O., Silva, H.H., Luz, C. (2004) Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Revista de Patologia Tropical*, 33(2):207-216.
- Silva, R.O., Silva, H.H.G., Ulhoa, C.J., Luz, C. (2005) Is there a relationship between N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in central Brazil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae)? *Journal of Applied Entomology*, 129: 158-164.
- Slosek, J. (1986) *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. *Social Science & Medicine*, 23:249-57.
- Soderlund, D.M., Knipple, D.C. (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33:563-577.
- Soper, F.L. (1965) The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 14(6):887-891.
- Superintendência Controle Endemias (2001) Praguidas. <http://www.bvsde.paho.org/bvsapud/p/fulltext/plagui/plagui.pdf> Acessado em 10/09/2010.
- Tabachnick, W.J., Black IV, W.C. (1996) Population genetics in vector biology. In: Marquardt, W.C., Beaty, B.J. (eds.) *The Biology of Disease Vectors*. Niwot: University Press of Colorado, p. 417-437.

- Tauil, P.L. (2002). Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno Saúde Pública*, 18(3): 867-71.
- Taveira, L.A., Fontes, L.R., Natal, D. (2001) Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.
- Taylor P. (1991) Anticholinesterase agents. In: Brunton L., Lazo J., Parker K., Goodman Gilman's (eds.) *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th ed. New York: McGraw Hill, p.131-149.
- Teixeira, M.G., Barreto, L.M., Guerra, Z. (1999) Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*, 8(4): 5-33.
- Teixeira, M.G., Barreto, M.L. (1996) Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. *Ciência & Saúde Coletiva*, 1: 122-35.
- Thatheyus, J.A. (2007) Bio control of mosquitoes In: Defeating the public enemy, the mosquito: a real challenge. Loyola: 76–94.
- Tikar, S.N., Kumar, A., Prasad, G.B.K.S., Prakash, S. (2009) Temefós-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitology Research*, 105(1):57-63.
- Vaugh, A.; Ffrench-Constant, R.H. (1998) Biochemical monitoring of organophosphorous and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Medical and Veterinary Entomology*, 12: 318-32.
- Vilarinhos, P.T.R. (2002) Dengue transmission and *A. aegypti* control in Brazil. International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 8, Foz do Iguaçu: Society for Invertebrate Pathology. p. 55-57.

- Wei, S.H., Clark, A.G., Syvanen, M. (2001) Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyperinsecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12):1145–1153.
- Wilce, M.C., Parker, M.W. (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205:1-18.
- WHO (1981a) Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides, WHO/VBC/81.807, Geneva, 6 p.
- WHO (1981b) Criteria and Meaning of Tests for Determining the susceptibility or resistance of Insects to insecticides, WHO/VBC/81.6, Geneva, 4 p.
- WHO (1991) Safe use of pesticides: fourteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Technical Report Series, n. 813, Geneva: WHO, 27p.
- WHO (2008) Dengue and dengue hemorrhagic fever. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acessado em: 31/05/2010
- WHO (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva: WHO, 147p
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P. (1999) Selection and characterization of temefós in a population *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Island. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15: 315-320.
- Zhang, L., Harada, K., Shono, T. (1998) Cross resistance to insect growth regulators in pyriproxyfen-resistant housefly. *Applied Entomology and Zoology*, 33:195-197.