

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CAMPUS DE DOURADOS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENTOMOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

MAGDA FREITAS FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA:
CULICIDAE) A INSETICIDAS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS, NA CIDADE DE
DOURADOS-MS, BRASIL**

ORIENTADORES

PROF. DR. MICHAEL ROBIN HONER

PROF. DR. WEDSON DESIDÉRIO FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, *Campus* de Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zoologia, Área de Concentração Entomologia.

JUNHO DE 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
***CAMPUS* DE DOURADOS**
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENTOMOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

MAGDA FREITAS FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA:
CULICIDAE) A INSETICIDAS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS, NA CIDADE DE
DOURADOS-MS, BRASIL**

ORIENTADORES

PROF. DR. MICHAEL ROBIN HONER

PROF. DR. WEDSON DESIDÉRIO FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, *Campus* de Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zoologia, Área de Concentração Entomologia.

JUNHO DE 2004

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Michael Robin Honer, pela orientação na realização do trabalho, pela confiança depositada e pela revisão do texto.

Ao Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes, pela co-orientação neste trabalho, pelo incentivo e apoio sempre presentes, pela amizade e oportunidades oferecidas e por toda a sua contribuição na minha formação acadêmica e o auxílio incondicional como profissional e como pessoa.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/*Campus* de Dourados.

Ao Centro de Controle de Zoonoses/Secretaria Municipal de Saúde Pública de Dourados-MS.

Ao Núcleo de Entomologia/Secretaria Estadual de Saúde, Belo Horizonte-MG na pessoa do Dr. Marcelo Carvalho de Rezende pelo fornecimento do produto formulado com *Bacillus thuringiensis* (var.) *israelensis* do Ministério da Saúde (MS) e pelos resultados dos bioensaios realizados com o organofosforado temefós em comparação à linhagem padrão de referência Rockefeller de *Aedes aegypti*.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Laboratório de Biologia - CCS na pessoa do Prof. Dr. Alfredo Martins Oliveira Filho pelo fornecimento dos papéis filtro Whatman/OMS.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Campinas/Unicamp pelas sugestões.

Aos Profs. Drs da UFMS Honório Roberto dos Santos e Manoel Araújo Uchôa-Fernandes pelas sugestões que ajudaram a melhorar o trabalho e sua compreensão.

Ao Prof. Dr. Odival Faccenda/UEMS pela orientação na análise dos dados estatísticos.

Ao Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes/UFMS pela orientação e análise dos dados na elaboração da distribuição espacial de *Ae. aegypti* do município de Dourados-MS.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses, Laboratório de Entomologia, Adão Orcide Pavão, Margot Jaqueline Velásquez Berri e Wisley Arguelho de Alencar pelo auxílio no trabalho de campo e laboratório durante a realização deste.

Aos estagiários Ana Cláudia Verlindo, Jhoy Alves Leite, Michelle Viscardi Sant'Ana e Vagner Cristaldo do Curso de Ciências Biológicas, UFMS/*Campus* de Dourados.

Em especial ao ex-Secretário de Saúde Dr. Luís Carlos Arruda Leme pela confiança depositada, pelo incentivo, pela amizade e oportunidades oferecidas e pela liberação para o ingresso ao Programa de Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, UFMS/*Campus* de Dourados.

SUMÁRIO

Resumo.....	iv
Abstract.....	v
I. Introdução.....	1
1.1 A espécie, os inseticidas e resistência.....	1
1.2 Considerações gerais sobre o manejo de <i>Aedes</i> sp.	5
II. Material e Métodos.....	12
2.1 Material biológico e coleta de ovos de <i>Ae. aegypti</i> em campo.....	12
2.2 Criação de larvas e adultos em laboratório.....	15
2.3 Provas de susceptibilidade aos inseticidas em larva.....	18
2.4 Prova de susceptibilidade à cipermetrina em adultos.....	21
III. Resultados.....	23
3.1 Avaliação da resistência de <i>Ae. aegypti</i> na fase de larva ao temefós.....	23
3.2 Avaliação da resistência de <i>Ae. aegypti</i> aos inseticidas na fase de larva.....	24
3.3. Avaliação da resistência de <i>Ae. aegypti</i> na fase adulta à cipermetrina.....	26
IV. Discussão.....	26
V. Conclusões.....	28
VI. Recomendações.....	28
VII. Referências Bibliográficas.....	29

RESUMO

No presente estudo foram feitas avaliações da susceptibilidade e/ou resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforado, piretróide e biológico (*Bti*), para monitoramento da resistência na população desta espécie em Dourados-MS. A partir de ovos coletados em campo por meio de armadilhas de oviposição, as larvas F₁ de *Ae. aegypti* foram criadas em laboratório à temperatura (27°C) e umidade relativa do ar entre 70 a 82%, alimentadas e com pouco estresse por alta densidade populacional. Foram feitas avaliações com o inseticida químico organofosforado temefós, biológico *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, WDG e VETOBAC na fase larval e avaliação na fase adulta com o inseticida piretróide cipermetrina.

Nas provas de avaliação da resistência ao temefós ao longo do tempo, a população de *Ae. aegypti* de Dourados apresentou 100 % de mortalidade com 8 horas de exposição ao produto; com 4 horas à *Bti* WDG e à *Bti* VETOBAC com 16 horas de exposição, ao final de 24 horas de avaliação, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) a 0,33 h (20 minutos). Verificou-se que os valores de mortalidade foram significativos para todos os produtos ($p < 0,05$) a partir dos 60 minutos até 24 horas de avaliação quando comparados ao controle. Os resultados na fase de larva com o organofosforado temefós em *Ae. aegypti* apresentou resistência quando comparado à linhagem susceptível de referência Rockefeller.

Em relação à avaliação de resistência de adultos de *Ae. aegypti* à cipermetrina ($CD = 0,1 \% = 37 \text{ mg i.a./m}^2$) apresentou 45,49 % de mortalidade (F₂) e 18,67 % de mortalidade nas fêmeas sobreviventes, ou seja, presença de resistência desta população ao produto testado. A população de *Ae. aegypti* apresentou susceptibilidade à bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

ABSTRACT

In the present study evaluations were made of the susceptibility and/or resistance to organophosphorus, pyrethroid and biological *Bti* insecticides by *Aedes aegypti* by monitoring population resistance of this species in Dourados-MS.

Starting with eggs collected in field by means of ovitraps, the larvae F₁ of *Ae. aegypti* were reared in the laboratory at a temperature of 27°C and relative humidity of the air between 70 to 82%, fed at a low population density to present stress in the individuals. Evaluations were made with the chemical insecticide organophosphorus temephos, the biological insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, WDG and VETOBAC in the larvae phase, and evaluation in the adult with the pyrethroid cypermethrin.

In the evaluation trials of resistance to temephos with time, the population of *Ae. aegypti* presented 100% of mortality with 8 hours of exposure to the product, with 4 hours to *Bti* WDG and *Bti* VETOBAC with 16 hours of exposure, at the end of 24 hours of evaluation, with no significant difference ($p > 0,05$) to 0,33 h (20 minutes). It was verified that the mortality values were significant for all the products ($p < 0,05$) starting from the 60 minutes to 24 hours of evaluation when compared to the control. The results in the larvae phase with the organophosphorus temephos in *Ae. aegypti* presented resistance when compared as the susceptible reference lineage strain Rockefeller.

In relation to the evaluation of adults of *Ae. aegypti* resistance to cypermethrin (DC = 0,1% = 37 mg i.a./m²) 45,49% of mortality (F₂) and 18,67% of mortality in the surviving females was found, in other words, resistance presence of this population to the tested product. The population of *Ae. aegypti* presented susceptibility to the bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

I. INTRODUÇÃO

1.1 A espécie, os inseticidas e resistência

A dengue é uma arbovirose, cujo agente etiológico é um vírus do gênero *Flavivirus*, sendo atualmente conhecidos quatro sorotipos, antigenicamente distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) (Tauil, 2001). Este patógeno tem como vetor o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae); que também é transmissor da febre amarela urbana (Tauil, 2001, Carvalho, 2002, Forattini, 2002). Participa também do ciclo de transmissão de outras doenças para o homem e para animais nas Américas, onde suas formas imaturas se desenvolvem quase que exclusivamente em recipientes artificiais (Forattini, 2002).

A dengue está entre as arboviroses mais importantes do mundo. Clinicamente suas manifestações variam de uma síndrome viral inespecífica e benigna, até um quadro grave e fatal da doença hemorrágica com choque (Tauil, 2001). O *Ae. aegypti* teve papel importante na re-emergência nas infecções causadas pelo vírus da dengue em suas diversas formas clínicas (Paho, 1995, Rodhain & Rosen, 1997, Nogueira *et al.*, 1999). Essa virose tornou-se um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo. Cerca de 3,5 bilhões de pessoas vivem expostas a esse mosquito na faixa cosmotropical (Martins *et al.*, 2004), onde se encontram sob o risco de se infectarem, principalmente em países tropicais, onde as condições climáticas, temperatura e umidade, são favoráveis à proliferação do *Ae. aegypti* (Tauil, 2002).

Os mosquitos geralmente adquirem o vírus enquanto se alimentam de sangue de pessoas infectadas. Depois de incubado por 8 a 10 dias, a fêmea infectada é capaz de transmitir o vírus a indivíduos suscetíveis, durante a picada e a alimentação. As fêmeas infectadas podem transmitir o vírus para sua prole através da transmissão transovariana (Polanczyk *et al.*, 2003), mas sua importância na transmissão do vírus para os humanos ainda não foi esclarecida (WHO, 1997).

Ae. aegypti é uma espécie exótica que chegou ao continente americano após desenvolver, em seu ambiente primário, um grau significativo de sinantropia. A espécie é

responsável pela transmissão da dengue clássica e dengue hemorrágico em vários estados brasileiros, e tem representado risco potencial na re-urbanização da febre amarela no Brasil (Gomes, 1998 e 1999, Tauil, 2001, Massad *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004). Há vários anos a dengue é um dos mais sérios problemas de saúde pública do País, causando preocupação no governo e na população de vários estados da Federação (Polanczyk *et al.*, 2003).

Ae. aegypti é um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de recipientes artificiais de água limpa para colocar os seus ovos. Estes têm uma alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis na ausência de água por até 450 dias. Essa espécie tem mostrado uma grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais consideradas desfavoráveis. Adultos já foram encontrados em altitudes elevadas e larvas em água poluída (Tauil, 2002).

Historicamente, o controle dessa espécie tem sido realizado através de aplicações de inseticidas principalmente contra adultos em área urbana. Consoli *et al.* (1986) relataram 142 espécies de culicídeos apresentando resistência múltipla aos inseticidas rotineiramente utilizados; além de causar o desenvolvimento de raças resistentes, estes causam contaminação de trabalhadores, de animais domésticos, contaminação das águas, distúrbios genéticos e outros (Sighamoni *et al.*, 1986, Chahad & Boof, 1994).

A resistência dos mosquitos aos inseticidas é um problema na saúde pública que vem sendo registrado desde a década de cinquenta (Fox, 1961, Brown, 1986, WHO, 1992, Andrade, 1989, Pinheiro & Tadei, 2002). No Brasil, o organofosforado temefós é usado no controle de *Ae. aegypti* desde 1967 (Braga *et al.*, 2004). Macoris *et al.* (1999) registraram em 1985 o estabelecimento de *Ae. aegypti* em municípios do oeste paulista, deflagrando execução de medidas de controle mecânico e químico. Iniciou-se então o controle de larvas com temefós e controle de adultos com fenitroton, ambos organofosforados. O malation foi usado em substituição ao fenitroton, no período de 1987 a 1993, quando este não era encontrado no mercado. As termonebulizações foram utilizadas desde 1985, destacando-se os inseticidas: propuxur (1986 a 1989), malation (1985 a 1992) e cipermetrina (1989), os quais pertencem respectivamente ao grupo dos carbamatos, organofosforados e piretróides.

Em 1992, iniciou-se a realização de testes de susceptibilidade de *Ae. aegypti* ao temefós, nos municípios de Bauru, Marília e São José do Rio Preto no Estado de São Paulo. A partir de 1996, foi implantado o sistema de monitoramento da susceptibilidade aos inseticidas empregados no controle desse vetor naquele Estado (Macoris *et al.*, 1999), que consistia na

realização anual de bioensaios, utilizando-se dois tipos de parâmetros propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS): resposta de mortalidade frente à exposição à dose diagnóstico recomendada e resposta à exposição a um gradiente de concentrações para estabelecimento da linha-base de dose resposta (WHO, 1981).

O cenário atual, com profundas alterações ambientais e a conseqüente domiciliação de vetores, provocado pelo crescimento alarmante da população humana em centros urbanos, tem gerado a ressurgência de vetores que são disseminados rapidamente por diferentes partes do mundo (Gomes, 2002). Esse processo de urbanização desordenada, principalmente nos países subdesenvolvidos em virtude da deficiência de saneamento básico, habitação e pela disseminação da infestação pelo principal vetor da doença, tem dificultado o controle de *Ae. aegypti* (Gubler, 1997).

Embora avanços importantes tenham surgido com o desenvolvimento de medidas alternativas para o controle de mosquitos, os inseticidas químicos ainda se mantêm como parte dos programas de manejo integrado de pragas. No caso da dengue, o uso desses produtos tem sido feito não só em áreas críticas, como borracharias, cemitérios e ferros-velho, mas também no ambiente domiciliar, devido à dificuldade da população em eliminar criadouros do mosquito vetor pela mudança de hábitos. Diversos casos de resistência têm sido registrados no mundo para espécies sinantrópicas de mosquitos e, mais particularmente para populações de *Ae. aegypti* no Brasil. Devido ao uso no passado, por exemplo, de DDT ou de inseticidas agrícolas clorados, a resistência cruzada pode reduzir a eficácia de piretróides, mesmo antes de sua introdução no combate a um vetor (Campos & Andrade, 2001). Segundo os autores, os piretróides são mais usados em adultos e por isso a cipermetrina tem sido pouco avaliada contra as larvas de *Ae. aegypti*.

No Brasil, em particular na área de saúde pública, o uso intensivo de inseticidas tem ocorrido pelo menos há seis décadas. O monitoramento da eficiência destes quase nunca foi feito antes de uma aplicação maciça, mesmo sendo necessário como rotina dentro dos planos de controle de vetores (Campos, 2002). Recentemente foi reconhecida a resistência de *Ae. aegypti* a inseticidas químicos nos Estados do Rio de Janeiro (Galardo *et al.*, 2000) e Espírito Santo, além da já registrada em Goiás e São Paulo (Macoris *et al.*, 1985, Macoris *et al.*, 1999, Macoris *et al.*, 2003, Campos & Andrade, 2001). A resistência ao *Bacillus sphaericus* já foi desenvolvida por *Culex quinquefasciatus* em Recife (Silva-Filha *et al.*, 1995), onde esta espécie transmite a *Wuchereria bancrofti*, agente causador da elefantíase.

Segundo nota técnica do Ministério da Saúde (2002), detectou-se a resistência de *Ae. aegypti* a organofosforados em dezessete municípios brasileiros, sendo quatro na região Norte, cinco na região Nordeste, três na Sudeste e cinco na região Centro-Oeste; já a região Sul, não foi registrado nenhum município. Devido ainda à detecção de resistência ao temefós em municípios do Estado do Rio de Janeiro, a partir de 2000 o controle passou a ser feito com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) e metoprene (Altosid) (Campos & Andrade, 2001).

A principal tática adotada pelo Ministério da Saúde é o uso maciço de produtos químicos para o controle de adultos e larvas. Entretanto, o uso intensivo de inseticidas aumenta o custo de controle e pode afetar a saúde pública (Polanczyk *et al.*, 2003). Assim, a eficiência dos inseticidas rotineiramente empregados ou o desenvolvimento de resistência pelos vetores reforça a necessidade de avaliações prévias e monitoramento da resistência como medida de segurança para a população envolvida, e também, como medida econômica para os cofres públicos (Campos & Andrade, 2001).

Atualmente, o principal problema do uso de inseticidas químicos para o controle de mosquitos é o desenvolvimento da resistência, resultando na redução da eficiência do produto devido à morte de todos os indivíduos suscetíveis, restando apenas os resistentes ao produto. O aspecto mais sério, neste caso, é o aumento do risco de poluição ambiental e do custo de controle, porque, usualmente, é realizado um número maior de aplicações para garantir um controle satisfatório (Polanczyk *et al.*, 2003).

Uma alternativa para se evitar este problema é a utilização de produtos com diferentes modos de ação. Estes produtos atuam em mais de um processo bioquímico e/ou fisiológico, matando o inseto de diferentes maneiras. A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) possui três diferentes toxinas Cry (cristal tóxico) e uma Cyt (toxina com atividade citolítica e hemolítica) (Polanczyk *et al.*, 2003). Esta ação sinérgica ocorre normalmente quando são usados mais de um inseticida (Delécluse *et al.*, 2000). Este grande número de toxinas reduz a probabilidade do desenvolvimento da resistência (Becker, 2000, Regis *et al.*, 2001). Um fator importante é a possibilidade dessa bactéria ser usada juntamente com inseticidas químicos para aumentar a eficiência do controle (Chui *et al.*, 1995 *apud* Polanczyk *et al.*, 2003). De acordo com Becker (2000), todos os estudos feitos após a introdução de *Bti* mostram que ocorreu um controle eficiente, sem que ocorressem danos ao ambiente, não havendo redução da biodiversidade dos locais tratados.

Antes de 1976 a bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (*Bt*) era usada exclusivamente no controle de insetos-praga na agricultura (Polanczyk *et al.*, 2003). Mas a descoberta de um isolado patogênico a dípteros chamado *Bt israelensis* (*Bti*) (WHO, 1999, Becker, 2000) iniciou o seu uso no controle de vetores de doenças.

A *Bti* tem sido comercializada em larga escala para o controle de mosquitos e um grande número de produtos eficientes estão disponíveis no mercado, sendo usada em campanhas intensivas de controle realizadas nos EUA e Alemanha para o controle de mosquitos e na África para o combate de simulídeos vetores da Oncocercose (Glare & O'Callaghan, 2000).

O uso de bactérias no controle biológico das larvas de mosquitos tem-se destacado entre as diversas estratégias que compõem os programas de manejo integrado de pragas. As principais razões para isto são as suas vantagens em relação aos inseticidas químicos. Esses produtos que possuem inúmeras formulações, são usados contra diversas espécies de mosquitos, sendo encontrados no mercado a um preço superior aos produtos tradicionalmente utilizados; são entretanto, competitivos quando considerados os custos sociais e ambientais do uso de inseticidas não seletivos em ecossistemas aquáticos (Vilarinhos *et al.*, 1998).

Neste trabalho buscou-se avaliar a susceptibilidade e/ou resistência de larvas de *Ae. aegypti* aos inseticidas químicos organofosforado temefós e biológico *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e de adultos ao piretróide cipermetrina, na cidade de Dourados-MS. Especificamente, duas hipóteses foram avaliadas: 1) se a população de *Ae. aegypti* ainda é susceptível aos inseticidas químicos utilizados no município; 2) e se é possível a utilização da *Bti* no manejo de *Ae. aegypti* na cidade de Dourados, uma vez que nunca foi usado como estratégia no manejo rotativo de produtos para prevenir o desenvolvimento da resistência.

1.2 Considerações gerais sobre o manejo de *Aedes* sp.

Em Dourados-MS, o controle de *Ae. aegypti* é baseado no manejo da fase de larva usando-se o organofosforado temefós. Os piretróides são mais usados no controle de adultos e, por isso, a cipermetrina, como em todos os estados do Brasil, tem sido pouco avaliada contra as larvas de *Ae. aegypti*. Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não foram usados no município para manejo desses culicídeos, apesar do Ministério da Saúde,

recomendar e disponibilizar o produto para o manejo rotativo, visando prevenir o desenvolvimento da resistência e se antecipando às falhas na rotina de controle.

A estratégia tradicional de controle da dengue e conseqüentemente do *Ae. aegypti*, tem sido realizada por meio do trabalho de agentes de saúde, com visitas periódicas a todas às edificações urbanas em Dourados, como ocorre em outros estados do País. No entanto, se a questão for enfrentada, não simplesmente como um problema entomológico, mas também virológico e médico, ou seja, um problema de saúde coletiva, torna-se evidente a necessidade premente de mudança de estratégia.

Segundo Tauil (2002) e Penna (2003) a reforma sanitária brasileira em um primeiro momento priorizou a ampliação da cobertura dos serviços básicos de saúde, de modo a atender o princípio da universalidade de acesso à saúde e não ações de controle de doenças específicas, principalmente aquelas ações que não tivessem efeito sinérgico para a atenção básica. O desenvolvimento do Sistema Único de Saúde (SUS) envolveu a construção de consensos em torno de modelos de financiamento, modelo gerencial de organização dos serviços de saúde e de atenção. A discussão sobre o controle vetorial foi sempre completamente periférica, porque essa atividade não se realiza na rede de atenção à saúde, arcabouço principal do SUS. A situação da dengue reflete, portanto, a decisão política de não priorizar o controle vetorial no País no primeiro momento da construção do SUS. O custo deste controle realizado por meio da estratégia tradicional é muito alto, com um custo/benefício baixo, quando comparado à expansão da cobertura das ações básicas de saúde. O que se vê, portanto, é a transposição de antigas práticas de uma organização verticalizada para os municípios executarem de maneira descentralizada, ou seja, no controle da dengue, o que se vê, é a municipalização de uma execução acrítica, cujas normas continuam vindo do nível federal. Questões técnicas como o conhecimento entomológico e o manejo seguro de inseticidas foram desprezadas. Há, por exemplo, relatos de surtos de pneumonite por uso de diluente inadequado para a pulverização ultrabaixo volume de inseticida.

A organização atual do espaço dos grandes centros urbanos e a situação da população de mosquitos no País leva à conclusão de que a “erradicação” do *Ae. aegypti* pelo método perifocal, que consiste na aplicação de inseticidas de efeito residual de seis meses em paredes externas e internas de todos os depósitos domiciliares com ou sem água, assim como nas paredes próximas até 1 m de distância dos eventuais criadouros, como aconteceu nas epidemias no Brasil entre 1967 e 1973, não é mais viável. O Ministério da Saúde (MS) passou

então a recomendar o controle e não mais a erradicação. Controle significa a redução permanente da densidade vetorial (Penna, 2003). Isto só será possível com a eliminação definitiva de criadouros que respondem por grande parte da reprodução do vetor. Entretanto, nenhum trabalho sistemático foi, ou é, realizado para conhecer quais os principais criadouros existentes. A utilização de inseticidas na fase larval e adulta por agentes de saúde não resultará em controle vetorial, mas apenas em redução temporária de sua densidade. Inseticidas larvais são instrumentos centrais para erradicação local do vetor, não para o seu controle. Centrar o controle no trabalho de agentes de saúde apenas, como no início do século XX, tempo de Oswaldo Cruz, não tem sido, nem será efetivo.

O problema diz respeito ao meio ambiente urbano, um problema de todos, população e autoridades constituídas, não apenas da área de saúde. É preciso envolver o setor de urbanismo das prefeituras, de forma a evitar edificações com arquitetura que permitam possíveis criadouros, alertar e fiscalizar construções que são grandes geradores de criadouros, com seus entulhos e recipientes, exigir boa drenagem de superfícies impermeabilizadas como, Lages, uma cooperação efetiva com o setor do meio ambiente. Afinal está se trabalhando com ecologia de vetores e reservatórios e com o uso de inseticidas. É preciso ainda ter a consciência de que a coleta de lixo e a distribuição de água potável estão diretamente relacionadas ao controle do *Ae. aegypti*, pela possibilidade do lixo e a água armazenada para consumo no caso de provisão intermitente pela rede, virarem criadouros do mosquito (Neto, 1997, Neto *et al.*, 2003, Tauil, 2001 e 2002, Penna, 2003).

Enquanto a mídia ou os veículos de comunicação de massa dão importância aos pneus, vasos, lata; nada é dito sobre os macro criadouros, como por exemplo, grandes poças em lages de empresas, que podem ser identificadas pela população e assim ter sua localização informada às equipes de agentes de saúde. Os macro criadouros são os que alimentam os pequenos criadouros, como ralos e pratos dos vasos de plantas. A variação da densidade vetorial está mais correlacionada com as chuvas do que com a temperatura. Isto reflete a importância maior de criadouros ao ar livre do que dos existentes dentro das casas, aí incluída a água para consumo humano. A população deve receber a melhor e mais recente informação possível, ter meios de comunicação com os responsáveis pelo controle vetorial e acesso a todos os meios disponíveis para o controle vetorial doméstico, de sua responsabilidade. É hora de separar o espaço público do privado no controle da dengue, assim como empresas de

cidadãos. Da mesma forma, o que é de responsabilidade de uma empresa, como a não emissão de poluentes na atmosfera, também o é não manter um macro criadouro de *Ae. aegypti*.

Em termos práticos, precisa-se distinguir o que deve ser normalizado e fiscalizado do que deve ser executado diretamente pelo poder público, e do que fazer para viabilizar as ações privadas de controle no ambiente doméstico. Cabe ao poder público: a coleta adequada de lixo, o suprimento contínuo de água, o cuidado com o espaço público; não deixar que lagos em praças se tornem grandes criadouros ou não manter caçambas para coleta de lixo sem tampa; criação de regras e fiscalização de atividades comerciais, industriais e da construção civil. Cabe ao poder público, também, informar à população sobre riscos e medidas a serem tomadas no espaço doméstico com base na realidade de organização do espaço domiciliar e peridomiciliar. Cabe ainda, informar sobre a efetividade de produtos e serviços que vêm sendo vendidos para o combate à dengue.

O modo como a Região Sudeste enfrentou a epidemia de cólera no início da década de 90, pode servir de base para o controle de vetores. Diante da hipótese da introdução da cólera na região, a população foi instruída sobre a lavagem de verduras e frutas; foi recomendada a limpeza das caixas d'água de residências e condomínios, e as companhias de água e esgoto intensificaram a vigilância do sistema para detecção de falhas, com a avaliação da qualidade da água não só na entrada das residências, como também nas torneiras, por amostragem. Os órgãos responsáveis pelo meio ambiente monitoraram a contaminação ambiental de água superficial e subterrânea, e auxiliaram na avaliação da qualidade e cloração da água para consumo humano.

Outro exemplo, o isolamento no início de 2001 do vírus DEN-3 no Rio de Janeiro, indicava a ocorrência de uma epidemia no verão de 2001/2002 com intensidade dependente da densidade vetorial do *Ae. aegypti*. Do mesmo modo que a ocorrência da epidemia pôde ser prevista, com meses de antecedência por qualquer epidemiologista familiarizado com dinâmica de transmissão, seu fim, no Rio de Janeiro, no mês de maio de 2002 por esgotamento de susceptíveis e redução sazonal da densidade vetorial, independente de qualquer medida de controle, era previsível (Penna, 2003). Esta epidemia não será a última. O vírus do DEN-4 já circula no continente americano (Penna, 2003) e provocará epidemias se o controle vetorial permanecer ineficiente. No caso da dengue as informações repassadas à população, além de tardias foram incompletas. O uso da creolina em ralos, sem dúvida, procedimento factível e de baixo custo, é lembrado pelos mais velhos, herança da campanha

bem sucedida de “erradicação” do *Aedes*. A informação de que a larva nunca se desenvolve até a forma alada em menos de 7 dias, (11 a 18 dias a 26°C) que permitiria a vigilância e eliminação de possíveis criadouros com periodicidade menor, não foi passada à população.

O comportamento doméstico do *Aedes*, em contraste com outros mosquitos semidomésticos ou silvestres, também não foi devidamente esclarecido. A população da cidade do Rio de Janeiro manifesta constantemente preocupação pela proximidade de florestas. Dizer que a dengue se contrai em casa não basta. A malária transmitida pelo *Anopheles darlingi* também é transmitida nas residências, embora seus criadouros sejam naturais, em contraste com os criadouros do *Ae. aegypti* fabricados pelo homem (Penna, 2003).

O governo do Estado do Rio de Janeiro, consultou em 2001 o Ministério da Saúde (MS) sobre a possibilidade de distribuição do biolarvicida *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) em formulação líquida à população, encontrando oposição a esta medida (Penna, 2003). A *Bti*, além de utilizado na água de consumo humano por recomendação do próprio MS, é disponível nos Estados Unidos para o uso doméstico. Seu uso é incentivado pelas autoridades sanitárias de Nova York, preocupadas com o controle de mosquitos transmissores de encefalites. Trata-se de um produto sem registro de desenvolvimento de resistência em campo e cujo efeito residual é de apenas 15 dias, sendo portanto inviável que venha sendo depositado em criadouros não elimináveis domésticos, ralos, tanques, etc, por agentes de saúde de dois em dois meses e não a cada quinzena pelos moradores. Colocar essa atribuição para os agentes de saúde é, segundo Penna (2003), comparável a, durante o risco de cólera, ter agentes sanitários para lavar as saladas cruas das refeições domésticas, quando ao invés disso, o hipoclorito foi distribuído à população de baixa renda sob maior risco, pelas unidades básicas de saúde com instruções sobre seu uso.

A última e recente epizootia de febre amarela atingiu o sul de Minas Gerais, com casos humanos (Penna, 2003). Isso aponta que as ações de conservação ambiental, com a política de corredores ecológicos, integram ecossistemas que se encontravam isolado, florestas da Mata Atlântica, como o Cerrado e a Floresta Amazônica. Atualmente há registros de febre amarela pelo aparecimento de casos humanos, embora esporádicos (Penna, 2003, Massad *et al.*, 2003). Sistemas de vigilância da doença entre macacos nas áreas de preservação ambiental são sem dúvida uma alternativa, aparentemente mais cara para os cofres públicos, mas certamente mais civilizada para o acompanhamento deste risco.

No caso de *Ae. aegypti*, espécie não nativa das Américas, introduzida no Brasil a partir da África no início do século XIX e, tendo encontrado um meio ambiente adequado à sua sobrevivência e reprodução, ocupou o País de norte a sul e progressivamente se expandiu geograficamente, aumentando sua população. Foi “erradicada” do país em 1957, reintroduzido em 1967 e novamente eliminado em 1973; mas, finalmente reintroduzido para iniciar a reocupação de seu antigo habitat em 1976. Observa-se que desde as primeiras atividades de controle deste mosquito no País no início do século XX, e sua “erradicação”, passaram-se mais de cinquenta anos. Sem intervenção espera-se que no atual processo de reocupação o *Ae. aegypti* se expanda geograficamente e aumente sua densidade até um ponto de equilíbrio determinado pelo meio ambiente. A distribuição dos casos de dengue no tempo e espaço desde 1985, quando foi introduzido no Rio de Janeiro, reflete este processo de reocupação do *Ae. aegypti* em curso. Note-se que 26 anos é um período curto para este processo. Portanto, a espécie encontra-se em processo de reocupação que ainda não atingiu o equilíbrio (Penna, 2003). A situação atual deve ser caracterizada como a de um risco eminente de reintrodução da febre amarela urbana (Fraiha, 1968, Gomes, 1998 e 1999, Tauil, 2001, Massad *et al.*, 2003, Penna, 2003).

O saneamento básico, particularmente o abastecimento de água e a coleta seletiva do lixo, mostram-se insuficientes ou inadequados nas periferias das grandes metrópoles e também cidades pequenas. Uma das conseqüências desta situação é o aumento do número de criadouros potenciais do principal mosquito vetor. Associada a esta situação, o sistema produtivo industrial moderno, que produz uma grande quantidade de recipientes descartáveis, entre plásticos, latas e outros materiais, cujo destino inadequado, abandonados em quintais, ao longo das vias públicas, nas praias e em terrenos baldios, também contribui para a proliferação do *Ae. aegypti*. É ainda importante considerar que, na grande maioria dos municípios brasileiros, tem havido uma deterioração da infra-estrutura de saúde pública, com redução dos recursos humanos e financeiros. As autoridades têm privilegiado ações emergenciais de combate às epidemias da doença em detrimento de medidas para a sua prevenção. A luta contra o mosquito *Ae. aegypti*, também vetor da forma urbana da febre amarela, tem se concentrado na aplicação espacial de inseticida em ultrabaixo volume, medida valiosa durante a vigência de uma epidemia, porém pouca efetiva na obtenção e manutenção de baixos índices de infestação predial. A luta contra esse mosquito apresenta muitos pontos críticos. Não se sabe qual o índice de infestação abaixo do qual a transmissão

de dengue se interrompe (Gomes, 1998). Dois índices são os mais usados: o de infestação predial (percentual de prédios encontrados com recipientes contendo água e larvas em relação ao número total de prédios examinados) e o de Breteau (percentual de recipientes encontrados com larvas em relação ao número total de prédios examinados). Nenhum deles é suficientemente capaz de medir a intensidade de infestação (Gomes, 1998). No primeiro caso, um prédio pode ter um ou vários recipientes positivos para larvas e é considerado apenas como um prédio infestado. No caso do Índice de Breteau, não se diferencia o tipo de recipiente, contabilizando da mesma forma um tonel de água com larvas e um prato de xaxim com larvas, embora o número de larvas num tonel seja em geral, muitas vezes maior que no prato de xaxim (Tauil, 2002). Na literatura, há referência de que com um índice de infestação predial menor que 1% e um índice de Breteau abaixo de 5% não haveria transmissão de dengue. Porém Kuno (1995) relata que houve transmissão de dengue em Cingapura com índice de Breteau abaixo de 5%. Portanto, baixos índices de infestação pelo *Ae. aegypti* reduzem o risco de transmissão de dengue, porém não o eliminam. Há ainda a necessidade de manter esses índices baixos, o que exige uma vigilância entomológica permanente, atividade essa intensiva de mão-de-obra e que, com a redução da incidência da doença, perde, com o passar dos anos, o seu apelo político e, por consequência, recursos financeiros, materiais e humanos, em favor de outras prioridades em saúde (Tauil, 2002). Outro vetor transmissor de dengue no Sudeste Asiático, existente no Brasil desde 1986, é o *Aedes albopictus*. É um vetor secundário, e seu combate é muito mais complexo e menos eficaz em virtude de seus hábitos serem também silvestres e seu comportamento não se restringir ao domicílio e peridomicílio. Assim, mesmo que o *Ae. aegypti* seja eliminado, ainda existe, mesmo que reduzido, o risco de transmissão de dengue pelo *Ae. albopictus*.

Na tentativa de compreender a re-emergência da dengue é necessário considerar ainda que o diagnóstico precoce dos casos da doença não tem sido a regra, pois, com frequência, são confundidos com os de outras doenças ou viroses indeterminadas. Quando o diagnóstico é realizado, o vírus da dengue já está infectando grande número de pessoas e atingindo áreas geográficas extensas, dificultando o controle da epidemia.

Diante de uma epidemia, a relevância da atuação conjunta da área de saneamento e meio ambiente neste caso, é não somente propor e implementar uma estratégia de controle da febre amarela urbana e da dengue factível e viável, mas para isso é necessário que as propostas e seus riscos e custos sejam amplamente discutidos, para a criação de consenso no

meio técnico e que o poder público e a sociedade os assumam como uma escolha. No aspecto técnico, podemos começar discutindo a conveniência de ampliar a vacinação antiamarílica enquanto continuarmos a conviver com o *Ae. aegypti* em nossas áreas urbanas e o único meio disponível na prevenção da dengue, o combate ao vetor, o qual está limitado na eliminação dos seus criadouros.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico e coleta de ovos de *Ae. aegypti* em campo

O município de Dourados-MS está localizado a 22°13'16"S, 54°48'20"W, na região Sudeste do Estado de Mato Grosso do Sul, Centro-Oeste do Brasil. O relevo é plano com suaves ondulações, estando em uma altitude média de 430,49 m. O clima no verão é tropical e úmido e no inverno tropical seco e o tipo de solo é o latossolo roxo e latossolo vermelho. A área urbana é de 857,40 Km², com oito distritos (Itahum, Guassú, Formosa, Picadinha, Indápolis, Panambi, Vila Vargas e Vila São Pedro) e a área indígena com 35,33 Km² para uma área total do município de 4.136,83 Km². A população da cidade, estimada pelo censo IBGE/2003 para 2004 é de 179.963 habitantes. O município encontra-se a 220 Km da capital do estado e a 1.710 Km da capital federal.

A coleta de ovos de *Ae. aegypti*, foi realizada através da instalação de 200 armadilhas de oviposição distribuídas aleatoriamente no peridomicílio de residências, em 100 bairros da cidade, no período de outubro/2003 a janeiro/2004 (Figura 1), formando uma colônia única da população de *Aedes* do município. A escolha do local de colocação das armadilhas de oviposição (ovitampa), no peridomicílio (Figuras 2 e 3), baseou-se nas normas da Gerência Técnica de Entomologia da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde: local calmo onde a armadilha não pode ser afetada por pessoas e animais; armadilha próxima a criadouros domésticos potenciais como caixa d'água, vasos de plantas e tanques; próximo aos abrigos das fêmeas, plantas e locais sombreados em geral e de preferência a uma altura entre 0,8 a 1,2 metros.

Segundo Consoli & Oliveira (1994), a seleção do local de oviposição por parte das fêmeas é o principal fator responsável pela distribuição dos mosquitos nos criadouros e é da maior relevância para a distribuição das espécies na natureza.

A descrição padrão das ovitrampas, como são denominadas as armadilhas de oviposição (Fay & Eliason, 1966), consiste em um recipiente preto, normalmente de plástico, com boca larga, volume de 1000 mL e com orifícios laterais para escoamento d'água em caso de precipitação pluvial. Como suporte para oviposição foi colocada verticalmente no interior do vaso, uma palheta do tipo “eucatex” com dimensão de 2,5 x 12,5 cm, sendo que uma das faces da superfície era rugosa. Cada palheta foi enumerada (1 a 200) e as armadilhas foram inspecionadas a cada quatro ou cinco dias, fazendo-se a troca de palhetas e reposição do volume d'água.



Figura 2. Armadilha de oviposição para culicídeos neotropicais. Recipiente preto, de plástico, com boca larga, volume de 1000 mL e com orifícios laterais. Como suporte para oviposição, palheta de “eucatex”.



Figura 3. Armadilha de oviposição próximo aos abrigos das fêmeas, plantas e locais sombreados.

O tempo necessário para o monitoramento das ovitrampas em cada imóvel foi exatamente três dias. Em caso de chuva durante a semana, as palhetas eram monitoradas e/ou trocadas imediatamente no dia seguinte ao término das chuvas, para se evitar possível emergência de mosquitos adultos.

Ao total foram instaladas 2.060 armadilhas de oviposição com suas respectivas palhetas enumeradas, tendo sido recolhidas 988 palhetas positivas para *Aedes* sp., com aproximadamente 65.112 ovos.

Durante o período em que as armadilhas ovitrampa ficaram em campo, foram feitas pulverizações de piretróide cipermetrina com máquinas de ultrabaixo volume pela equipe de campo do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) nos períodos de 30 de setembro a 15 de dezembro de 2003, somente nos 26 pontos estratégicos: borracharias, ferros-velho, cemitérios, entre outros.

2.2 Criação de larvas e adultos em laboratório

As palhetas recolhidas das armadilhas instaladas no campo permaneceram em substratos úmidos por um ou mais dias antes de serem submetidos à secagem. Após secagem, os ovos foram armazenados por períodos variáveis. Logo após terem sido conferidas,

identificadas e procedido a contagem dos ovos, as palhetas positivas para *Ae. aegypti*, foram embaladas em papel alumínio, enumeradas e estocadas (Figuras 4 e 5).

A colocação das palhetas positivas para eclosão de larvas foi iniciada no dia 02 de fevereiro de 2004 com temperatura d'água de 27°C e pH 6,54 (básico), temperatura interna do laboratório de 27,2° C e U.R. entre 70 e 82%. Foram colocadas 98 palhetas (de 100 bairros), tendo sido escolhidas aquelas com maior número de ovos por bairro, obtendo-se assim amostras de uma colônia única da cidade, totalizando 15.977 ovos. Desses, 4.086 larvas eclodiram, iniciando a colônia parental (F₀) para a realização dos bioensaios nas gerações F₁. Os dois bairros Morada do Salto e Guaicurus apresentaram índice zero de ovos coletados durante o período de outubro/2003 a janeiro/2004 (armadilhas de oviposição sob arbustos de erva-cidreira (Tubiflorae: Verbenaceae Juss.).

Somente depois que emergiram os mosquitos da geração parental é que foi possível a identificação das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), segundo as chaves dicotômicas de Consoli & Oliveira (1994) e Forattini (2002) para identificação das espécies de *Aedes* sp.

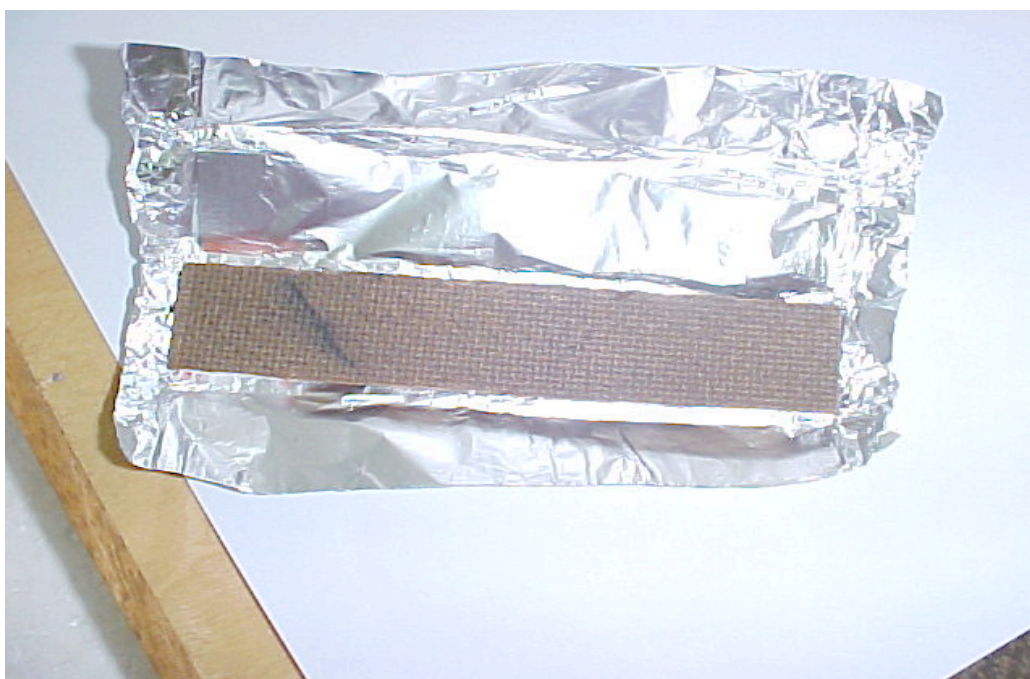


Figura 4. Palheta com ovos de *Ae. aegypti*, embalada em papel alumínio.



Figura 5. Palhetas positivas para *Ae. aegypti*, identificadas e embaladas em papel alumínio e estocadas.

As larvas utilizadas para iniciar a geração parental (Figura 6), foram mantidas em uma bandeja com volume de água destilada superior a 1 mL por larva e alimentadas com ração para peixes ($0,4 \text{ cm}^2/\text{larva}$, dissolvida e filtrada para evitar excesso de gordura e resíduos), uma a duas vezes por dia. Foram criadas quantidades inferiores a 1000 larvas por recipiente para se evitar o canibalismo.

Para a manutenção dos mosquitos adultos de *Ae. aegypti* foram utilizadas gaiolas apropriadas (de metal e/ ou madeira), medindo 40X40X40 cm e gaiolas pequenas 30X20X20 cm com 3 faces teladas (Figura 7), face superior com vidro transparente e mangas de organza branco. Os machos foram alimentados com solução aquosa à base de sacarose a 20% e a alimentação sangüínea das fêmeas foi administrada uma vez por semana com *hamsters*.



Figura 6. Larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).



Figura 7. Gaiola de criação de metal, medindo 40X40X40 cm com três faces teladas. A face superior de vidro transparente e as mangas de organza branco.

2.3 Provas de susceptibilidade aos inseticidas em larvas

Para se determinar o nível de susceptibilidade e/ou resistência ao temefós, foram utilizadas larvas da geração F₁ de *Ae. aegypti*, provenientes de ovos coletados em armadilhas

de oviposição pelo Centro de Controle de Zoonoses, Dourados-MS e uma linhagem padrão susceptível – Rockefeller de *Ae. aegypti* que foi usada como controle. Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia, Secretaria de Estado de Saúde/SES de Belo Horizonte-MG.

O inseticida usado foi o organofosforado temefós (Fersol 1G). A partir de uma dissolução estoque à concentração de 100 ppm i.a. desse produto em água, foram feitas diluições adicionais em água destilada para se chegar às concentrações de trabalho (mg/L). Para cada bioensaio utilizou-se nove concentrações. Ao total foram três bioensaios completos para cada linhagem testada. Para cada concentração testada usou-se grupos de 25 larvas de terceiro instar em copos descartáveis com quatro repetições com as soluções do inseticida. Como referência e comparação dos dados utilizou-se a linhagem padrão Rockefeller. A mortalidade final foi avaliada 24 horas após o contato com o produto, e corrigida pela fórmula de Abbott (1925). Os valores selecionados dos dados foram submetidos à análise probit, usando-se o programa Raymond onde divide-se os valores das DLs entre a linhagem testada. As razões de resistência (RR) foram calculadas para as CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉, comparando-se os valores da população de Dourados com aquelas da linhagem susceptível Rockefeller, com base na resposta da linhagem padrão. Os parâmetros para avaliação da Razão de Resistência foram: se o valor da RR for próximo de 1 não há resistência; RR com valores de 5 indica resistência média e RR com valores acima de 10 resistência alta.

Também foram realizados bioensaios no Laboratório de Entomologia de Dourados-MS, com larvas de *Ae. aegypti* na geração F₁, alimentadas duas horas antes do início dos testes. Grupos de 25 larvas de terceiro instar foram utilizadas para cada repetição. Empregou-se um total de 125 larvas para cada produto (4 tratamentos com 5 repetições), totalizando 500 larvas da espécie. No grupo controle utilizou-se apenas água desclorada.

Os produtos utilizados foram:

- Temefós – Fersol 1G, grupo químico (organofosforado). Lote 201 R SP 02 14000. FAB Dez/2002 e VAL Dez/2004.
- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) - WDG Lote 92.029-PG. FAB 08/2002 e VAL 08/2004.
- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) - VETOBAC G. Lote 92.736-N8. FAB 08/2002 e VAL 08/2004.

Os recipientes utilizados para os bioensaios foram tambores de plástico com 100 litros de água desclorada (Figura 8). A dose utilizada para o organofosforado temefós a 1% e para *Bti* WDG: 3000 UI/mg (unidades tóxicas internacionais por miligrama) e *Bti* VETOBAC G: 200 UI/mg. A base para diluição, segundo normas técnicas Funasa/MS (2001); temefós: 10 gramas/100 litros de água; *Bti* – 2 gramas/100 litros de água.



Figura 8. Tambores de plástico de 100 litros utilizados nos bioensaios.

Os recipientes para o teste com as larvas eram de plástico transparente com duas laterais abertas e as faces inferiores e superiores vedadas com tecido de organza branco (Figura 9) para contato das larvas com o volume líquido. Foi utilizado isopor para manter os recipientes flutuando na superfície e permitindo um espaço interno para os indivíduos adultos emergidos.

Após 24 horas de exposição aos inseticidas foram contadas as larvas mortas (WHO, 1992), adotando-se o critério de resistência em larvas conforme preconizados por Amin & White (1984), Brown (1986) e WHO (1992). A sobrevivência de qualquer larva à dose recomendada foi considerada como indício de resistência. Foram feitas dez observações; com início no dia 02/04/04. Observações foram realizadas inicialmente após 20 minutos, 60 minutos, 2 e 4 horas. Em seguida as observações foram realizadas a cada quatro horas até o total de 24 horas após a colocação do produto.

O critério de mortalidade assumido foi de larvas que não reagiram ao estímulo com o toque de um pincel, com paralisia irreversível ou incapacitadas de alcançar a superfície, segundo metodologia de Campos & Andrade (2002).

Os dados obtidos nos bioensaios foram submetidos a testes estatísticos para verificação de susceptibilidade e/ou resistência à dose recomendada, utilizando-se o cálculo de mortalidade de *Ae. aegypti* em porcentagem corrigida pela Fórmula de Abbott (1925).



Figura 9. Recipientes de plástico transparente com duas faces laterais abertas e as faces inferiores e superiores vedadas com organza branco. Foi utilizado isopor para manter os recipientes flutuando, em tambores de plástico de 100 litros.

2.4 Prova de susceptibilidade à cipermetrina em adultos

Para os testes de susceptibilidade de adultos, foram utilizados tubos de plásticos padronizados de acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) (Figuras 10 e 11). Estes eram forrados com folha de papel filtro (15X15 cm) Whatman nº 1/OMS. Para realizar o teste de susceptibilidade ou resistência de mosquitos ao inseticida químico piretróide cipermetrina, utilizou-se papéis filtro impregnados com o inseticida em óleo mineral (0,1%= 37 mg i.a./m²). Para o controle foi usado papel filtro impregnado apenas com óleo mineral (ambos mantidos envoltos em papel alumínio, conservados em geladeira a 4° C).

Foram utilizadas para o teste, fêmeas adultas da geração F_2 , alimentadas com sangue (três repetições com 20 indivíduos), expostas à cipermetrina com observações a cada hora (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas). O experimento foi realizado com temperaturas entre 23,5 e 34,1°C e umidades relativas entre 54 e 90%.

Para a avaliação foram considerados mortos todos aqueles mosquitos incapazes de andar. Para o monitoramento de resistência em adultos foram utilizados os critérios, segundo Davidson & Zahar (1973): 98% de mortalidade = susceptível; 80-98% de mortalidade = requer verificação e 80% de mortalidade = presença de indivíduos resistentes.

Para o teste de verificação, as fêmeas sobreviventes foram alimentadas com sangue e confinadas nas gaiolas de criação com água para ovipor a 27°C e com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro (Consoli & Oliveira, 1994). As fêmeas filhas da geração F_2 ($=F_3$) (sem alimentação de sangue) foram testadas como em F_2 . Se elas apresentarem mortalidade menor que a geração parental então pode ser concluído que há resistência (Campos & Andrade, 2002).

Para a análise estatística, a mortalidade final foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925). Utilizou-se a análise de variância pelo teste de *Dunnnett* e o teste de Tukey.



Figura 10. Tubos OMS de plásticos padronizados (kits) para avaliação de susceptibilidade a inseticidas.



Figura 11. Kits OMS impregnados com inseticida em óleo mineral para o controle e ao inseticida piretróide cipermetrina.

III. RESULTADOS

3.1 Avaliação da resistência de *Ae. aegypti* na fase de larva ao temefós

As Tabelas 1e 2 apresentam uma relação do material biológico utilizado e o resultado do teste de susceptibilidade. Em ensaios com larvas F₁ de *Ae. aegypti* coletadas em Dourados-MS, foi verificada mortalidade de 71,67% ao organofosforado temefós. Larvas de *Ae. aegypti* quando submetidos à dose diagnóstico apresentaram CL₅₀ (=0,01708), CL₉₅ (=0,03096), CL₉₉ (0,03589), cepa de Dourados, e a linhagem padrão CL₅₀ (=0,00420), CL₉₅ (=0,01140), CL₉₉ (0,01725). Da mesma forma, a razão de resistência da cepa de Dourados apresentou RR₅₀ (4,07), RR₉₅ (2,72) e a RR₉₉ (2,08), em relação à linhagem Rockefeller RR (1), indicando portanto resistência da população de *Ae. aegypti* de Dourados ao organofosforado temefós.

Tabela 1. Mortalidade em porcentagem à dose diagnóstico em larvas de 3º instar de *Ae. aegypti*.

Município	Bioensaio 1	Bioensaio 2	Bioensaio 3	Média (%)
Dourados	72	69	74	71,67

Tabela 2. Concentrações letais (mg/L) e estimativa da razão de resistência para temefós em larvas de 3º instar de *Ae. aegypti* comparado com o padrão susceptível Rockefeller, referente

aos ovos coletados no período de outubro a novembro de 2003. Bioensaios realizados no Laboratório de Entomologia/SES de Belo Horizonte, Minas Gerais durante o ano de 2004.

Cepa	Inclinação	CL ₅₀	CL ₉₅	CL ₉₉	RR ₅₀	RR ₉₅	RR ₉₉
Rockefeller	2,95	0,00420	0,01140	0,01725	1	1	1
Dourados	6,36	0,01708	0,03096	0,03589	4,07	2,72	2,08

3.2 Avaliação da resistência de *Ae. aegypti* aos inseticidas na fase de larva

As provas de avaliação da susceptibilidade e/ou resistência ao organofosforado temefós, a população de *Ae. aegypti* de Dourados apresentou 100% de mortalidade à dose recomendada, após 8 horas de exposição ao produto; com 4 horas à *Bti* WDG e com 16 horas à *Bti* VETOBAC também houve 100% de mortalidade (Tabela 3). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) a 0,33 h (20 minutos). É possível verificar que os valores de mortalidade foram significativos para todos os produtos ($p < 0,05$) a partir dos 60 minutos até 24 horas de exposição aos inseticidas quando comparados ao controle.

Tabela 3. Mortalidade em porcentagem (corrigida pela fórmula de Abbott) em larvas de 3º instar de *Ae. aegypti* ao longo do tempo quando submetidos à dose testada aos produtos temefós (organofosforado) e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* WDG e VETOBAC G. O controle foi comparado em relação aos três produtos.

Horas	Temefós	Produtos	
		WDG	Vetobac G
0	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}
0,33	0,00 ^{ns}	22,20*	0,60*
1	59,20*	97,60*	96,80*
2	67,48*	98,37*	99,19*
4	84,55*	100,00*	99,19*
8	100,00*	100,00*	99,19*
12	100,00*	100,00*	99,19*
16	100,00*	100,00*	100,00*
20	100,00*	100,00*	100,00*
24	100,00*	100,00*	100,00*

* Valores que diferem significativamente com $p < 0,05$ pelo teste de *Dunnnett* para média de cada tratamento em comparação com a média do controle.

^{ns} Valores não diferem significativamente, $p > 0,05$ pelo teste de *Dunnnett* para comparar médias em comparação com a média do controle.

A Figura 12 reproduz graficamente os valores apresentados na Tabela 3, sendo possível observar que os valores de mortalidade foram significativos para os três produtos ($p < 0,05$) a partir dos 60 minutos quando comparados ao controle.

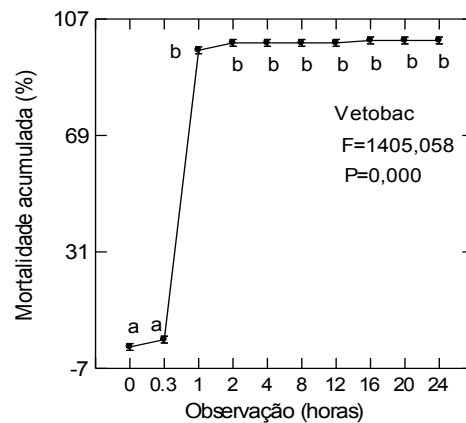
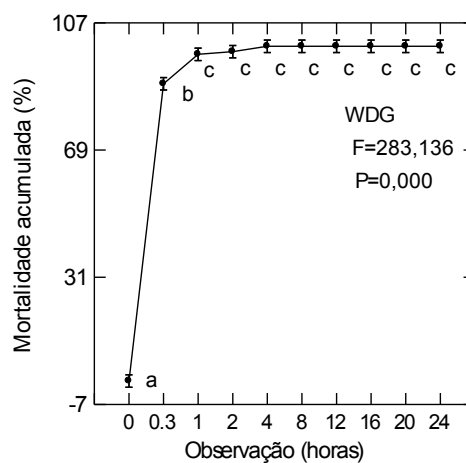
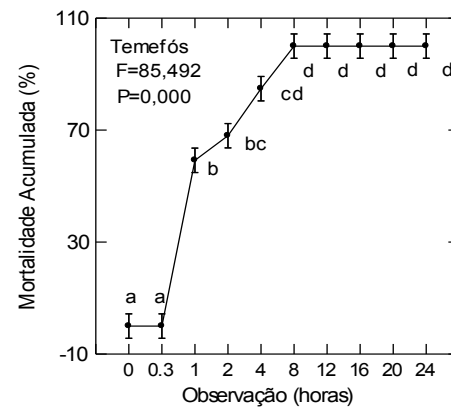


Figura 12. Média dos quadrados mínimos para a mortalidade acumulada (%) de larvas de *Ae. aegypti* aos inseticidas temefós, *Bti* WDG e VETOBAC com resultados da Análise de Variância e Tukey ($p < 0,001$).

3.3 Avaliação da resistência de *Ae. aegypti* na fase adulta à cipermetrina

Nas provas de avaliação de resistência de adultos de *Ae. aegypti* à cipermetrina (CD= 0,1 % = 37 mg i.a./m²), a geração F₂ apresentou 45,49% de mortalidade à concentração testada. A geração sobrevivente (F₃) apresentou 18,67% de mortalidade (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade em porcentagem (corrigida pela fórmula de Abbott) de adultos de *Ae. aegypti* ao longo do tempo quando submetido à dose de 0,1 % ao inseticida piretróide cipermetrina. O controle foi comparado em relação ao produto.

Horas	Geração F ₂		Teste de verificação	
	F	% mortalidade	F	% mortalidade
0	F ₂	0	F ₃	0
1	F ₂	40,16	F ₃	8,00
2	F ₂	45,49	F ₃	12,00
3	F ₂	45,49	F ₃	14,67
4	F ₂	45,49	F ₃	18,67
5	F ₂	45,49	F ₃	18,67
6	F ₂	45,49	F ₃	18,67

IV. DISCUSSÃO

O resultado obtido no Laboratório de Entomologia/SES em Belo Horizonte/MG mostrou que *Ae. aegypti* na fase de larva é resistente para o organofosforado temefós à dose diagnóstico quando comparado à linhagem padrão Rockefeller.

Nos bioensaios realizados em Dourados, a dose diagnóstico de temefós usada para *Ae. aegypti* foi superior àquela recomendada pela World Health Organization (WHO). Analisada a porcentagem de mortalidade ao longo do tempo dos produtos utilizados, somente após 8 horas de exposição ao temefós a população de *Ae. aegypti* apresentou 100% de mortalidade. Enquanto *Bti* WDG apresentou 100% de mortalidade com 4 horas de exposição, o organofosforado temefós apresentou 84,55 % de mortalidade no mesmo período. Portanto, a sobrevivência indica real resistência da população ao inseticida.

A população de adultos de *Ae. aegypti* também apresentou resistência (45,49 % de mortalidade) ao piretróide cipermetrina. No teste de verificação, as fêmeas sobreviventes apresentaram 18,67 % de mortalidade. A mortalidade foi menor que a geração parental (=F₂), portanto conclui-se que há resistência ao piretróide avaliado.

Resistência a inseticidas é um problema em todos os grupos de insetos que servem como vetores de doenças emergentes, e embora os mecanismos envolvidos sejam similares nos táxons, cada problema de resistência é potencialmente único e pode envolver um padrão complexo de focos de resistência (Brodgon & McAllister, 1998, Pasteur *et al.*, 2001). Assim, há evidências de que os elementos transponíveis (TE) responsáveis em parte pela variabilidade e biodiversidade das populações de insetos (Salvado *et al.*, 1994 *apud* Campos, 2002) possam estar implicados como iniciadores da resistência a inseticidas. No Brasil, o organofosforado temefós é usado no controle de larva de *Ae. aegypti* desde 1967 (Ministério da Saúde, 1968). Posteriormente às epidemias da dengue em 1986, os organofosforados foram intensivamente usados no controle de larvas e adultos. A partir de 1999 estes foram substituídos pelo piretróide cipermetrina no controle de adultos na grande maioria dos municípios brasileiros, exceto no estado de São Paulo, onde os piretróides são usados desde 1989 (Macoris *et al.*, 1999). E nos estados do Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas em 1999 foi detectado resistência de *Ae. aegypti* ao temefós (Funasa, 2000, Lima *et al.*, 2003, Braga *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos para os mosquitos *Ae. aegypti* das áreas sujeitas ou não a tratamento químico com inseticidas, em Dourados e as conclusões apontadas em outros trabalhos, asseguram a necessidade de monitoramentos rotineiros (Fox 1961, Brown 1986, WHO 1992, Dorta *et al.*, 1993, Mazzarri & Georghiou, 1995, Macoris *et al.*, 1995, 1999, 2003, Campos & Andrade, 2001, Lima *et al.*, 2003, Braga *et al.*, 2004). A determinação dos coeficientes angulares e das razões de resistência (RR) permite acompanhar as mudanças temporais de susceptibilidade aos produtos químicos e orienta o planejamento do manejo da resistência e das estratégias de controle a serem aplicadas. Mudanças da CL₅₀ não acompanhadas por mudanças na CL₉₅ podem ser manejadas com a troca temporária do produto. Ou caso seja econômico, pela substituição definitiva do produto por outros que não apresentem risco de resistência cruzada ou com diferente mecanismo de ação.

Portanto, é necessário não somente o monitoramento das populações de *Ae. aegypti* como de outros culicídeos neotropicais vetores transmissores de encefalites, filaríoses, bem

como o risco eminente da reintrodução da febre amarela urbana, já constatada no Estado de São Paulo e Minas Gerais.

E a possibilidade de utilização da *Bti Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como estratégia de manejo rotativo é viável, contudo não no modelo tradicional de controle preconizado pelo Ministério da Saúde, pois a *Bti* é um produto cujo efeito residual é de apenas quinze dias, sendo portanto inviável que venha a ser usada em criadouros não elimináveis domésticos a cada dois meses e não a cada quinzena. A eficiência do Vetobac, por exemplo, varia de 96 a 100% até 72 h após a aplicação do produto. Com esta alta eficiência, apesar da *Bti* atuar somente sobre larvas, ele restringe o nível populacional do *Ae. aegypti* de tal modo que o inseto seja incapaz de causar epidemia.

V. CONCLUSÕES

1. A população de *Ae. aegypti* de Dourados-MS avaliada em 2004 apresentou resistência ao organofosforado temefós e ao piretróide cipermetrina.
2. E a população de *Ae. aegypti* apresentou-se susceptível à *Bti – Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* WDG e VETOBAC.

VI. RECOMENDAÇÕES

Os resultados aqui apresentados e as discussões de outros trabalhos evidenciam a necessidade de um monitoramento rotineiro dos produtos químicos que forem utilizados no verão no controle de mosquitos como o *Ae. aegypti*.

A possibilidade de utilização da *Bti Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como estratégia de manejo rotativo é viável, contudo não no modelo tradicional de controle preconizado pelo Ministério da Saúde, pois é um produto cujo efeito residual é de apenas quinze dias.

Entre os desafios da Educação em Saúde não depende apenas orientar as pessoas, mas também do seu envolvimento para que se responsabilizem por ações, executando as que lhes

competem e exigindo dos órgãos públicos as medidas necessárias. As campanhas preventivas, na maioria emergenciais, responsabilizam a população pela ausência de participação e de apoio às medidas adotadas, tendo como consequência, a transmissão da doença. Na medida em que se substitui a idéia de erradicação para controle, a participação da comunidade se torna mais importante e, para que ela ocorra, os programas não podem ser pontuais e devem se basear em estratégias de longo prazo, pois o aprimoramento das práticas depende de uma interação permanente e contínua entre serviço público e população.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 18:265-267.

Amin AM & White GB, 1984. Resistance potential of *Culex quinquefasciatus* against the insect growth regulators methoprene and diflubenzuron. *Entomol Exp Appl.* 36:69-76.

Andrade CFS, 1989. Ecologia da supressão de populações de culicídeos e simulídeos. Tese de Doutorado, Área de Ecologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas. 253p. + 89pp.

Braga IA, Lima JBP, Soares SS & Valle D, 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(2):199-203.

Becker N, 2000. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. *In:* Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers.* p.383-98.

Brogdon WG & Mcallister JC, 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Disease.* 4(4):605-613.

Brown AWA, 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc.* 2(2):123-140.

Campos J & Andrade CFS, 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Pública.* 35(3):232-6.

Campos J, 2002. Análise citológica de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicinae). Tese de Doutorado – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP.

Campos J & Andrade CFS, 2002. Avaliação da susceptibilidade a inseticidas em *Aedes aegypti*, *A. albopictus* e *Culex quinquefasciatus* por meio de bioensaios - Protocolo para avaliação de susceptibilidade e monitoramento da resistência a inseticidas químicos usados no controle. 4 ed. Instituto de Biologia – UNICAMP. 82-100p.

Carvalho MSL, 2002. Avaliação da susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. Dissertação de Mestrado – Ciências da Saúde/UnB –BCE Brasília/DF.

Chahad S & Boof MIC, 1994. Efeitos de extratos de pimenta-preta sobre larvas de *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *An. Soc. Entomol. Brasil*. 23(1):13-8.

Consoli RAGB, Pereira JNS, Castro MMT, 1986. Suscetibilidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* (Say) e *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) a diversos inseticidas em laboratório. *Rev Bras Entomol*. 30:79-85.

Consoli RAGB & Oliveira RL, 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 225p.

Davidson G & Zahar AR, 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. *Bull. WHO* 29:475-483.

Delécluse A, Pérez VJ, Berry C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN, 2000. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p.101-26.

Dorta DM, Vasuki V, Rajavel A, 1993. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species. *Rev. Saúde Pública*. 27(6):391-397.

Fay & Eliason DA, 1966. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosquito News*. 26:531-535.

Forattini OP, 2002. Culicidologia médica. 2 ed. São Paulo: Edusp. 860p.

Fox I, 1961. Resistance of *Aedes aegypti* to certain chlorinated hydrocarbon and organophosphorus insecticides in Puerto Rico. *Bull WHO* 24:489-494.

Fraiha H, 1968. Reinfestação do Brasil pelo *Aedes aegypti*. Considerações sobre o risco da urbanização do vírus da febre amarela na região infestada. *Rev Inst Med Trop*. 10:289-94.

Funasa, 2000. Relatório da reunião de avaliação do monitoramento da resistência das populações de *Aedes aegypti* do país. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.

Funasa, 2001. Dengue - instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3. ed. 84p. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.

Galardo AKR, Braga LA & Soares SS, 2000. Evaluation of temephos susceptibility in *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro, Brazil. Em: XXI Internacional Congress of Entomology, Foz do Iguaçu, Brazil. Abstract 4976.

Glare TR, O'Callaghan M, 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley and Sons. p. 350.

Gomes AC, 1998. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* e *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* em programa de vigilância entomológica. Informativo Epidemiológico dos SUS (*IESUS*). 7:49-57.

Gomes AC, Bittencourt MD, Natal D, Barata JMS, Pinto PLS, Mucci LP, Paula MB, Ubinati PR., 1999. *Aedes albopictus* em área do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. *Rev. Saúde Pública*. 33(1):95-7.

Gomes AC, 2002. Vigilância entomológica. *IESUS*. 11(2):79-90.

Gubler DJ, 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: Its history and resurgence as a global health problem. In: Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DJ Gubler & Kuno, eds.), pp.1-22, New York: CAB *Internacional*.

IBGE, 2003. www.ibge.gov.br

Kuno G, 1995. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiologic Review*. 17:321-335.

Lima JBP, Pereira da Cunha M, Silva-Jr RCS, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D, 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 68:329-333.

Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L & Andrighetti MT, 1985. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao Temephos. *Rev. Pat. Trop*. 24(1):31-40

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB, 1999. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 33(5):521-522.

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE, 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98:703-708.

Martins F & Silva IG, 2004. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 34(2):135-138.

Massad E, Burattini MN, Coutinho FAB & Lopez LF, 2003. Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in São Paulo State, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 37(4):477-84.

Mazzarri MB, Georghiou GP, 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Cont Assoc*. 11:315-322.

Ministério da Saúde, 1968. Endemias Rurais – métodos de trabalho adotados pelo DNERu, Departamento Nacional de Endemias Rurais.

Ministério da Saúde, 2002. Nota Técnica; *Status* de resistência/susceptibilidade de *Aedes aegypti*. 9p.

Neto FC, 1997. Conhecimentos da população sobre dengue, seus vetores e medidas de controle em São José do Rio Preto, São Paulo. *Rev Saúde Pública*. 13(3):447-453.

Neto FC, Fiorin AM, Conversani DT, Cesarino MB, Barbosa AAC, Dibo MR, Moraes MS, Baglini V, Ferraz AA, Rosa RS, Battigaglia M & Cardoso Jr RP, 2003. Controle do vetor do dengue e participação da comunidade em Catanduva, São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 19(6):1739-1749.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Santos FB, Araújo ESM, Filippis AMB, Souza RV, Zagner SM, Nicolai C, Baran M, Teixeira-Filho G, 1999. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94:297-304.

Paho, 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas – Guías para su prevención y control. *Pan American Health Organization, Pub Cient* n. 548, 110p. Washington, D.C.

Pasteur N, Nancé E & Bons N, 2001. Tissue localization of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 38(6):791-801.

Penna MGF, 2003. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cad Saúde Pública*. 19(1):305-309.

Pinheiro VCS & Tadei WP, 2002. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 18(6):1529-1536.

Polanczyk RA, Garcia MO & Alves, SB, 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*. 37(6):813-6.

Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, 2001. Bacteriological larvicides of diptera disease vectors. *Trends Parasitol*. 17:377-80.

Rodhain F, Rosen L, 1997. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In DJ Gubler, G Kuno (eds), *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, CAB International, New York, p.45-60.

Sighamoni S, Anees I, Chandrakal T & Osmani Z, 1986. Efficacy of certain indigenous plant products as grain protections against *Sitophilus oryzae* (F.). *J Stored Prod Res*. 22:21-22.

Silva-Filha MH, Regis L, Nielsen-LeRoux C & Charles JF, 1995. Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus*. *J Econ Entomol.* 88:525-530.

Tauil PL, 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad. Saúde Pública.* v.17 suplemento.

Tauil PL, 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública.* 18:867-71.

Vilarinhos PTR, Dias JMCS, Andrade CFS, Araújo-Coutinho CJPC. 1998. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. *In: Alves SB. Controle microbiano de insetos.* Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. p.447-80.

WHO, 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. *WHO/VBC/81:807*, World Health Organization, Geneva.

WHO, 1992. Vector resistance to pesticides. *WHO Tech. Rep. Ser.* 818. 63p. World Health Organization, Geneva.

WHO, 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnostic, treatment, prevention and control, 2 nd ed. p.84, World Health Organization, Geneva.

WHO, 1999. Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. World Health Organization, Geneva.