

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSIANE SOMARIVA PROPHIRO

**SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) E DE *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) (DIPTERA: CULICIDAE) A ORGANOFOSFORADO E ATIVIDADE INSETICIDA DE PRODUTOS DE ORIGEM BOTÂNICA**

CURITIBA

2008

**JOSIANE SOMARIVA PROPHIRO**

**SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) E DE *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) (DIPTERA: CULICIDAE) A ORGANOFOSFORADO E ATIVIDADE INSETICIDA DE PRODUTOS DE ORIGEM BOTÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Co-orientadora: Prof. Dra. Onilda Santos da Silva

**CURITIBA**

**2008**

Aos meus pais, Porfirio Passarela Prophiro (*in memoriam*) e Irene Somariva Prophiro.  
Ao meu namorado Ricardo Israel Castilhos.  
Por todo amor e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, bênção e proteção.

Aos meus pais Porfirio Passarela Prophiro (*in memoriam*) e Irene Somariva Prophiro por quem sou e pelo incentivo na minha formação acadêmica.

Ao professor Mário Antônio Navarro da Silva, pela acolhida, confiança, amizade, orientação e especialmente pelo exemplo de paciência.

À professora Onilda Santos da Silva, pela amizade, apoio, incentivo, co-orientação e, sobretudo por me escutar nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Ricardo Israel Castilhos, pelo amor, companheirismo e principalmente pela compreensão da minha ausência.

Ao Dr. Jonny Edward Duque Luna, pela amizade, paciência, incentivo nos momentos difíceis e principalmente pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Kanis da Universidade do Sul de Santa Catarina, pelo auxílio na realização deste trabalho.

A Marileusa Guimarães e Lucas Damiani pela acolhida em sua casa, carinho e principalmente pela amizade.

À Msc. Lisiane de Castro Poncio e Msc. Ana Caroline Dalla Bona, pela amizade, conselhos, convivência, ajuda nas férias e pelas tardes de pipoca.

A Carla F. Piccoli e Isabel C. de Assumpção pelo auxílio nos experimentos no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária – UFPR. Louyse Carlyne de B. P. da Rocha, Bruna M. da Silva e Flávia V. Fonseca pelo auxílio nos experimentos no Laboratório de Imunoparasitologia – UNISUL.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, Gerson, Ana Tissot, Eduardo, Allan, Elaine, Milena e Carol pela amizade.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Entomologia, Marcelo, Mariane, Thiago, Amanda, Jana Magaly, Geovan e Eduardo pela convivência.

À Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, de maneira especial ao coordenador da parte de entomologia, Allan Martins, pela colaboração no envio do material para os bioensaios.

A Universidade do Sul de Santa Catarina, de maneira especial ao Dr. Luiz Alberto Kanis, pelo auxílio e infra-estrutura disponibilizados para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa.

O que pode ser mais comovente que olhar para uma galáxia distante através de um telescópio de 2,5 metros, ter nas mãos um fóssil de 100 milhões de anos ou uma ferramenta de pedra de 500 mil anos, ver-se diante do imenso abismo temporal e espacial que é o Grand Canyon ou ouvir um cientista que ficou, sem pestanejar, cara a cara com a criação do universo? Isso é a profunda e sagrada ciência.

Michael Shermer

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- FIGURA 1- Mapa do Brasil, destacando parte da região sul e os municípios analisados do Estado do Paraná – Brasil.....32
- FIGURA 2 - Amostra de paleta recebida, identificação e individualização, indução a eclosão larval, estabelecimento das colônias, obtenção de ovos para os bioensaios, indução a eclosão com larvas de idade sincronizada e triagem das larvas para os bioensaios .....35
- FIGURA 3 - Modelo de análise de susceptibilidade ao inseticida temefós.....37
- FIGURA 4 - Fórmula para cálculo do índice de dispersão .....38
- FIGURA 5 - Fórmula para cálculo da razão sexual .....39

### CAPÍTULO II

- FIGURA 1 - Mapa do Brasil, destacando os municípios analisados do Estado do Paraná – Brasil.....75
- FIGURA 2 - Amostra de paleta recebida, identificação e individualização, indução a eclosão larval, estabelecimento das colônias, obtenção de ovos para os bioensaios, indução a eclosão com larvas de idade sincronizada e triagem das larvas para os bioensaios .....77
- FIGURA 3 - Modelo de análise de susceptibilidade aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, sob diferentes temperaturas .....80
- FIGURA 4 - Modelo de análise do período de atividade larvicida dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, sob temperatura constante .....81
- FIGURA 5 - Modelo de análise do efeito residual dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, sob temperatura constante .....82

FIGURA 6 - Modelo de análise para o efeito de concentrações sub-letais dos óleos de <i>C. guianensis</i> e <i>Copaifera</i> , sob temperatura constante.....	83
FIGURA 7 - Comparações múltiplas entre o efeito larvicida causado pelo óleo de <i>C. guianensis</i> nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C.....	91
FIGURA 8 - Comparações múltiplas entre o efeito larvicida causado pelo óleo de <i>Copaifera</i> nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C .....	92
FIGURA 9a - Larvas de <i>A. aegypti</i> expostas ao óleo de <i>C. guianensis</i> .....	93
FIGURA 9b - Larva de <i>A. aegypti</i> exposta ao óleo de <i>C. guianensis</i> .....	93
FIGURA 10a- Larvas de <i>A. aegypti</i> expostas ao óleo de <i>Copaifera</i> .....	94
FIGURA 10b- Larvas de <i>A. aegypti</i> expostas ao óleo de <i>Copaifera</i> .....	94
FIGURA 11 - Período de atividade larvicida, em horas, sob soluções contendo óleo de <i>Carapa guianensis</i> (500 mg/L) e de <i>Copaifera</i> (90mg/L) em populações de <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller na temperatura 25°C, 85% UR e 14:10 C/E .....	96
FIGURA 12 - Período de atividade larvicida, em horas, sob soluções contendo óleo de <i>Carapa guianensis</i> (1400 mg/L) e de <i>Copaifera</i> (150mg/L) em população de <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller na temperatura 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.....	97
FIGURA 13 - Efeito residual, em dias da atividade larvicida, de soluções contendo óleo de <i>Copaifera</i> (150mg/L) e <i>Carapa guianensis</i> (1.400 mg/L) em populações de <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller na temperatura 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.....	98
FIGURA 14 - Pupas de <i>A. aegypti</i> (cepa: Rockefeller) pertencente ao grupo controle polisorbato 80.....	100
FIGURA 15 - Pupas de <i>A. aegypti</i> (cepa: Rockefeller), expostas à concentração letal de 48 mg/L (CL <sub>50</sub> ), de <i>Copaifera</i> que não se desenvolveram ao estágio adulto.....	101
FIGURA 16- Emergência incompleta de <i>A. aegypti</i> (cepa: Rockefeller), exposto à concentração letal de 48 mg/L (CL <sub>50</sub> ), de <i>Copaifera</i> .....	102
FIGURA 17 - Pupas de <i>A. aegypti</i> (cepa: Rockefeller), expostas à concentração letal de 32 mg/L (CL <sub>20</sub> ) de <i>Copaifera</i> que não se desenvolveram ao estágio adulto .....	102
FIGURA 18a-Emergência incompleta de <i>A. aegypti</i> (cepa: Rockefeller), exposto à concentração letal 32 mg/L (CL <sub>20</sub> ) de <i>Copaifera</i> .....	103

FIGURA 18b -Detalhe emergência incompleta de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller),  
exposto à concentração letal 32 mg/L (CL<sub>20</sub>) de *Copaifera*..... 103

FIGURA 19 - Pupas de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller), pertencente ao grupo controle  
DMSO..... 104

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- TABELA 1 - Número de paletas positivas, atividade de oviposição, eclosão de adultos e sexagem de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* nos municípios de Ubitatã, Santa Helena, Foz do Iguaçu sul e Foz do Iguaçu norte, durante o verão de 2006/2007 .....42
- TABELA 2 - Número total de paletas, percentagem de palhetas positivas, razão sexual de *Aedes aegypti* e de *Aedes albopictus* nos municípios de Ubitatã, Santa Helena, Foz do Iguaçu sul e Foz do Iguaçu norte, durante o verão de 2006/2007 ...42
- TABELA 3 - Análise comparativa entre as populações avaliadas: frequência de oviposição, número de adultos e localidades e as duas espécies, *A. aegypti* e *A. albopictus* de diferentes municípios do estado do Paraná, durante o verão 2006/2007 .....43
- TABELA 4 - Índices de dispersão e parâmetro K, em relação à disposição espacial da oviposição de *Aedes* spp. nos municípios de Ubitatã, Santa Helena, Foz do Iguaçu setor sul e Foz do Iguaçu setor norte, durante o verão 2006/2007.....43
- TABELA 5 - Bioensaios com a concentração diagnóstico 0.0060 mg/L (calibrada com a cepa Rockefeller) em larvas de *A. aegypti* provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná e *A. albopictus* provenientes do estado do Paraná e de Santa Catarina, durante o verão 2006/2007 .....46
- TABELA 6 - Municípios avaliados, espécies e geração utilizada, concentrações letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e razão de resistência (RR<sub>50</sub> e RR<sub>95</sub>) em populações de *A. aegypti* e *A. albopictus* de municípios do estado do Paraná e *A. albopictus* do estado de Santa Catarina, no verão de 2006/2007 .....47

## CAPÍTULO II

TABELA 1 - Municípios avaliados, geração utilizada, concentrações letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, provenientes de municípios do Estado do Paraná e cepa Rockefeller, após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Carapa guianensis*, na temperatura de 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.....87

TABELA 2 - Municípios avaliados, geração utilizada, concentrações letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, provenientes de municípios do Estado do Paraná e cepa Rockefeller, após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Copaifera*, na temperatura de 25°C, 85% UR e 14:10 C/E .....88

TABELA 3 - Populações analisadas, temperatura e concentração letal 50% (CL<sub>50</sub> mg/L) com respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller e proveniente do município de Foz do Iguaçu (PR), após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Carapa guianensis*, na temperatura de 15, 20, 25 e 30°C, 85% UR e 14:10 C/E .....89

TABELA 4 - Populações analisadas, temperatura e concentração letal 50% (CL<sub>50</sub> mg/L) com respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller e proveniente do município de Foz do Iguaçu (PR), após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Copaifera*, na temperatura de 15, 20, 25 e 30°C, 85% UR e 14:10 C/E .....90

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	15
1.1 Dengue.....	15
1.2 Vetores do dengue .....	16
1.3 Dengue no Brasil.....	18
1.4 Dengue na região sul .....	19
1.5 Justificativa.....	20
REFERÊNCIAS.....	21

CAPÍTULO I - Coexistência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) e análise de suscetibilidade destas populações ao inseticida Temefós nos municípios com ocorrência de casos de dengue no Estado do Paraná – Brasil.....

RESUMO.....	25
ABSTRACT .....	26
1. INTRODUÇÃO .....	27
2. OBJETIVO GERAL.....	30
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Área de estudo .....	31
3.1.1 Caracterização dos municípios analisados .....	31
3.2 Coleta de material .....	33
3.3 Bioensaios.....	36
3.4 Análise de resultados biológicos .....	38
3.5 Análise de resultados dos bioensaios .....	39
4. RESULTADOS .....	41
4.1 Biológicos.....	41
4.2 Concentração diagnóstico, concentrações múltiplas e razão de resistência.....	44
5. DISCUSSÃO .....	48
5.1 Biológicos .....	48
5.2 Concentração diagnóstico, concentrações múltiplas e razão de resistência.....	51
6. CONCLUSÕES .....	57

REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO II - Óleos de <i>Carapa guianensis</i> (Aublet) (Meliaceae) e <i>Copaifera</i> sp. (Linnaeus) (Leguminosae), análise do seu efeito larvicida e no desenvolvimento de imaturos de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).....	66
RESUMO.....	67
ABSTRACT .....	68
1. INTRODUÇÃO .....	69
2. OBJETIVO GERAL.....	73
2.1 OBJETIVOS EXPECÍFICOS .....	73
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	74
3.1 Área de estudo .....	74
3.2 Coleta de material .....	74
3.3 Obtenção dos óleos.....	78
3.4 Preparo das soluções.....	78
3.5 Bioensaios.....	79
3.5.1 Efeito larvicida .....	79
3.5.2 Período de atividade larvicida .....	80
3.5.3 Efeito residual.....	81
3.5.4 Efeito sub-letal.....	82
3.6 Análise estatística.....	84
4. RESULTADOS .....	85
4.1 Efeito larvicida .....	85
4.2 Período de atividade larvicida .....	95
4.3 Efeito residual.....	95
4.4 Efeito sub-letal.....	99
5. DISCUSSÃO .....	105
5.1 Efeito larvicida .....	105
5.2 Período de atividade larvicida .....	107
5.3 Efeito Residual .....	108
5.4 Efeito sub-letal.....	109
6. CONCLUSÕES .....	112
REFERÊNCIAS.....	113

## RESUMO

Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e atividade inseticida de produtos de origem botânica. Esta dissertação foi desenvolvida, devido à grande incidência da dengue nos últimos anos no Paraná, bem como a alta dispersão de *A. aegypti* e de *A. albopictus* neste estado. O estudo foi então baseado em fatores de vigilância entomológica e possibilidades de controle dos vetores. No processo de vigilância entomológica, o monitoramento de comportamentos biológicos de *A. aegypti* e de *A. albopictus* é um fator muito importante, pois fornece informações para o entendimento da transmissão de arboviroses, como a dengue e a febre amarela. Outro fator importante é o conhecimento sobre o desenvolvimento de resistência destes vetores a inseticidas químicos. Assim, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos: Capítulo I - Coexistência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) e análise da suscetibilidade destas populações ao inseticida Temefós nos municípios com ocorrência de casos de dengue no Estado do Paraná - Brasil. Neste capítulo, observou-se a coexistência de *A. aegypti* e *A. albopictus* além da agregação de seus ovos, indicando que as duas espécies estão sobre o mesmo processo de pressão seletiva. Amostras de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu (sul e norte) apresentaram menor susceptibilidade, indicando processo de estabelecimento de resistência ao temefós. Todas as populações de *A. albopictus*, provenientes do estado do Paraná e Santa Catarina, evidenciaram insipiente alteração do status de susceptibilidade ao organofosforado temefós. Capítulo II - Óleos de *Carapa guianensis* (Aublet) (Meliaceae) e *Copaifera* sp. (Linnaeus) (Leguminosae), análise do seu efeito larvicida e no desenvolvimento de imaturos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Neste capítulo, analisou-se a susceptibilidade de *A. aegypti*, provenientes de campo e de laboratório, aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*. As mortalidades, causadas pelas soluções contendo óleos de *C. guianensis* e de *Copaifera* na temperatura de 25°C, evidenciam que as populações naturais de *A. aegypti* analisadas são susceptíveis aos óleos, assim como a cepa Rockefeller. A eficácia dos óleos para letalidade foi relacionada ao aumento da temperatura. A letalidade larval, causada pelo óleo de *C. guianensis* e de *Copaifera*, ocorreu em menos de três horas de exposição. A persistência larvicida de *Copaifera* e principalmente de *C. guianensis*, evidenciou a eficácia destes óleos por períodos superiores há 20 dias. Também foram observadas alterações no período de desenvolvimento de *A. aegypti*, expostos a concentrações sub-letais de *C. guianensis* e de *Copaifera*, como o prolongamento do estágio imaturo e alterações morfológicas que inviabilizaram a emergência dos adultos. Assim, os óleos de *C. guianensis* e de *Copaifera* demonstram eficácia no controle de *A. aegypti*, tanto como larvicida quanto sob efeito no desenvolvimento biológico deste vetor.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. Coexistência. Susceptibilidade. Organofosforado. Dengue. *Carapa guianensis*. *Copaifera*. Larvicida botânico. Persistência. Efeito sub-letal.

## ABSTRACT

Susceptibility of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) the organophosphate and insecticide activity products of botanical origin. This thesis was developed, due to a great incidence of dengue fever in the Paraná, recent years, as well as the high dispersion of *A. aegypti* and *A. albopictus* in this state. The study was then based on factors of entomological monitoring and possibilities of vector control. In the process of entomological monitoring, biological behaviors of *A. aegypti* and *A. albopictus* is a very important factor, therefore it supplies information to the agreement of arbovirose transmissions as dengue fever and yellow fever. Another important factor is the knowledge of development of resistance of these vectors to chemical insecticides. Thus, this work was divided into two chapters: Chapter I - Coexistence of *Aedes* (*Stegomyia*) and *Aedes aegypti* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) and susceptibility analysis of these populations to Temephos insecticide in municipalities with occurrence of dengue cases in the state of Parana - Brazil. In this chapter, the coexistence between *A. aegypti* and *A. albopictus* and the aggregation for their eggs were observed in all the analyzed cities, indicating that both species are on the same process of selective pressure. Samples of *A. aegypti* of Foz do Iguaçu (south and north) presented minor susceptibility, indicating process of resistance establishment to organophosphate temephos. All *A. albopictus* populations, which proceeded from Paraná and Santa Catarina States, demonstrated weak alteration in the susceptibility status to organophosphate temephos. Chapter II - Oil *Carapa guianensis* (Aublet) (Meliaceae) and *Copaifera* sp. (Linnaeus) (Leguminosae), analysis the effect of larvicidal and the development of immature of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In this chapter the susceptibility of *A. aegypti*, from field and laboratory, to oils of *C. guianensis* and *Copaifera* was analyzed. Larvae mortality occurred by the exposure to the solutions containing *C. guianensis* and *Copaifera* oils in the temperature of 25°C, evidencing that the natural populations of *A. aegypti* analyzed were susceptible to the oils, as well as, of Rockefeller strain. The efficacy of the oils for lethality was directly related to the increase of the temperature. The larval lethality, caused by the oils of *C. guianensis* and *Copaifera*, occurred in less than three hours of exposure. The persistence of *Copaifera* and mainly *C. guianensis* as larvicidal, evidenced the efficacy of these oils for periods of more than 20 days. Were also observed changes in populations of *A. aegypti* when placed into the sub-lethal concentrations of *C. guianensis* and *Copaifera*. It demonstrated delay in the development of immature instars. Also some morphologic alterations were observed as hinder in the emergency of adults. In this way the oils demonstrate to be effective not only as larvicidal but also in the biological development of this vector.

Key words: *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. Coexistence. Susceptibility. Organophosphate. Dengue. *Carapa guianensis*. *Copaifera*. Botanical larvicida. Persistence. Sub-lethal effect.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Dengue

A dengue é considerada uma das mais importantes arboviroses que afetam o homem, em termos de morbidade e mortalidade. Estima-se que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente em mais de 100 países de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue (SVS 2005). Conforme a Organização Mundial da Saúde (2008), durante uma epidemia de dengue, as taxas de infecção entre indivíduos suscetíveis ao vírus são de 40 a 50%, mas podem chegar de 80 a 90%. Sem tratamento adequado, o índice de mortalidade causada por febre hemorrágica da dengue pode exceder 20%.

Esta arbovirose caracteriza-se por estado febril agudo que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresenta. Podendo ser infecção assintomática, dengue clássica, febre hemorrágica da dengue ou síndrome do choque da dengue. A dengue clássica, em geral, se inicia abruptamente com febre alta (39° a 40°), seguida de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retroorbitária, náuseas, vômitos, exantema, prurido cutâneo, hepatomegalia, dor abdominal generalizada. Pequenas manifestações hemorrágicas como petéquias, epistaxe, gengivorragia, sangramento gastrointestinal, hematúria e metrorragia podem ocorrer. Dura cerca de cinco a sete dias, quando há regressão dos sinais e sintomas, podendo persistir a fadiga. 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 (MS/SVS 2006).

A forma assintomática é considerada de grande importância epidemiológica, pois constitui fonte silenciosa de transmissão do vírus dengue, podendo carrear o vírus para áreas indenes, porém infestadas com o vetor (Vasconcelos *et al.* 1998).

Atualmente, a dengue é considerada a mais importante arbovirose que afeta o ser humano e constitui sério problema de saúde pública no mundo. Ocorre e dissemina-se especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do vetor. Nas últimas décadas, vem apresentando elevado crescimento do número de casos e de países acometidos (Barrera *et al.* 2000; Gluber 2001; MS/SVS 2006).

A febre hemorrágica da dengue foi reconhecida pela primeira vez na década de 1950, durante epidemias nas Filipinas e Tailândia. Até a década de 1970, nove países apresentavam epidemias de febre hemorrágica da dengue, atualmente, este número quadruplicou. Os países com maior incidência localizam-se, principalmente, nas Américas e na Ásia, onde há circulação de todos os quatro sorotipos. A febre hemorrágica da dengue tornou-se uma das principais causas de hospitalização e morte entre as crianças em vários países (WHO 2008).

Devido à ausência de vacina tetravalente eficaz, atualmente, o controle vetorial é o único método disponível para a prevenção e o controle da dengue e febre hemorrágica da dengue. Pesquisas estão obtendo progressos no desenvolvimento de vacinas que possam proteger contra todos os quatro sorotipos virais da dengue, entretanto, ainda não há previsão para a aplicação (WHO 2008).

Tanto a forma clássica como a hemorrágica da dengue são causadas por vírus (RNA) da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*. Atualmente, são conhecidos quatro sorotipos virais (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) (Gluber 2001).

## 1.2 Vetores do vírus dengue

Os vetores são mosquitos do gênero *Aedes*. Nas Américas, o vírus da dengue persiste na natureza mediante o ciclo de transmissão homem > vetor > homem. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é o principal vetor do vírus da dengue, espécie considerada extremamente antropofílica. Foi erradicada de vários países do continente americano nas décadas de 1950 e 1960, retornando na década de 1970 por falhas na vigilância epidemiológica e pelas mudanças sociais e ambientais propiciadas pela urbanização acelerada. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), já presente nas Américas

e com ampla dispersão no Brasil, até o momento não foi associado à transmissão do vírus da dengue nas Américas. A fonte da infecção e hospedeiro vertebrado é o homem. Na Ásia e na África foi descrito um ciclo selvagem envolvendo o macaco como hospedeiro vertebrado (SVS/MS 2006).

As razões para o ressurgimento global de epidemias de dengue não estão completamente compreendidas, mas estão relacionadas a mudanças demográficas e sociais, incluindo o aumento do fluxo populacional (Vanwambeke *et al.* 2006).

A infecção do vetor com o vírus da dengue ocorre através da ingestão de sangue contendo partículas virais, estando o mosquito apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. Logo, a transmissão ao homem se faz pela picada da fêmea infectada de *A. aegypti*. A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro suscetível próximo (SVS/MS 2006). Além disso, os sorotipos virais também podem ser transmitidos entre mosquitos, o que reforça o papel dos vetores na manutenção e amplificação no ambiente, principalmente quando a densidade de vertebrados suscetíveis é baixa. A transmissão entre vetores pode ocorrer por via vertical, quando o vírus infecta o óvulo ou o ovo, ou por via venérea, quando machos, que herdaram a infecção de sua progenitora transmitem o vírus no líquido seminal (Rosen *et al.* 1983, Joshi *et al.* 2002).

A infecção por um dos quatro sorotipos virais da dengue confere imunidade apenas contra esse sorotipo, e, algumas vezes, proteção parcial contra a infecção posterior pelos outros três sorotipos. A infecção seqüencial aumenta o risco de desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue, forma mais letal da doença (WHO 2008).

A fêmea de *A. aegypti* coloca seus ovos em locais como tonéis, pneus, vasos de plantas, entre outros (Saúde Brasil 2004; SVS 2005). A oviposição ocorre frequentemente nas paredes úmidas dos criadouros, ou seja, um pouco acima da superfície líquida (Forattini 2002; Natal 2002). A quantidade de posturas de cada fêmea de *A. aegypti* depende essencialmente da disponibilidade de sangue ingerido para o desenvolvimento ovariano. O repasto satisfatório poderá ser alcançado com 3,0 a 3,5 mg de sangue, podendo ser produzido cerca de 120 ovos por fêmea (Forattini 2002).

Geralmente, a fêmea faz uma postura após cada repasto sangüíneo. O intervalo entre a alimentação sangüínea e a postura é, em regra, de três dias, em

condições de temperatura satisfatórias. Com frequência, a fêmea se alimenta mais de uma vez, entre duas posturas sucessivas, em especial quando perturbada antes de totalmente ingurgitada. Este fato resulta na variação de hospedeiros, com disseminação do vírus a vários deles (Barata *et al.* 2001; Natal 2002).

Após a oviposição há o período de incubação, em que os ovos passam um tempo no meio ambiente para que ocorra a embriogênese e a formação de larvas. Em condições favoráveis varia de quatro a sete dias. Caso contrário o período de incubação poderá ser prolongado até que haja condições favoráveis. Estas, acontecendo, determinam à eclosão ou saída da larva de primeiro estágio. Entretanto, se após o completo amadurecimento do ovo, este se encontrar em situação adversa, poderá entrar em período de diapausa. Este período poderá se prolongar por seis meses ou mais, até que surja condição favorável para eclosão. Os ovos eclodem apenas se estiverem em contato com a água, dando origem à larva de 1º estágio (Forattini 2002).

Em geral o período larval é mais longo para as fêmeas, o que acarreta a emergência posterior destas em relação aos machos. Admite-se que a proporção entre os sexos seja de aproximadamente 50% para cada um (CVAS 2005).

### **1.3 Dengue no Brasil**

Nos últimos anos, grandes epidemias de dengue têm acontecido no mundo, e, no Brasil, a situação é caracterizada principalmente pela grande infestação vetorial em todas as regiões. Em 2007, notificou-se mais de 890.000 casos de dengue nas Américas, dos quais 26.000 casos foram de febre hemorrágica da dengue (WHO 2008).

No Brasil, o nível endêmico de dengue já alterou os indicadores de morbidade, e a magnitude destas incidências nos últimos anos superou a de todas as outras doenças de notificação compulsória (Teixeira *et al.* 2005). O país foi responsável por 85% dos casos de dengue notificados nas Américas do Sul e Central, em 2006 (OPAS 2006).

No verão de 2002, ocorreu uma grande epidemia de dengue no país. Como resultado, o Ministério da Saúde registrou mais de 794.219 casos, entre eles a

dengue clássica, febre hemorrágica da dengue e mortes por síndrome do choque. Devido à ação de campanhas de combate e controle do mosquito vetor, o número de casos notificados decresceu para 341.776 no ano de 2003 (SVS 2005a), e para 112.918 em 2004 (SVS 2005b). Entretanto, em 2005 foi notificado um total de 203.789 casos de dengue (SVS 2005c), em 2006 foram registrados 345.922 casos (SVS 2006) e em 2007 foram registrados 559.954 casos (SVS 2008a). No ano de 2008, até o mês de abril, foram confirmados 230.829 casos suspeitos de dengue, 1.069 casos confirmados de febre hemorrágica da dengue e a ocorrência de 77 óbitos resultando em uma taxa de letalidade para febre hemorrágica da dengue de 7,2%. Também foram notificados 3.298 casos de dengue com complicação, com 53 óbitos (SVS 2008b).

#### **1.4 Dengue na região sul**

A região sul, em 2006, apresentou a menor taxa de incidência do país, com 20 casos de dengue por 100.000 habitantes. O Estado do Paraná registrou 5.196 casos, sendo que os municípios de Londrina e Foz do Iguaçu contribuíram com a maior parte dos casos. Os Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul não apresentaram transmissão autóctone de dengue (SVS 2006).

Em 2007, a região sul notificou 50.841 casos de dengue, sendo que o Estado do Paraná confirmou nove casos de febre hemorrágica com cinco óbitos. Esta região apresentou o maior aumento no número de casos se comparado com o mesmo período de 2006 (807%), em virtude das transmissões ocorridas em vários municípios do Estado do Paraná. Neste Estado foram registrados 48.858 casos, sendo que Maringá notificou 8.356 casos, Foz do Iguaçu 4.630 casos, Londrina 3.777 casos e Umuarama 1.877 casos. O Estado de Santa Catarina continuou sem transmissão autóctone de dengue e registrou 678 casos importados. O Estado do Rio Grande do Sul notificou o primeiro caso confirmado de dengue autóctone em abril de 2007, tendo sido notificados 1.305 casos de dengue, com a confirmação de 262 casos autóctones, distribuídos nos municípios de Giruá, Erechim, Três de Maio, Horizontina e Tuparendi (SVS 2008a).

A região sul, até o mês de abril de 2008, notificou 6.769 casos de dengue, apresentando uma redução de 72,6% quando comparado com o mesmo período de 2007. No Estado do Paraná, foram registrados 6.108 casos, com redução de 74,8% em relação ao mesmo período do ano anterior e foi o único estado, desta região, a apresentar transmissão autóctone. Os municípios deste estado com maior número de notificações foram: Maringá, Londrina, Ibiporã, Foz do Iguaçu e Jataizinho. No Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram registrados 317 e 344 casos, respectivamente, sendo todos considerados importados embora o Rio Grande do Sul tenha apresentado transmissão autóctone no ano anterior (SVS 2008b).

### 1.5 Justificativa

Diante de grande incidência da dengue e da alta dispersão, densidade e coexistência de *A. aegypti* e de *A. albopictus* verificada nos últimos anos se faz necessário, no processo de vigilância entomológica, o monitoramento de aspectos biológicos, assim como o processo de resistência e o desenvolvimento de metodologias alternativas aos inseticidas organofosforados. Sobretudo, fornecendo informações que possam contribuir efetivamente no controle destas espécies de Culicidae e de arboviroses, como a dengue e a febre amarela.

Assim, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos:

Capítulo I - Coexistência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) e análise da suscetibilidade destas populações ao inseticida Temefós nos municípios com ocorrência de casos de dengue no Estado do Paraná - Brasil.

Capítulo II - Óleos de *Carapa guianensis* (Aublet) (Meliaceae) e *Copaifera* sp. (Linnaeus) (Leguminosae), análise do seu efeito larvicida e no desenvolvimento de imaturos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

## REFERÊNCIAS

Barata, E.A.M.F., A.I.P. Costa, F. Chiaravalloti, C. M. Glasser, J.M.S. Barata & D. Natal. 2001. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública 35**: 237-242.

Barrera R., N. Delgado, M. Jiménez, I.Villalobos & I. Romero. 2000. Estratificación de una ciudad hiperendémica en dengue hemorrágico. **Revista Panamericana de Salud Pública 8**: 225-233.

CVAS - Coordenação de Vigilância Ambiental em Saúde. 2005. **Centro de Estudos e Pesquisa em Antropozoonoses Máximo da Fonseca Filho**. Disponível em < <http://www.saude.rj.gov.br/cvas/cepa.shtml#mosquitos> > Acessado em 21 de outubro de 2005.

Forattini, O.P. 2002. **Culicidologia Médica**, vol.2. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 864p.

Gluber, D.J. 2001. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences 951**: 13-24.

Joshi, V., D.T. Mourya & R.C. Sharma. 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67**: 158-161.

Natal, D. 2002. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico 64**: 205-207.

Pan American Health Organization. **Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion)**. 2006 [Acesso em: 01/03/07]. Disponível em < <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2006.htm> > Acessado em

Rosen, L., D.A. Shroyer, R.B. Tesh, J.E. Freier & J.C. Lien. 1983. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32**: 1108-1119.

Saúde Brasil. 2004. **Uma análise da situação de saúde** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

SVS/MS. 2005a. **Situação atual da dengue no Brasil.** Disponível em <  
[http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be\\_dengue\\_14\\_2005.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be_dengue_14_2005.pdf)>  
Acessado em 08/08/2005.

SVS/MS. 2005b. **Situação atual da dengue no Brasil.** Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_da\\_dengue\\_semana24\\_2005.p  
df](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_da_dengue_semana24_2005.pdf)> Acessado em 28/08/2005.

SVS/MS. 2005c. **Dengue - Boletim da semana 52 / 2005.** Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_52.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_52.pdf)  
Acessado em 19/01/2006.

SVS. 2005. **Dengue.** disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21429](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21429) > Acessado  
em agosto de 2005.

SVS/MS. 2006. **Situação Epidemiológica da Dengue Janeiro a Março de 2006.**  
Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_13.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_13.pdf)> Acessado em  
05/06/2006.

SVS/MS. 2006. **Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Guia de bolso. 4ª edição  
ampliada. Disponível em <  
[http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GBDIP/guia\\_bolso\\_4ed.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GBDIP/guia_bolso_4ed.pdf)>Acessado em março  
de 2008.

SVS/MS. 2008a. **Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de  
2007.** Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_010208.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf) >  
Acessado em 20/02/2008.

SVS/MS. 2008b. **Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Abril de 2008.**  
Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_maio2008.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_maio2008.pdf) >  
Acessado em 08/06/2008.

Teixeira, M.G., M.C. Costa, M.L. Barreto & E. Mota. 2005. Dengue and dengue  
hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends,  
surveillance, and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública** 21: 1307-1315.

Vanwambeke, S.O., B.H.V. Benthem, N. Khantikul, C. Burghoorn-Maas, K. Panart, L. Oskam, E.F. Lambin & P. Somboon. 2006. Multilevel analyses of spatial and temporal determinants for dengue infection. **International Journal of Health Geographics 5**: 5.

Vasconcelos, P.F.C., J.W.O. Lima, A.P.A.T. Rosa, M.J. Timbó, E.S.T. Rosa, H.R. Lima, S.G. Rodrigues & J.F.S.T. Rosa. 1998. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. **Revista de Saúde Pública 32**: 447-454.

WHO. 1997. **Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnostic, Treatment, Prevention and Control**, 2 ed., Geneva.

WHO. 2008. **Dengue/dengue haemorrhagic fever**. Disponível em <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>> Acessado em 12/06/2008.

## CAPÍTULO I

**Coexistência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*  
(Diptera: Culicidae) e análise de suscetibilidade destas populações ao  
inseticida Temefós nos municípios com ocorrência de casos de dengue no  
Estado do Paraná - Brasil**

## RESUMO

O monitoramento de comportamentos biológicos, de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), assim como o desenvolvimento de resistência destes vetores é imprescindível no processo de vigilância entomológica. Um monitoramento fornece informações importantes na transmissão de arboviroses, como a dengue e a febre amarela. O presente estudo teve como objetivo verificar a coexistência de populações de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, em municípios com ocorrência de casos de dengue no Estado do Paraná – Brasil, além de avaliar sua suscetibilidade ao organofosforado temefós. As populações analisadas foram provenientes de Uiratã, Santa Helena, Foz do Iguaçu - setor sul e Foz do Iguaçu - setor norte, obtidas através de armadilhas de oviposição. A suscetibilidade das populações ao temefós, foi analisada para estimar os valores das  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  e determinar as razões de resistência  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ , utilizando-se a linhagem Rockefeller como controle. Foram estabelecidas oito concentrações, com quatro réplicas cada, tanto para as populações avaliadas como para a linhagem Rockefeller. Os bioensaios seguiram o protocolo da Organização Mundial da Saúde, com concentração diagnóstico 0,0060 mg/L. Para a oviposição das fêmeas 345 armadilhas foram instaladas, e, destas, 63% contiveram um total de 11.220 ovos. Estes foram submetidos à eclosão no laboratório, dos quais se obteve 6.132 adultos, sendo 3.222 *A. aegypti* e 2.910 *A. albopictus*. O número de palhetas positivas variou de 56% a 78% com a percentagem de emergência de adultos entre 35% a 77%, sendo detectada em frequência elevada a presença simultânea de ambas as espécies. A relação entre sexos aproximou-se do esperado (1:1) em todas as localidades para ambas as espécies. Os resultados indicaram que, a partir da concentração diagnóstico 0,0060 mg/L, as percentagens de mortalidade das populações foram: Foz do Iguaçu setor norte 75.94 e sul 77.5, Santa Helena 99.06 e Uiratã 98.44. As concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ) foram: 0,00373 e 0,00916 mg/L para Foz do Iguaçu setor norte, 0,00383 e 0,01062 mg/L para setor sul, 0,00259 e 0,00483 mg/L para Santa Helena e 0,00283 e 0,00498 mg/L para a cidade de Uiratã. As razões de resistência ( $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ ) foram: 2,23 e 3,12 para Foz do Iguaçu setor norte, 2,29 e 3,62 para Foz do Iguaçu setor sul, 1,55 e 1,64 para Santa Helena e 1,69 e 1,69 para a cidade de Uiratã. Coexistência de *A. aegypti* e *A. albopictus* e a agregação de seus ovos foram observadas em todos os municípios do estado do Paraná analisados, indicando que as duas espécies estão sobre o mesmo processo de pressão seletiva. Amostras de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu (sul e norte) apresentaram menor susceptibilidade, indicando processo de estabelecimento de resistência ao temefós. As populações de *A. aegypti* dos municípios de Uiratã e Santa Helena foram consideradas como suscetíveis. Todas as populações de *A. albopictus*, provenientes do estado do Paraná e Santa Catarina, evidenciaram insipiente alteração do status de susceptibilidade ao organofosforado temefós.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. Coexistência. Suscetibilidade. Organofosforado. Dengue.

## ABSTRACT

The monitoring of biological behaviors of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) as well as the process of development of resistance in such vectors is crucial, in the process of entomological vigilance. These studies should contribute with important information in the arboviroses transmission, as dengue and yellow fever. The aim of the present study was to verify the coexistence between populations *A. aegypti* and *A. albopictus* in municipalities of the State of the Paraná – Brazil, where dengue occurs, and evaluate their susceptibility to the organophosphate temephos. The populations analyzed were obtained from Ubiratã, Santa Helena, Foz do Iguaçu - south and north sector. The susceptibility of these populations to temephos was analyzed to determine the  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  values, and estimate the ratios of resistance  $RR_{50}$  and  $RR_{95}$ , and using the Rockefeller as a control. Eight concentrations were established, each with four replicates, as much for the populations evaluated as for the Rockefeller. For the bioassays, the diagnostic concentration was 0.0060 mg/L recommended by the World Health Organization. For the female oviposition 345 traps were installed, and 63% were positive with 11.220 eggs. These eggs were laid to hatch under laboratory conditions and the number of adults obtained was 6.132. From those 3.222 belong to *A. aegypti* and 2.910 to *A. albopictus*. The number of positive traps rang from 56% to 78% and the percentage of emerged adults oscillated from 35% to 77%. The presence of both species was high in the traps. The sex relation was observed as normal correlation (1:1) in both localities and for both species. The ratio between *A. aegypti* and *A. albopictus* in Ubiratã was (1) 0,14 and (2) 0,20, Santa Helena 0,98, and Foz do Iguaçu north and south sectors 13,92 and 7,13, respectively. The results indicate that, based on diagnostic concentration 0.0060 mg/L, the percentage of mortality were: Foz do Iguaçu north and south sectors 75.94 and 77.5, Santa Helena 99.06 and Ubiratã 98.44. The lethal concentrations ( $LC_{50}$  and  $LC_{95}$ ) were: 0.00373 and 0.00916 mg/L for Foz do Iguaçu sector north, 0.00383 and 0.01062 mg/L for south sector respectively, 0.00259 and 0.00483 mg/L for Santa Helena and 0.00498 and 0.00283 mg/L for Ubiratã city. The resistance ratios ( $RR_{50}$  and  $RR_{95}$ ) were 2.23 and 3.12 for Foz do Iguaçu sector north, 2.29 and 3.62 for Foz do Iguaçu south sector, 1.55 and 1.64 for Santa Helena and 1.69 and 1.69 for Ubiratã city. Coexistence between *A. aegypti* and *A. albopictus* and the aggregation for their eggs were observed in all the analyzed cities, indicating both species are on the same process of selective pressure. Samples of *A. aegypti* of Foz do Iguaçu (south and north) presented minor susceptibility, indicating process of resistance establishment to organophosphate temephos. The *A. aegypti* populations of Ubiratã and Santa Helena were considered as susceptible to organophosphate temephos. All *A. albopictus* populations, which proceeded from Paraná and Santa Catarina States, demonstrated weak alteration in the susceptibility status to organophosphate temephos had evidenced incipient.

Key words: *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. Coexistence. Susceptibility. Organophosphate. Dengue.

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma infecção transmitida por mosquitos culicídeos, que nos últimos anos tornou-se um importante problema de saúde pública. A manifestação mais grave é a dengue hemorrágica, uma complicação potencialmente letal da dengue (WHO 2002). O vírus causador da dengue e da febre hemorrágica do dengue possui quatro sorotipos virais, denominados DEN-1, 2, 3 e 4, os quais pertencem à família Flaviviridae, gênero Flavivirus. Esta arbovirose é considerada um grave problema em zonas tropicais e subtropicais do mundo (PAHO 1995; Rosen 1999). Aproximadamente três bilhões de pessoas estão sob o risco de contrair o vírus e anualmente são registrados 50-100 milhões de casos de dengue clássica e cerca de 500 mil internações por febre hemorrágica, chegando a uma mortalidade de 5% nestes casos (Jacobs 2000; WHO 2002).

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é o vetor primário dos sorotipos virais que ocasionam a dengue e a febre amarela urbana nas Américas, onde a incidência destas arboviroses tem aumentado significativamente nos últimos 25 anos (Gubler 2005).

*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) é considerado vetor secundário do vírus da dengue no Velho Mundo (Shroyer 1986). No Brasil foi assinalado sua presença pela primeira vez em 1986 (Forattini 1986). Hoje se encontra amplamente distribuído no país, especialmente nas regiões Sul e Sudeste (Santos 2003). Espécimes brasileiras de *A. albopictus* têm-se revelado experimentalmente susceptível aos sorotipos virais do dengue (Miller & Ballinger 1988; Lourenço de Oliveira *et al.* 2003). Além disso, infecção natural de machos coletados na cidade de Reynosa, México, foi reportada por Ibanez-Bernal *et al.* (1997) e amostras do sorotipo viral DEN-1 foram isoladas de larvas coletadas na cidade de Campos Altos, Minas Gerais, Brasil (Serufo *et al.* 1993). No entanto não há evidências, atualmente, que atribuam a esta espécie a capacidade vetorial em condições naturais. Segundo Braga & Valle (2007), permanece desconhecido o efeito que a presença dessa espécie pode provocar na dinâmica de transmissão da dengue nas Américas. Acredita-se que *A. albopictus* possa também afetar o potencial de transmissão do vírus da febre amarela no Brasil, atravessando o nicho ecológico entre os ciclos de

transmissão silvestre e urbano, e, neste último teria o auxílio do *A. aegypti* (Gomes *et al.* 2005).

*A. aegypti* e *A. albopictus* são espécies invasoras que ocorrem atualmente em diversas regiões tropicais e subtropicais do globo. Estas espécies exóticas chegaram ao continente americano após desenvolverem, em seus ambientes primários, grau significativo de sinantropia (Rodhain & Rosen 1997; Gomes 1998). Geralmente, a ocorrência de epidemias de dengue está diretamente relacionada com a presença e a densidade destes vetores. A capacidade de se reproduzir em recipientes artificiais facilitou a dispersão passiva destas espécies nas últimas décadas através das principais vias de transporte (Lounibos 2002). Essas espécies de mosquitos podem, muitas vezes, coexistir em recipientes artificiais em zonas urbanas e periurbanas (Passos *et al.* 2003; Juliano *et al.* 2004; Honório *et al.* 2006; Fantinatti *et al.* 2007). Não obstante, imaturos de *A. albopictus* podem ainda habitar recipientes naturais como bromélias, bambu e buracos em troncos de árvore (Hawley 1988).

Segundo Honório e Lourenço de Oliveira (2001), a interação de *A. albopictus* e *A. aegypti* requer atenção, pois essas espécies se desenvolvem essencialmente nos mesmos criadouros artificiais e são muito comuns em áreas de grande concentração humana. Confirmando a capacidade que essas espécies têm de colonizar os mesmos criadouros espera-se que a pressão exercida pelo controle com inseticidas acometa de forma igual estas populações. Conseqüentemente, alteração na suscetibilidade de *A. albopictus* para inseticidas químicos, como ocorrido para *A. aegypti* poderá ser observada num futuro próximo (Fox 1961; Brown 1986; WHO 1992; Braga *et al.* 2004; Duque *et al.* 2004; Lima *et al.* 2006).

O surgimento de populações resistentes tem ocasionado sérios problemas para o controle de mosquitos. Alteração na susceptibilidade tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando diretamente a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (Brogdon & McAllister 1998). Apesar de importantes avanços em metodologias alternativas, os inseticidas químicos são uma poderosa ferramenta contra vetores e continuarão desempenhando papel importante no controle integrado (Thatheyus 2007), pelo menos até a descoberta de métodos alternativos sustentáveis que permitam um controle rápido e seguro de vetores.

Com a alta densidade e dispersão de *A. aegypti* e *A. albopictus*, muitas vezes coexistindo, em diversos estados brasileiros. Faz-se essencialmente

necessário, no processo de vigilância entomológica, o monitoramento de comportamentos biológicos assim como o processo de desenvolvimento de resistência destes vetores. Fornecendo informações importantes na transmissão de arboviroses, como a dengue e a febre amarela. Sobretudo, pensando em contribuir efetivamente no controle destas espécies de Culicidae (PAHO 1995; WHO 1997; Braks *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005).

## 2. OBJETIVO GERAL

Verificar a coexistência e avaliar a suscetibilidade ao inseticida Temefós, de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae), de municípios com ocorrência de casos de dengue do Estado do Paraná - Brasil.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Averiguar a agregação dos ovos, a coexistência e a razão sexual de populações de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, provenientes dos municípios de Ubitatã, Santa Helena, Foz do Iguaçu setor norte e Foz do Iguaçu setor sul.

2. Determinar a susceptibilidade de larvas de terceiro instar final e quarto inicial de *A. aegypti* e de *A. albopictus* ao inseticida Temefós, estimando as  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ,  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$  de populações provenientes dos municípios de Ubitatã, Santa Helena, Foz do Iguaçu setor norte e Foz do Iguaçu setor sul.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Área de estudo**

Foram analisadas populações de mosquitos provenientes de municípios do Estado do Paraná, com registro de casos autóctones de dengue no verão de 2006/2007: Ubiratã, Santa Helena, Foz do Iguaçu - setor sul e Foz do Iguaçu - setor norte (FIGURA 1).

##### **3.1.1 Caracterização dos municípios analisados**

1. Foz do Iguaçu localiza-se no extremo oeste paranaense, na fronteira do Brasil com o Paraguai e a Argentina, com população média de 259.000 habitantes, em área urbana média de 257.000 e em área rural média de 2.000 habitantes. Possui altitude média de 173 metros, latitude 25° 32' 45" sul e longitude 54° 35' 07" oeste. O clima é subtropical, com temperatura média máxima de 40°C e mínima de 5°C (IBGE 2008).

2. Ubiratã localiza-se na região centro ocidental paranaense, com população média de 22.000 habitantes, em área urbana média de 17.000 e em área rural média de 5.000 habitantes. Localiza-se a uma altitude de 508 metros e com latitude de 24° 32' 42" sul e longitude de 52° 59' 16" oeste. O clima é subtropical, com temperatura média máxima de 22°C e mínima de 18°C (IBGE 2008).

3. Santa Helena está situada na região oeste paranaense com média de 21.000 habitantes, em área urbana média de 10.000 e em área rural média de 11.000 habitantes. Localiza-se a uma altitude de 258 metros e latitude de 24° 51' 37" sul e longitude 54° 19' 58" oeste. O clima é subtropical, com temperatura média anual de 20°C (IBGE 2008).

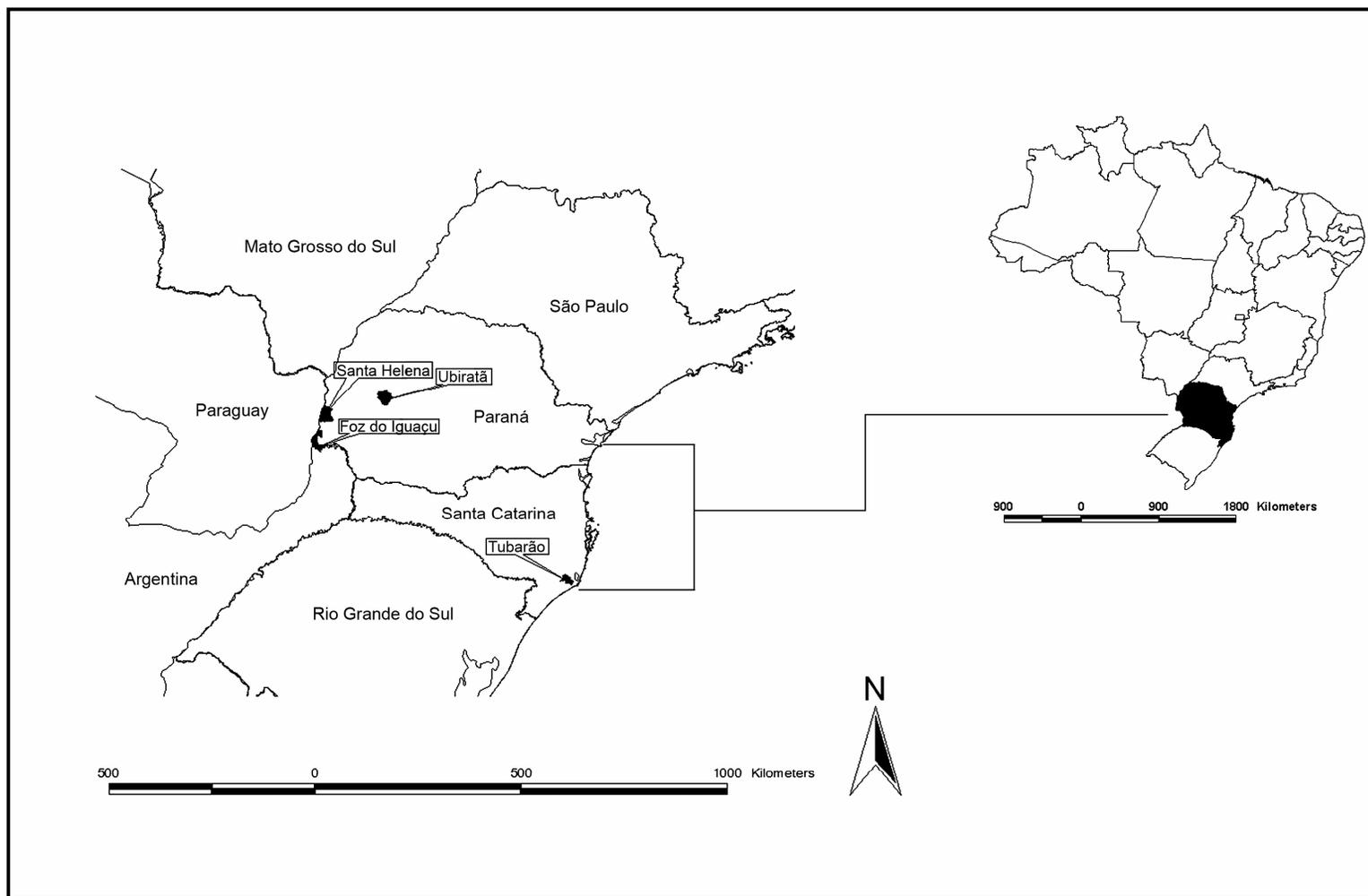


FIGURA 1 - Mapa do Brasil, destacando parte da região sul e os municípios analisados do Estado do Paraná – Brasil.

### 3.2 Coleta de material

A instalação das armadilhas (ovitampas) foi realizada pelo Núcleo de Entomologia da 9ª Regional de Saúde de Foz do Iguaçu - Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA), nas localidades de Ubiratã (1º coleta – 06/03 a 10/03/2007) e (2º coleta – 30/04 a 04/05/2007), Santa Helena (05/03 a 09/03/2007), Foz do Iguaçu setor sul (14/03 a 19/03/2007) e setor norte (14/03 a 19/03/2007) no verão de 2006/2007.

A distribuição das armadilhas foi de forma aleatória nos peridomicílios das residências em vários pontos dos municípios, seguindo o padrão da Fundação Nacional de Saúde (Funasa 2001). As ovitampas são constituídas de recipientes plásticos de coloração escura, em seu interior é fixada verticalmente uma paleta de madeira (“eucatex”) utilizando um clipe de metal.

As paletas foram parcialmente submersas em 500 mL de água permanecendo em campo por cinco dias. Todas as paletas (positivas ou negativas) foram registradas e enviadas para o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Neste, as paletas foram armazenadas na sala de criação de insetos com temperatura e umidade relativa controlada. Após a verificação de positividade para ovos, estes foram quantificados sob microscópio estereoscópico, não havendo distinção entre espécies de *Aedes* neste momento. As paletas foram submersas individualmente em copos com capacidade de 770 mL preenchido com água de torneira submetida à passagem de ar sob pressão para reduzir o teor de cloro. Adicionou-se ração para gatos Purina® Cat Chow® triturada (0,36g por copo) para induzir a eclosão das larvas, a qual foi administrada diariamente na mesma quantidade diluída em um mL de água até a última larva entrar no estágio de pupa. As paletas foram retiradas 24 horas após a imersão, em função do decréscimo da qualidade da água quando estas são mantidas nos copos por longos períodos, devido a propriedades físicas das paletas. As larvas foram mantidas nestes copos até o estágio de pupa e nesta fase foram retiradas e colocadas em gaiolas individualizadas e identificadas com o número e município da paleta, para captura dos adultos emergidos, registrando-se quanto ao sexo e espécie. Em seguida, estes adultos foram acondicionados por município e por espécie, em gaiolas (30cm x 30cm x 30cm) para implantação de colônias e

obtenção da geração de ovos F1 de *A. aegypti* e *A. albopictus*, utilizadas nos bioensaios de susceptibilidade. No interior das gaiolas os adultos foram tratados com uma solução de mel (10%), que foi renovada duas vezes por semana. As fêmeas realizaram a hematofagia em camundongo imobilizado (Certificado Comitê de Ética Nº: 227), duas vezes por semana, para o desenvolvimento de seus ovos e consequentemente obtenção da geração F1. Recipientes de vidro com papel filtro (com 12,5 cm de diâmetro, gramatura 80 g/m<sup>2</sup>, espessura 205 µm e 0,5% de cinza) umedecido foram colocados no interior de cada gaiola, como local de oviposição das fêmeas (FIGURA 2).

O tempo de armazenamento das paletas contendo os ovos, desde a coleta até a chegada ao laboratório e indução da eclosão, não foi homogêneo, contudo não ultrapassando cinquenta dias. Todo o processo de criação e armazenamento das paletas contendo os ovos foram em condições controladas de temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa  $80\pm 10\%$  e fotofase 12h.



FIGURA 2 - Amostra de paleta recebida, identificação e individualização, indução a eclosão larval, estabelecimento das colônias, obtenção de ovos para os bioensaios, indução a eclosão com larvas de idade sincronizada e triagem das larvas para os bioensaios.

### 3.3 Bioensaios

O inseticida utilizado foi o temefós grau técnico 90% lote 002/2005 fabricado por laboratórios “Fersol Mairinque”, São Paulo. A calibração deste inseticida foi realizada com a linhagem susceptível, *A. aegypti* cepa Rockefeller. Os bioensaios seguiram o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde descrito em WHO (1981a,b), Lima *et al.* (2003) e Braga *et al.* (2004) utilizando como concentração diagnóstica (CD) 0,0060 mg/L (duas vezes a concentração letal que causa mortalidade de 99% de uma cepa susceptível – CL<sub>99</sub> – como definido por WHO (1981a,b). O protocolo compreende dois tipos de parâmetros: resposta de mortalidade frente à exposição em concentração diagnóstica (CD), e resposta à exposição a um gradiente de concentrações (concentrações múltiplas - CM) para estabelecimento da linha-base de dose resposta.

A susceptibilidade de larvas foi determinada para um total de quatro localidades, pertencentes a municípios do Estado do Paraná. Para cada bioensaio utilizaram-se 640 larvas, de terceiro instar tardio e quarto instar inicial, de cada população de *A. aegypti* e *A. albopictus* avaliada. Quatro réplicas de 20 larvas, totalizando 80 larvas por concentração, foram expostas a oito diferentes concentrações (CM) de temefós. Entre as concentrações múltiplas continha a concentração diagnóstica (CD). Para o controle, quatro réplicas de 20 larvas, totalizando 80 larvas de cada população foram expostas ao solvente (etanol).

Como um controle interno, em cada bioensaio, o mesmo procedimento foi realizado simultaneamente com larvas da cepa referência Rockefeller. Como um controle externo, em cada bioensaio, o mesmo procedimento foi realizado simultaneamente com larvas de uma colônia (Fn) de *A. albopictus* mantida em laboratório a mais de três anos. Esta população de *A. albopictus* (Fn) foi proveniente do município de Tubarão, Santa Catarina. Tubarão localiza-se na região sul catarinense, com população média de 89.000 habitantes, em área urbana média de 70.000 e em área rural média de 19.000 habitantes. Localiza-se a uma altitude média de 9 metros e latitude 28° 28' 00" sul e longitude 49° 00' 25" oeste. O clima é subtropical, com temperatura média máxima de 23,6°C e mínima de 15,5°C (IBGE 2008). Esta colônia foi obtida no ano de 2004, a partir de coleta de imaturos em armadilhas (pneus, vasos e caixas de água) encontradas no peridomicílio de

residências localizadas em áreas urbanas do município de Tubarão (SC). Neste município ainda não foi registrado a presença de *A. aegypti* ou de casos autóctones do dengue. Por isso, não tem histórico de aplicação de temefós.

Os bioensaios foram reproduzidos quatro vezes em dias diferentes, para cada população de *A. aegypti* e *A. albopictus* avaliada (FIGURA 3).

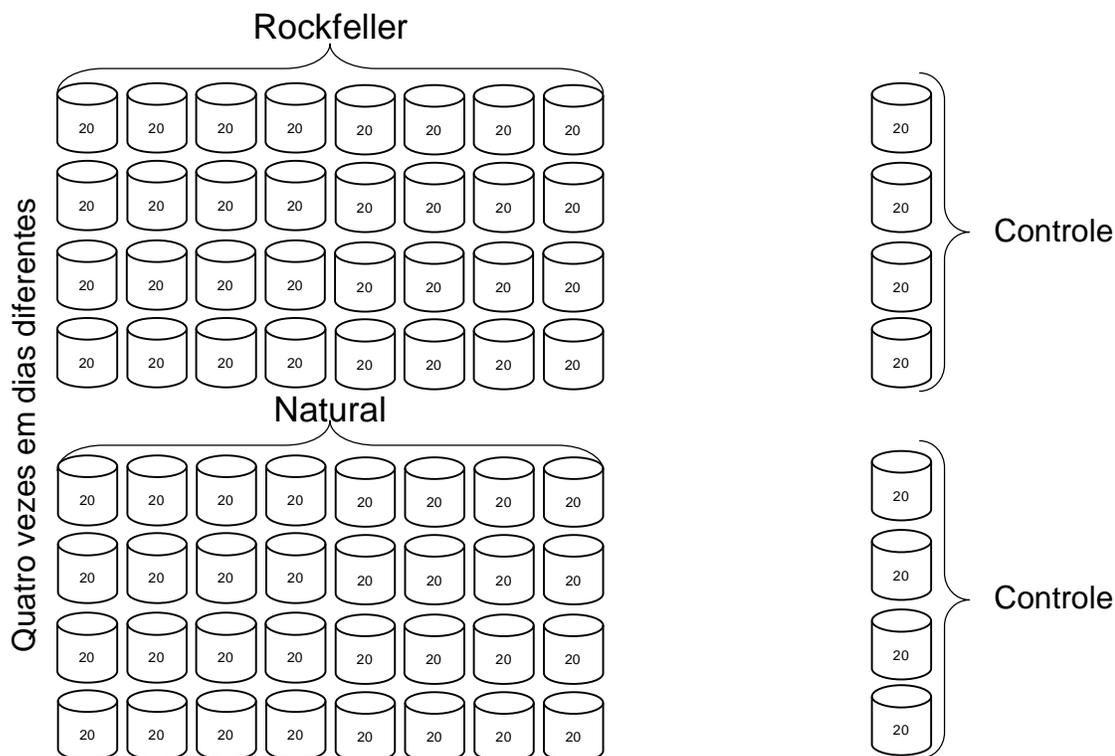


FIGURA 3 - Modelo de análise de susceptibilidade ao inseticida temefós.

As razões de resistência  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$  foram estimadas para os cinco municípios avaliados através da exposição das larvas a um intervalo de oito diferentes concentrações (CM), como descrito anteriormente. Deste modo, obtiveram-se as concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ), sendo a razão de resistência ( $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ ) calculada a partir da divisão entre as concentrações letais da população avaliada e as concentrações letais da população susceptível.

As larvas utilizadas nos bioensaios foram provenientes da primeira geração de ovos obtida em condições de laboratório (F1) de cada população natural

avaliada, com exceção a cepa referência Rockefeller e a população de laboratório de *A. albopictus* de Tubarão (SC).

A mortalidade foi verificada após 24h de exposição ao temefós. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas foram consideradas como mortas (WHO 1981). As larvas sobreviventes aos testes foram descartadas. O desenho experimental seguiu as indicações de Robertson & Preisler (1992), todos os testes foram realizados em conjunto com a colônia Rockefeller e tiveram condições controladas de temperatura ( $25^{\circ}\pm 1$ ), umidade ( $70\%\pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) em câmara climatizada modelo CDG-347 marca FANEM®.

### 3.4 Análise de resultados biológicos

Para determinar a aleatoriedade e a agregação dos ovos em relação às armadilhas e a distribuição dos ovos nas palhetas, foi calculado o índice razão variância/média (índice de dispersão) (FIGURA 4).

$$I = \frac{S^2}{\bar{m}} \text{ onde } S^2 = \text{variância e } \bar{m} = \text{média.}$$

FIGURA 4 – Fórmula para cálculo do índice de dispersão.

Valores menores que 1 aponta disposição espacial regular ou uniforme, valores iguais a 1 indicam disposição espacial aleatória e valores significativamente maiores que 1 revela disposição agregada (Rabinovich 1980; Pereira *et al.* 2004).

Além do índice de dispersão, que serve para medir o desvio de um arranjo das condições de aleatoriedade, o parâmetro k da binomial negativa também foi determinado, sendo este o indicador de agregação. Quando os valores de k são negativos indicam uma distribuição uniforme, quando são baixos e positivos ( $k < 2$ ) indicam uma disposição altamente agregada, valores de k variando de 2 a 8 indicam

uma agregação moderada e valores superiores a 8 ( $k > 8$ ) indicam uma disposição aleatória (Pielou 1977; Southwood 1978).

A razão sexual foi determinada com a divisão do número de fêmeas de cada população e espécie com a soma do número de fêmeas e machos de cada população e espécie avaliada (FIGURA 5).

$$RS = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de fêmeas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de machos} + \text{N}^{\circ} \text{ de fêmeas}}$$

FIGURA 5 – Fórmula para cálculo da razão sexual.

Os resultados foram analisados com o programa “Statistica versão 7.0”, apenas os dados com  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Para verificar diferenças estatísticas foram aplicados os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis (KW) e Mann-Whitney U (MW).

### 3.5 Análise de resultados dos bioensaios

Os critérios adotados para detectar qualitativamente alterações no status de susceptibilidade das populações analisadas seguiram o protocolo de Davidson & Zahar (1973): a) resposta de mortalidade à concentração diagnóstico superior a 98% foi considerado susceptível, b) entre 98 e 80% sugerem insipiente alteração do status de resistência e c) menores de 80% indicam populações em que a resistência está presente.

A razão de resistência ( $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ ) como indicador quantitativo, foi calculada pela divisão das concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ) de cada população avaliada com as concentrações letais ( $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$ ) da colônia Rockfeller. Os níveis de resistência definem-se como; menor de 5 vezes considerado status baixo, entre 5 e 10 considera-se médio e acima de 10, alto (Mazzari & Georghiou 1995).

O programa Probit GW-Basic (Finney 1971) foi utilizado para determinação das concentrações letais  $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$ , teste  $\chi^2$ , coeficiente angular e intervalos de confiança.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Biológicos

Instalou-se um total de 345 armadilhas de oviposição (ovitrampas), destas 63% foram positivas com um total de 11.220 ovos, os quais foram submetidos à eclosão sob condições de laboratório, dando origem a 6.132 adultos, sendo 3.222 *A. aegypti* e 2.910 *A. albopictus*. A percentagem de eclosão do total de adultos entre os municípios analisados, oscilou de 35% a 77% (TABELA 1). Entre as espécies, *A. aegypti* e *A. albopictus*, a percentagem de eclosão oscilou de 12% a 93% e 7% a 88%, respectivamente.

A razão entre *A. aegypti* e *A. albopictus* atingiu em Ubiratã (1º coleta) 0,14 e Ubiratã (2º coleta) 0,20; Santa Helena 0,98 e Foz do Iguaçu setor norte e sul 13,92 e 7,13; respectivamente.

Percentagem de paletas positivas oscilou de 55,7% a 78%, sendo detectada em frequência elevada à presença simultânea de ambas as espécies nas armadilhas em todos os municípios avaliados. A razão sexual observada para *A. aegypti* e *A. albopictus* permaneceu 1:1 entre os municípios avaliados (TABELA 2).

As frequências de oviposição assim como o número de adultos observados, entre as localidades avaliadas, apresentaram diferenças significativas. Do mesmo modo, foram observadas diferenças significativas entre as localidades e as duas espécies observadas, *A. aegypti* e *A. albopictus* (TABELA 3).

A relação variância/média (índice de dispersão) e parâmetro K aplicada para verificar a disposição dos ovos nas armadilhas indicaram disposição agregada destes nas palhetas, e em todos os municípios analisados (TABELA 4).

TABELA 1 - Número de paletas positivas, atividade de oviposição, emergência de adultos e sexagem de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* nos municípios de Ubiratã, Santa Helena, Foz do Iguaçu sul e Foz do Iguaçu norte, durante o verão de 2006/2007.

Localidades	Palhetas +	Ovos	Adultos	% eclosão	<i>A. aegypti</i>	♀	♂	<i>A. albopictus</i>	♀	♂
Ubiratã 1*	30	1003	646	64	80	36	44	566	295	271
Ubiratã 2*	54	2746	1.948	71	321	144	177	1627	749	878
Santa Helena	39	2597	972	37	482	252	230	490	254	236
Foz do Iguaçu Sul	44	2058	1.582	77	1476	742	734	106	54	52
Foz do Iguaçu Norte	50	2816	984	35	863	415	448	121	59	62

\*Foram realizadas duas coletas apenas para o município de Ubiratã.

TABELA 2 - Número total de paletas, percentagem de palhetas positivas, razão sexual de *Aedes aegypti* e de *Aedes albopictus* nos municípios de Ubiratã, Santa Helena, Foz do Iguaçu sul e Foz do Iguaçu norte, durante o verão de 2006/2007.

Localidade	Nº total de paletas	Palhetas + (%)**	Razão sexual <i>A. aegypti</i>	Razão sexual <i>A. albopictus</i>
Ubiratã 1*	49	61,2	0,45	0,52
Ubiratã 2*	97	55,7	0,45	0,46
Santa Helena	50	78,0	0,52	0,52
Foz do Iguaçu Sul	74	59,4	0,50	0,51
Foz do Iguaçu Norte	75	66,7	0,48	0,49

\*Foram realizadas duas coletas apenas para o município de Ubiratã. \*\*Palhetas positivas: número de palhetas positivas x 100 / número total de palhetas.

TABELA 3 - Análise comparativa entre as populações avaliadas: frequência de oviposição, número de adultos e localidades e as duas espécies, *A. aegypti* e *A. albopictus* de diferentes municípios do estado do Paraná, durante o verão 2006/2007.

	<b>KW</b>	<b>p</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
<b>Frequência de oviposição entre localidades</b>	11,97	0,0176	10,01	4	0,0402
<b>Número de adultos entre localidades</b>	20,14	0,0005	17,13	4	0,0018
<b>Localidades e espécies <i>A. aegypti</i></b>	63,47	< 0,05	49,15	4	< 0,05
<b>Localidades e espécies <i>A. albopictus</i></b>	65,98	< 0,05	49,79	4	< 0,05

TABELA 4 - Índices de dispersão e parâmetro K, em relação à disposição espacial da oviposição de *Aedes* spp. nos municípios de Uiratã, Santa Helena, Foz do Iguaçu setor sul e Foz do Iguaçu setor norte, durante o verão 2006/2007.

<b>Localidades</b>	<b>Índices de dispersão</b>	<b>Parâmetro K</b>
<b>Uiratã 1*</b>	77,43	0,43
<b>Uiratã 2*</b>	35,33	1,49
<b>Santa Helena</b>	69,92	0,98
<b>Foz do Iguaçu Sul</b>	46,85	1,03
<b>Foz do Iguaçu Norte</b>	95,72	0,59

\*Foram realizadas duas coletas apenas para o município de Uiratã.

## 4.2 Concentração diagnóstico, concentrações múltiplas e razão de resistência

As populações, de *A. aegypti* e *A. albopictus*, avaliadas neste trabalho responderam de formas distintas quanto à classificação de status de suscetibilidade ao organofosforado temefós.

A concentração diagnóstico 0,0060 mg/L, demonstrou que a ação da resistência está presente e em desenvolvimento nas populações de *A. aegypti* pertencentes à Foz do Iguaçu (PR), tanto setor sul quanto norte, 77% e 75% de mortalidade, respectivamente. Para os municípios de Ubiratã (PR) e Santa Helena (PR), os resultados demonstraram que as populações de *A. aegypti* foram suscetíveis ao temefós, 98% e 99% de mortalidade, respectivamente.

Todas as populações de *A. albopictus*, pertencentes a municípios do estado do Paraná, avaliadas apontaram insipiente alteração do status de resistência, quando comparado à concentração diagnóstico 0,0060 mg/L. Do mesmo modo, ocorreu com a população de *A. albopictus* de Tubarão (SC), utilizada como controle externo (TABELA 5).

Para as amostras de *A. aegypti* do Estado do Paraná, a maior e a menor concentração letal ( $CL_{95}$ ) foram, respectivamente, 0,01062 mg/L em Foz do Iguaçu Sul e 0,00483 mg/L em Santa Helena (TABELA 6). Para as amostras de *A. albopictus* dos Estados do Paraná e Santa Catarina, a maior e a menor concentração letal ( $CL_{95}$ ) foram, respectivamente, 0,00755 mg/L em Foz do Iguaçu Norte e 0,00578 mg/L em Ubiratã (TABELA 6).

As populações de *A. aegypti*, pertencentes a municípios do estado do Paraná, submetidos à bioensaios com diferentes concentrações (CM) de temefós apresentaram  $RR_{95}$  de 1,70 (Ubiratã, PR), 1,65 (Santa Helena, PR), 3,62 (Foz do Iguaçu - Sul, PR) e 3,13 (Foz do Iguaçu - Norte, PR) (Tabela 6). As populações de *A. albopictus*, pertencentes a municípios do Estado de Santa Catarina e Paraná, submetidos à bioensaios com diferentes concentrações (CM) de temefós apresentaram  $RR_{95}$  de 2,01 (Tubarão, SC), 1,97 (Ubiratã, PR), 2,36 (Santa Helena, PR), 2,23 (Foz do Iguaçu - Sul, PR) e 2,58 (Foz do Iguaçu - Norte, PR) (TABELA 6).

Os valores de coeficiente angular de todas as populações de *A. aegypti* e *A. albopictus* apresentaram-se menor quando comparado ao obtido a cepa Rockefeller, indicando maior heterogeneidade (TABELA 6).

TABELA 5 - Bioensaios com a concentração diagnóstico 0,0060 mg/L (calibrada com a cepa Rockefeller) em larvas de *A. aegypti* provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná e *A. albopictus* provenientes do estado do Paraná e de Santa Catarina, durante o verão 2006/2007.

Município	% Mortalidade	
	Espécie	0,0060 mg/L*
Rockefeller Tubarão (SC)	<i>A. aegypti</i>	100
	<i>A. albopictus</i>	95,25 ± 1,69
Ubiratã (PR)	<i>A. aegypti</i>	98,44 ± 0,96
	<i>A. albopictus</i>	94,38 ± 0,58
Santa Helena (PR)	<i>A. aegypti</i>	99,06 ± 0,50
	<i>A. albopictus</i>	90,94 ± 0,96
Foz do Iguaçu Sul (PR)	<i>A. aegypti</i>	77,50 ± 8,37
	<i>A. albopictus</i>	91,56 ± 1,26
Foz do Iguaçu Norte (PR)	<i>A. aegypti</i>	75,94 ± 9,78
	<i>A. albopictus</i>	87,19 ± 0,96

\*Dados referentes à média ± desvio padrão.

TABELA 6 - Municípios avaliados, espécies e geração utilizada, concentrações letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e razão de resistência (RR<sub>50</sub> e RR<sub>95</sub>) em populações de *A. aegypti* e *A. albopictus* de municípios do estado do Paraná e *A. albopictus* do estado de Santa Catarina, no verão de 2006/2007.

Município	Espécie	CL <sub>50</sub> (IC)	CL <sub>95</sub> (IC)	CA	χ <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>
Rockefeller	<i>A. aegypti</i> (Fn)	0,00167 (0,00164 ± 0,00170)	0,00293 (0,00282 ± 0,00306)	7,68 ± 0,14	2,19	1	1
Tubarão (SC)	<i>A. albopictus</i> (Fn)	0,00333 (0,00327 ± 0,00339)	0,00590 (0,00574 ± 0,00608)	6,63 ± 0,16	5,92	1,99	2,01
Ubiratã (PR)	<i>A. aegypti</i> (F1)	0,00283 (0,00244 ± 0,00328)	0,00498 (0,00392 ± 0,00638)	6,71 ± 0,62	8,47	1,69	1,70
	<i>A. albopictus</i> (F1)	0,00335 (0,00327 ± 0,00344)	0,00578 (0,00553 ± 0,00606)	6,96 ± 0,25	5,49	2,0	1,97
Santa Helena (PR)	<i>A. aegypti</i> (F1)	0,00259 (0,00240 ± 0,00275)	0,00483 (0,00460 ± 0,00514)	6,10 ± 0,49	0,88	1,55	1,65
	<i>A. albopictus</i> (F1)	0,00357 (0,00345 ± 0,00368)	0,00692 (0,00662 ± 0,00727)	5,72 ± 0,20	4,95	2,14	2,36
Foz do Iguaçu Sul (PR)	<i>A. aegypti</i> (F1)	0,00383 (0,00361 ± 0,00403)	0,01062 (0,00996 ± 0,01144)	3,71 ± 0,17	3,6	2,29	3,62
	<i>A. albopictus</i> (F1)	0,00360 (0,00350 ± 0,00369)	0,00653 (0,00625 ± 0,00686)	6,35 ± 0,21	5,11	2,15	2,23
Foz do Iguaçu Norte (PR)	<i>A. aegypti</i> (F1)	0,00373 (0,00353 ± 0,00391)	0,00916 (0,00866 ± 0,00976)	4,21 ± 0,19	8,58	2,23	3,13
	<i>A. albopictus</i> (F1)	0,00361 (0,00348 ± 0,00372)	0,00755 (0,00721 ± 0,00797)	5,12 ± 0,20	1,76	2,16	2,58

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Biológicos

Nos municípios analisados, a percentagem de emergência de adultos, independente da espécie, ultrapassou 60% em três das cinco amostras. Apenas as amostras de Santa Helena e Foz do Iguaçu setor norte foram menores, 37% e 35% respectivamente. A percentagem de emergência pode ser considerada alta quando comparado aos valores obtidos por Fantinatti *et al.* (2007) em populações de *Aedes* spp. de cinco municípios do estado do Paraná. Estes autores obtiveram eclosão dos ovos abaixo de 49% em todas as amostras. Conforme Juliano *et al.* (2002) e Almeida (2005) a temperatura, umidade e tempo de armazenamento afetam a integridade e eclosão dos ovos de *A. aegypti*. Para Fantinatti *et al.* (2007), o tempo de armazenamento dos ovos desde a coleta não foi homogêneo, mas não ultrapassou noventa dias. No presente trabalho este tempo não ultrapassou cinquenta dias, o que pode explicar a maior percentagem de emergência de adultos. As amostras de Santa Helena e Foz do Iguaçu setor norte permaneceram armazenadas por um período maior de tempo, do que as de Ubitatã (1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> coleta) e de Foz do Iguaçu setor sul, justificando a menor percentagem de eclosão. Portanto, a viabilidade dos ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* para a eclosão pode estar diretamente relacionada ao tempo de armazenamento destes, precedente à imersão em água. Assim, se estocadas por longos períodos pode-se inviabilizar a eclosão dos ovos. Almeida (2005), avaliando a sobrevivência de ovos de *A. aegypti* em diferentes temperaturas, umidades e períodos de armazenamento, obteve taxas de eclosão que permitem sugerir a inviabilização de 30-40% de ovos, a partir de 30 dias em ambiente natural a temperatura de 25-30°C e umidade relativa 60-80%. Após 120 dias em ambiente natural nestas condições não há eclosão larval.

As taxas de eclosão, obtidas neste trabalho, bem como nos trabalhos de Almeida (2005) e de Fantinatti *et al.* (2007), sugerem que a redução nas densidades populacionais de *A. aegypti* e *A. albopictus* registradas em períodos quentes e sem chuvas de regiões tropicais é fortemente influenciada pela ação da temperatura, da

umidade e do período de quiescência na inviabilização dos ovos (Juliano *et al.* 2002; Almeida 2005; Beserra & Castro 2008).

No presente trabalho, dos 6.132 adultos obtidos, 53% pertenciam à espécie *A. aegypti* e 47% a *A. albopictus*. Em alguns municípios analisados houve o predomínio de *A. aegypti* em relação a *A. albopictus* e, em outros, o predomínio de *A. albopictus* em relação a *A. aegypti*. Em Uiratã, tanto na primeira quanto na segunda coleta, houve considerável predominância do *A. albopictus* (88 e 84%) sobre *A. aegypti* (12 e 16%), respectivamente. Nas amostras realizadas em Foz do Iguaçu (setor sul e norte) houve alta predominância de *A. aegypti* (93 e 88%) em relação a *A. albopictus* (7 e 12%), respectivamente. Apenas nas amostras de Santa Helena houve homogeneidade entre as espécies de *A. albopictus* (50%) e *A. aegypti* (50%) encontradas.

O predomínio de *A. aegypti* sobre *A. albopictus* em Foz do Iguaçu (norte e sul) poderia estar relacionado à elevada densidade de habitantes em área urbana, em relação à área rural, 257.000 e 2.000 habitantes respectivamente. No município de Santa Helena houve homogeneidade na presença de *A. aegypti* e *A. albopictus*, do mesmo modo ocorre com a média de habitantes em área rural e urbana, 11.000 e 10.000, respectivamente. Estes dados corroboram com os obtidos por Braks *et al.* (2003), onde o habitat afeta a abundância de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, com predominância de *A. aegypti* em áreas altamente urbanizadas e de *A. albopictus* em áreas rurais, além de abundância similar de ambas as espécies em áreas suburbanas.

Com relação ao município de Uiratã, houve uma diferenciação entre a predominância das espécies encontradas. *A. albopictus* predominou onde havia maior densidade habitacional em área urbana, em relação a rural, (17.000 e 5.000), respectivamente. O município de Uiratã é um local arborizado, o que pode ter favorecido a presença e/ou sobrevivência maior de *A. albopictus* em relação a *A. aegypti*. É importante ressaltar que as instalações de armadilhas para ovos neste local ocorreram no mesmo período em que havia um surto de dengue. No ano de 2007, foram registrados 1.437 casos autóctones de dengue em Uiratã, equivalendo em média 9% da população urbana infectada. Atualmente não há registro oficial no Brasil de transmissão dos sorotipos do vírus da dengue por *A. albopictus*. Entretanto, é importante mencionar o provável papel do *A. albopictus* na transmissão dos casos de dengue em Uiratã no ano de 2007. Devido à elevada predominância de *A.*

*albopictus* sobre o *A. aegypti*, no mesmo período de transmissão viral. Porém, apenas através do isolamento dos sorotipos virais em *A. albopictus* de Uiratã pode-se confirmar a capacidade deste culicídeo em transmitir a dengue na área sob estudo.

A coexistência de *A. aegypti* e *A. albopictus*, foi verificada em todos os municípios analisados neste trabalho, o mesmo foi verificado por Gomes *et al.* (2005) e Fantinatti *et al.* (2007). A coexistência de *A. aegypti* e *A. albopictus*, levou Alto *et al.* (2008) a determinarem os efeitos da competição entre essas espécies, comparando a susceptibilidade à infecção por vírus da dengue sorotipo 2. A competição inter e/ou intraespecífica entre as larvas aumentou a susceptibilidade de *A. albopictus* à infecção ao vírus da dengue e potencial para transmissão. A competência de *A. albopictus* para transmissão do vírus amarelo (Johnson *et al.* 2002) e a expansão de sua área de ocupação no território nacional apontam para o aumento das áreas de risco potencial de febre amarela, uma vez que esta espécie transita tanto nos ambientes silvestre ou rural como urbano. Pode assim, tanto carrear o vírus daquele ambiente para este, quanto propiciar a manutenção do vírus em áreas urbanas.

A razão sexual, que é a proporção entre machos e fêmeas em uma população, é um dos principais parâmetros populacionais, e o esperado é que estas duas proporções se igualem. A razão sexual tem importantes implicações para o crescimento da população uma vez que o número de fêmeas em um determinado momento tem um efeito significativo sobre a composição da próxima geração (Queiroz *et al.* 1996; Brown & Keller 2000). Uma razão sexual favorável às fêmeas pode reduzir a competição entre os machos. Conseqüentemente haverá a diminuição na variabilidade genética da população já que os genes de poucos machos serão compartilhados por várias fêmeas. Para *A. aegypti* variações na razão sexual, foi reportada por Tun-lin *et al.* (2000), devido a mudanças na temperatura. Estes autores detectaram predominância de fêmeas sobre machos a temperatura de 30°C e razão sexual homogênea a 25°C. Para *A. albopictus*, Briegel & Timmermann (2001), analisando o desenvolvimento e parâmetros reprodutivos sob condições de laboratório controladas em quatro constantes temperaturas de 12 a 32°C, observaram razão sexual macho/fêmea de 2:1 em quase todos os casos, independentemente da temperatura e da densidade. Neste trabalho, a relação entre

sexos aproximou-se do esperado, 1:1 em todos os municípios para ambas as espécies, sugerindo estabilidade no desenvolvimento das populações avaliadas.

Existem três padrões de distribuição espacial: aleatório, uniforme e agrupado. Na distribuição aleatória, a localização de um indivíduo não interfere na localização de outro da mesma espécie e na distribuição uniforme, interações negativas como competições por alimento ou espaço resultam em espaçamento uniforme. Na distribuição agrupada, os indivíduos estão agregados nas partes mais favoráveis do habitat (Barbour *et al.* 1987). Neste trabalho, os índices razão variância/média (índice de dispersão) para ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* apresentaram valores significativamente maiores que 1 indicando disposição altamente agregada, dos ovos destas espécies, em todos os municípios avaliados. Do mesmo modo, os valores obtidos com o parâmetro k da binominal negativa também indicaram distribuição agregada nas amostras de todos os municípios avaliados, cujos valores foram sempre positivos entre zero e oito. A distribuição agregada de ovos de *Aedes* spp. sugere, segundo Duque (2008), que a disponibilidade de criadouros favoráveis estejam limitados para as fêmeas poderem realizarem a oviposição. A disposição agregada para ovos de *A. aegypti* e de *A. albopictus* também foi verificada por Fantinatti *et al.* (2007), a partir de coletas utilizando armadilhas de oviposição em Cambé, Ibiporã, Jacarezinho, Maringá e Paranavaí, municípios do estado do Paraná. Almeida *et al.* (2006), também observou disposição agregada para ovos de *A. albopictus*, coletados na cidade de Dourados, região sul do estado de Mato Grosso do Sul.

## **5.2 Concentração diagnóstico, concentrações múltiplas e razão de resistência**

A mortalidade causada pela concentração diagnóstico, demonstrou que as populações de *A. aegypti* em Foz do Iguaçu foram menos susceptíveis, indicando processo de estabelecimento de resistência. Apenas as populações de *A. aegypti* dos municípios de Ubitatã e Santa Helena foram consideradas como susceptíveis.

Embora as populações de *A. aegypti* pertencentes à Foz do Iguaçu demonstraram processo inicial de alteração no status de susceptibilidade, no período

de 2007, foram registrados 3.043 casos autóctones de dengue, afetando em média 1% da população urbana. A susceptibilidade observada nas populações de *A. aegypti* de Uiratã e Santa Helena sugerem que, em caso de aplicação de organofosforado, estas populações apresentem alta mortalidade e suspenda o ciclo de transmissão viral. Entretanto, os municípios de Uiratã e Santa Helena apresentaram em 2007, 1.437 e 704 casos autóctones de dengue, afetando em média 9 e 7% da população urbana, respectivamente. Estes resultados sugerem que a susceptibilidade de *A. aegypti* ao inseticida utilizado pode não ser o único fator importante no controle do vetor, com efeito na redução do número de casos de dengue.

Seguindo o critério de Davidson & Zahar (1973), foram detectadas variações no status de susceptibilidade nas populações de *A. aegypti*. Populações de Foz do Iguaçu setor sul e norte apresentam alteração na susceptibilidade, classificada como status resistente. As populações de Uiratã e Santa Helena são classificadas como susceptíveis. Sugere-se que as populações destes municípios estejam sob pressão seletiva distinta, justificando as variações no status de suscetibilidade.

Embora *A. albopictus* não seja alvo nos programas de controle, todas as populações desta espécie provenientes do estado do Paraná e Santa Catarina analisadas, evidenciaram insipiente alteração do status de susceptibilidade ao organofosforado temefós, quando expostos a concentração diagnóstico. Com base nestes resultados, sugere-se que, em locais onde há coexistência de *A. aegypti* e *A. albopictus*, ambas as espécies estão sendo expostas ao mesmo processo de pressão seletiva aos inseticidas aplicados. Assim sendo, a elevada co-ocorrência de *A. aegypti* e *A. albopictus* no Brasil, em áreas sob pressão seletiva e intensa de inseticidas, pode justificar a insipiente alteração no status de susceptibilidade ao temefós das populações de *A. albopictus* analisadas. Estes resultados indicam que a espécie *A. albopictus* poderá num futuro próximo assumir status de resistência ao temefós, como ocorre com *A. aegypti* em diversos estados brasileiros.

Ressalta-se que a amostra de *A. albopictus* do estado de Santa Catarina, mantida em laboratório há três anos, apresentou insipiente alteração no status de susceptibilidade, quando comparado à concentração diagnóstico. Embora originada de ambiente nunca exposto às aplicações de temefós, os mosquitos fundadores dessa colônia podem ter chegado ao município de Tubarão já com insipiente alteração no status de susceptibilidade.

Mesmo que até o momento, não esteja comprovado a participação de *A. albopictus* na transmissão de qualquer sorotipo do vírus da dengue no Brasil, alterações no status de susceptibilidade ao temefós desta espécie é extremamente preocupante. Principalmente, pela grande extensão territorial brasileira que este culicídeo ocupa atualmente. No Brasil, após seu primeiro registro no Estado de Espírito Santo, hoje *A. albopictus*, encontra-se amplamente distribuído por diversos estados brasileiros. Apenas seis Estados (Amapá, Roraima, Acre, Tocantins, Piauí, e Sergipe) permanecem, até o momento, sem registro oficial da presença do *A. albopictus* (Santos 2003). Kambhampati *et al.* (1991) após análise de composição genética de *A. albopictus*, provenientes do Brasil e do Estados Unidos da América, concluíram que as populações de *A. albopictus* americanas e brasileiras tiveram sua origem no Japão. Do mesmo modo, a partir de análise genética de populações do Brasil, do EUA e Ilhas Cayman, Lourenço de Oliveira *et al.* (2003), observaram maior diferença entre duas amostras brasileiras do que entre uma amostra brasileira e uma amostra americana, concluindo que novas introduções de *A. albopictus* ainda estão em curso, moldando a composição genética e, potencialmente, modificando os padrões de transmissão do vírus da dengue e da febre amarela.

Dificuldades em controlar a proliferação do *A. albopictus* já foi descrita por Franco-Estrada & Craig Jr (1995), que a explicam como consequência da ampla distribuição de seus criadouros naturais e artificiais. Forattini *et al.* (1997), comprovaram que essa característica de sobrevivência da espécie pode ser uma resposta à sua adaptabilidade nas cidades, particularmente quando essas são bem arborizadas e apresentam uma gama diversificada de micro-habitats (Gomes *et al.* 2005).

Todas as populações de *A. aegypti* (PR) e de *A. albopictus* (PR e SC) submetidos aos bioensaios apresentaram valores de  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$  em níveis baixos, seguindo o critério de Mazzari & Georghiou (1995). O mesmo foi verificado por Duque *et al.* (2004) e Duque (2008), para populações de *A. aegypti* dos municípios de Curitiba, Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã, Cambé e Jacarezinho (PR). Os valores de  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ , encontrados por Duque (2008), para população de *A. aegypti* pertencente à Foz do Iguaçu, coletadas no ano de 2005, foram 2.6 e 3.9, respectivamente. No presente estudo, os valores de  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ , encontrados para população de Foz do Iguaçu, coletadas no ano de 2007, foram um pouco inferiores

2.29 e 3.62 para Foz do Iguaçu Sul e 2.23 e 3.13 para Foz do Iguaçu Norte, respectivamente.

A população de laboratório de *A. albopictus* (Fn) de Tubarão (SC) foi avaliada como um controle externo para as populações naturais de *A. albopictus* provenientes do Estado do Paraná. Entretanto, esta população mantida em laboratório a mais de três anos, apresentou razões de resistência similares às obtidas para populações naturais (F1) de *A. albopictus* provenientes de municípios paranaenses.

Embora os valores de RR<sub>50</sub> e RR<sub>95</sub> evidenciados nas populações paranaense e catarinense analisadas no presente trabalho são considerados de status baixo, como os encontrados para *A. aegypti* em alguns municípios de São Paulo (Campos & Andrade 2001; Macoris *et al.* 2003). Em diversos estados brasileiros têm-se observado razões de resistência em status médio a elevado como Rio de Janeiro, Alagoas e Sergipe (Lima *et al.* 2003), Rio de Janeiro (Braga *et al.* 2004) e Ceará (Lima *et al.* 2006). Segundo Câmara *et al.* (2007) e Duque (2008), a região sul apresenta menores valores de RR<sub>50</sub> e RR<sub>95</sub>, em relação a outras regiões do Brasil, devido à redução na densidade dos vetores nas estações frias o que diminui a pressão seletiva pela menor aplicação de inseticidas.

O monitoramento de alteração no status de susceptibilidade de *A. aegypti* ao temefós tem sido reportado, além do Brasil, na Malásia (Lee & Lime 1989), Tailândia (Chareonviriyaphap *et al.* 1999; Paeporn *et al.* 2003; Jirakanjanakit *et al.* 2007), Índia (Sharma *et al.* 2004), Camboja (Polson *et al.* 2001) e Venezuela (Mazzarri & Georghiou 1995).

Para *A. albopictus*, o monitoramento do desenvolvimento de resistência ao temefós tem sido reportado na Malásia (Lee *et al.* 1998; Nazni *et al.* 2000; Chen *et al.* 2005) e Tailândia (Ponlawat *et al.* 2005; Jirakanjanakit *et al.* 2007), Índia (Sharma *et al.* 2004) e Itália (Romi *et al.* 2003).

*A. aegypti* e *A. albopictus* demonstraram resistência a temefós e permetrina em algumas regiões da Tailândia, verificadas por Ponlawat *et al.* 2005. Conforme Ponlawat *et al.* (2005), a elevada resistência de *A. aegypti* na Tailândia deve-se a intensa exposição a inseticidas como temefós, permetrina e malathion devido ao comportamento intradomiciliar desta espécie. No entanto, para *A. albopictus*, sugere que a alteração na suscetibilidade é devido a freqüente exposição a inseticidas agrícolas, por seu comportamento peri e extradomiciliar. Na Tailândia, o habitat de

*A. aegypti* e *A. albopictus* muitas vezes se sobrepõe, indicando que esses vetores podem ser expostos similarmente à pressão seletiva para resistência.

Embora, as populações de *A. aegypti* e *A. albopictus* coexistam nos municípios de Ubitatã e Santa Helena analisados no presente trabalho, sendo expostos similarmente à pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência. As populações de *A. aegypti* apresentaram status de susceptibilidade ao organofosforado temefós. Porém, as populações de *A. albopictus* apresentaram insipiente alteração no status de susceptibilidade. Além disso, as razões de resistências observadas para populações destes municípios foram maiores para *A. albopictus* do que para *A. aegypti*. Conforme Lourenço de Oliveira *et al.* (2003), ocorrem ininterruptas e recentes introduções de *A. albopictus* no território brasileiro. A introdução de diferentes populações de *A. albopictus* pode estar contribuindo para a maior diversidade quanto à resposta de *A. albopictus* ao status de susceptibilidade ao organofosforado temefós.

Conforme Duque (2008) a revisão sistemática dos inseticidas empregados no controle das populações de *A. aegypti*, no estado paranaense, é de grande importância. Mesmo que o produto possa ser considerado como relativamente efetivo até o momento, sua utilização deve ser monitorada constantemente, no sentido de evitar o comprometimento das ações de controle do vetor da dengue.

Embora as populações de *A. aegypti* e de *A. albopictus* analisadas, apresentaram níveis baixos de alteração no status de susceptibilidade ao temefós o monitoramento constante destas populações a inseticidas, com o objetivo de colaborar com estratégias racionais de controle com base em conhecimento detalhado sobre o perfil da resistência e dos mecanismos envolvidos no nível local, são considerados de extrema importância para a previsão da situação da dengue no sul do Brasil nos próximos anos. Com base nesses resultados e na importância epidemiológica atribuída ao *A. albopictus*, julga-se necessário o estudo detalhado dessa espécie, acompanhando paralelamente a sua ocorrência no Brasil.

Confirmando-se a alteração nos níveis de suscetibilidade e analisando, em campo, o impacto da resistência causada pelo organofosforado, é possível formular estratégias distintas de controle, as quais poderão ser diferenciadas para cada região. Além disso, é importante a realização de estudos sobre o isolamento e caracterização da resistência, inexistentes para o estado paranaense, para definir os mecanismos bioquímicos e verificar se os resultados obtidos com a concentração

diagnóstico e com as concentrações múltiplas são compatíveis com os resultados de alteração desses mecanismos.

Até o momento, o presente trabalho é o primeiro reporte de análise de alteração na susceptibilidade ao organofosforado temefós para a espécie *A. albopictus* na América do Sul.

## 6. CONCLUSÕES

1. Coexistência de *A. aegypti* e de *A. albopictus* e a agregação de seus ovos foram observadas em todos os municípios do estado do Paraná analisados, indicando que as duas espécies estão sobre o mesmo processo de pressão seletiva.

2. Amostras de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu (sul e norte - PR) apresentaram menor susceptibilidade, indicando processo de estabelecimento de resistência ao organofosforado temefós.

3. As populações de *A. aegypti* dos municípios de Ubiratã (PR) e Santa Helena (PR) foram consideradas como suscetíveis ao organofosforado temefós.

4. Todas as populações de *A. albopictus*, provenientes do estado do Paraná e de Santa Catarina, evidenciaram insipiente alteração do status de susceptibilidade ao organofosforado temefós.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, P.S., A.D., Ferreira, V.L., Pereira, M.G., Fernandes & W.D. Fernandes. 2006. Spatial distribution of *Aedes albopictus* in the southern area of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista de Saúde Pública** **40**: 1094-1100.
- Almeida, E.A.P. 2005. **Fecundidade, fertilidade e quiescência dos ovos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em resposta a variações de temperatura e umidade.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 73p.
- Alto, B.W., L. P. Lounibos, C. N. Mores & M. H. Reiskind. 2008. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **275**: 463-471.
- Barbour, M.G., J.H. Burk & W.D. Pitts. 1987. **Terrestrial plant ecology.** 2nd. ed. The Benjamin/Cummings Pub.C. London.
- Beserra, E.B. & F.P. Castro Jr. 2008. Compared biology of populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) of Paraíba state, Brazil. **Neotropical Entomology** **37**: 81-85.
- Braga, I.A., J.B.P. Lima, S.S. Silva & D. Valle. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos 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. & D. Valle. 2007a. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** **16**: 279-293.
- Braga, I.A. & D. Valle. 2007b. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** **16**: 113- 118.
- Braks M.A.H., N.A. Honório, R. Lourenço de Oliveira, S.A. Juliano & L.P. Lounibos. 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil and Florida. **Journal of Medical Entomology** **40**: 785-94.

- Briegel, H. & S. Timmermann. 2001. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Physiological aspects of development and reproduction. **Journal of Medical Entomology** **38**: 566-571.
- Brogdon, W.G. & J.C. McAllister. 1998. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases** **4**: 605-613.
- Brown, A.W. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association** **2**: 123-140.
- Brown, W.D. & L. Keller. 2000. Colony sex ratios vary with queen number but not relatedness asymmetry in the ant *Formica exsecta*. **Proceedings: Biological Sciences** **267**: 1751-1757.
- Câmara, P.F., G.R.L. Theophilo, T.G. Santos, G.S.R.F. Pereira, P.D.C. Câmara & R.R. Matos. 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **40**: 192-196.
- Campos, J. & C.F.S. Andrade. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticida químicos. **Revista de Saúde Pública** **35**: 232-236.
- Chan, K.L., Y.C. Chan & B.C. Ho. 1971. *Aedes aegypti* (L) and *Ae. albopictus* (Skuse) in Singapore City. 4. Competition Between Species. **Bulletin of the World Health Organization** **44**: 643-9.
- Chareonviriyaphap, T., B. Aum-aung & S. Ratanatham. 1999. Current insecticide resistance pattern in mosquito vectors in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** **30**: 184 – 194.
- Chen, C.D., W.A. Nazni, H.L. Lee & M. Sofian-Azirun. 2005. Weekly variation on susceptibility status of *Aedes* mosquitoes against temephos in Selangor, Malaysia. **Tropical Biomedicine** **22**: 195–206.
- Davidson, G. & D.A. Zahar. 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. **Bulletin of the World Health Organization** **49**: 475-483.
- Duque, J.E.L., F.M. Martins, F.A. Dos Anjos, E.F. Kuwabara & M.A. Navarro-Silva. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temephos e Cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **38**: 842-843.

Duque, J.E.L. 2008. **Descrição e análise de fatores epidemiológicos, vetoriais e do controle da dengue no Estado do Paraná, Brasil.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 150p.

Fantinatti, E.C.S., J.E.L. Duque, A.M. Silva & M.A. Navarro-Silva. 2007. Abundance and aggregation egg of *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in the north and northwest of the State of Paraná, Brazil. **Neotropical Entomology 36**: 960-965.

Finney, D.J. 1971. **Probit Analysis.** Cambridge University Press, 3rd Edition.

Forattini, O.P. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública 20**: 5.

Forattini, O.P., I. Kakitani, M.A.M. Sallum & L. Rezende. 1997. Produtividade de criadouro de *Aedes albopictus* em ambiente urbano. **Revista de Saúde Pública 31**: 545-5.

Fox, I. 1961. Resistance of *Aedes aegypti* to certain chlorinated hydrocarbon and organophosphorus insecticides in Puerto Rico. **Bulletin of the World Health Organization 24**: 489-494.

FUNASA. 2001. Fundação Nacional de Saúde - **Programa Nacional de Controle da Dengue.** Brasília: Ministério da Saúde.

Estrada-Franco, J.G., & G.B. Craig. 1995. Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*. Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization. **Pan American Health Organization 42**: 1-49.

Gomes, A.C. 1998. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*. **Informe Epidemiológico do SUS 7(3)**: 49-57.

Gomes, A.C., J.M.P. Souza, D.P. Bergamaschi, J.L.F. Santos, V.R. Andrade, O.F. Leite, O. Rangel, S.S.L. Souza, N.S.N. Guimarães & V.L.C. Lima. 2005. Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. **Revista de Saúde Pública 39**: 206-210.

Gubler, D.J. 2005. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. **Pan American Journal of Public Health** 17: 221–224.

Hawley, W.A. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association** 4 (Suppl 1): 1-40.

Hobbs, J.H., E.A. Hughes & B.H. Eichold. 1991. Replacement of *Aedes aegypti* by *Aedes albopictus* in Mobile, Alabama. **Journal of the American Mosquito Control Association** 7: 488-9.

Honório, N.A. & R. Lourenço-de-Oliveira. 2001. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. **Revista de Saúde Pública** 35: 385-91.

Honório, N.A., P.H. Cabello, C.T. Codeço & R. Lourenço-de-Oliveira. 2006. Preliminary data on the performance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* immatures developing in water-filled tires in Rio de Janeiro. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** 101: 225-228.

Ibañez-Bernal, S., B. Briseño, J.P. Mutebi, E. Argot, G. Rodríguez, C. Martínez-Campos, R. Paz, P. de la Fuente-San Roman, R. Tapia-Conyer & A. Flisser. 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Medical and Veterinary Entomology** 11: 305-9.

IBGE. 2008. **População residente, por sexo e situação do domicílio, população residente de 10 anos ou mais de idade, total, alfabetizada e taxa de alfabetização, segundo os Municípios**. Disponível em <  
[http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/censo2000/universo.php?tipo=31o/tabela13\\_1.shtm&paginaatual=1&uf=41&letra=F](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/censo2000/universo.php?tipo=31o/tabela13_1.shtm&paginaatual=1&uf=41&letra=F) > Acessado em 04/05/2008.

Jacobs, M. 2000. Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 94: 7-8.

Jirakanjanakit, N., S. Saengtharapit, P. Rongnoparut, S. Duchon, C. Bellec & S. Yoksan. 2007. Trend of temephos resistance in *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes in Thailand during 2003-2005. **Environmental Entomology** 36: 506-11.

Johnson, B.W., T.V. Chambers, M.B. Crabtree, A.M. Filippis, P.T. Vilarinhos, M.C. Resende, M.L. Macoris & B.R. Miller. 2002. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **96**: 611-3.

Juliano, S.A., G.F. O'Meara, J.R. Morrill & M.M. Cutwa. 2002. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. **Oecologia** **130**: 458-469.

Juliano, S.A., L.P. Lounibos & G.F. O'Meara. 2004. A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *A. aegypti* in South Florida: Differences between sites of coexistence and exclusion? **Oecologia** **139**: 583-593.

Kambhampati, S., W.C. Black & K.S. Rai. 1991. Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. **Heredity** **67**: 85-93.

Lee, H.L. & W. Lime. 1989. A reevaluation of the susceptibility of field collected *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) larvae to temephos in Malaysia. **Mosquito Borne Diseases Bulletin** **6**: 91-95.

Lee, H.L., N. Asikin, W.A. Nazni & S. Sallehuddin. 1998. Temporal variations of insecticide susceptibility status of field-collected *Aedes albopictus* (Skuse) in Malaysia. **Tropical Biomedicine** **15**: 43 – 50.

Lima, J.B.P., M. Pereira da Cunha, R.C.S. Silva-Jr, A.K.R. Galardo, S.S. Soares, I.A. Braga, R.P. Ramos, & D. Valle. 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.

Lima, E.P., A.M.F. Oliveira, J.W.O. Lima, A.N.J. Ramos, L.P.G. Cavalcanti & R. J. S. Pontes. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **39**: 259-263.

Lounibos, L.P. 2002. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual review of entomology** **47**: 233-266.

Lourenço-de-Oliveira, R., M. Vazeille, A.M.B. Filippis & A.B. Failloux. 2003. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. **American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene** **69**: 105-114.

Macoris, M.L.G., M.T. Andrighetti, L. Takaku, C.M. Glasser, V.C. Garbeloto & J.E. Bracco. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to Organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**: 703-708.

Macoris, M.L.G. M.T.M. Andrighetti, K.C.R. Nalon, V.C. Garbeloto & A.L.C. Junior. 2005. Standardization of bioassays for monitoring resistance to insecticides in *Aedes aegypti*. **Dengue Bulletin** **29**: 176-182.

Mazzari, M.B & G.P. Georghio. 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.

Miller, B.R. & M.E. Ballinger. 1988. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **82**: 476-7.

Nazni, W.A., M.Y. Kamaludin, H.L. Lee, T.A.R. Rogayah & I. Sa'diyah. 2000. Oxidase activity in relation to insecticides resistance in vectors of public health importance. **Tropical Biomedicine** **17**: 69-79.

Paeporn, P., N. Komalamisra, V. Deesin, Y. Rongsriyam, Y. Eshita & S. Thongrunkiat. 2003. Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanism. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** **34**: 786-792.

PAHO. 1995. **Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas** – Guias para su Prevencion y Control, Pan American Health Organization, OPS – Publicación Científica 548, Washington.

Passos, R.A., G.R.A.M. Marques, J.C. Voltolini & M.L.F. Condino. 2003. Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública** **37**: 729-734.

Pereira, M.F.A., A.L. Boiça Jr. & J.C. Barbosa. 2004. Distribuição espacial de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Neotropical Entomology** **33**: 493-498.

Pielou, E. C. 1977. **Mathematical ecology**. 2nd ed. New York: Wiley.

Polson, K.A., C. Curtis, M.S. Chang, J.G. Olson, N. Chantha & S.C. Rawlins. 2001. Susceptibility of two Cambodian population of *Aedes aegypti* mosquito larvae to temephos during 2001. **Dengue Bulletin 25**: 79-83.

Ponlawat, A., J.G. Scott & L.C. Harrington. 2005. Insecticide Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. **Journal of Medical Entomology 42**: 821-825.

Queiroz, M.M.C., Mello, R.P. & N.M.S. Freire. 1996. The effect of different proportions of males and females over the *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera, Calliphoridae) biotic potential and longevity under laboratory conditions. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz 91**: 243-247.

Rabinovich, J.E. 1980. **Introducción a la ecología de poblaciones animales**. México, Continental, 313 p.

Robertson, J.L & H.K. Preisler. 1992. **Pesticide bioassays with arthropods**. CDC Press. United States of America. 127 pp.

Rodhain, F. & L. Rosen. 1997. **Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships**. In: Gubler DJ, Kuno G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: CAB International.

Romi R, L. Toma, F. Severini & M. Di Luca. 2003. Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticides. **Journal of the American Mosquito Control Association 19**: 419-23.

Rosen, L. 1999. Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue. **Médecine tropicale : revue du Corps de santé colonial 59**: 495-498.

Santos, R.C. 2003. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997-2002). **Revista de Saúde Pública 37**: 671-673.

Santos, S.O. & J.C. Nascimento. 1998. Primeiro registro da presença do *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública 32**: 486.

Serufo, J.C. H.M. de Oca, V.A. Tavares, A.M. Souza, R.V. Rosa, M.C. Jamal, J.R. Lemos, M.A. Oliveira, R.M. Nogueira & H.G. Schatzmayr. 1993. Isolation of dengue

vírus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **88**: 503-504.

Sharma, S.N., V.K. Saxena & S. Lal. 2004. Study on susceptibility status in aquatic and adult stages of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* against insecticides at international airports of south India. **The Journal of communicable diseases** **36**: 177-81.

Shroyer, D. 1986. *Aedes albopictus* and arboviruses: a concise review of the literature. **Journal of the American Mosquito Control Association** **2**: 424-428.

Southwood, T.R.E. 1971. **Ecological methods**. London: Chapman and Hall.

SVS/MS. 2008. **Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007**. Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_010208.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf) >  
Acessado em 20/02/2008.

Thatheyus, J.A. 2007. Bio control of mosquitoes In: Defeating the public enemy, the mosquito: a real challenge. **Loyola**: 76–94.

WHO. 1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva.

WHO. 1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides**. Geneva.

WHO. 1992. **Vector Resistance to Pesticides, Fifteenth report of the WHO expert committee on Vector Biology and Control**, Geneva.

WHO. 1997. **Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnostic, Treatment, Prevention and Control**, 2 ed., Geneva.

WHO. 2002. **Dengue and dengue haemorrhagic fever**. Disponível em <  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acessado em 10/05/2008.

## CAPÍTULO II

**Óleos de *Carapa guianensis* (Aublet) (Meliaceae) e *Copaifera* sp. (Linnaeus) (Leguminosae), análise do seu efeito larvicida e no desenvolvimento de imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**

## RESUMO

Óleos essenciais obtidos de plantas são considerados fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas. Atualmente, devido ao desenvolvimento de resistência em insetos vetores, produtos de origem botânica vêm sendo amplamente testados pela sua diversidade química como bioinseticida. Óleos de *Carapa guianensis* e de algumas espécies de *Copaifera* já são conhecidos quanto ao efeito larvicida sobre populações de laboratório de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762). Entretanto, seu efeito em populações naturais de *A. aegypti*, com histórico de exposição à organofosforado, estes óleos ainda não foram avaliados. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do óleo de *C. guianensis* e de *Copaifera* sp., enquanto inseticida e os possíveis efeitos sobre o desenvolvimento de imaturos de *A. aegypti*, de populações de diferentes municípios do Estado do Paraná. Foram analisadas populações provenientes de Ubitatã, Santa Helena, Maringá, Foz do Iguaçu - setor sul e norte. A suscetibilidade destas populações aos óleos, foi analisada para determinar os valores das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, utilizando a linhagem Rockefeller como controle. Foram estabelecidas no mínimo 10 concentrações, com quatro réplicas cada, tanto para as populações naturais avaliadas como para a linhagem Rockefeller. A eficácia dos óleos, além de 25°C, também foi verificada sob outras três diferentes temperaturas (15, 20 e 30°C). O período de atividade larvicida (inicial e final), assim como a persistência residual e o efeito de concentrações sub-letais (CL<sub>50</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>10</sub>), também foram analisados. Os óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* foram previamente dissolvidos em água, utilizando como promotor da solubilidade polisorbato 80 e dimetilsulfóxido, respectivamente. As soluções demonstraram atividade larvicida, em intervalo de concentrações dose-resposta, sobre as populações naturais de *A. aegypti* avaliadas, sob temperatura controlada de 25°C. Os resultados obtidos demonstraram não haver diferença significativa entre os valores de mortalidade, em todos os municípios avaliados incluindo a cepa Rockefeller. Alterações morfológicas externas foram observadas em todas as larvas expostas a soluções contendo óleos de *C. guianensis* e de *Copaifera*, após 24 horas de exposição. Não foram observadas alterações morfológicas e/ou mortalidades nos grupos controle água, água mais polisorbato 80 e água mais dimetilsulfóxido. As mortalidades, causadas pelas soluções contendo óleos de *C. guianensis* e de *Copaifera* na temperatura de 25°C, evidenciam que as populações naturais de *A. aegypti* analisadas são susceptíveis aos óleos, assim como a cepa Rockefeller. A eficácia dos óleos para letalidade, foi relacionada ao aumento da temperatura. A letalidade larval, causada pelo óleo de *C. guianensis* e de *Copaifera*, ocorreu em menos de três horas de exposição. A persistência larvicida de *Copaifera* e principalmente de *C. guianensis*, evidenciou a eficácia destes óleos por períodos superiores a 20 dias. Foram observadas alterações no período de desenvolvimento de *A. aegypti*, expostos a concentrações sub-letais de *C. guianensis* e de *Copaifera*, como o prolongamento do estágio imaturo e alterações morfológicas que inviabilizaram a emergência dos adultos. Assim, os óleos de *C. guianensis* e de *Copaifera* demonstram eficácia no controle de *A. aegypti*, tanto como larvicida quanto sob efeito de doses sub-letais.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. *Carapa guianensis*. *Copaifera*. Larvicida botânico. Persistência. Efeito sub-letal.

## ABSTRACT

Essential oils obtained from plants are considered good sources as active biological substance. Currently, regardless of chemical resistance in insect vectors, products from botanical origin have become amply studied for its diversity as chemical bioinsecticide. Oils of *Carapa guianensis* (Aublet) (Meliaceae) and some species of *Copaifera* (Linnaeus) (Leguminosae), are known by their larvicidal effect in laboratory populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762). However, the effect in natural populations of *A. aegypti*, with exposure to organophosphate, these oils were not yet evaluated. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficiency of *C. guianensis* and *Copaifera* sp., as insecticide, and their possible effects in development of immature *A. aegypti*, from populations of different municipalities of Paraná State. Populations were obtained from Uiratã, Santa Helena, Maringá, Foz do Iguazu - south and north sectors. The susceptibility of these populations to the oils was analyzed to determine the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values, using the Rockefeller strain as a control. Ten concentrations were established, each with four replicates, for both natural populations as for the Rockefeller. The effectiveness of oils, beyond 25°C, also was verified under others three different temperatures (15, 20 and 30°C). The larvicidal activity period (initial and end), as well as the residual persistence, and the effect of sub-lethal concentrations (LC<sub>50</sub>, LC<sub>20</sub> and LC<sub>10</sub>), were also analyzed. The oils of *C. guianensis* and *Copaifera* were previously dissolved in water, using as promotional of the solubility polisorbato 80 and dimetilsulfóxido, respectively. The solutions containing oils of *C. guianensis* and *Copaifera* demonstrated larvicidal activity for both natural *A. aegypti* and Rockefeller populations in intervals of dose-response concentrations, under controlled temperature of 25°C. The results didn't demonstrate significant difference in the values of mortality in all the evaluated localities including Rockefeller. External morphological alterations were observed in all larvae laid in the solutions containing oils of *C. guianensis* and *Copaifera*, after 24 hours of exposure. Morphological alterations and/or mortalities were not observed in the controlled groups using only in water, of water plus polisorbato 80 and of water plus dimetilsulfóxido. Larvae mortality occurred by the exposure to the solutions containing *C. guianensis* and *Copaifera* oils in the temperature of 25°C, evidence that the natural populations of *A. aegypti* analyzed were susceptibly to the oils, as well as, of Rockefeller strain. The efficacy of the oils for lethality was directly related to the increase of the temperature. The larval lethality, caused by the oils of *C. guianensis* and *Copaifera*, occurred in less than three hours of exposure. The persistence of *Copaifera* and mainly *C. guianensis* as larvicidal, evidenced the efficacy of these oils for periods of more than 20 days. Populations of *A. aegypti* placed into the sub-lethal concentrations of *C. guianensis* and *Copaifera*, demonstrated delay in the development of immature instars. Also some morphologic alterations were observed as hinder in the emergency of adults. In this way the oils demonstrate to be effective for the control of this vector.

Key words: *Aedes aegypti*. *Carapa guianensis*. *Copaifera*. Botanical larvicida. Persistence. Sub-lethal effect.

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma infecção transmitida por mosquitos, que, nas últimas décadas, tornou-se um grave problema de saúde pública internacional. Esta arbovirose é encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente em áreas urbanas e semi-urbanas (WHO 2008).

No Brasil, a ocorrência de casos de dengue incluindo febre hemorrágica do dengue tem aumentado, consideravelmente, desde 1990, reflexo da elevada dispersão de seu vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) no território nacional. As maiores epidemias detectadas até o momento, no Brasil, ocorreram nos anos de 1998 e 2002 com cerca de 530 mil e 800 mil casos notificados, respectivamente. Em 2007 foram registrados 559.954 casos suspeitos de dengue, 1.541 casos confirmados de febre hemorrágica do dengue e 158 óbitos. A região sul registrou 50.841 casos de dengue, sendo que o Estado do Paraná confirmou nove casos de dengue hemorrágica com cinco óbitos. Esta região apresentou o maior aumento no número de casos se comparado com o mesmo período de 2006 (807%), em virtude das transmissões ocorridas em vários municípios do Estado do Paraná (SVS 2008a). No ano de 2008, até o mês de abril, foram confirmados 230.829 casos suspeitos de dengue, 1.069 casos confirmados de febre hemorrágica da dengue e a ocorrência de 77 óbitos resultando em uma taxa de letalidade para febre hemorrágica da dengue de 7,2%. Também foram notificados 3.298 casos de dengue com complicação, com 53 óbitos. A região sul, neste mesmo período, notificou 6.769 casos de dengue, destes, 6.108 casos foram registrados apenas no Estado do Paraná (SVS 2008b).

Enquanto se aguarda a disponibilidade de uma vacina eficaz ou drogas antivirais, específicas contra os quatro sorotipos da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, e DEN-4), a única forma de reduzir a incidência desta doença se restringe ao controle do vetor *A. aegypti* (Bangs, 2001; MS/SVS, 2004). O controle deste frequentemente dependente de aplicações de inseticidas sintéticos convencionais (Malavige *et al.* 2004).

O controle químico, através de organofosforados e piretróides é caracteristicamente eficaz contra mosquitos. No entanto, se o mesmo produto inseticida é utilizado por muitas gerações estes culicídeos podem desenvolver

alteração na suscetibilidade, tornando-os menos susceptíveis (Lawler & Lanzaro 2005). Pesticidas químicos organofosforados e piretróides são uma poderosa ferramenta contra vetores e continuarão desempenhando papel importante no controle integrado. No entanto, eles têm desvantagens, como o custo elevado, riscos a saúde humana e a organismos não-alvo, bioacumulação e desenvolvimento de resistência dos organismos alvo (Thatheyus 2007). Estes problemas têm justificado a necessidade de novas estratégias alternativas usando produtos de origem natural, especialmente os derivados de plantas, minimizando a dependência aos inseticidas químicos sintéticos como os organofosforados e piretróides.

Produtos de origem botânica são amplamente reconhecidos por sua diversidade química, como por sua considerável aplicação na área farmacêutica (Penido *et al.* 2005). Logo, as plantas oferecem uma fonte alternativa de controle porque contêm uma série de bioativos químicos. Considerável número de pesquisas tem ressaltado a busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos (Schmutterer 1990; Sukamar *et al.* 1991; Silva *et al.* 2004; Mendonça *et al.* 2005; Amer & Mehlhorn, 2006a e 2006b; Silva *et al.* 2006; Champakaew *et al.* 2007; Gleiser & Zygadlo 2007; Cheng *et al.* 2008; Geris *et al.* 2008; Mullai *et al.* 2008; Pavela 2008; Pushpanathan *et al.* 2008; Rahuman *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008).

Dentre estas plantas, destaca-se *Carapa guianensis* Aublet. (Andiroba) pertencente à família Meliaceae e espécies do gênero *Copaifera* Linnaeus, 1762 (Copaíba) que pertence à família Leguminosae. *C. guianensis* ocorre no sul da América Central, como também na Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Peru, Paraguai e nas ilhas do Caribe (Pennington *et al.* 1981). Árvores do gênero *Copaifera* são nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina (Veiga & Pinto 2002).

O fruto da andirobeira é em forma de cápsula com várias sementes em seu interior. Estas sementes possuem uma grande concentração de óleo, reconhecido por sua eficácia como repelente de insetos, propriedades antialérgicas e antiinflamatórias, no tratamento de doenças cutâneas, artrite, reumatismo, otite, infecções respiratórias incluindo faringite, laringite, tosse, gripe, pneumonia e bronquite (Hammer & Johns 1993; Gilbert *et al.* 1999; Miot *et al.* 2004; Orellana *et al.* 2004; Penido *et al.* 2005; Penido *et al.* 2006a; Penido *et al.* 2006b;). Óleo de *C.*

*guianensis* apresenta triterpenos, tetraterpenos, alcalóides e limonóides, características fitoquímicas presentes em todos os membros da família Meliaceae (Banerji & Nigam 1984). A caracterização química dos óleos de sementes de *C. guianensis* revelou a presença de ácidos mirístico, palmítico, oléico, linoléico, esteárico e araquídico (Pinto 1956; Pereira *et al.* 1997). Diferentes tetranortriterpenóides são encontrados na composição química de *C. guianensis*. Estes são principalmente limonóides (2-5%), como andirobina; 6 $\alpha$  - acetoxiepoxiazadiradiona; 6 $\alpha$  - acetoxigedunina; 6 $\beta$  - acetoxi gedunina; 11 $\beta$  - acetoxigedunina; 6 $\alpha$ ,11 $\beta$  - diacetoxigedunina; 6 $\beta$ ,11 $\beta$  - diacetoxigedunina; 6 $\alpha$ - hidroxigedunina; 7-deacetoxi-7-oxogedunina; 1,3-dibenzeno carbono amino-2-octadecílico ácido-gliceride; hexacosanóico ácido-2,3-dihidroxi-gliceride; ácido ursólico; naringenina; scopoletina; 3,4-di-hidroxi-metil-benzoato; 2,6-di-hidroxi-metil-benzoato; ácido tetra-triacontanóico e ácido triacontanóico (Taylor *et al.* 1984; Qi *et al.* 2004; Penido *et al.* 2005; Penido *et al.* 2006).

Estudos demonstrando a atividade larvicida de *C. guianensis* foram descritos por Silva *et al.* (2004) para populações silvestres de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), Silva *et al.* (2006) e Mendonça *et al.* (2005) para populações de laboratório de *A. aegypti*. A eficácia no efeito larvicida de plantas pertencentes à família Meliaceae, como *Azadirachta indica* A. Juss (Neem), tem sido diretamente relacionada aos seus limonóides (Mitchell *et al.* 1997, Siddiqui *et al.* 2000, Wandscheer *et al.* 2004).

Espécies do gênero *Copaifera*, que exudam do seu tronco um óleo resinoso chamado de óleo de copaíba é também descrito como bálsamo de copaíba. Óleo de *Copaifera* são óleos-resina obtidos através da incisão a cerca de um metro de altura do tronco de árvores de várias espécies do gênero *Copaifera* (Veiga Junior *et al.* 2007). Conforme Biavatti *et al.* (2006), não há como garantir, de imediato, a identidade botânica do óleo de *Copaifera* já que o óleo vem sendo obtido na maioria das vezes via extrativismo sustentável e, simultaneamente, de várias espécies de *Copaifera*. Este óleo demonstra efeito antiinflamatório, gastroprotetor, cicatrização cutânea, efeito protetor contra colite induzida em ratos, bactericida, tripanossomicida, anti-helmíntico, analgésico, antiinflamatório e antitumoral (Maruzzela & Sicurella 1960; Pellegrino 1967; Gilbert *et al.* 1972; Opdyke 1976; Basile *et al.* 1988; Fernandes & Pereira 1989; Fernandes *et al.* 1992; Ohsaki *et al.* 1994; Pessoa *et al.* 1994; Cascon *et al.* 1998; Paiva *et al.* 2004). A composição química de óleos de *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata*

Ducke e *Copaifera multijuga* Hayne apresenta principalmente sesquiterpenos e diterpenos. Entre os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -bergamoteno,  $\delta$ -cadineno. Entre os diterpenos, os principais componentes foram o ácido copálico para *Copaifera multijuga*, ácidos hardwíckiico e clorechínico para *Copaifera cearensis*, ácidos caurenóico e colavênico predominam em *Copaifera reticulata* (Veiga Junior *et al.* 2007).

Com relação a estudos envolvendo propriedades inseticidas desta planta, Silva *et al.* (2003) avaliaram *Copaifera reticulata* (Ducke, 1915) sobre populações de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823). Mendonça *et al.* (2005), Silva *et al.* (2007) e Geris *et al.* (2008) analisaram o efeito de *Copaifera langsdorffi* Desf. e *C. reticulata*, respectivamente, em populações de laboratório de *A. aegypti*.

Os resultados obtidos até o momento indicam a potencialidade larvicida de *C. guianensis* e espécies do gênero *Copaifera*, sobre populações de *A. aegypti* provenientes de laboratório. Entretanto, em espécimes naturais de *A. aegypti*, com histórico de exposição à organofosforado, estes óleos ainda não foram avaliados. Além disso, o efeito residual, o mecanismo de ação desses óleos, efeito em diferentes temperaturas, a influência no desenvolvimento de imaturos ainda são desconhecidos.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência do óleo de *Carapa guianensis* e de *Copaifera* sp., enquanto inseticida e os prováveis efeitos sobre o desenvolvimento de imaturos de *A. aegypti*, em populações de diferentes municípios do Estado do Paraná.

### 2.1 OBJETIVOS EXPECÍFICOS

1. Determinar a susceptibilidade de larvas de terceiro instar final e quarto inicial de *A. aegypti*, provenientes de cinco localidades, aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sp., para estimar as concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) sob temperatura constante.

2. Verificar a susceptibilidade de larvas de terceiro instar final e quarto inicial de *A. aegypti*, provenientes de duas populações (Rockfeller e Foz do Iguaçu sul) aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sp., para estimar as concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) sob as temperaturas de 15, 20 e 30°C.

3. Observar o período de atividade larvicida (inicial e final) dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sp. sobre larvas de terceiro instar final e quarto inicial de *A. aegypti* (Rockfeller), sob temperatura constante.

4. Analisar a persistência residual da atividade larvicida dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sp. sobre larvas de terceiro instar final e quarto inicial de *A. aegypti* (Rockfeller), sob temperatura constante.

5. Avaliar a influência de doses sub-letais ( $CL_{50}$ ,  $CL_{20}$  e  $CL_{10}$ ) dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sp., sobre o desenvolvimento de imaturos de *A. aegypti* (Rockfeller), sob temperatura constante.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

Foram analisadas populações de *A. aegypti* provenientes de municípios do Estado do Paraná, com registro de casos de dengue no verão de 2006/2007: Ubitatã, Santa Helena, Maringá, Foz do Iguaçu setor sul e Foz do Iguaçu setor norte.

#### 3.2 Coleta de material

Para a obtenção das populações naturais de *A. aegypti* foram instaladas armadilhas do tipo ovitrampa pelo Núcleo de Entomologia da 9ª Regional de Saúde de Foz do Iguaçu - Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA), nas localidades de Ubitatã (1º coleta – 06/03 a 10/03/2007) e (2º coleta – 30/04 a 04/05/2007), Santa Helena (05/03 a 09/03/2007), Maringá (30/01 a 03/02/2006), Foz do Iguaçu setor sul (14/03 a 19/03/2007) e setor norte (14/03 a 19/03/2007) no verão de 2006/2007.

O município de Ubitatã localiza-se na região centro ocidental paranaense, com população de 22.000 habitantes, em área urbana média de 17.000 e em área rural média de 5.000 habitantes (IBGE 2008). Santa Helena está situada na região oeste paranaense com população de 21.000 habitantes, em área urbana média de 10.000 e em área rural média de 11.000 habitantes (IBGE 2008). Maringá está situada na região noroeste paranaense com população de 289.000 habitantes, em área urbana média de 284.000 e em área rural média de 5.000 habitantes (IBGE 2008). Foz do Iguaçu localiza-se no extremo oeste paranaense, na fronteira do Brasil com o Paraguai e a Argentina, com população de 259.000 habitantes, em área urbana média de 257.000 e em área rural média de 2.000 habitantes (IBGE 2008) (FIGURA 1).

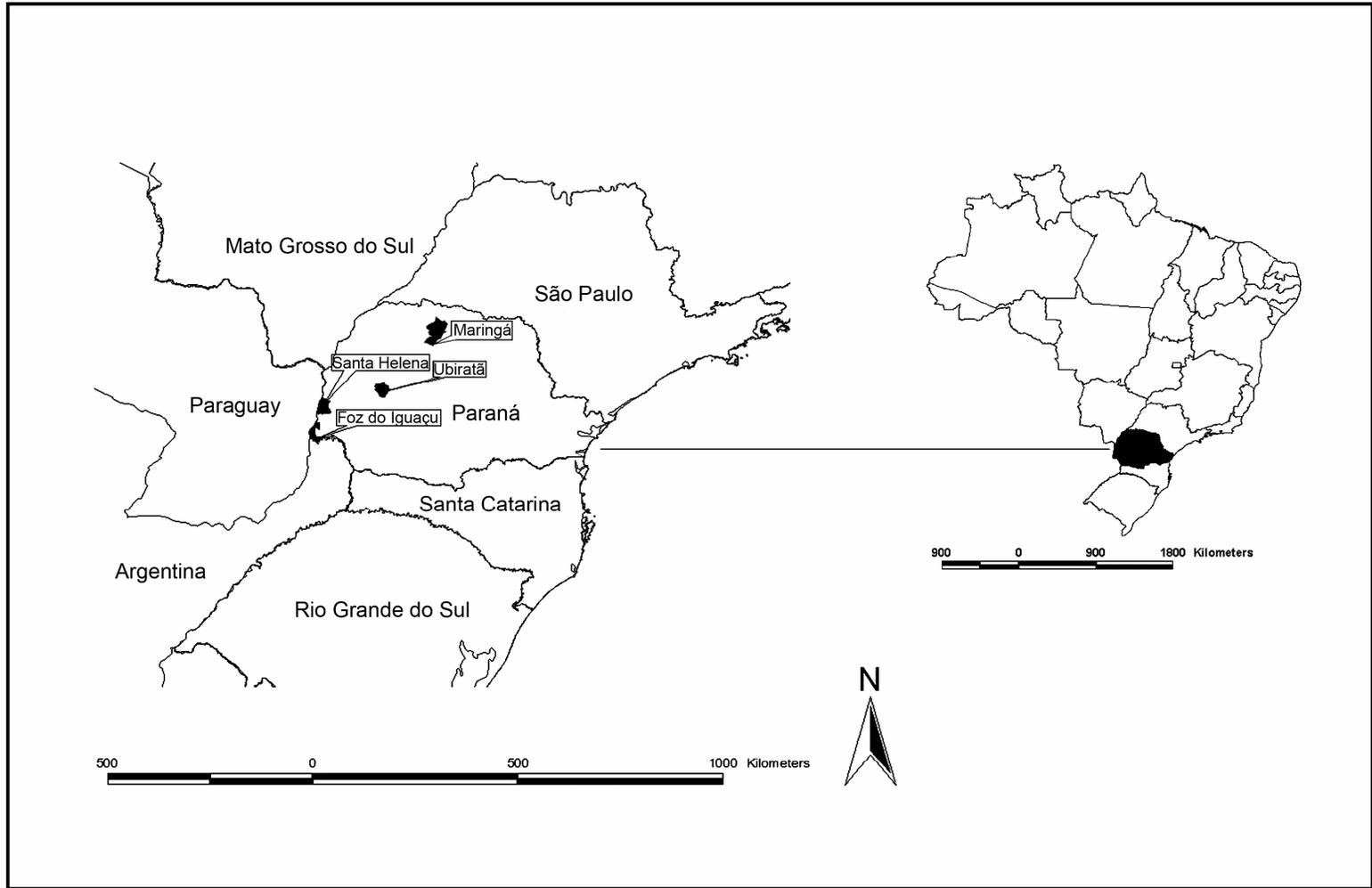


FIGURA 1 - Mapa do Brasil, destacando os municípios analisados do Estado do Paraná – Brasil.

A distribuição das armadilhas foi de forma aleatória nos peridomicílios das residências e distribuídas em vários pontos dos municípios, seguindo o padrão da Fundação Nacional de Saúde (Funasa 2001). As ovitrampas são constituídas de recipientes plásticos de coloração escura, em seu interior é fixada verticalmente uma paleta de madeira (eucatex) utilizando um clipe de metal. As paletas foram parcialmente submersas em 500 mL de água permanecendo em campo por cinco dias. Todas as paletas (positivas ou negativas) foram registradas e enviadas para o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Neste, foram armazenadas na sala de criação de insetos com temperatura e umidade relativa controlada. Após a verificação de positividade para ovos, estes foram quantificados sob microscópio estereoscópico. As paletas foram submersas individualmente em copos com capacidade de 770 mL preenchido com água de torneira submetida à passagem de ar sob pressão para reduzir o teor de cloro. Adicionou-se ração para gatos Purina® Cat Chow® triturada (0,36g por copo) para induzir a eclosão larval, a qual foi administrada diariamente até a última larva entrar no estágio de pupa. As larvas foram mantidas nestes copos até o estágio de pupa e nesta fase foram retiradas e colocadas em gaiolas individualizadas e identificadas com o número e município da paleta, para captura dos adultos emergidos. Em seguida, os adultos de *A. aegypti* foram acondicionados por município em gaiolas (30cm x 30cm x 30cm) para implantação de colônias e obtenção da geração de ovos F2/F3 utilizados nos bioensaios. No interior das gaiolas os adultos foram tratados com uma solução de mel (10%), que foi renovada duas vezes por semana. As fêmeas realizaram a hematofagia em camundongo imobilizado, duas vezes por semana, para o desenvolvimento de seus ovos (Certificado Comitê de Ética: 227). Recipientes de vidro com papel filtro (12,5 cm de diâmetro, gramatura 80 g/m<sup>2</sup>, espessura 205 µm e 0,5% de cinza) umedecido foram colocados no interior de cada gaiola, como local de oviposição das fêmeas (FIGURA 2).

Todo o processo de criação e armazenamento do material foi em condições controladas de temperatura (25±2°C), umidade relativa 80±10% e fotofase 12h.



FIGURA 2 - Amostra de paleta recebida, identificação e individualização, indução a eclosão larval, estabelecimento das colônias, obtenção de ovos para os bioensaios, indução a eclosão com larvas de idade sincronizada e triagem das larvas para os bioensaios.

### 3.3 Obtenção dos óleos

Óleo-resina de *Copaifera* foi coletado através de perfurações no tronco de *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulata* pela cooperativa Amazoocop, formada por cinco sociedades indígenas em Altamira, Pará - Brasil. As sementes de *C. guianensis* foram também coletadas pela mesma cooperativa. Estas sementes foram encaminhadas ao galpão de extração de óleo da Amazoncoop, localizado no município de Altamira, onde foram realizados os processos de secagem, trituração e prensa necessários à extração deste óleo.

### 3.4 Preparo das soluções

O óleo de *C. guianensis* foi primeiramente pesado e dissolvido em água em temperatura de 40°C, utilizando como promotor da solubilidade o tensoativo polisorbato 80 na concentração de 0,025%, para a produção de uma solução principal a 750 mg/L do óleo. Esta solução principal foi utilizada para preparar uma série de soluções, em concentrações de 10 a 750 mg/L, através da diluição da solução principal em água, quatro réplicas de cada concentração foram produzidas. O grupo controle foi realizado com quatro réplicas de polisorbato 80 na concentração de 0,025% dissolvidos em água e quatro réplicas somente com água.

Para o preparo da solução principal contendo óleo de *Copaifera* na concentração de 700 mg/L, este foi pesado e dissolvido em água em temperatura de 40°C, utilizando como promotor da solubilidade o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2%. Esta solução foi utilizada para preparar uma série de soluções, em concentrações de 12 a 114 mg/L, através da diluição da solução principal em água, quatro réplicas de cada concentração foram produzidas. O grupo controle foi realizado com quatro réplicas de DMSO na concentração de 2% dissolvidos em água e quatro réplicas somente com água.

### 3.5 Bioensaios

#### 3.5.1 Efeito larvicida

A susceptibilidade larval de populações de *A. aegypti* de cinco municípios do Estado do Paraná foi determinada sob a temperatura de 25°C. Para cada bioensaio utilizaram-se 1.000 larvas (terceiro instar tardio e quarto instar inicial - quatro réplicas de 25 larvas por concentração) de cada população que foram expostas a 10 diferentes concentrações (CM - concentrações múltiplas) de *C. guianensis* e *Copaifera*. Para o controle, 100 larvas de cada população divididas em quatro réplicas foram expostas ao polisorbato 80, 100 larvas para o DMSO e outras 100 larvas somente em água. Para servir de controle interno, em cada bioensaio, o mesmo procedimento foi realizado simultaneamente com larvas da cepa Rockfeller. Os bioensaios foram reproduzidos três vezes em dias diferentes. Imediatamente após o preparo dos bioensaios os recipientes contendo as soluções e as larvas, foram acondicionados à temperatura 25°C com umidade relativa de 80% ( $\pm 10\%$ ), em câmara climatizada modelo 132FC marca ELETROlab® (FIGURA 3).

Posteriormente, a susceptibilidade larval de *A. aegypti* foi determinada sob outras três diferentes temperaturas de 15, 20 e 30°C com umidade relativa de 80% ( $\pm 10\%$ ), em câmara climatizada modelo 132FC marca ELETROlab®. Nestes bioensaios utilizaram-se larvas de terceiro instar tardio e quarto instar inicial provenientes de duas populações de *A. aegypti*, Foz do Iguaçu setor sul e cepa Rockfeller. O desenho experimental seguiu como descrito anteriormente para a susceptibilidade na temperatura de 25°C.

A mortalidade foi verificada após 24 horas de exposição aos óleos. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO 1981). O mesmo procedimento foi realizado com os grupos controle de somente água, água mais polisorbato 80 e água mais DMSO. As larvas utilizadas nos bioensaios foram provenientes da segunda e terceira geração de ovos obtida em condições de laboratório (F2/F3) de cada população avaliada. As larvas sobreviventes aos testes foram descartadas. Todos os testes foram realizados em conjunto com a cepa Rockfeller.

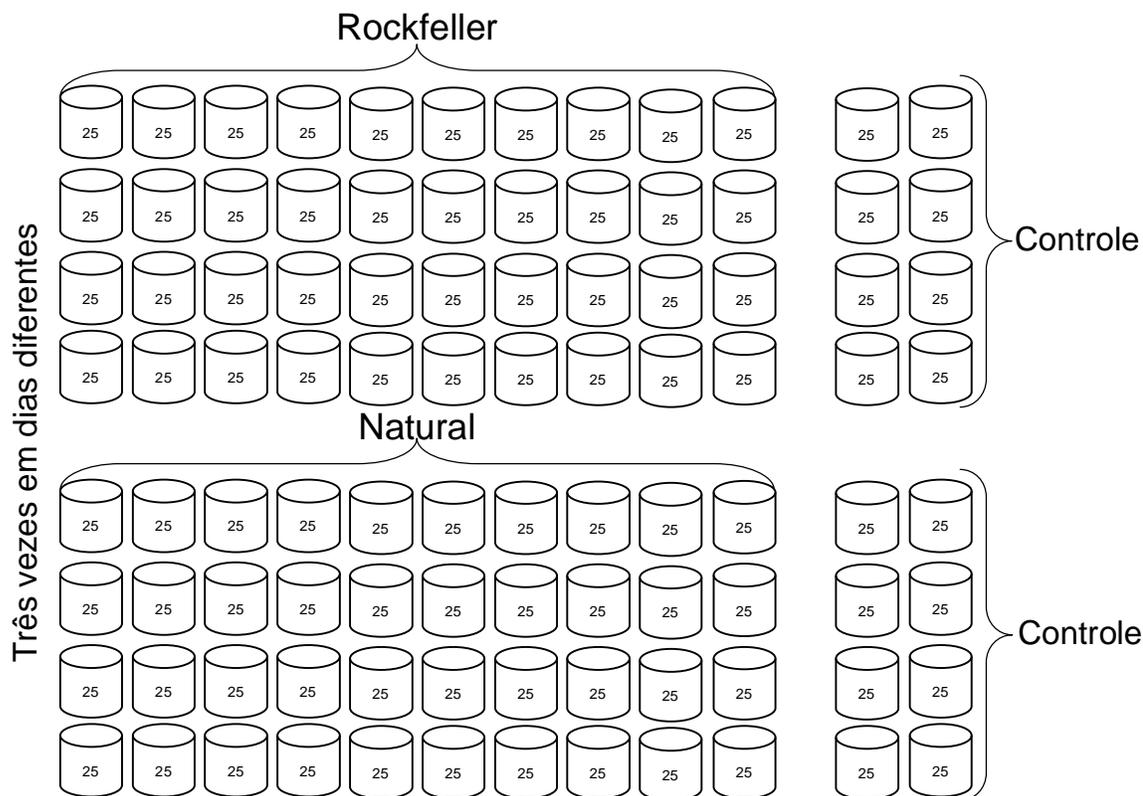


FIGURA 3 - Modelo de análise de susceptibilidade aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, sob diferentes temperaturas.

### 3.5.2 Período de atividade larvicida

Para constatar o período de atividade larvicida dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* foi utilizada a concentração correspondente a  $CL_{99}$  de cada óleo, previamente calculada para a temperatura de 25°C. Utilizaram-se larvas de terceiro instar tardio e quarto instar inicial provenientes apenas da cepa Rockefeller. O preparo das soluções seguiu como descrito anteriormente, as concentrações utilizadas foram 1.400 mg/L para óleo de *C. guianensis* e 150 mg/L para óleo de *Copaifera*. Foram utilizadas quatro réplicas, cada uma contendo 500 mL da solução em recipientes plásticos com capacidade de 1.000 mL. Duzentas larvas foram colocadas em cada réplica, totalizando 800 larvas por bioensaio. Posteriormente, os recipientes foram acondicionados à temperatura de 25°C com umidade relativa de 80% ( $\pm 10\%$ ), em câmara climatizada modelo 132FC marca ELETROlab® (FIGURA

4). A mortalidade foi verificada após 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas de exposição aos óleos. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas foram consideradas como mortas (WHO 1981a; 1981b). As larvas sobreviventes aos testes foram descartadas. O mesmo procedimento foi realizado com os grupos controle de somente água, água mais polisorbato 80 e água mais DMSO. Os bioensaios foram reproduzidos três vezes em dias diferentes.

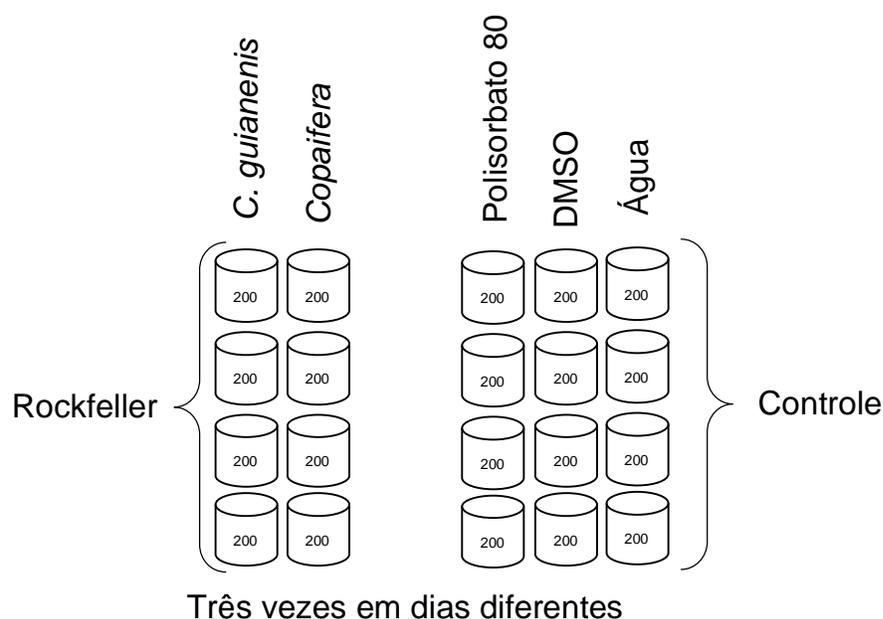


FIGURA 4 - Modelo de análise do período de atividade larvicida dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, sob temperatura constante.

### 3.5.3 Efeito residual

Para verificar o efeito residual dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* foi utilizada a concentração correspondente a  $CL_{99}$  de cada óleo, previamente calculada para a temperatura de 25°C. Para avaliar o efeito residual utilizaram-se larvas de terceiro instar tardio e quarto instar inicial provenientes apenas da cepa Rockefeller. O preparo das soluções seguiu como descrito anteriormente, as concentrações utilizadas foram 1.400 mg/L para óleo de *C. guianensis* e 150 mg/L para óleo de *Copaifera*. Foram utilizadas quatro réplicas, cada uma contendo 500 mL da solução em recipientes plásticos com capacidade de 1.000 mL. Duzentas larvas foram

colocadas em cada réplica, totalizando 800 larvas por bioensaio. Posteriormente, os recipientes foram acondicionados à temperatura de 25°C com umidade relativa de 80% ( $\pm 10\%$ ), em câmara climatizada modelo 132FC marca ELETROlab® (FIGURA 5). A mortalidade foi verificada após 24 horas de exposição aos óleos. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas foram consideradas como mortas (WHO 1981a; 1981b). As larvas sobreviventes aos testes foram descartadas. Em seguida, a solução de cada réplica foi filtrada e 200 novas larvas sadias foram colocadas para exposição. Este processo foi repetido até não se obter qualquer mortalidade larval. O mesmo procedimento foi realizado com os grupos controle de somente água, água mais polisorbato 80 e água mais DMSO.

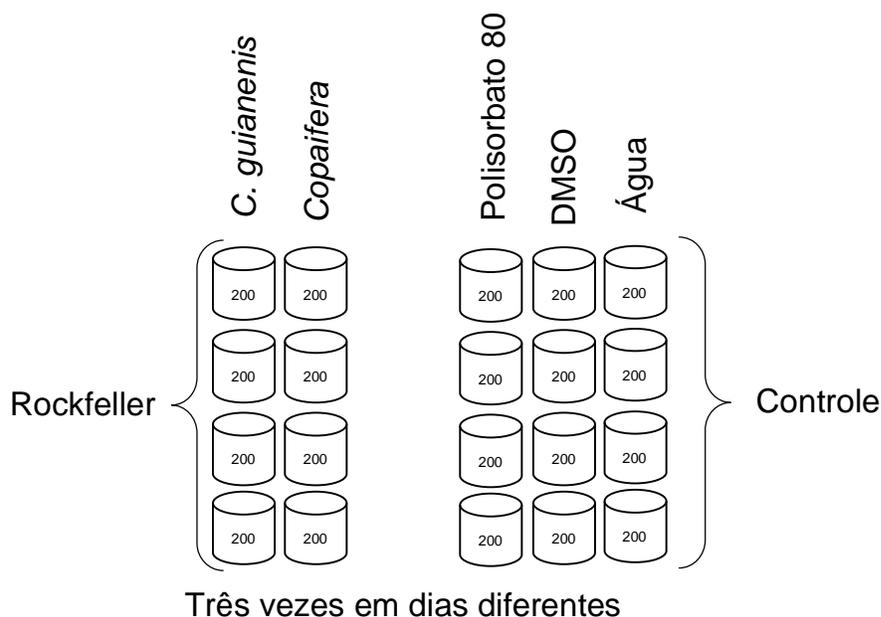


FIGURA 5 - Modelo de análise do efeito residual dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, sob temperatura constante.

### 3.5.4 Efeito sub-letal

Para verificar o efeito sub-letal dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* foram utilizadas as concentrações correspondente a  $CL_{50}$ ,  $CL_{20}$  e  $CL_{10}$ , previamente calculadas para a temperatura de 25°C. O preparo das soluções seguiu como descrito anteriormente, para óleo de andiroba as concentrações utilizadas foram

CL<sub>50</sub>: 140 mg/L, CL<sub>20</sub>: 60 mg/L e CL<sub>10</sub>: 40 mg/L. Para óleo de copaíba as concentrações foram CL<sub>50</sub>: 48 mg/L, CL<sub>20</sub>: 32 mg/L e CL<sub>10</sub>: 26 mg/L. Prepararam-se três réplicas, cada uma contendo 500 mL da solução em recipientes plásticos com capacidade de 1.000 mL. Para a alimentação das larvas e possível desenvolvimento ao estágio adulto, adicionou-se ração para gatos Purina® Cat Chow® triturada (0,36 g) em cada réplica. Trezentas larvas de terceiro instar final e quarto inicial foram colocadas em cada réplica, totalizando 900 larvas por bioensaio. Posteriormente, os recipientes foram acondicionados à temperatura de 25°C com umidade relativa de 80% (±10%), em câmara climatizada modelo 132FC marca ELETROlab® (FIGURA 6).

O comportamento larval, alimentação, presença de exúvias, mudança de estágio, eclosão de adultos, mobilidade alterada, debilidade e mortalidade foram verificados diariamente até a possível obtenção de adultos. As larvas sobreviventes foram deixadas na água tratada até a possível emergência dos adultos. Não foram adicionadas novas larvas sadias. A cada 96 horas foi adicionado 0,36g de ração para gatos Purina® Cat Chow® triturada, por réplica, e a solução foi misturada por 15 segundos. O mesmo procedimento foi realizado com os grupos controle de somente água, água mais polisorbato 80 e água mais DMSO.

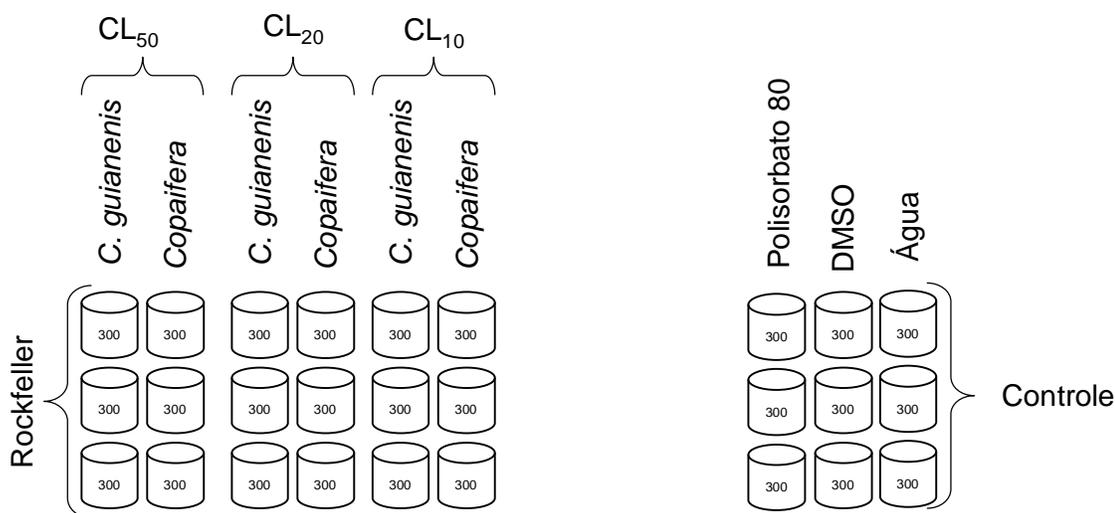


FIGURA 6 - Modelo de análise para o efeito de concentrações sub-letais dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, sob temperatura constante.

### 3.6 Análise estatística

Os valores de concentração letal  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  e  $CL_{95}$  na temperatura de 15, 20, 25 e 30°C, teste  $\chi^2$ , coeficiente angular e intervalos de confiança foram determinados pela análise Probit GW-Basic (Finney 1971). Para detectar diferenças nos tratamentos em relação as diferentes populações e temperaturas utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (KW) e quando se detectou diferenças aplicou-se o teste de Comparações Múltiplas, através do programa STATISTICA 7.0, com nível de significância  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito larvicida

As soluções contendo os óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* demonstraram atividade larvicida, em intervalo de concentrações dose-resposta, sobre as populações naturais de *A. aegypti* avaliadas sob temperatura controlada de 25°C (TABELA 1 e TABELA 2).

Os resultados obtidos, através da exposição aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sob temperatura controlada de 25°C, demonstraram não haver diferença significativa entre os valores de mortalidade obtidos em todos os municípios avaliados incluindo a cepa Rockefeller ( $KW = 0,055$ ;  $P = 1,00$ ;  $X^2 = 0,00$ ;  $gl = 5$ ;  $P = 1,00$  e  $KW = 0,143$ ;  $P = 0,9996$ ;  $X^2 = 0,94$ ;  $gl = 5$ ;  $P = 0,97$ ), respectivamente.

A eficácia dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* contra larvas de *A. aegypti*, além de 25°C, também foi verificada sob outras três diferentes temperaturas (15, 20 e 30°C). Nesta análise, apenas a população natural de Foz do Iguaçu setor sul e a cepa Rockefeller foram analisadas (TABELA 3 e TABELA 4).

O efeito larvicida causado pelo óleo de *C. guianensis* sob as temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C evidenciou diferença significativa na mortalidade obtida entre estas diferentes temperaturas nas populações de *A. aegypti* avaliadas ( $KW = 36,32$ ;  $P < 0,05$ ;  $X^2 = 18,45$ ;  $gl = 3$ ,  $P = 0,0004$ ). Entretanto, quando o efeito larvicida causado pelo óleo de *C. guianensis* foi comparado de forma múltipla, observou-se que as mortalidades obtidas entre as temperaturas de 15 - 20°C e entre 25 - 30°C não apresentaram diferenças significativas (FIGURA 7).

Diferenças significativas também foram observadas na mortalidade causada pelo óleo de *Copaifera* sob as temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C nas populações analisadas ( $KW = 101,62$ ;  $P < 0,05$ ;  $X^2 = 68,69$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0,05$ ). Apenas o efeito larvicida causado pelo óleo de *Copaifera* entre as temperaturas de 25 - 30°C, quando comparado de forma múltipla, não evidenciou diferença significativa (FIGURA 8).

Alterações morfológicas externas foram verificadas em todas as larvas expostas aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, após 24 horas de exposição. As

principais alterações observadas para *C. guianensis* foram: exoesqueleto rígido, entretanto, de fácil rompimento e alongamento da parte anterior ao tórax (FIGURA 9 a,b). Para larvas expostas em óleo de *Copaifera*, as principais alterações foram: exoesqueleto flexível e de fácil rompimento, alongamento entre o tórax e a cápsula cefálica e algumas larvas apresentaram escurecimento da parte posterior do abdome (FIGURA 10 a,b). Não foi observada alterações morfológicas e mortalidades nos grupos controle de somente água, água mais polisorbato 80 e água mais DMSO.

TABELA 1 - Municípios avaliados, geração utilizada, concentrações letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, provenientes de municípios do Estado do Paraná e cepa Rockefeller, após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Carapa guianensis*, na temperatura de 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.

Localidades	Geração	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CA	X <sup>2</sup>	gl
Rockefeller	F <sub>n</sub>	141 (136-146)	499 (468-535)	2,34 ± 0,06	4,14	4
Santa Helena	F2	138 (129-147)	518 (471-576)	2,23 ± 0,07	4,35	6
Ubiratã	F2	136 (126-143)	496 (453-550)	2,26 ± 0,07	5,66	6
Maringá	F3	139 (131-148)	523 (476-581)	2,23 ± 0,07	6,96	6
Foz do Iguaçu Sul	F2	138 (130-148)	551 (499-616)	2,13 ± 0,07	7,01	6
Foz do Iguaçu Norte	F2	139 (131-148)	538 (489-600)	2,18 ± 0,07	8,96	6

Não houve mortalidade nos grupos controle. CL<sub>50</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 50% das larvas expostas, CL<sub>90</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 90% das larvas expostas, CA: coeficiente angular ± desvio padrão, X<sup>2</sup>: qui-quadrado e gl: grau de liberdade.

TABELA 2 - Municípios avaliados, geração utilizada, concentrações letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, provenientes de municípios do Estado do Paraná e cepa Rockefeller, após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Copaifera*, na temperatura de 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.

Localidades	Geração	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CA	X <sup>2</sup>	gl
Rockefeller	F <sub>n</sub>	48 (47-49)	89 (86-92)	4,83 ± 0,14	9,42	5
Santa Helena	F2	48 (47-50)	91 (85-98)	4,68 ± 0,23	1,18	5
Ubiratã	F2	48 (47-49)	87 (82-83)	4,93 ± 0,23	1,13	5
Maringá	F3	48 (46-49)	84 (80-89)	5,20 ± 0,24	3,52	5
Foz do Iguaçu Sul	F2	48 (47-49)	86 (82-91)	5,10 ± 0,21	7,33	6
Foz do Iguaçu Norte	F2	47 (46-48)	83 (79-87)	5,17 ± 0,02	7,31	6

Não houve mortalidade nos grupos controle. CL<sub>50</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 50% das larvas expostas, CL<sub>90</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 90% das larvas expostas, CA: coeficiente angular ± desvio padrão, X<sup>2</sup>: qui-quadrado e gl: grau de liberdade.

TABELA 3 - Populações analisadas, temperatura e concentração letal 50% (CL<sub>50</sub> mg/L) com respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller e proveniente do município de Foz do Iguaçu (PR), após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Carapa guianensis*, na temperatura de 15, 20, 25 e 30°C, 85% UR e 14:10 C/E.

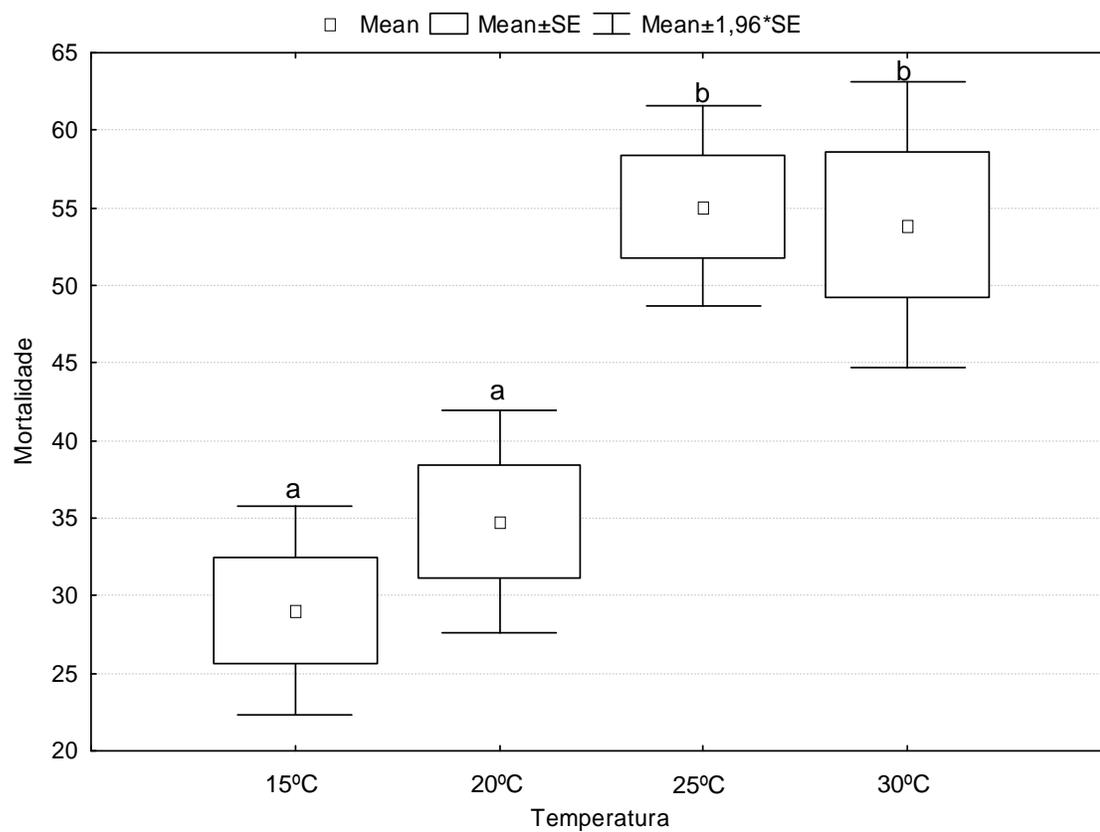
Localidades	15°C CL <sub>50</sub> (IC)	CA	X <sup>2</sup>	gl	20°C CL <sub>50</sub> (IC)	CA	X <sup>2</sup>	gl
Rockefeller	447 (412-490)	1,99 ± 0,10	7,54	5	386 (348-436)	1,68 ± 0,09	6,49	5
Foz do Iguaçu Sul	448 (414-489)	2,08 ± 0,11	10,35	5	381 (344-427)	1,79 ± 0,09	2,97	5
Localidades	25°C CL <sub>50</sub> (IC)	CA	X <sup>2</sup>	gl	30°C CL <sub>50</sub> (IC)	CA	X <sup>2</sup>	gl
Rockefeller	141 (136-146)	2,34 ± 0,06	4,14	4	146 (137-155)	2,31 ± 0,08	4,91	6
Foz do Iguaçu Sul	138 (130-148)	2,13 ± 0,07	7,01	6	145 (136-154)	2,26 ± 0,07	12,12	6

Não houve mortalidade nos grupos controle. CL<sub>50</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 50% das larvas expostas, CA: coeficiente angular ± desvio padrão, X<sup>2</sup>: qui-quadrado e gl: grau de liberdade.

TABELA 4 - Populações analisadas, temperatura e concentração letal 50% (CL<sub>50</sub> mg/L) com respectivos intervalo de confiança, coeficiente angular, qui-quadrado e grau de liberdade em populações de *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller e proveniente do município de Foz do Iguaçu (PR), após 24 horas de exposição a soluções contendo óleo de *Copaifera*, na temperatura de 15, 20, 25 e 30°C, 85% UR e 14:10 C/E.

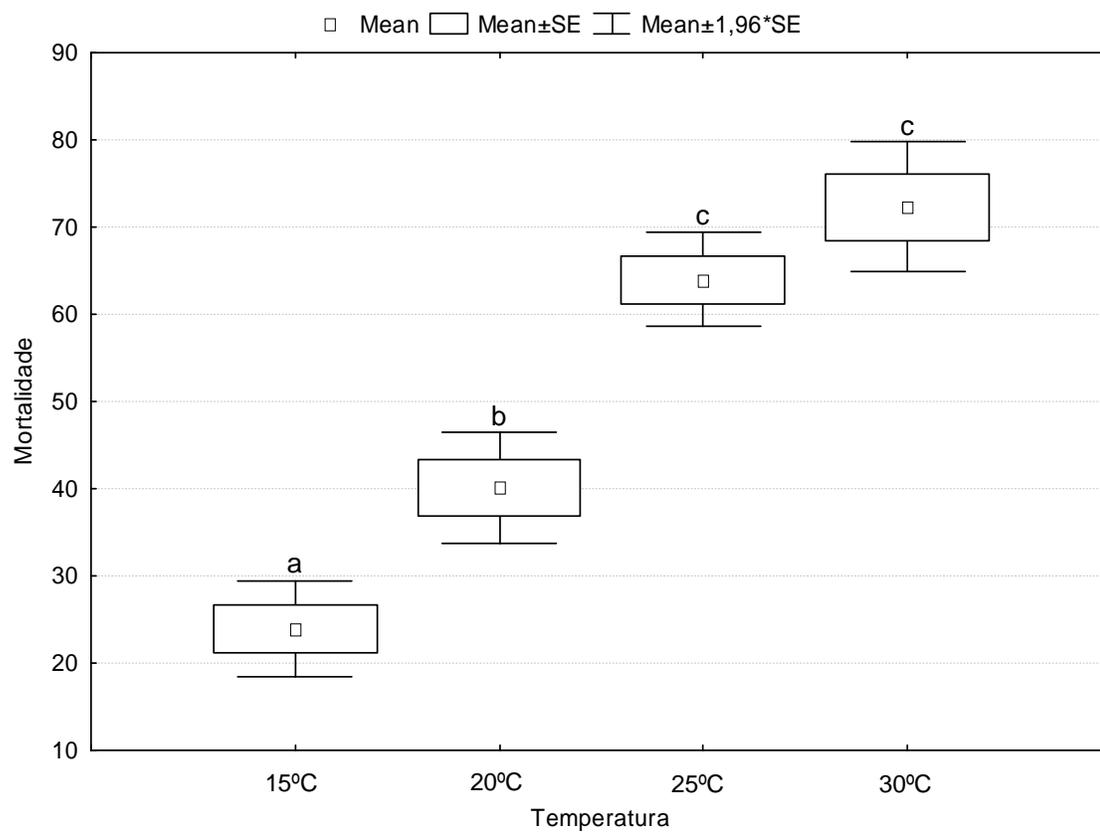
Localidades	15°C	CA	X <sup>2</sup>	gl	20°C	CA	X <sup>2</sup>	gl
Rockefeller	95 (93-98)	5,88 ± 0,23	11,64	8	72 (71-74)	4,70 ± 0,15	3,25	10
Foz do Iguaçu Sul	94 (92-96)	6,27 ± 0,26	11,21	7	72 (71-74)	4,82 ± 0,16	2,67	10
Localidades	25°C	CA	X <sup>2</sup>	gl	30°C	CA	X <sup>2</sup>	gl
Rockefeller	48 (47-49)	4,83 ± 0,14	9,42	5	40 (39-41)	5,90 ± 0,27	6,40	3
Foz do Iguaçu Sul	48 (47-49)	5,10 ± 0,21	7,33	6	41 (39-42)	5,21 ± 0,30	0,05	2

Não houve mortalidade nos grupos controle. CL<sub>50</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 50% das larvas expostas, CA: coeficiente angular ± desvio padrão, X<sup>2</sup>: qui-quadrado e gl: grau de liberdade.



\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste não-paramétrico de comparações múltiplas a 5% de probabilidade.

FIGURA 7 – Comparações múltiplas entre o efeito larvicida causado pelo óleo de *C. guianensis* nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C.



\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste não-paramétrico de comparações múltiplas a 5% de probabilidade.

FIGURA 8 – Comparações múltiplas entre o efeito larvicida causado pelo óleo de *Copaifera* nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C.



FIGURA 9a - Larvas de *A. aegypti* expostas ao óleo de *C. guianensis*.



FIGURA 9b - Larva de *A. aegypti* exposta ao óleo de *C. guianensis*.



FIGURA 10a - Larvas de *A. aegypti* expostas ao óleo de *Copaifera*



FIGURA 10b - Larvas de *A. aegypti* expostas ao óleo de *Copaifera*

## 4.2 Período de atividade larvicida

Atividade larvicida, das soluções contendo óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sobre *A. aegypti*, demonstrou que o efeito letal ocorre, principalmente, entre as primeiras 2-3 horas de exposição aos óleos. Nestes bioensaios apenas a cepa Rockefeller foi avaliada (FIGURA 11 e 12).

Observações no comportamento das larvas tratadas com óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, revelaram modo similar de toxicidade. Todas as larvas se apresentavam ativas, com movimentos normais de ziguezague, imediatamente a exposição destas aos óleos. Entretanto, após 5 minutos de exposição, movimentos anormais de perturbação foram observados na maioria das larvas expostas à concentração de 1.400 mg/L de *C. guianensis* e 150 mg/L de *Copaifera*. Nas concentrações de 500 mg/L de *C. guianensis* e 90 mg/L de *Copaifera* tais comportamentos foram observados após 15 minutos de exposição. Movimentos de agitação das larvas persistiram entre 5-60 minutos e posteriormente observaram-se início de movimentos lentos, tremores, convulsões seguidos de paralisia e morte.

## 4.3 Efeito residual

O efeito larvicida de soluções contendo o óleo de *C. guianensis* permaneceu com total eficácia (100% de mortalidade) até o 12º dia após o preparo da solução, atenuando para 97 e 92% no 13º e 14º dia. Apenas no 32º dia, após o preparo da solução, nenhuma mortalidade larval foi observada (FIGURA 13).

Nos bioensaios contendo soluções com o óleo de *Copaifera*, o efeito larvicida permaneceu com total eficácia até o 4º dia após o preparo da solução, atenuando para 96% no 5º dia. Apenas no 22º dia, após o preparo da solução, nenhuma mortalidade larval foi observada (FIGURA 13).

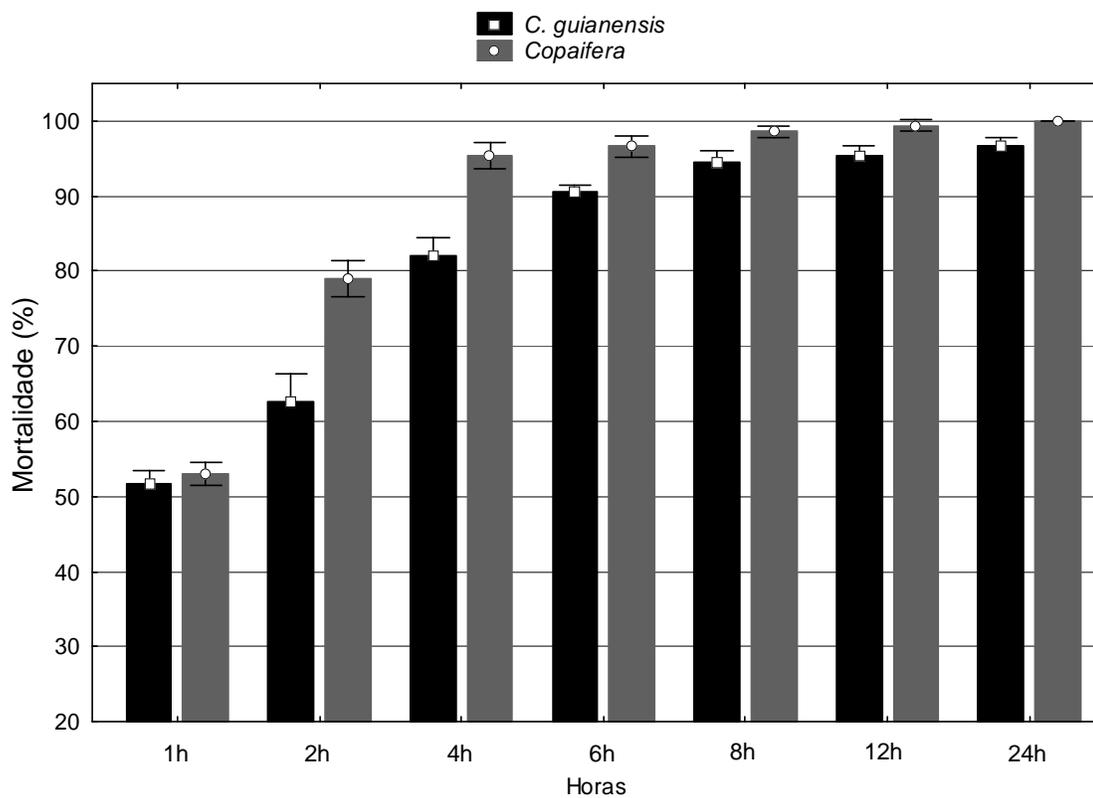


FIGURA 11 - Período de atividade larvicida, em horas, sob soluções contendo óleo de *Carapa guianensis* (500 mg/L) e de *Copaifera* (90mg/L) em populações de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller na temperatura 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.

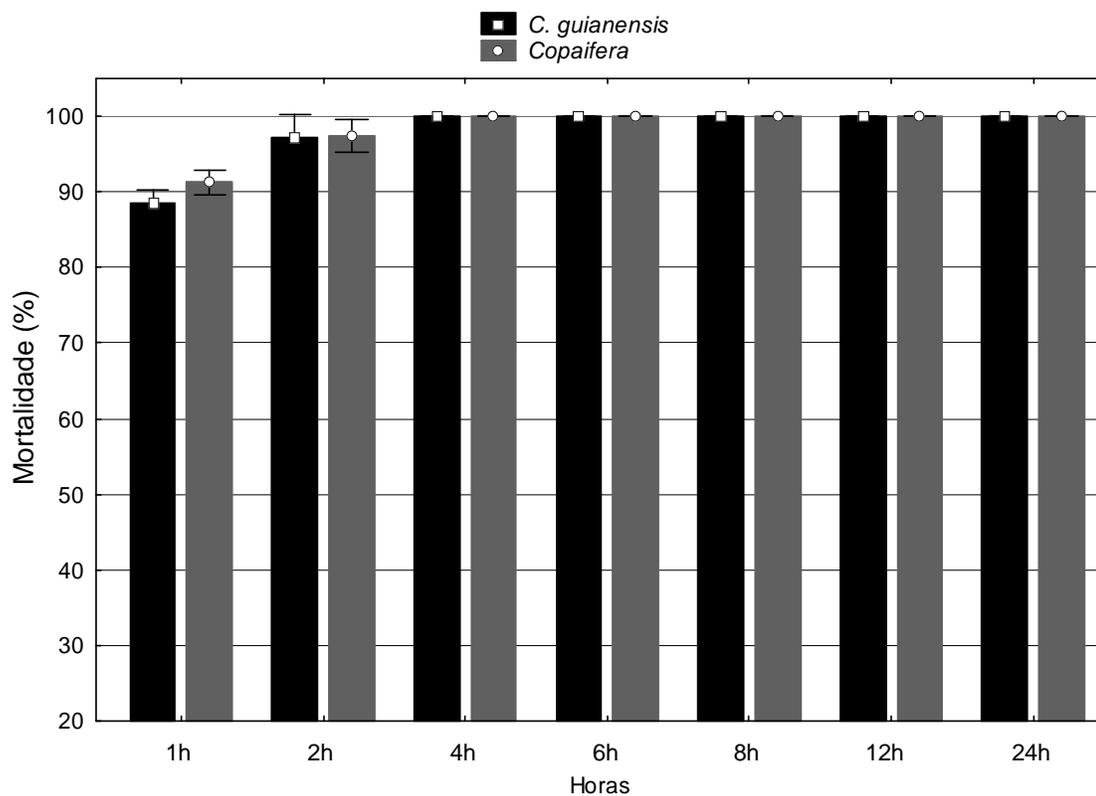


FIGURA 12 - Período de atividade larvicida, em horas, sob soluções contendo óleo de *Carapa guianensis* (1400 mg/L) e de *Copaifera* (150mg/L) em população de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller na temperatura 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.

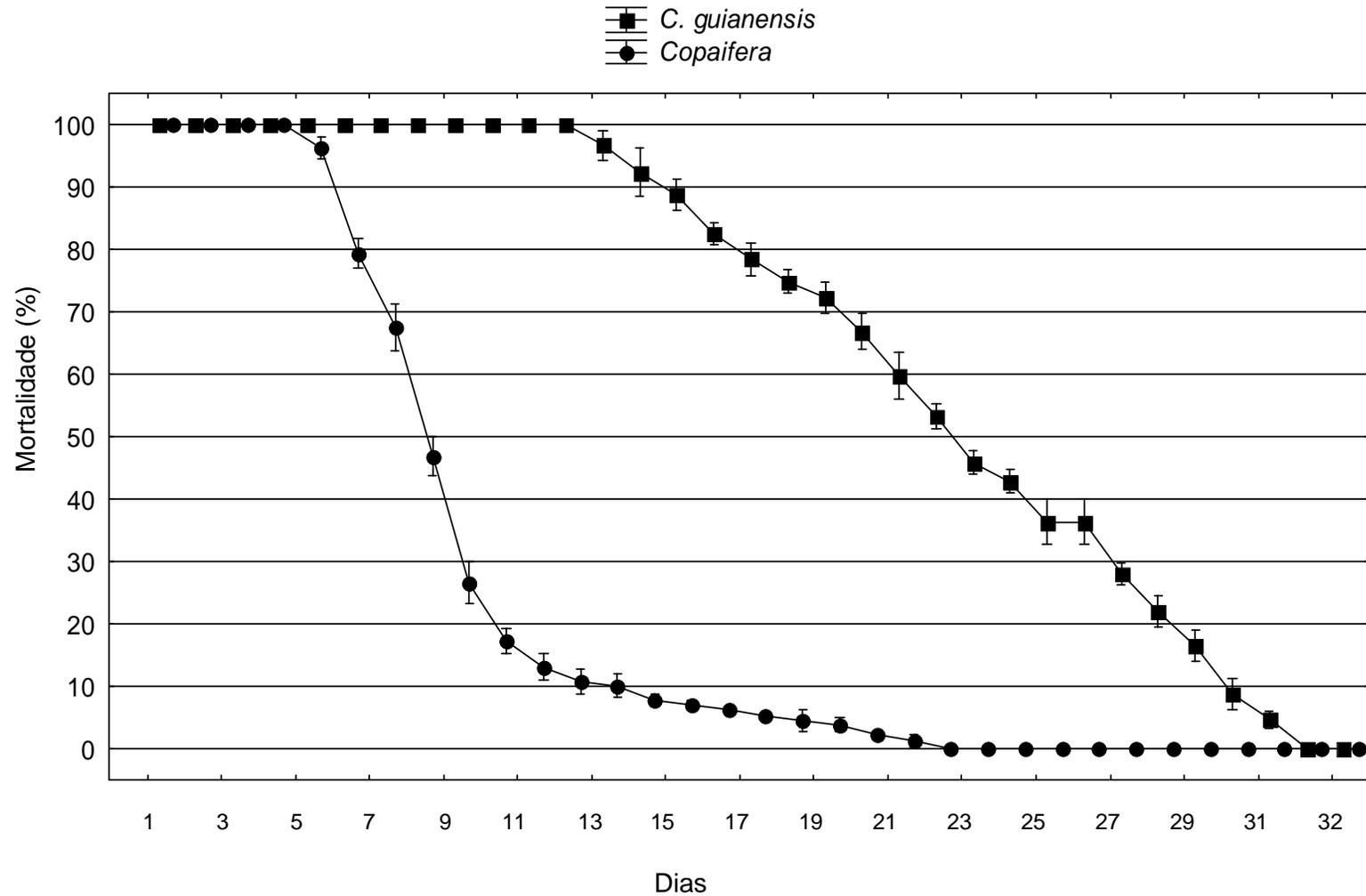


FIGURA 13 - Efeito residual, em dias da atividade larvicida, de soluções contendo óleo de *Copaifera* (150mg/L) e *Carapa guianensis* (1.400 mg/L) em populações de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller na temperatura 25°C, 85% UR e 14:10 C/E.

#### 4.4 Efeito sub-letal

Utilizando-se doses sub-letais, correspondentes a  $CL_{50}$ ,  $CL_{20}$  e  $CL_{10}$ , previamente calculadas para a temperatura de 25°C, verificou-se o efeito dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sobre o desenvolvimento de *A. aegypti*. Nesta análise, apenas a cepa Rockefeller foi utilizada.

A concentração letal de *C. guianensis* que ocasiona a morte de 50% das larvas ( $CL_{50}$ : 140 mg/L) em 24 horas de exposição ocasionou 100% de mortalidade em 72 horas. Do mesmo modo, a concentração letal de *C. guianensis* que ocasiona a morte de 20% das larvas ( $CL_{20}$ : 60 mg/L) em 24 horas de exposição ocasionou 100% de mortalidade em 96 horas. Verificou-se, nas duas concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{20}$ ), que a mortalidade total foi contígua após a troca de instar larval. Estágio de pupa e eclosão de adulto não foi observado neste tratamento. A concentração letal de *C. guianensis* que ocasiona a morte de 10% das larvas ( $CL_{10}$ : 40 mg/L) em 24 horas de exposição ocasionou 99,7% de mortalidade após uma semana de tratamento. Nesta concentração, das 900 larvas expostas, apenas três chegaram ao estágio adulto no 10º dia aparentemente sem alterações morfológicas. Em todas as concentrações utilizadas ( $CL_{50}$ ,  $CL_{20}$  e  $CL_{10}$ ) do óleo de *C. guianensis*, nestes bioensaios, observou-se que não houve alimentação larval equivalente a alimentação larval dos grupos controle. Nos grupos controle, de água mais polisorbato 80 e somente água, não houve mortalidade em 24 horas de exposição e as larvas desenvolveram-se ao estágio de pupa e, em seguida, adulto entre 48 e 120 horas (FIGURA 14).



FIGURA 14 - Pupas de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller) pertencente ao grupo controle polisorbato 80.

Para o óleo de *Copaifera* as concentrações avaliadas foram  $CL_{50}$ : 48 mg/L,  $CL_{20}$ : 32 mg/L e  $CL_{10}$ : 26 mg/L. A partir do 4º dia de tratamento as larvas expostas à concentração letal 50% e 20% sobreviventes, apresentaram-se em sua maioria debilitadas ou com mobilidade alterada. Presença de exúvias larvais foram verificadas a partir 12º dia de tratamento para a  $CL_{50}$  e 10º dia para a  $CL_{20}$ . Desenvolvimento ao estágio de pupa foi observado após 16º para a  $CL_{50}$  e 14º para a  $CL_{20}$ . Na concentração letal de 48 mg/L ( $CL_{50}$ ), das 900 larvas expostas, 153 se desenvolveram ao estágio de pupa. Porém, destas 153 pupas, 79 não se desenvolveram ao estágio adulto (FIGURA 15). Do restante de pupas, 49 iniciaram a eclosão ao estágio adulto, contudo, não conseguiram completá-la (FIGURA 16). Apenas 25 larvas alcançaram o estágio adulto, aparentemente sem alterações morfológicas externas. Na concentração letal de 32 mg/L ( $CL_{20}$ ), das 900 larvas expostas, 198 se desenvolveram ao estágio de pupa. Entretanto, destas 198 pupas, 67 não se desenvolveram ao estágio adulto (FIGURA 17). Do restante de pupas, 41 iniciaram a eclosão ao estágio adulto, contudo, não conseguiram completar a eclosão (FIGURA 18a e 18b). Das 900 larvas expostas, apenas 90 chegaram ao estágio adulto, aparentemente sem alterações morfológicas externas. As larvas expostas à concentração letal de *Copaifera* que ocasiona a morte de 10% das larvas

(CL<sub>10</sub>: 26 mg/L) em 24 horas de exposição, apresentaram mortalidade baixa. As larvas sobreviventes desenvolveram-se ao estágio de pupa a partir do 13º dia e adulto a partir do 16º dia. No estágio de pupa também houve mortalidade baixa. Nesta concentração, das 900 larvas expostas, 314 chegaram ao estágio adulto aparentemente sem alterações morfológicas externas. Nos grupos controle, de água mais DMSO e somente água, não houve mortalidade larval em 24 horas e as larvas desenvolveram-se ao estágio de pupa e, em seguida, adulto entre 48 e 120 horas (Figura 19). Em todas as concentrações utilizadas (CL<sub>50</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>10</sub>) do óleo de *Copaifera*, nestes bioensaios, observou-se que não houve alimentação larval equivalente a alimentação larval dos grupos controle.



FIGURA 15 - Pupas de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller), expostas à concentração letal de 48 mg/L (CL<sub>50</sub>), de *Copaifera* que não se desenvolveram ao estágio adulto.



FIGURA 16 - Emergência incompleta de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller), exposto à concentração letal de 48 mg/L (CL<sub>50</sub>), de *Copaifera*.



FIGURA 17 - Pupas de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller), expostas à concentração letal de 32 mg/L (CL<sub>20</sub>) de *Copaifera* que não se desenvolveram ao estágio adulto.



FIGURA 18a - Emergência incompleta de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller), exposto à concentração letal 32 mg/L (CL<sub>20</sub>) de *Copaifera*.



FIGURA 18b - Detalhe emergência incompleta de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller), exposto à concentração letal 32 mg/L (CL<sub>20</sub>) de *Copaifera*.



FIGURA 19 - Pupas de *A. aegypti* (cepa: Rockefeller), pertencente ao grupo controle DMSO.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito larvicida

A eficácia como larvicida das soluções contendo óleo de *C. guianensis* e de *Copaifera* foi verificada em todas as populações avaliadas. As cinco populações naturais de *A. aegypti* e a população de laboratório (Rockefeller) apresentaram mortalidade larval similar sob condições controladas de temperatura a 25°C. Estes resultados demonstram que as populações naturais e de laboratório avaliadas respondem de maneira semelhante e homogênea à exposição aos óleos. O que era esperado, pois o modo de ação destes óleos para causar a letalidade é distinto do modo de ação dos inseticidas químicos sintéticos, como organofosforado, a que estas populações de *A. aegypti* naturais são expostas no ambiente. Indicando que as populações naturais de *A. aegypti* são inteiramente susceptíveis aos óleos de *C. guianensis* e de *Copaifera*, assim como a cepa referência de laboratório Rockefeller.

Em estudos prévios, Silva *et al.* (2004), avaliaram o efeito larvicida de sementes de *C. guianensis* em populações de *A. albopictus*. Os autores concluíram que as sementes possuem propriedades larvicidas e que possivelmente o óleo contido nessas sementes é que provocou mortalidade larval. Posteriormente, Silva *et al.* (2006), avaliaram a atividade larvicida do óleo de *C. guianensis* para duas populações de laboratório de *A. aegypti* (Rockefeller e GCZ). O óleo de *C. guianensis* causou mortalidade em todos os estádios larvais de ambas as linhagens. Mendonça *et al.* (2005), avaliando o potencial larvicida de extratos e óleos de dezessete plantas do Brasil, observaram alta atividade larvicida de *C. guianensis* para populações de laboratório de *A. aegypti*.

Estudos envolvendo a atividade larvicida do óleo de *Copaifera* foram reportados por Silva *et al.* (2003), Mendonça *et al.* (2005) e Geris *et al.* (2008). Silva *et al.* (2003) avaliaram o efeito larvicida de *Copaifera reticulata* (Ducke, 1915) sobre populações de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823). Geris *et al.* (2008) e Mendonça *et al.* (2005) analisaram o efeito de *C. reticulata* e *Copaifera langsdorffii*, respectivamente, em populações de laboratório de *A. aegypti*.

Os resultados obtidos no presente trabalho, pela atividade larvicida de *C. guianensis* sobre populações naturais de *A. aegypti* foram similares aos encontrados por Silva *et al.* (2006) e Mendonça *et al.* (2005) para populações de laboratório de *A. aegypti*. Da mesma forma, os resultados obtidos com óleo de *Copaifera* sobre populações naturais de *A. aegypti* foram semelhantes aos observados por Mendonça *et al.* (2005), Geris *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2007) para populações de laboratório de *A. aegypti*.

Estes dados confirmam o potencial efeito larvicida do óleo de *C. guianensis* e *Copaifera*, não apenas para populações de laboratório, mas também contra populações naturais de *A. aegypti*, que são os principais responsáveis pela transmissão do vírus da dengue no ambiente.

Avaliando-se a eficácia como larvicida dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* em larvas de *A. aegypti*, sob um intervalo de quatro diferentes temperaturas de 15 a 30°C, observou-se diferenças na resposta de mortalidade. A eficácia dos óleos para letalidade foi diretamente relacionada ao aumento da temperatura, sendo o melhor resultado observado para a temperatura de 25°C. Em temperaturas abaixo de 25°C a mortalidade diminuiu consideravelmente. Estes resultados eram esperados, pois mosquitos apresentam diminuição no processo metabólico e locomotor, diretamente relacionado a temperaturas baixas ou demasiadamente elevadas (Ramoska & Pacey 1979). Portanto, a influência direta de temperaturas baixas na mortalidade larval de *A. aegypti*, indica ser necessário uma quantidade maior dos óleos avaliados para o controle efetivo. Resultados similares foram observados por Duque & Navarro-Silva (2006) quando estes avaliaram a eficácia de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) sob 20, 25 e 30°C contra *A. aegypti*. Os autores afirmam que pesquisas sobre a diferença na resposta de mortalidade, sob distintas temperaturas, são de extrema importância. Diversos estudos avaliando o efeito inseticida de produtos derivados de plantas têm sido reportados. Entretanto, análises da eficácia destes inseticidas sob diferentes condições de temperatura são escassos.

No presente estudo as larvas expostas a soluções contendo o óleo de *C. guianensis* e de *Copaifera*, após 24 horas de exposição, apresentaram alterações morfológicas externas como exoesqueleto de fácil rompimento, alongamento da parte anterior ao tórax, além de parte posterior do abdome de coloração escura.

Para o óleo de *Copaifera reticulata*, Abed *et al.* (2007) analisaram alterações morfológicas nas larvas de *A. aegypti*, expostas a uma solução a 30 mg/L. Após 20 horas, observaram destruição total ou parcial das células, vacuolização citoplasmática, aumento do espaço intercelular e da liberação de secreções celulares e alterações nos nervos periféricos, nas microvilosidades, no núcleo, no nucléolo, e no epitélio que sofre pavimentação e estratificação.

Apesar de alterações morfológicas terem sido claramente observadas, no presente trabalho, são necessários estudos específicos como microscopia eletrônica de varredura para elucidar as alterações externas causadas pelos óleos de *C. guianensis* e de *Copaifera* em imaturos de *A. aegypti*. Chaithong *et al.* (2006) verificando alterações morfológicas em larvas de *A. aegypti* expostas a extratos etanólicos de três espécies de Piperaceae, observou que a maioria dos órgãos apresentava aparência estrutural normal, exceto as papilas anais (brânquias). Através de estudos ultra-estruturais os autores verificaram a destruição da cutícula nas papilas anais, indicando que o efeito tóxico do extrato etanólico de Piperaceae é predominantemente sobre as papilas anais, levando a sua deformação morfológica.

Alterações do exoesqueleto, assim como nas papilas anais e membrana peritrófica de larvas expostas a derivados de plantas, foram observados por diversos autores (Green *et al.* 1991; Insun *et al.* 1999; Gusmão *et al.* 2002; Arruda *et al.* 2003). Conforme Matsumura (1975), geralmente a penetração dos inseticidas nos insetos se dá por via cuticular e/ou ingestão, até atingir o sítio de ação. Embora as alterações externas observadas no presente estudo indicam possíveis modos de ação de componentes químicos dos óleos nas larvas, o mecanismo que provoca mortalidade ainda é desconhecido e precisa ser estudado.

## 5.2 Período de atividade larvicida

Em intervalo de sete observações após 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas de exposição, verificou-se que o efeito letal dos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* ocorre, principalmente, entre as primeiras 2-3 horas. Resultados similares foram observados por Amer & Mehlhorn (2006a) e Amer & Mehlhorn (2006b). Amer & Mehlhorn (2006a), obtiveram resultados semelhantes, ao analisar o efeito larvicida

de *Cinnamomum camphora*, *Citrus limon*, *Anethum graveolens*, *Myrtus communis*, *Piper nigrum* e *Santalum album* em concentrações de 50 mg/L contra larvas de *A. aegypti*. Amer & Mehlhorn (2006b), avaliando a persistência do efeito larvicida de *Cinnamomum camphora*, *Thymus serpyllum*, *Amyris balsamifera*, *Citrus limon*, *Juniperus virginiana*, *Boswellia carteri*, *Anethum graveolens*, *Myrtus communis*, *Juniperus communis*, *Piper nigrum*, *Lippia citriodora*, *Helichrysum italicum*, *Santalum album* em concentrações de 50 mg/L contra larvas de *A. aegypti* sob diferentes condições de estocagem. Os autores verificaram mortalidades semelhantes às obtidas no presente estudo, após 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas de exposição aos 13 óleos essenciais.

### 5.3 Efeito Residual

O efeito larvicida de soluções contendo o óleo de *C. guianensis* permaneceu com 100% de mortalidade até o 12º dia após o preparo da solução, nenhuma mortalidade larval foi observada apenas no 32º dia. Nos bioensaios com óleo de *Copaifera*, o efeito larvicida permaneceu com total eficácia até o 4º dia. Nenhuma mortalidade larval foi observada apenas no 22º dia, após o preparo da solução. Amer & Mehlhorn (2006b), avaliando a persistência do efeito larvicida de 13 óleos essenciais, observaram 100% de mortalidade em apenas três (*Cinnamomum camphora*, *Thymus serpyllum* e *Citrus limon*) após uma semana do preparo das soluções. Estes óleos (*Cinnamomum camphora*, *Thymus serpyllum* e *Citrus limon*) permaneceram com total eficácia por até três semanas após o preparo das soluções.

Observações comportamentais sobre as larvas expostas aos óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* demonstraram formas semelhantes de toxicidade nas larvas. Comportamento de agitação, tremores, convulsões seguidos de paralisia e morte indicam que provavelmente os óleos avaliados possuem efeito tóxico sobre o sistema neuromuscular. Comportamentos similares foram observados por Sakthivadivel & Thilagavathy (2003), Choochote *et al.* (2004) e Chaithong *et al.* (2006) em larvas de mosquitos expostas a extratos de plantas.

#### 5.4 Efeito sub-letal

No presente estudo, soluções contendo óleo de *C. guianensis* e de *Copaifera*, em concentrações sub-letais CL<sub>50</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>10</sub>, ocasionaram efeito larvicida, pupicida, atraso do estágio larval, além de inibir a emergência de adultos.

Todas as concentrações sub-letais de *C. guianensis* (CL<sub>50</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>10</sub>), além do efeito larvicida imediato e prolongamento do estágio imaturo, inibiram consideravelmente a emergência de adultos. Apenas na concentração letal, que causa a mortalidade de 10% em larvas após 24 horas de exposição, (CL<sub>10</sub>) houve a eclosão de 0,3% de adultos no 10º dia de exposição. Nos grupos controle, água mais Tween e somente água, a emergência de 90,9% e 93,9% de adultos ocorreu entre 48 e 120 horas, respectivamente.

As concentrações sub-letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>20</sub>) de *Copaifera* inibiram significativamente a emergência de adultos, além de prolongarem o estágio imaturo. Apenas 2,7% e 10% das larvas expostas a estas concentrações se desenvolveram ao estágio adulto, respectivamente. Além de inibir o estágio adulto, estas concentrações atrasaram consideravelmente o desenvolvimento larval quando comparado aos grupos controle. Na concentração sub-letal CL<sub>10</sub> de *Copaifera* foi observado menor mortalidade em larvas e pupas, quando comparada às concentrações sub-letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>20</sub>. Do total de 900 larvas, expostas a esta concentração, 34,9% se desenvolveram ao estágio adulto. Nos grupos controle, de água mais DMSO e somente água, a emergência de 91,2% e 93,9% de adultos ocorreu entre 48 e 120 horas, respectivamente. Não houve diferença significativa na razão sexual observada nas concentrações sub-letais avaliadas, contendo óleo de *C. guianensis* e de *Copaifera*, e nos grupos controle de Tween, DMSO e água.

Além de apresentarem efeito larvicida produtos derivados de plantas podem causar atividade pupicida, efeitos sobre o desenvolvimento larval e pupal, e, muitas vezes, reduzir a emergência de adultos (Shaalan *et al.* 2005). Chapagain & Wiesman (2005) avaliaram a eficácia de saponinas extraídas do mesocarpo de frutos de *Balanites aegyptiaca* Del. (Zygophyllace) como larvicida sobre *A. aegypti* e observaram que as frações puras de saponinas interferiram na emergência de adultos. Saxena & Sumithra (1985), avaliando o efeito inseticida de *Ipomoea carnea*, observaram efeito larvicida e distúrbios no desenvolvimento e crescimento de

*Anopheles stephensi*. O óleo de Neem e extrato de sementes reduziram consideravelmente a percentagem de pupas e emergência de adultos de *An. stephensi* (Murugan *et al.* 1996). Extratos de plantas induziram a malformações, principalmente em intervalos larval-pupa e ecdise incompleta de adultos (Al-Sharook *et al.* 1991, Jayaprakasha *et al.* 1997; Karmegam *et al.* 1997).

As mortalidades causadas por concentrações sub-letais de *C. guianensis* e *Copaifera* foram observadas, principalmente, entre a troca de instar larval, larval-pupal e pupal-adulto. As percentagens de indivíduos expostos às concentrações sub-letais de *C. guianensis* e *Copaifera*, que não conseguiram alcançar o estágio de pupa e adulto, poderiam estar diretamente relacionadas a anormalidades causadas por distúrbios nos hormônios reguladores de crescimento. Distúrbios nos hormônios reguladores de crescimento são ocasionados pela ação dos diversos componentes químicos presentes nos produtos derivados botânicos, atuando de forma sinérgica, certamente estes componentes são limonóides. Anormalidades morfogénicas, causadas por extratos botânicos, já foram reportadas por Zebitz 1984; Mwangi & Mukiyama 1988; Pereira & Gurudutt 1990; Saxena *et al.* 1993; Shaalan *et al.* 2005.

Portanto, na ausência de produtos que possuam compostos altamente letais, um produto de origem botânica capaz de prolongar o desenvolvimento de imaturos e inibir a eclosão de adultos pode ser essencial no controle de vetores. O prolongamento do estágio imaturo de *A. aegypti* em campo além de diminuir o número de gerações, o deixará exposto por um período maior de tempo a condições adversas.

Conforme Shaalan *et al.* (2005), a aplicação de produtos naturais em doses sub-letais podem não só levar a novas estratégias de controle, mas podem inibir o desenvolvimento de resistência dos insetos aos inseticidas sintéticos existentes.

Assim, os resultados obtidos nestes bioensaios confirmam o potencial larvicida e o considerável efeito inibidor da emergência do adulto, causados por óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* sobre *A. aegypti*. Estes resultados evidenciam que os efeitos de *C. guianensis* e *Copaifera* sobre a biologia de *A. aegypti*, são ocasionados pela diversidade de compostos químicos presentes nestes produtos de origem botânica que atuam sinérgicamente. Entre os vários compostos bioativos de *C. guianensis*, incluem-se triterpenos, tetraterpenos, alcalóides e limonóides, características fitoquímicas presentes em todos os membros da família Meliaceae (Banerji & Nigam 1984). Para *Copaifera*, os principais compostos bioativos são os

sesquiterpenos e diterpenos (Veiga Junior *et al.* 2007). Apesar de os óleos de *C. guianensis* e *Copaifera* apresentarem considerável atividade inseticida contra mosquitos, ainda permanece desconhecido o papel individual de seus principais componentes bioativos no controle do principal vetor do vírus da dengue.

Novas investigações são necessárias para determinar a atividade larvicida, de *C. guianensis* e *Copaifera* sobre outras distintas espécies de mosquitos. Do mesmo modo, identificar os principais ingredientes bioativos de *C. guianensis* e *Copaifera* que atuam na atividade larvicida e inibição na eclosão de adultos. A fim de utilizá-los na preparação de uma formulação comercial, capaz de causar letalidade larval além de inibir a eclosão de adultos.

Até o momento, o presente estudo é o primeiro a avaliar a eficiência de larvicidas botânicos sobre populações naturais de *A. aegypti* e verificar o efeito de doses sub-letais no desenvolvimento de imaturos deste vetor.

## 6. CONCLUSÕES

1. As mortalidades, causadas por *C. guianensis* e *Copaifera* na temperatura de 25°C, evidenciam que as populações naturais de *A. aegypti* analisadas são inteiramente susceptíveis aos óleos, assim como a cepa de laboratório Rockefeller.

2. A eficácia de *C. guianensis* e *Copaifera*, na letalidade larval, foi diretamente relacionada ao aumento da temperatura.

3. A letalidade larval, causada por óleos de *C. guianensis* e *Copaifera*, ocorre em menos de três horas de exposição.

4. A persistência larvicida de *Copaifera* e principalmente de *C. guianensis*, evidencia a eficácia destes óleos por períodos superiores a 20 dias.

5. Alterações no período de desenvolvimento de *A. aegypti*, expostos a concentrações sub-letais de *C. guianensis* e *Copaifera*, que prolonga o estágio imaturo e provoca alterações morfológicas que inviabilizam a emergência de adultos, demonstram a eficácia destes óleos no controle deste vetor.

## REFERÊNCIAS

- Abed, R.A., G.M. Cavasin, H.H.G. Silva, R. Geris & I.G. Silva. 2007. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista de Patologia Tropical 36**: 75-86.
- Al-Sharook, Z, K. Balan, Y. Jiang & H. Rembold. 1991. Insect growth inhibitors from two tropical meliaceae. Effects of crude seed extracts on mosquito larvae. **Journal of Applied Entomology 111**: 425-430.
- Amer, A. & H. Mehlhorn. 2006a. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research 99**: 466-472.
- Amer, A. & H. Mehlhorn. 2006b. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. **Parasitology Research 99**: 473-477.
- Arruda, W., G.M.C. Oliveira, & E.G. da Silva. 2003. Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36**: 17-25.
- Banerji, B. & S.K. Nigam. 1984. Wood constituents of Meliaceae: a review. **Fitoterapia 55**: 3-36.
- Bangs, M.J., R. Tan, E. Listiyaningsih, B.H. Kay & K.R. Porter. 2001. Detection of Dengue Viral RNA in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Sticky Lures Using Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Entomology 38**: 720-724.
- Basile, A.C., J.A. Sertie, P.C.D. Freitas & A.C. Zanini. 1988. Antiinflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology 22**: 101-109.
- Cascon, V., E. Fernandez-Ferreira, R.O.A. Soares, D. Gibaldi, B. Gilbert & R. Ribeiro dos Santos. 1998. Avaliação da composição química e da atividade tripanosomicida in vitro de óleo-resinas de *Copaifera* spp. Resumos, **XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Águas de Lindóia, SP, p. 199.

Chaithong, U., W. Choochote, K. Kamsuk, A. Jitpakdi, P. Tippawangkosol, D. Chaiyasit, D. Champakaew, B. Tuetun, & B. Pitasawat. 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology** **31**: 138-144.

Champakaew, D., W. Choochote, Y. Pongpaibul, U. Chaithong, A. Jitpakdi, B. Tuetun & B. Pitasawat. 2007. Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research** **100**: 729-737.

Cheng, S.S., C.G. Huang, Y.J. Chen, J.J. Yu, W.J. Chen & S.T. Chang. 2008. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology* **In Press**.

Choochote, W., B. Tuetun, D. Kanjanapothi, E. Rattanachanpichai, U. Chaithong, P. Chaiwong, A. Jitpakdi, P. Tippawangkosol, D. Riyong, & B. Pitasawat. 2004. Potential of crude seed extract of celery, *Apium graveolens* L., against the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology** **29**: 340-346.

Duque, J.E.L. & M.A. Navarro-Silva. 2006. Dynamics of the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, related with temperature, density and concentration of insecticide. **Revista Brasileira de Entomologia** **50**: 528-533.

Fernandes, R.M. & N.A. Pereira, 1989. **Copalic acid analgesic activity in mice**. Abstracts, Simpósio Brasil - China de Química e Farmacologia de Produtos Naturais. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde p. 248.

Fernandes, R.M., N.A. Pereira & L.G. Paulo. 1992. Antiinflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis* Huber). **Revista Brasileira de Farmácia** **73**: 53-56.

Finney, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition.

FUNASA. 2001. Fundação Nacional de Saúde - **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília: Ministério da Saúde.

Geris, R., I.G. Silva, H.H. Silva, A. Barison, E. Rodrigues-Filho, A.G. Ferreira. 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **50**: 25-28.

Gilbert, B., W.B. Mors, P.M. Baker, T.C.B. Tomassini, E.G. Goulart, J.C. Holanda, J.A.R. Costa, J.N.G. Lopes, F.D. Santos, S.J. Sarti, A.M. Turco, W. Vichnewski, J.L.C. Lopes, A.W. Thames, J. Pellegrino & N. Katz. 1972. A atividade antihelmíntica de óleos essenciais e de seus componentes químicos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências 44**: 423-428.

Gilbert, B., D.F. Teixeira, E.S. Carvalho, A.E. Paula, J.F. Pereira, J.L. Ferreira, M.B. Almeida & R.S. Machado. 1999. Activities of the Pharmaceutical Technology Institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências 71**: 265-271.

Gleiser, R.M. & J.A. Zygadlo. 2007. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research 101**: 1349-1354.

Gubler, D. J. 1998. The global pandemic of dengue/dengue hemorrhagic fever: Current status and prospects for the future. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore 27**: 227-234.

Lawler, S.P. & G.C. Lanzaro. 2005. Managing mosquitoes on the farm. Regents of the University of California. **Division of Agriculture and Natural Resources 8158**: 1-19.

Gusmão, D.S., V. Páscoa, L. Mathias, I.J.C. Vieira, R. Braz-Filho & F.J.A. Lemos. 2002. *Derris (Lonchocarpus) urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97**: 371-375.

Green M.M., J.M. Singer, D.J. Sutherland & C.R. Hibben. 1991. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association 7**: 282-286.

Hammer, M.L.A. & E.A. Johns. 1993. Tapping an Amazon plethora: four medicinal plants of Marajó island, Pará (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology 40**: 53-75.

IBGE. 2008. **População residente, por sexo e situação do domicílio, população residente de 10 anos ou mais de idade, total, alfabetizada e taxa de alfabetização, segundo os Municípios**. Disponível em <  
[http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/censo2000/universo.php?tipo=31o/tabela13\\_1.shtm&paginaatual=1&uf=41&letra=F](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/censo2000/universo.php?tipo=31o/tabela13_1.shtm&paginaatual=1&uf=41&letra=F) > Acessado em 04/05/2008.

Insun, D., W. Choochote, A. Jitpakdi, U. Chaithong, P. Tippawangkosol & B. Pitasawat. 1999. Possible site of action of *Kaempferia galanga* in killing *Culex quinquefasciatus* larvae. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** **30**: 195-199.

Jayaprakasha, G.K, R.P. Singh, J. Pereira & K.K. Sakariah. 1997. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. **Phytochemistry** **44**: 843-846.

Karmegam, N., M., Sakthivadivel, V. Anuradha, and T. Daniel. 1997. Indigenous plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* Say. **Bioresource Technology** **59**: 137-140.

Malavige, G.N., S. Fernando, D.J. Fernando, S.L. Seneviratne. 2004. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal** **80**: 588-601.

Maruzzella, J.C. & N.A. Sicurella. 1960. Antibacterial activity of essential oil vapors. **Journal of the American Pharmaceutical Association** **49**: 692-694.

Matsumura, F. 1975. **Toxicology of insecticides**. Plenum Press, New York.

Mendonça, F.A., K.F. Silva, K.K. Santos, K.A.Jr. Ribeiro & A.E. Sant'Ana. 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia** **76**: 629-636.

Miot, H.A., R.F. Batistella, K.A. Batista, D.E.C. Volpato, L.S.T. Augusto, N.G. Madeira, V. Haddad & L.D.B. Miot. 2004. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and Deet 50% as repellent for *Aedes* sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **46**: 253-256.

Mitchell, M. J., S. L. Smith, S. Johnsonson & E. D. Morgan. 1997. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** **35**: 199-209.

MS/SVS. 2004. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. In: Dengue. Brasília, 3 edição, Vol. 1.

Mullai, K., A. Jebanesan & T. Pushpanathan. 2008. Effect of bioactive fractions of *Citrullus vulgaris* Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Parasitology Research 102**: 951-955.

Murugan, K., R. Babu, D. Jeyabalan, N.S. Kumar & S. Sivaramakrishnan. 1996. Antipupational effect of neem oil and neem seed kernel extract against mosquito larvae of *Anopheles stephensi* (Liston). **Journal of Entomological Research 20**: 137-139.

Mwangi, R.W & T.K. Mukiama. 1988. Evaluation of *Melia volkensii* extract fractions as mosquito larvicides. **Journal of the American Mosquito Control Association 4**: 442-447.

Opdyke, D.L.J. 1976. Balsam copaiba. **Food and Cosmetics Toxicology 14**: 687.

Orellana, B.J.P., E.S. Kobayashi & G.M. Lourenço. 2004. Terapia alternativa através do uso da andiroba. **Lato & Sensu 5**: 136-141.

Ohsaki, A., L.T. Yan, I. Shigeru, H. Edatsugi, D. Iwata & Y. Komoda. 1994. The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfi* Desfon. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 4**: 2889-2892.

Paiva, L.A. L.A. Gurgel, E.T. Sousa, E.R. Silveira, R.M. Silva, F.A. Santos & V.S. Rao. 2004. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology 93**: 51-56.

Pavela, R. 2008. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research 102**: 555-559.

Pellegrino, J. 1967. Protection against human *Schistosoma cercariae*. **Journal of Experimental Parasitology 21**: 12.

Penido, C., K.A. Costa, R.J. Pennaforte, M.F.S. Costa, J.F.G. Pereira, A.C. Siani & M.G.M.O. Henriques. 2005. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research 54**: 295-303.

Penido, C., F.P. Conte, M.S.S. Chagas, C.A.B. Rodrigues, J.F.G. Pereira & M.G.M.O. Henriques. 2006a. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research** **55**: 457-464.

Penido, C., K.A. Costa, M.F.S. Costa, J.F.G. Pereira, A.C. Siani & M.G.M.O. Henriques. 2006b. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF $\kappa$ B activation. **International Immunopharmacology** **6**: 109-121.

Pennington, T.D. B.T. Stules & D.A.H. Taylor. 1981. Meliaceae. **Flora Neotropica** **28**: 406-419.

Pereira, J. & K.N. Gurudutt. 1990. Growth inhibition of *Musca domestica* L. and *Culex quinquefasciatus* (Say) by (levo)-3-epicaryoptin isolated from leaves of *Clerodendron inerme* (Gaertn) (Verbenaceae). **Journal of chemical ecology** **16**: 2297-2306.

Pereira, J.F.G., D. Teixeira & B. Gilbert. 1997. Chemical study of Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet). **Bolletino di Chimica Farmaceutico** 136, 107.

Pessoa, A.C., M.I.L. Machado, F.J.A. Matos, M.C. Fonteles, A.A. Craveiro & M.O. Moraes. 1994. Plantas do Nordeste brasileiro com atividade antitumoral, abstract 301. **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Fortaleza, CE.

Pinto, G.P. 1956. Contribuição ao estudo químico do óleo de Andiroba. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte** **31**: 195-206.

Pushpanathan, T., A. Jebanesan & M. Govindarajan. 2008. The essential oil of *Zingiber officinalis* Linn (Zingiberaceae) as a mosquito larvicidal and repellent agent against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research** **102**: 1289-1291.

Qi, S., D. Wu, S. Zhang & X. Luo. 2004. Constituents of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). **Pharmazie** **59**: 488 - 490.

Rahuman, A.A., G. Gopalakrishnan, P. Venkatesan & K. Geetha. 2008. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research** **102**: 867-873.

Ramoska, W. A. & C. Pacey. 1979. Food availability and period of exposure as factors of *Bacillus sphaericus* efficacy on mosquito larvae. **Journal of Economy Entomology** **72**: 523-525.

Sakthivadivel, M. & D. Thilagavathy. 2003. Larvicidal and chemosterilant activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from *Argemone mexicana* L. seed. **Bioresource Technology** **89**: 213-216.

Saxena, S.C. & L. Sumithra. 1985. Laboratory evaluation of leaf extract of a new plant to suppress the population of malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Current Science** **54**: 201-202.

Saxena, R.C., V. Harshan, A. Saxena, & P. Sukumaran. 1993. Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. **Journal of the American Mosquito Control Association** **9**: 84-87.

Shaan, E.A.S., D.V. Canyon, M.W.F. Younes, H.A. Wahab & A.H. Mansour. 2005. Effects of sub-lethal concentrations of synthetic insecticides and *Callitris glaucophylla* extracts on the development of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology** **30**: 295-298.

Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology** **35**: 271-297.

Siddiqui, B.S., F. Afshan, Ghiasuddin; S. Faizi, S.N.H. Naqvi & R.M. Tariq. 2000. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry** **53**: 371-376.

Silva, O.S., P. R. Romão, R.D. Blazius & J.S. Prophiro. 2004. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association** **20**: 456-457.

Silva, O.S., J.S. Prophiro, J.C.N. Rossi, L.A. Kanis, P.R.T. Romão & R.D. Blazius. 2006. Larvicidal effect of andiroba oil *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association** **22**: 699-701.

Silva, W.J., G.A. Dória, R.T. Maia, R.S. Nunes, G.A. Carvalho, A.F. Blank, P.B. Alves, R.M. Marçal & S.C. Cavalcanti. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology** **99**: 3251-3255.

Silva, I.G., V.O.M. Zanon & H.H.G. Silva. 2003. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology 32**: 729-732.

Silva, H.H.G., R. Geris, E. Rodrigues, C. Rocha & Silva I.G. 2007. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40**: 264-267.

Sukamar, K., M.J. Perich & L.R. Boobar. 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of the American Mosquito Control Association 7**: 210-237.

SVS/MS. 2008a. **Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007.** Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_010208.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf) >  
Acessado em 20/02/2008.

SVS/MS. 2008b. **Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Abril de 2008.** Disponível em <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_maio2008.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_maio2008.pdf) >  
Acessado em 08/06/2008.

Taylor, D. A. H. 1984. The chemistry of the limonoids from Meliaceae. **Chemistry of Organic Natural Products 45**: 1-102.

Thatheyus, J.A. 2007. Bio control of mosquitoes In: Defeating the public enemy, the mosquito: a real challenge. **Loyola**: 76–94.

Veiga, V.F. & A.C. Pinto. 2002. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova 25**: 273-286.

Veiga, V.F., E.C. Rosas, M.V. Carvalho, M.G.M.O. Henriques & A.C. Pinto. 2007. Chemical composition and antiinflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology 112**: 248-254.

Wandscheer, C.B., J.E.L. Duque, M.A. Navarro-Silva, Y. Fukuyama, J.L. Wohlke, J. Adelman & J. D. Fontana. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon 44**: 829-35.

WHO. 1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.** Geneva.

WHO. 1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides.** Geneva.

Zebitz, C.P.W. 1984. Effect of some crude and azadirachtin-enriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. **Entomologia Experimentalis et Applicata 35:** 11-16.