Errata

No Resumo em Português

Linha 12 do Resumo em Português onde se lê *Bacillus thuringienseis*, considere *Bacillus thuringiensis*;

Os descritores são: Controle químico, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, resistência, culicídeos;

Na pagina 79.

- Linha 2, onde se lê *Culex quinquefasciatus*.., desconsidere os dois pontos final, deixando apenas um ponto final.

Revisão dos métodos de controle e dos mecanismos de resistência do *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

João Batista Vítor Neto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública

Área de Concentração: Epidemiologia
Orientador: Prof. Dr. Almério de Castro Gomes

São Paulo
2006

FACULDADE de SAÚDE PÚBLICA
Biblioteca/CIR
UNIVERSIDADE de SÃO PAULO

47809/2006 dex

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

" Viver pelo seu desejo nunca irá fazê-lo feliz. O que significa, para ser inteiramente humano você deve se esforçar pra viver por idéias e ideais, e não por medir sua vida por aquilo que você alcançou nos termos de seus desejos, mas aqueles pequenos momentos de integridade, compaixão, racionalidade, e mesmo auto-sacrifício. Porque no fim, a única maneira que nós podemos medir o significado de nossas próprias vidas é valorizando a vida dos outros."

Lição de Lakan

Á minha família pela compreensão nos momentos difíceis

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Almério de Castro Gomes** pela orientação e todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho, no qual, sem este seria impossível concluí-lo.

Ao Prof. Dr. **Delsio Natal**, do Departamento de Epidemiologia da FSP/USP pela co-orientação e apoio na elaboração deste trabalho.

Á Prof. Dr. **Regiane Maria Tironi de Menezes** da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) pela enorme cooperação e sugestões na redação deste trabalho.

À **Paloma H.F. Shimabukuro** pelo auxílio na tradução do resumo deste trabalho.

À **Márcia Bicudo de Paula** pela compreensão e apoio durante o período deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Ana Maria R. C. Duarte, Márcia F. C. G. Souza, Maria Dulce B. Rosa, Ana Maria Marassá, Helene M. Ueno, Maura A. L. Porto, Edna F. M. Bueno, Luís F. Mucci, Marcelo S. Sebastião, Mauro B. Fonseca, Delano A. Silva, Aristides Fernades, Sirlei Antunes, Paulo R. Urbinatti e Walter C. Júnior, Débora Mendes Fiaschi e família pelo apoio incondicional durante os momentos bons e ruins.

Ao Prof. Dr. **Péricles Alves Nogueira** pela compreensão durante alguns momentos.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Epidemiologia, da Comissão de Pós-Graduação e Biblioteca da FSP/USP, pela compreensão e auxílio que sempre disponibilizaram durante mais de 3 anos nesta instituição.

Ao Conselho **Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq**, pelo auxílio Financeiro através da bolsa de Mestrado – Processo 830625/1999-2.

Resumo

Vítor Neto, JB. **Revisão dos métodos de controle e dos mecanismos de resistência do *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).** São Paulo; 2006.[Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objetivo. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de revisar os principais métodos de controle e dos mecanismos de resistência do *Culex quinquefasciatus*, e assim fornecer subsídio para o melhor emprego do controle da espécie em questão. **Métodos.** Todo o trabalho foi desenvolvido através de um levantamento bibliográfico abrangendo o período de 1960 a 2005. Foram consultadas as bases Medline, Lilacs, Life Science, Biological Abstrat, entre outras. **Resultados** A utilização dos inseticidas químicos desde a década de 40 desempenha um papel importante no controle de vetores. Entretanto, o uso indiscriminado e muitas vezes de forma equivocada, além de favorecer o desenvolvimento de resistência não somente em populações de *Culex*, acaba gerando efeitos como intoxicação no ser humano e o desequilíbrio ecológico. A partir desse contexto, a utilização de produtos que tenham menor impacto como o *Bacillus thuringienseis* e *Bacillus sphaericus* se faz cada vez mais necessário, porém, não devendo ser exclusivamente o único método de controle, e sim, uma interação entre o controle químico e o controle biológico (Controle Integrado), uma vez que por meio de rotação de produtos e métodos, estes constituirão maior sucesso e menor desenvolvimento de resistência.

SUMMARY

Vítor Neto JB. **Review of the control methods and resistance of** *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). São Paulo; 2006. [Master's degree dissertation – College of Public Health, University of São Paulo].

Objective. The objective of the present study was to review the main control methods and the resistance mechanisms of *Culex quinquefasciatus*, and therefore provide subsidies to the better use of the focused species control. **Methods.** This whole study was based on a bibliographic survey from 1960 to 2005. The following databases were consulted: Medline, Lilacs, Life Science, Biological Abstracts, among others. **Results.** The use of chemical insecticides since de decade of 40 plays an important role in vectors control. However, the indiscriminate and usually wrong use of insecticides favours the development of resistance in *Culex* populations but also has hazardous effects in human population (intoxication) and causes ecological unbalance. On this context, the use of products with less impact on the ecosystem such as *Bacillus thuringienseis* and *Bacillus sphaericus* are even more necessary, although, they should not be used as the only method of control, instead they should be used along with the chemical control (Integrated Control). Once the products and methods rotation occur, they will be more successful and reduce the resistance development.

Descriptors: Chemical control, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, resistance, Culicidae.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Bioecologia do *Culex quinquefasciatus* e a importância epidemiológica 3

2. JUSTIFICATIVA 6

3. OBJETIVOS 8

3.1. Objetivo Geral 8

3.2. Objetivos Específicos 8

4. MATERIAL E MÉTODO 9

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 10

5.1. Métodos de Controle do *Culex quinquefasciatus* 12

5.1.1. Controle Químico 12

5.1.1.1. Organoclorados 17

5.1.1.2. Organofosforados 18

5.1.1.3. Carbamatos 20

5.1.1.4. Piretróides 21

5.2. Resistência aos inseticidas químicos 24

5.2.1. Redução na Taxa de penetração do inseticida 26

5.2.2. Resistência metabólica 27

5.2.3. Alteração do sítio-alvo 32

5.3. Inibidores de crescimento 34

5.3.1. Análogo do Hormônio Juvenil 35

5.3.2. Inibidores de Síntese de Quitina 36

5.3.3. Agonistas de Ecdisona ou Ecdisteróides 38

5.4. Controle Biológico 40

5.4.1. *Bacillus thuringiensis* Berliner 40

5.4.2. *Bacillus sphaericus* Neide 52

5.5. Mecanismos de detecção de resistência 61

5.6. Fatores limitantes da efetividade dos entomopatogênicos 64

5.7. Inseticidas alternativos 67

6. CONCLUSÕES 76

7. RECOMENDAÇÕES 78

8. REFERÊNCIAS 80

1. INTRODUÇÃO

A Terra atravessa atualmente um período crítico, uma época em que a humanidade deve escolher o seu futuro. Á medida que o mundo torna-se cada vez mais interdependente e frágil, o futuro enfrenta, ao mesmo tempo, grandes perigos e grandes promessas. Os padrões dominantes de produção e consumo têm causado inúmeras implicações na qualidade de vida e bem-estar da humanidade, tais como a devastação ambiental, a redução dos recursos e uma massiva extinção de espécie (A CARTA DA TERRA 2004).

O crescimento sem precedentes da população humana tem sobrecarregado os sistemas ecológicos e sociais. Segundo FORATTINI (1998), o crescimento populacional traz, como óbvia conseqüência, mudanças ecológicas as quais, em última instância, se traduzem pela formação e desenvolvimento do meio onde vive o homem. E isto pela razão fundamental de que a espécie humana, ao invés de se adaptar à natureza, necessita construir o próprio meio "ambiente antrópico", o que implica não apenas mudanças físicas, mas também comportamentais.

As relações decorrentes da ação humana sobre o meio se interligam de maneira muito mais abrangente. A interferência antrópica não se reveste em sua gênese apenas na relação homem/ecossistema de forma unidisciplinar e unidirecional, uma vez que de acordo com FORATTINI (1998), as interações entre os fatores que agem na relação homem/ambiente podem se revestir de aspectos

altamente complexos, com vários deles agindo conjuntamente ou em seqüência, na qual, têm-se dentre várias implicações, o surgimento do processo epidemiológico.

Assim, a discussão em torno da questão ambiental, especificamente alterações antrópicas e suas relações com os problemas de saúde, tem sido um dos temas centrais entre os especialistas em entomologia aplicada à saúde pública. Estudo realizado por BORGES (1998) têm demonstrado que acentuada degradação da qualidade das águas dos rios e reservatórios para o abastecimento de água, localizados nas áreas de expansão das metrópoles são conseqüências do processo de industrialização e crescimento populacional nas grandes cidades.

Por outro lado, especialista em entomologia urbana vem discutindo a inter-relação entre a urbanização e a conseqüente interferência na composição e estrutura das comunidades de insetos vetores de doenças (COOSEMANS e MOUCHET 1990).

Em relação aos culicídeos, tais modificações têm sido apontadas como responsáveis pelo surgimento ou aumento do número de casos de diversas doenças, cujos agentes, são transmitidos por vetores, dentre elas a malária, a filariose e arboviroses (SURTEES 1971; FRANKIE e EHLER 1978; COOSEMANS e col. 1990; SCHOFIELD 1990).

1.1. Bioecologia do *Culex quinquefasciatus* e a importância Epidemiológica

As doenças cujos agentes são veiculados por insetos da ordem Díptera representam um grande problema de saúde pública no mundo, uma vez que, muitas das 4000 espécies descritas de culicídeos são vetores.

Culex quinquefasciatus Say 1823 é um dos mais freqüentes mosquitos urbanos e antropofílico no Brasil, que além de causar um grande incômodo, acrescenta-se o fato de ser o principal transmissor de filarias em alguns Estados do país (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994).

Especificamente ao *Culex quinquefasciatus,* este merece atenção devido á cinco aspectos:

a) Incômodo à população nas proximidades de seus criadouros;

b) Espécie com elevado grau de domiciliação que de acordo a FORATTINI e col. (1982), parece não haver dúvida de que os fatores antrópicos sejam fundamentais para que agentes etiopatológicos tenham sua distribuição ampliada. Isto mostra que, no sentido da domiciliação, as modalidades de dispersão tendem a tornar-se cada vez mais dependentes da atividade humana. Desta forma, sob o prisma de um raciocínio ecológico é compreensível aceitar, que há dependência da domiciliação aos estímulos antrópicos representados pela estrutura organizacional da sociedade

humana, particularmente evidenciável sob os contínuos processos de alteração ambiental e nas precárias condições de vida humana em povoamentos rurais ou periferias de centros urbanos. Assim sendo, fatores sociais advindo dessas condições assumem aspectos epidemiológicos tão importantes como os de natureza biológica (GOMES 1986).

c) Ser vetor de filarias, sendo as correspondentes parasitoses endêmicas em várias regiões tropicais da Ásia, África e América, sendo sério problema de saúde pública em países como China, Índia, Indonésia e partes leste, central e oeste da África, na qual, aproximadamente 800 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contrair a parasitose, e estimam-se em 119 milhões os portadores de filariose linfática no mundo, sendo 106 milhões o número de infectados por *Wuchereria bancrofti* e em torno de 12,9 milhões os parasitados por *B. malayi* ou *B. timori*. No Brasil, estima-se que 49 mil pessoas estejam infectadas pela *W. bancrofti* e três milhões de indivíduos residem em áreas consideradas de risco, estando inserida em áreas urbanas dos estados de Alagoas (Maceió), Pará (Belém) e Pernambuco (Região Metropolitana do Recife-RMR). Esta última apresenta a maior casuística no país (RACHOU 1956; ORIHEL 1985; WHO 1992; 1994; OTTESEN 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000);

d) Acrescido o fato da espécie em questão ser incriminada como vetor dos vírus da encefalite de Saint Louis, do vírus Oropouche e do vírus da

Encefalite Venezuelana no Meio Oeste dos Estados Unidos, no Estado do Pará e no Panamá, respectivamente (REISEN et al. 1992; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994);

e) A espécie em questão associa-se conforme FORATTINI (1962); CONSOLI e LOURENÇO–DE-OLIVEIRA (1994); por criadouros artificiais, no solo ou em recipientes com água estagnada, rica em matéria orgânica em decomposição, corpos d'água com elevado teor de poluentes e detritos de aspecto sujo e mal cheirosos, e com grande capacidade de colonização de ecótopos, tanto naturais como artificiais, decorrentes da ação humana (GOMES e FORATTINI 1990).

2. JUSTIFICATIVA

A exemplo do que acontece em maior ou menor grau em ambientes preservados, o desenvolvimento urbano vem alterando irreversivelmente sua paisagem e sua relação com o meio ambiente. A ação humana sobre o meio não implica somente a médio e longo prazo em alterações das relações ecológicas de maneira simples e unidirecional. Tem-se como impacto imediato uma maior pressão ecológica sobre determinas espécies e assim, alterando toda a biocenose.

Desta forma, extinção de espécies de flora e fauna e/ou superposição de uma espécie por outra são conseqüências da transformação de um determinado ambiente, seja ele natural ou urbano. Assim, tem-se o *Culex quinquefasciatus* como exemplo de espécie adaptada ao ambiente em desequilíbrio, representando assim uma alta valência ecológica, colonizando tanto ambientes menos degradado como também alta tolerância (adaptação) a ambientes poluídos.

Não obstante a importância desta espécie como causadora de incômodo as populações nas proximidades de seus criadouros, acrescenta-se o fato da espécie em questão ser o principal vetor de filariose no Brasil, como também incriminada como vetor do Vírus do Oeste do Nilo.

Dada a importância de substâncias químicas e dos entomopatógenos no controle desse vetor, e assim a preocupação com sua resistência a esses produtos, o

presente trabalho justifica-se pela reunião de informações sobre os métodos e mecanismos de resistência do *Cx. quinquefasciatus* no período de 45 anos, visando dar subsídios para o conhecimento de novas estratégias de controle e/ou aprimoramento das já existentes.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

- Revisar os métodos de controle e os mecanismos de resistência do *Culex quinquefascaitus* no período de 1960 a 2005.

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever os métodos de controle químico e biológico mais eficazes no controle do *Cx. quinquefasciatus*;

- Descrever os métodos alternativos mais promissores no controle do *Cx. quinquefasciatus*;

- Associar a bioecologia do *Cx. quinquefasciatus* aos métodos de controle da referida espécie;

- Recomendar estratégias menos impactantes e mais eficazes no controle do *Culex quinquefasciatus*.

4. MATERIAL E MÉTODO

A elaboração do presente trabalho baseou-se em um levantamento bibliográfico, abrangendo o período de 1960 a 2005. A pesquisa foi feita em relação aos métodos de controle do *Culex* com produtos químicos e entomopatógenos, como também, seus respectivos mecanismos de ação e resistência. Buscou-se na literatura também métodos alternativos de controle do *Culex quinquefasciatus*.

Foram consultadas as seguintes bases de pesquisa:

Medline

Lilacs

Life Science

Biological Abstrats

Scielo

Os descritores foram:

Culicídeos x fatores abióticos x bióticos

Culex quinquefasciatus x controle x químico

Culex quinquefasciatus x controle químico x resistência

Culex quinquefasciatus x *Bacillus sphaericus* x *Bacillus thuringiensis*

Culex quinquefasciatus x controle biológico x resistência

Culex quinquefasciatus x bacillus recombinante

Culex quinquefasciatus x inseticidas alternativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A importância do *Culex quinquefascitus* no processo epidemiológico, hora como vetor, hora como causador de incômodo, permite não somente compreender o processo epidemiológico de maneira restrita "strictu sensu", mas auxilia na compreensão das características bioecológicas, e assim permitindo: a) entender a inter-relação vetor/habitat e b) promover medidas mais eficazes que auxilie na redução dessa espécie.

As formas imaturas de mosquitos, por viverem e se desenvolverem em ecossistemas aquáticos estão submetidas á ação de diversos fatores bióticos e abióticos (FORATTINI 1962; SEGNINI e col. 1979; CASANOVA 1994). Tais fatores interferem na flutuação e/ou regulação destas populações e conseqüentemente seu conhecimento reveste-se de grande importância epidemiológica (CASANOVA 1994).

Conforme HAGSTRUM (1971), as características químicas da água dos criadouros limitam a ocorrência de larvas de algumas espécies de mosquitos, influenciando a ovoposição e o desenvolvimento das larvas.

Desta forma, parâmetros físico-químicos como pH, salinidade e matéria orgânica, dentre outros, selecionam espécies mais bem adaptadas. Ao contrário do *Aedes aegypti*, que apresenta preferência por água limpa, baixa turbidez, alta taxa de

oxigênio dissolvido, o gênero *Culex*, em especial, o *Culex quinquefasciatus* não somente pode se desenvolver em águas limpas, como tem preferência por água com alta turbidez, alto grau de matéria orgânica, baixíssimo teor de oxigênio dissolvido (água poluída), como mostra a tabela 1 referente ao trabalho realizado por SEGHAL (1970).

Tabela 1. Características químicas da água de criadouros de mosquito.

	Turbidez (Unidade de Turbidez de Jackson)	Oxigênio dissolvido (ppm)	pH	Alcalinidade (ppm)	Cloro (ppm)	Sulfato (ppm)	Nitrato (ppm)	Fosfato (ppm)
Culex Variação	70 - 280	1 - 4	7.6 - 8.0	190 - 300	20 - 100	23 - 50	10 - 13	1.1 - 30
Média	150	2.6	7.8	267	57	41	11.6	16.60
Ae. aegypti Variação	25 - 70	5 - 5	7.5 - 7.6	170 - 180	47 - 50	5 5 - 85	8 - 12	0.9 - 1.0
Média	47.5	5.0	7.5	175	49	70	10.0	0.95
Ae. Albopictus Variação	50 - 75	3 - 6	7.6 - 7.6	55 - 150	20 - 50	55 - 100	10 - 13	0.4 - 2.0
Média	62.5	4.5	7.6	103	35	76	11.5	1.20

Fonte: Seghal, 1970.

Corroborando com SEGHAL (1970), HAGSTRUM (1971), analizou os parâmetros químicos da água de 52 criadouros, obtendo como resultado, alto teor de amônia e nitrato, significando segundo o mesmo autor que associação do *Cx. quinquefasciatus* com água de altas concentrações de nitrogênio seria um indicador de preferência ou tolerância a águas poluídas.

BIBLIOTECA / CIR
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Por outro lado, alterações das características químicas da água não estão somente associadas ao processo adaptativo do *Cx. quinquefasciatus*. De acordo a STRASKRABA & TUNDISI (2000), o aumento da disponibilidade de nutrientes no corpo d'água, principalmente nitrogênio e fósforo funciona como principal estímulo ao processo de eutrofização, que segundo THOMANN e MUELLER (1987), se caracteriza pelo crescimento excessivo de plantas aquáticas, tanto planctônicas quanto aderidas, em níveis tais que sejam considerados como causadores de interferências, tendo como exemplo a *Eichhornia crassipes* (aguapé) servindo conseqüentemente como abrigo aos mosquitos como foi observado por URBINATTI (2001), que apresentou a ocorrência de (*Eichhornia sp*) e densa camada de gramíneas sobre a superfície da água como fatores que provavelmente influenciaram nas elevadas densidades de *Cx. quinquefasciatus* encontrado no Parque Ecológico do Tietê.

5. 1. Métodos de controle do *Culex quinquefasciatus*

5.1.1. Controle Químico

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais utilizadas como parte de ação de manejo sustentável e integrado para os vetores em Saúde Pública (ROSE 2001).

O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o DDT, um organoclorado que foi sintetizado por Othmar Zeidler em 1874. Porém, seu uso generalizado se deu por Paul Muller na década de 40 (durante a Segunda Guerra Mundial), sendo utilizado em grande escala nas frentes de batalha, contra piolhos humanos, pulgas dos ratos e mosquitos e que, quando aplicado em paredes e tetos das casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (WHO 1987; ROZENDAAL 1997).

Entretanto, desde 1985 está proibido o uso de DDT no Brasil, uma vez que segundo algumas pesquisas, este inseticida apresenta algumas características como o efeito prolongado, move-se facilmente pelo ar, rios e solo e acumula-se no organismo dos seres vivos, no caso do homem na glândula tireóide, fígado e rim.

Existem vários produtos químicos que são utilizados no controle de pragas. Mais de 300 princípios ativos distribuídos em mais de 2.000 formulações são empregados nas mais variadas culturas, finalidades e modalidades de uso (LARA e BATISTA 1992).

Muitas vezes, o conceito de inseticida é erroneamente confundido como sendo toda substância química que mata os insetos. Porém, a toxicidade de uma substância química a insetos não a qualifica necessariamente como inseticida. Diversas propriedades conforme WHO (1994) devem estar associadas à atividade para que as substâncias sejam consideradas inseticidas, tais como:

1. Serem eficazes contra os insetos, mesmo quando empregadas em baixas concentrações;
2. Serem econômicas;
3. Não serem tóxicas ao homem e animais domésticos;
4. Não se acumularem no tecido adiposo do homem e dos animais domésticos;
5. Não serem fitotóxico, quando destinado à agricultura e;
6. Serem de fácil obtenção e fácil manipulação.

Fica evidente que as características citadas referem-se áquele inseticida tido como ideal o que raramente será o caso. Dentre a classificação de inseticidas estão incluídas também substâncias que repelem e que atraem insetos (MARICONI 1963; ADDOR 1994; COBERTT et al. 1984).

Além das propriedades já mencionadas acima, os inseticidas podem ser classificados também de acordo as seguintes formas (WHO, 1994).

I – Modo de ação:

a) Contato: são aqueles absorvidos pelo inseto através de qualquer parte de seu organismo;

b) Ingestão: são substâncias que penetram no organismo do inseto apenas pelo aparelho digestivo, provocando a morte;

c) Fumigação: são aqueles que apresentam elevada pressão de vapor, emitindo, portanto, vapores nas condições normais de pressão e temperatura, a que exterminam os insetos pela absorção através dos órgãos do aparelho respiratório;

d) Profundidade: aplicado em uma superfície, o produto exerce sua ação tóxica contra os organismos alojados no interior de fendas e orifícios (desalojante).

II – Quanto à duração do efeito residual do produto:

a) Efeito residual: o ingrediente ativo aplicado num determinado local, permanece em dosagens letais para um organismo alvo por um tempo prolongado (algumas semanas ou meses);

b) Efeito instantâneo: também conhecido como "knockdown", é o inseticida que logo após a aplicação, o efeito é imediato sobre o inseto alvo.

III – Quanto à natureza química:

Inorgânicos - Arsênico, Ácido Bórico;

Vegetais – Rotenono, Nicotina, Piretro;

Organoclorados – DDT, BHC, Dieldrin;

Fosforados - Malathion, Diazinon, Pirimifós – methyl;

Carbamatos – Propoxur, Carbaryl, Bendiocarb;

Piretróides – Cipermetrina, Deltametrina, Flumetrina;

Reguladores de crescimento (IGR):

Análogos do hormônio juvenil – Methoprene;

Inibidores de síntese de Quitina – Triflumuron, Diflubenzur;

Origem Biológica – Avermectinas;

Fenil Piresóis – Fipronil;

Neonicotinóides – Imidacloprido.

IV – Quanto à idade do agente:

Adulticida – de combate aos insetos adultos;

Larvicida – de combate ás larvas dos insetos;

Ovicida – atuam nos ovos dos insetos;

V – Quanto à persistência:

Curta – até 90 dias

Média – de 91 até 180 dias

Longa – maior que 180 dias

VI - Quanto ao deslocamento:

Pequeno - até 20 cm

Médio – de 21 a 60 cm

Grande – maior que 60 cm

5.1.1.1. Organoclorados

Os organoclorados são inseticidas que contém carbono, hidrogênio e cloro. São classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexano, ciclodienos e policloroterpenos (WARE 2000).

Os inseticidas organoclorados agem no canal de sódio, mantendo-o aberto e destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios, impedindo assim a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos (WARE 2000).

O DDT apresenta um coeficiente de temperatura negativo, ou seja, a atividade deste produto aumenta à medida que a temperatura diminui como também este interage com os canais de sódio distribuídos ao longo do axônio, prolongando ou impedindo o fechamento normal desses canais após a transmissão do impulso nervoso, permitindo um fluxo excessivo de íons Na^{++} para o interior da célula nervosa. Como resultado, os insetos apresentam rapidamente sintomas de intoxicação, resultando em transmissão de impulsos repetitivos e descontrolados, hiperexcitabilidade, perda de postura locomotora ("knockdown") e, eventualmente, paralisia e morte (BLOOMQUIST 1996).

Embora tenham sido largamente utilizados nos programas de controle de malária, os organoclorados tiveram seu uso descontinuado, chegando a serem proibidos em vários países, devido a sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecidos de animais e humanos (PALCHICK 1996; CHEN e ROGAN 2003; FERRER 2003; WALISZEWSKI et al. 2003).

5.1.1.2 Organofosforados

Os inseticidas organofosforados foram desenvolvidos na década de 40, sendo os primeiros a substituírem os inseticidas organoclorados, na qual, já apresentavam resistência. Sua utilização está presente não somente na Saúde Pública, mas também no meio agrícola, apresentando produtos de alta toxicidade, até aqueles com baixa toxicidade como é o exemplo do Temephos, sendo este permitido o uso em água potável (CYANAMID 1991).

Os inseticidas fosforados são derivados do ácido fosfórico e classificam-se em três sub-grupos: os alifáticos (malathion, vidrin, vapona, etc), os derivados de fenil (etil e metil parathion, fenithrothion, etc) e os heterocíclicos (chlorpirifos, chlorpirifos-metil, etc). São amplamente usados em Saúde Pública por apresentarem muitas vantagens com relação aos organoclorados, pois são biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos; apresenta, porém, como principal desvantagem, a instabilidade química, o que o torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação. Além disto, são menos tóxicos para os vertebrados que os organoclorados,

características essas que substituíram com algumas vantagens, os inseticidas clorados (PALCHICK 1996; WARE 1994; 2000).

Os organofosforados agem inibindo a Acetilcolinestase (AchE), importante enzima do sistema nervoso central que regula os níveis de acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor sintetizado pela célula transmissora ou pré-sináptica. Ela é armazenada em vesículas sinápticas até que um potencial de ação leve a uma despolarização da membrana plasmática das células pré-sinápticas. Isto resulta na entrada de Ca^{++} seguida pela fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática. A acetilcolina é liberada na fenda sináptica e se difunde até o receptor, a célula pós-sináptica. Aqui, a acetilcolina se liga ao seu receptor, que pode atuar como um canal catiônico. O receptor sofre uma mudança conformacional logo após se ligar a acetilcolina. Esta mudança na estrutura tridimensional resulta em uma entrada de Na^{+}, que despolariza a membrana plasmática na célula pós-sináptica. Tem início um potencial de ação. É necessário que a acetilcolina seja removida da fenda sináptica antes que a sinapse seja capaz de responder a outro sinal. Isto requer a ação da acetilcolinesterase, que catalisa a reação abaixo:

$$\textbf{acetilcolina} + H_2O \longrightarrow \textbf{colina} + \textbf{acetato}$$

A colina é absorvida pelas células pré-sinápticas e usada na síntese de mais acetilcolina. O acetato é transportado para outros tecidos e metabolizado, uma vez não havendo a ação do organofosforado.

Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, isto é, a enzima acetilcolinesterase é ligada á molécula inseticida, sendo no caso dos organofosforados uma ligação bem mais forte e ficando irreversivelmente inativada. A inibição de AchE resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapse), impedindo a interrupção de propagação de impulso elétrico (hiperexcitibalidade). Conseqüentemente, o SNC continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia, que pode culminar com a morte do inseto (ECOBICHON 1991; KUHR e DOROUGH 1976; RICHARDSON 1981; TAYLOR 1990).

5.1.1.3 Carbamatos

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico e sua comercialização se iniciou por volta dos anos 1960. Entre os mais utilizados está o carbaril. Assim como os organofosforados, os carbamatos têm ação letal rápida sobre os insetos, apesar de um curto poder residual. São sistêmicos para as plantas, uma vez que são relativamente solúveis em água.

Assim como os organofosforados, os carbamatos inibem a Acetilcolinesterase, embora a reação envolvida, neste caso, seja a carbamilação. Esses inseticidas ligam-se á enzima acetilcolinesterase (a passagem do impulso

nervoso entre neurônios ocorre através de neurotransmissores, como a acetilcolina que é liberado pela região terminal de um axônio com o objetivo de atingir os dendritos ou corpo celular do neurônio) inibindo a sua atividade normal que é a de degradar as moléculas do neurotransmissor excitatório, acetilcolina, após a transmissão de um impulso nervoso (WARE 2000).

Apesar de agirem de forma muito similar nos sistemas biológicos, apresentam três principais diferenças em relação aos organofosforados: a) alguns carbamatos são potentes inibidores de Aliesterase (uma esterase alifática, cuja função exata é desconhecida) e apresenta seletividade pronunciada contra as AchE de certas espécies, b) é que a inibição da AchE pelos carbamatos é reversível, voltando a sua função normal, mediante o afastamento da fonte de inibição e c) a ligação do sítio de ação é muito mais rápida em relação à intoxicação por organofosforado (WARE 2000).

5.1.1.4. Piretróides

Os piretróides sintéticos, atualmente bastante estáveis, são produzidos em laboratório, sendo baseados em uma substância natural, o "Piretro", extraído de *Chrysantemun cineraraefolium* e do *C. coccineum*, popularmente conhecidas como crisântemo. São biodegradáveis, não cumulativos e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos, embora possam, nesses animais, provocar hipersensibilização e irritação da mucosa. Por outro lado, são extremamente tóxicos para os animais aquáticos. Possuem ainda as vantagens de serem muito ativos (atuam

em pequenas doses) e desalojantes, apresentando como única desvantagem o custo elevado (PALCHICK 1996).

Da primeira geração de piretróides, chegando atualmente a quarta geração, houveram algumas mudanças em relação às características de ação do produto, dentre elas: alta efetividade em baixas doses e maior resistência à degradação por radiação ultravioleta (luz solar), através da introdução de um radical ciano (CN) na molécula desse grupo de inseticida, permitindo com isto maior efeito residual (figura1) (WARE 2000; OLIVEIRA-FILHO (1988). Por outro lado, a ausência desse radical ciano (CN), como por exemplo no piretróide Birflex, evita a irritação na pele como também na mucosa respiratória do operador. Em relação á redução de seu efeito residual pela ausência desse radical, a ação por longo período no ambiente é devido há presença do grupo bifenil na molécula deste inseticida como mostra a figura 2 (NOVARTISFARMA 2006).

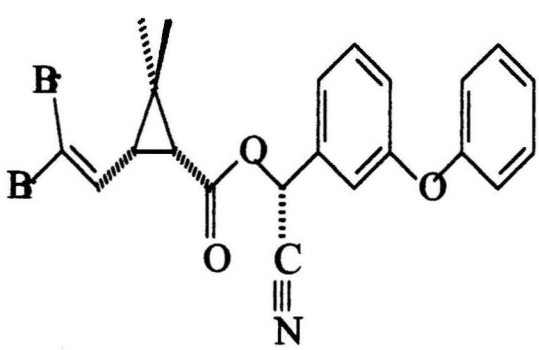

Figura 1. Fórmula estrutural da Deltametrina apresentando o radical ciano(CN).
Extraído de: INSTITUTO SPERIMENTAL PER LA PATOLOGIA VEGETALE, 2006.

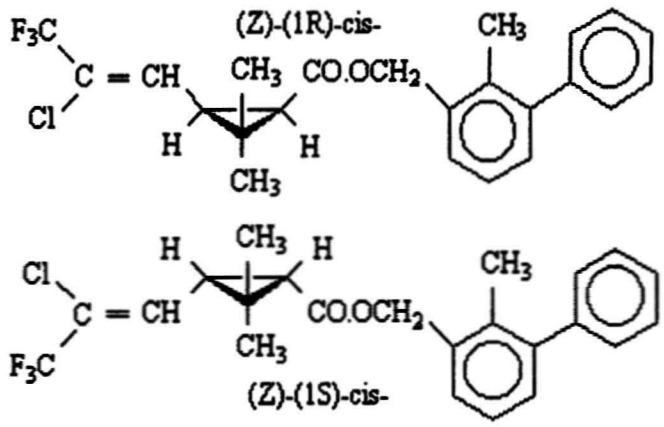

Figura 2. Presença do grupo bifenil na molécula de Bifentrin. Extraído de: FITO-INFO, 1998.

Em função das características específicas das estruturas químicas dos piretróides, estes são divididos em dois tipos: Tipo I (permetrina), na qual apresentam resposta fisiológica negativa á temperatura, ou seja, a atividade deste produto aumenta à medida que a temperatura diminui (semelhante ao DDT). O tipo I induz picos múltiplos de descargas nos nervos sensoriais periféricos, dos nervos motores como também dentro do sistema nervoso central (SNC); e o Tipo II (esfenvalerate) apresentando um coeficiente de temperatura positivo. Em contraste, o tipo II despolarizam o potencial da membrana do axônio, reduzindo o potencial de ação e eventualmente levando-o a perda de excitabilidade elétrica.

Os piretróides afetam o sistema nervoso periférico e central do inseto, atuando nos canais de sódio distribuídos ao longo do axônio, coagulando a circulação dos íons sódio nos canalículos das células nervosas impedindo ou prolongando o fechamento normal desses canais após o impulso nervoso, causando um fluxo

excessivo de íons Na^{++} para o interior da célula nervosa, produzindo descargas repetitivas e assim, acarretando um completo descontrole nervoso do inseto levando-o a paralisia e conseqüentemente a morte (BLOOMQUIST 1996; WARE 2000; NOVARTISFARMA 2006).

5.2. Resistência aos inseticidas químicos

A resistência dos insetos aos inseticidas já é conhecida há tempos, pois o caso mais antigo foi observado em 1908, nos Estados Unidos com a resistência do piolho-de-são-josé (*Quadraspidiotus periciosus*) ao enxofre (DENHOLM e ROLLAND 1992). Em 1947 na Flórida, as espécies *Aedes taeniorhynchus* e *Ae. sollicitans* começaram a apresentar alta tolerância ao organoclorado DDT. Posteriormente, em 1950, ainda nos Estados Unidos mosquitos do gênero *Culex* mostraram resistência aos organoclorados (WHO 1957; BROWN 1986).

Desde então, são conhecidas 109 espécies de mosquitos que são resistentes aos organoclorados (DDT e/ou dieldrin); 58 resistentes aos inseticidas organofosforados (OP), 17 resistentes aos carbamatos (propoxur ou bendiocarb) e 10 espécies apresentam alta resistência ou resistência cruzada a determinados piretróides (BROWN 1986).

O uso abusivo e continuado dos vários grupos de inseticidas ao longo de várias décadas tem como resultado imediato a seleção de populações resistentes. A aplicação mais freqüente de praguicidas e o aumento na dosagem do produto são os principais mecanismos que levam á resistência aos insetos, afetando concomitantemente os programas de controle de vetores e provocando a re-emergência de doenças transmitidas por insetos (GEORGHIOU 1983; 1990; BROGDON e McALLISTER 1998).

Apesar dos importantes avanços alcançados no desenvolvimento de métodos alternativos de controle, os inseticidas químicos continuam sendo uma importante ferramenta dos programas de controle integrado (ROSE 2001). Neste contexto, o monitoramento e o manejo da resistência através da rotação de inseticidas por modo de ação constitui como ferramentas de grande importância nos programas de controle de vetores (FERRARI 1996; OMOTO 2000).

A resistência a inseticidas é definida pela Organização Mundial de Saúde como sendo uma característica herdável, portanto genética, que confere um aumento na tolerância a um pesticida, ou grupo de pesticidas, de modo que os indivíduos resistentes sobrevivem à concentração do(s) componente(s) que seriam normalmente letais para a maioria dos indivíduos de uma população da mesma espécie (suscetível) (WHO 1957; 1992).

Apesar da disponibilidade cada vez maior de inseticidas no controle de vetores, os mecanismos de resistência desses grupos sobre os vetores são bem reduzidos. O mecanismo de resistência pode se dar por: fenômenos etológicos, aquele na qual o vetor reduz sua exposição ao inseticida; diminuição das taxas de absorção do inseticida ou pelo aumento de excreção desse composto, e finalmente por aquele processo que é mediado por sistemas enzimático, no qual o inseticida é ativamente metabolizado e/ou seqüestrado, ou ainda, o alvo do inseticida se torna insensível a ele. A resistência por fenômenos etológicos é de difícil comprovação, devido principalmente à existência de espécies crípticas de vetores, sendo portanto, muito arriscado afirmar que houve uma seleção comportamental numa dada espécie e não a ocupação de seu nicho por outra, críptica a ela (WHO 1992).

5.2.1. Redução na taxa de penetração do inseticida

Quando comparado com os outros mecanismos, este é considerado de importância secundária, por inferir somente um baixo nível de resistência (OPPENOORTH 1985), e são somente de importância quando combinadas com outros mecanismos de resistência. O aumento na taxa de excreção são bastante raros, sendo denominados mecanismos complementares (WHO 1992).

A base bioquímica da redução da taxa de penetração de um inseticida não está clara, embora tenha sido proposto que a composição protéica do tegumento tenha papel relevante (FERRARI 1996).

Segundo HOLLINGWORTH (1976); HOY (1990); GUEDES et al. (1992) o caráter lipofílico de alguns inseticidas associado à espessura e composição lipídica da cutícula dos insetos é responsável pela maior penetração do produto na cutícula e sua translocação até o alvo de ação.

Ainda, em alguns casos, conforme PLAPP (1986), pode haver uma base genética presente neste mecanismo, como exemplo no caso do estudo do gene *pen* da mosca doméstica, recessivo e localizado no cromossomo III. Normalmente esse gene confere pouca ou nenhuma resistência na ausência de outro mecanismo.

5.2.2. Resistência metabólica

Há muitos casos descritos de resistência que se desenvolvem ao aumento da capacidade de metabolização de inseticidas, conduzindo á formação de produtos menos tóxicos. A resistência metabólica ocorre quando níveis elevados ou a atividade alterada de enzimas envolvidas na degradação (esterases, oxidases ou glutation-S-transferase) impedem o inseticida de atingir sua ação. Talvez o mecanismo mais comum de resistência em insetos seja devido á modificações nos níveis de enzimas esterases as quais degradam (por hidrólise da ligação éster) uma ampla variedade de inseticidas (BROWN 1986; FERRARI 1996; BROGDON e McALLISTER 1998).

Quando uma enzima é superproduzida, mas o inseticida é metabolizado com baixa velocidade por essa mesma enzima, a causa da resistência pode ser devido ao grande seqüestramento do inseticida e não a um aumento na metabolização. Nestes casos os altos níveis da enzima atuam para apreender o inseticida, evitando assim que ele reaja com o seu sítio alvo específico (BRACCO 1998).

Em geral, as enzimas envolvidas em metabolismo de xenobióticos podem ser divididas em enzimas de Fase 1 e enzimas de fase 2. As enzimas de Fase 1 reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, introduzindo um grupo polar reativo na molécula, o que dá origem a substrato para as enzimas da Fase 2. A detoxificação que contribui para a resistência é realizada pelas enzimas da Fase1, que podem ser subdivididas em Monooxigenases, Esterases e Glutationa-S-transferases (BRAGA 2004).

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

As enzimas monooxigenases do citocromo P450 (CYP) são as principais enzimas envolvidas na fase inicial (fase I) do metabolismo xenobiótico. TIMBRELL

(2000), muitas vezes referindo-a como uma biotransformação, para distingui-lo do metabolismo intermediário (energia).

Citocromo P450 é uma hemoproteína que atua como Oxidase final no sistema de Monooxigenase, e está especialmente concentrada no intestino, corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi dos insetos. O sistema das Monooxidases P450 é caracterizado pelas numerosas reações oxidativas e pela falta de especificidade em relação ao substrato, características que tornam as Monooxidases bastante aptas para o ataque enzimático inicial a combinações lipofílicas exógenas (FEYEREISEN 1999).

Evidência inicial do desenvolvimento de metabolismo oxidativo com a resistência pode ser obtida com a adição, em bioensaios com iseticidas de inibidores de Oxidases, como o butóxido de piperonil (que atua, nestes casos, como sinergista). Nestes casos, avalia-se a capacidade do sinergista de reduzir a magnitude da resistência. Embora esta técnica não seja conclusiva, é valiosa como uma primeira indicação de que o aumento da atividade de Monooxigenases está contribuindo para a resistência (BERGÉ et al. 1998; SCOTT 1999).

Esterases: Essas enzimas estão envolvidas em funções vitais do mosquito como reprodução, transporte de impulsos nervosos, desenvolvimento e a própria resistência a inseticidas químicos.

Vários inseticidas que contêm o grupamento éster na sua estrutura química (organofosforados, carbamatos e piretróides) são suscetíveis à reação de hidrólise. As enzimas que catalizam estas reações são coletivamente chamadas de hidrolases, ou Esterases. São também chamadas de Carboxilesterases, quando hidrolisam compostos que apresentam ésteres carboxílicos na sua estrutura, como a maioria dos organofosforados, que são ésteres de ácido fosfóricos (BROGDON e McALLISTER 1998; HEMINGWAY e KARUNARATNE 1998).

O envolvimento das Esterases com a resistência pode ser verificado com a adição de inibidores em ensaios com os inseticidas como por exemplo usando-se o S,S,S-tributil fosforotioato(DEF) (BROGDON e McALLISTER 1998; HEMINGWAY e KARUNARATNE 1998).

Conforme HEMINGWAY e KARUNARATNE (1998) para a resistência ao malathion, a atividade é aparentemente devida a uma forma mutante de Esterase, que exibe propriedades cinéticas diferentes entre as cepas resistentes e suscetíveis. Em mosquitos *Culex ssp*, a superprodução de uma única isoenzima de Esterase envolvida com a resistência está relacionada ao processo de ampliação gênica (PASTEUR et al. 1981).

AMIN e PEIRIS (1980) mostraram o aparecimento de resistência a uma gama de organofosforados e ainda ao carbamato propoxur. Os mecanismos dessa

resistência foram investigados por HEMINGWAY et al (1990), mostrando que a elevação na atividade de esterase foi o principal mecanismo de resistência.

Corroborando com HEMINGWAY et al (1990), SEVERINI et al. (1993) correlacionaram a resistência ao Clorpirifós e temefós em 4 linhagens de *Cx. quinquefasciatus* a uma elevação na atividade de estarase, assim como uma diminuição na sensibilidade da acetilcolinesterase.

Glutationa-S-Transferase (GST): As Glutationa-S-Transferase são um grupo de enzimas que apresentam especificidades comuns em relação ao substrato aceptor eletrofílico. Uma característica da GST é a elevada especificidade pela Glutationa reduzida (GSH); após combinada, apresenta maior especificidade para um segundo substrato. A GSH, formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, é o co-fator para a GST. A capacidade redutora da GSH é determinada pelo agrupamento hidrofílico SH presente na cisteína. Considerada a principal enzima detoxificante da fase II, desempenha papel fisiológico na detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos. A reação de conjugação do grupo sulfídrílico da glutationa com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalizada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (FERRARI 1996; BROGDON e McALLISTER 1998).

5.2.3. Alteração do sítio-alvo

Acetilcolinesterase (AchE): Esta enzima é a responsável pela degradação de acetilcolina, neurotransmissor que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura dos canais de sódio na célula pós-sináptica. Em situação normal, após a parada do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptação ou por degradação enzimática, sendo a Acetilcolinesterase a enzima responsável.

Inseticidas organofosforados e carbamatos agem inibindo a AchE, e em conseqüência, a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso não cessa, causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos, e assim levando o inseto à morte (FERRARI 1996; FFRENCH-CONSTANT et al 1998; HEMINGWAY e RANSON 2000; ECHOBICHON 1991; KUHR e DOROUGH 1976; RICHARDSON 1981; TAYLOR 1990).

Canais de Sódio: A ligação destes inseticidas mantém aberto os canais de sódio, conseqüentemente, a propagação contínua do impulso nervoso, seja prolongando ou impedindo o fechamento normal desses canais após a transmissão do impulso nervoso, permitindo um fluxo excessivo de Íons Na^{++} para o interior da célula nervosa. A resistência é resultante de sensibilidade reduzida do canal de sódio

a esses compostos (BLOOMQUIST 1993; 1996; HEMINGWAY e RANSON 2000; WARE 2000).

Os sintomas de intoxicação de insetos por piretróides desenvolve-se rapidamente, resultando em transmissão repetitivos de impulso nervoso, hiperexcitabilidade, perda de postura locomotora "knockdown" e conseqüentemente, paralisia e morte do inseto (BLOOMQUIST 1996).

Receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA): O modo de ação destes inseticidas ainda não foi totalmente elucidado, entretanto, sabe-se que os mesmos antagonizam a ação do meurotransmissor inibitório, GABA. Estes pertencem a uma superfamília de receptores presentes nas junções sinápticas do sistema nervoso central (SNC) e das sinapses neuromusculares de insetos (HEMINGWAY e RANSON 2000).

Este grupo de inseticidas impedem que após a transmissão normal de um impulso nervoso, se desencadeie o processo normal de inibição que restabelece o estado de repouso do sistema nervoso central. Após a ligação de GABA ao seu receptor pós-sináptico, há um aumento na permeabilidade da membrana aos íons cloro, o que desencadeia o mecanismo inibitório do sistema nervoso. Assim, os ciclodienos e fenilpirezóis agem nos receptores GABA, impedindo a entrada de íons cloro para o meio intracelular, com isto antagonizando o efeito "calmante" de GABA, levando o inseto a emissão de impulsos espontâneos que levam à contração

BIBLIOTECA / CIR
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

muscular, convulsões, paralisia e morte. A resistência, ocasionada por insensibilidade do receptor de GABA aos inseticidas, já foi associada com mutação de único par de bases do receptor, ocasionando substituição de um aminoácido (alanina por serina) (HEMINGWAY e RANSON 2000).

5.3. Inibidores de crescimento

Os IGRs (insect growth regulator) surgiram na década de 70 como um novo grupo de inseticidas de ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos do que os outros inseticidas, pois atuam seletivamente ao interromper o desenvolvimento e o crescimento ao invés de intoxicação direta (MULLA e DARWAZEH 1979; SILVA e MENDES 2002).

A exposição a determinado IGR, normalmente não causa efeitos letais imediatos, mas induz anomalias que impedem a sobrevivência ou a reprodução em momentos particulares da vida do inseto (BENETT e REID 1995; AGUILERA et al. 2001).

Finalmente, os inibidores dos insetos estão divididos em dois grupos: hormonais e os não hormonais. Os primeiros são análogos aos hormônios dos insetos, provocando retardo no desenvolvimento das larvas e sua morte. Pertencem a este grupo: metoprene, hidroprene, piriproxifen e o fenoxicarb. Os não hormonais agem sobre a formação do exoesqueleto dos insetos. Pertencem a este grupo as benzofeniluréias (fluazuron, diflubenzuron, triflumuron, exaflumuron e o lufenuron),

que inibem a síntese da quitina e o grupo das diaminotriazinas (ciromazinas), que endurecem a cutícula do inseto. A grande vantagem deste grupo de composto é ser praticamente atóxico para os mamíferos e atuar basicamente sobre o inseto-alvo, preservando seus inimigos naturais *.

5.3.1. Análogo do Hormônio Juvenil

Com base nos trabalhos de Wigglesworth sobre o controle hormonal do desenvolvimento, WILLIAMS (1956) extraiu hormônio juvenil (HJ) de larvas de *Hyalophora cecropia* e postulou seu potencial como agente de controle de insetos, sugerindo que substâncias que o mimetizam poderiam ser utilizadas como inseticidas seguros (MIAN e MULLA 1982; GRAF 1993).

Assim, o isolamento de Hormônio Juvenil por BOWERS et al. (1966) abriu um novo capítulo no estudo da química deste hormônio.

O modo de ação desses compostos é prolongar os estágios larvais e de ninfas, sendo seu desenvolvimento não normal. Os juvenóides como são chamados os análogos do hormônio juvenil têm efeitos secundários característicos, pois alteram a produção hormonal do inseto e podem produzir insetos deformados, comprometendo o desenvolvimento embrionário.

Os inseticidas metoprene, fenoxicarb e piriproxifen assemelham-se estruturalmente ao hormônio juvenil do inseto e imitam a ação deste hormônio,

* Controle Integrado de Pragas. Texto extraído da revista eletrônica http://www.ccih.med.br/pragas.html em 30 de novembro de 2005.

interferindo numa série de processos fisiológicos vitais, dentre eles a ecdise (muda de pele) e a reprodução. A eficiência destes inseticidas é maior nas fases de desenvolvimento em que a taxa do hormônio juvenil está baixa na hemolinfa do inseto, ou seja, no último instar larval ou no inicio da fase pupal. O principal sintoma decorrente da intoxicação por juvenóides é a metamorfose anormal (insetos defeituosos e incapazes de sobreviver, com características mistas de larva e pupa ou larva e adulto). Na fase adulta de mariposas, por exemplo, os juvenóides afetam a fisiologia reprodutiva, reduzindo a fertilidade (GALLO et al. 2002).

5.3.2. Inibidores de Síntese de Quitina

Destacam-se os inibidores de quitina, os derivados da benzoilfenil-uréia (diflubenzuron, triflumuron, e etc.) tem a maior importância econômica. Por isso, desde o desenvolvimento da primeira substância desse tipo no final da década de setenta, elas são as substâncias ativas mais analisadas e melhor conhecidas (HAMMANN e SIRRENBERG 1980).

O diflubenzuron é um IGR que age pela inibição da síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto e tem sido comercializado em muitos países com o nome dimilin (GRAF 1993; MARTIN et al. 1995; MARTÍNEZ 1999; MEKURIA et al. 1991; SCHAEFER 1975; SILVA e MENDES 2002). Para os insetos de interesse na área da saúde existem vários estudos, mostrando os efeitos inseticidas do diflubenzuron, com a possibilidade de uso no controle (CHAMBERLAIN 1975;

CHAU-MEI et al. 1990; DORTA et al. 1989; FOURNET et al. 1993; 1995; 1997; MARCORIS et al. 1995; SCHAEFER 1975).

Nos insetos, a quitina (um polissacarídeo de N-acetilglucosamina e representa 50% da composição da cutícula dos insetos) é um composto essencial da cutícula que forma o exoesqueleto do animal e também a membrana peritrófica, um revestimento do conteúdo do intestino, formado pelas células especiais intestinais que tem uma grande importância nos processos de digestão e no mecanismo de proteção das células intestinais. Durante o processo de ecdise (muda), as proteínas e a quitina são sintetizadas pelas células epidérmicas. Para ocorrer a síntese de quitina é necessário a presença de precursores (como a trealose e o glicogênio) e a intervenção de várias enzimas, entre ela a sintetase e a ligase que ativam a última fase de polimerização.

Os derivados da benzilfenil-uréia mostram efeito inseticida contra todos estádios larvais. A mortalidade baseia-se na incapacidade dos animais de fazerem a troca da cutícula de maneira natural, uma vez que, de acordo a GUEDES e VILELA (1991), na ausência de quitina, a cutícula do inseto se torna fina e frágil e é incapaz de suportar o seu corpo e segundo o mesmo autor o processo de ecdise é afetado pela inabilidade de formar nova cutícula normal. Porém, algumas das benzoilfeniluréais também afetam a fase de pupa e/ou apresentam ação transovariana sobre as fêmeas expostas, reduzindo a fecundidade dos seus ovos (GUEDES e VILELA 1991).

5.3.3. Agonistas de Ecdisona ou Ecdisteróides

Os inseticidas agonistas de ecdisona (tebufenozide, metoxifenozide) são uma classe de inseticida relativamente nova. Estas diacil-hidrazinas são agonistas do hormônio esteroidal 20-hidroxiecdisona (um ecdiesteróide), que é necessário para o processo de muda do inseto. O efeito desta classe de inseticidas é a interrupção do processo de muda dos insetos alvos, resultando em sua destruição. Como são reguladores do crescimento, são mais seletivos que os organofosforados, carbamatos e rotenóides*.

O esteróide 20-hidroxiecdisona é um hormônio de desenvolvimento encontrado nos artrópodes. O processo de muda é regulado pela variação das concentrações da 20-hidroxiecdisona na larva (DHADIALLA et al. 1998). O aumento dos níveis deste hormônio leva ao início da muda. Quando a larva entra no estágio de muda, ela pára de se alimentar e o fluido de muda, que contém várias enzimas proteolíticas necessárias para a mesma, entra no espaço ecdisial. Neste ponto, as células epidérmicas entram em uma fase de aumento na síntese de proteínas (expressão do gene) e uma nova cutícula é produzida. Um decréscimo na concentração de 20-hidroxiecdisona desencadeia uma fase subseqüente, que inclui a ativação das enzimas no fluido de muda, digestão da pró-cutícula e reabsorção do fluido de muda. Na seqüência, há mais um decréscimo na concentração de 20-hidroxiecdisona e outros hormônios, necessários para completar o processo de muda, são liberados, reiniciando-se, então, a alimentação*.

* Um módulo de Química Verde. Texto extraído da revista eletrônica http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymoduleport.html em 30 de novembro de 2005

O crescimento e o desenvolvimento adequado dos insetos dependem da concentração de 20-hidroxiecdisona em vários estágios de diferenciação. Sugere-se que este hormônio esteroidal esteja relacionado com a regulação da expressão genética do genoma do inseto*.

Normalmente, os hormônios interagem com receptores específicos antes de iniciar um efeito fisiológico. O ecdiesteróide obriga uma proteína receptora de ecdiesteróide a regular as classes de genes "antes" e "depois" (existem numerosos exemplos deste tipo de regulação temporal nos sistemas bioquímicos. Alguns dos mais simples são encontrados em uma variedade de sistemas virais). Os genes "antes" são ativados pelo complexo hormônio/receptor. As proteínas produzidas pelos genes "antes" reprimem a transcrição destes genes, ao mesmo tempo em que ativam a transcrição dos genes "depois". Alguns dos produtos dos genes "antes" são fatores de transcrição. Os fatores de transcrição são proteínas que podem ligar-se a curtas seqüências de nucleotídeos, resultando no início ou regulação da transcrição*.

Estes inseticidas são capazes de se ligar às proteínas receptoras de ecdiesteróide. Enquanto que a expressão genética dependente da presença da 20-hidroxiecdisona ocorre na presença de diacil-hidrazinas, a expressão genética dependente da ausência da 20-hidroxiecdisona é impedida (DHADIALLA et al. 1998). O efeito tóxico das diacil-hidrazinas é devido não somente ao fato de que elas mimetizam a 20-hidroxiecdisona, mas também porque seus níveis não diminuem. Na

* Um módulo de Química Verde. Texto extraído da revista eletrônica http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymoduleport.html em 30 de novembro de 2005

presença da tebufenozida, o processo de muda começa, mas na etapa do processo em que os níveis de 20-hidroxiecdisona normalmente diminuiriam, a tebufenozida permanece. O processo de muda é alterado e a alimentação não é realizada, levando à morte.

Embora os IGRs possam ser um importante elemento no manejo da resistência a inseticidas, uma vez que atuam de maneira diferente dos inseticidas tradicionais acrescido pelo fato de ser biodegradável e não cumulativo no organismo, por não ser assimilado pelo intestino de vertebrados (MULLA 1995), já existem registro de resistência a esses compostos. A resistência aos IGRs está relacionada às monooxigenases (KOTZE et al. 1997; BROGDON e McLLISTER 1998) e foi detectada principalmente na mosca doméstica (CERF e GEORGHIOU 1974; ZHANG et al. 1998).

5.4. Controle Biológico

5.4.1. *Bacillus thuringiensis* Berliner

O uso de bactérias no controle biológico das larvas de mosquitos tem-se destacado entre as diversas estratégias que compõem os programas de manejo integrado. As principais razões para isto são as vantagens em relação aos inseticidas químicos, uma vez que esses produtos possuem inúmeras formulações e são usados contra diversas espécies de mosquitos, com um preço um pouco superior aos

produtos tradicionalmente utilizados, mas competitivos quando considerados os custos sociais e ambientais do uso de inseticidas não seletivos em ecossistemas aquáticos (VILARINHOS et al. 1998).

Destaca-se entre esses patógenos o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas (cristal) durante a esporulação, que são responsáveis pela atividade tóxica do referido entomopatogênico (Figura 3 e 4) (GLARE e O'CALLAGHAM 2000).

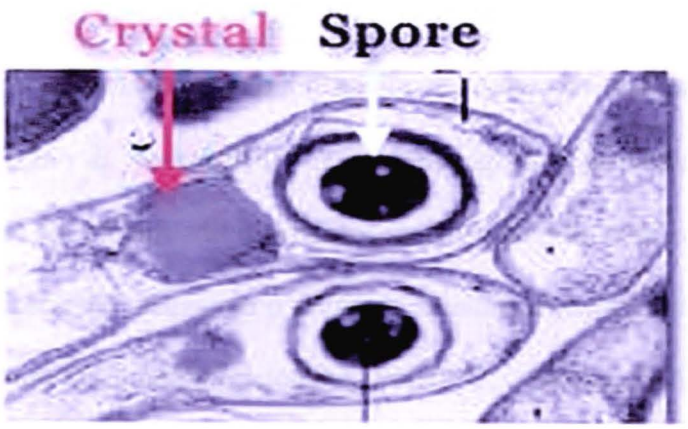

Figura 3. *Bacillus thuringiensis* em forma de bastonete com o esporo e o cristal.
Extraído de: MICROBIAL ENGINEERING LABORATORY, 2003.

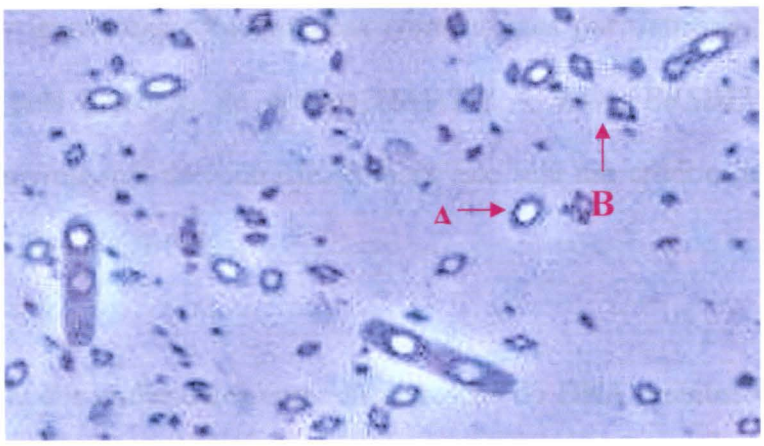

Figura 4. Células de *Bacillus thurigiensis*. De coloração mais clara os esporos (A); e de coloração mais escura os cristais bipiramidal (B).
Extraído de: INSTITUTE OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 2003.

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), foi descrito pela primeira vez por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*, nomeando posteriormente como *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde foi encontrado o primeiro inseto infectado com o bacilo. Embora seja a primeira descrição utilizando o nome de *Bacillus thuringiensis,* este não foi o primeiro isolamento deste entomopatógeno. Em 1901, o biólogo S. Ishiwata isolou a bactéria que era agente etiológico da "sotto-disease". Em 1908, Iwabuchi a denominou como *B. sotto Ishiwata*, sendo posteriormente considerado nome inválido e assim mantido o nome mais recente (*Bacillus thuringiensis*) (GLARE e O'CALLAGHAM 2000).

Embora geralmente o termo *Bacillus thuringiensis* seja empregado para uma única espécie, na verdade ele pertence a um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, B. *cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiencis* e B. *weihenstephanensis*), denominado *B. cereus*. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* mostram

características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição, *Bt* pode ser diferenciado pela presença de cristais (LUTHY e WOLFERSBERGER 2000), visíveis em microscopia de contraste, embora este seja um critério de pouco valor taxonômico (LYSENKO 1983).

Os métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolipídios, comparação da seqüência 16S rRNA, entre outros, mostram que essas duas espécies são, na verdade somente uma. Esta semelhança é devida a transferência de plasmídeos que codificam as δ-endotoxinas de *Bt* para *B. cereus* e, por outro lado, o *Bt* pode perder a capacidade de produzir essas toxinas, tornando-se *B. cereus*. Portanto, a distinção entre essas espécies não é clara e continua sendo um assunto de interesse de muitos taxonomistas (GLARE e O'CALLAGHAM 2000; HANSEN e SALAMITOU 2000; SCHNEPF et al. 1998).

Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária. No inicio da esporulação *Bt* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida. Durantes esse processo de esporulação, as proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina (cristal) razão pelas quais são denominadas Cry (YAMAMOTO e DEAN 2000).

Cada cristal pode ser formado por uma ou mais proteínas codificadas pelos genes Cry e conhecidas como δ-endotoxinas ou proteínas cristal (SALLES e BALDANI 1998). De acordo com a atividade biológica dos produtos dos genes cry e

com sua seqüência de aminoácidos, HÖFTE e WHITELEY (1989) classificaram 42 diferentes tipos de δ-endotoxinas em 14 grupos. Desta forma, as toxinas codificadas pelos genes *cryI, cryII, cryIII e cryIV* são específicas para as ordens Lepidoptera; Diptera e Lepidoptera; Coleoptera e Diptera; respectivamente como é observado abaixo.

Classes de genes cry segundo Höfte & Whiteley (1989)

CryI

Segundo HÖFTE e WHITELEY (1989) os genes dessa classe codificam proteínas com peso molecular variando de 130 a 140kDa, que se acumulam na célula mãe na forma de cristais bipiramidais durante a fase de esporulação. Após o processo de solubilização destes cristais em pH alcalino, ocorre a liberação da pró-toxina, na qual é ativada pelas proteases do intestino médio das larvas, liberando assim, o fragmento tóxico de tamanho variando de 60 a 70kDa.

Conforme HÖFTE e WHITELEY (1989) a Classe CryI contém 6 subclasses de genes (cryIA a F). A sua porção C-terminal entre os genes cryI é bastante conservada e não está evolvida com a toxicidade. Entretanto, devido ao elevado número de resíduos de cisteína, acredita-se que esta região contribua para a estabilidade do cristal através da formação de pontes de enxofre (AGAISSE e LERECLUS 1995).

A porção N-terminal das proteínas CryI é mais variável e corresponde ao fragmento tóxico, sendo esta região composta por 5 blocos bem conservados entre as proteínas CryI, CryIII, CryIV (A,B e C) e CryV. Esta proteína tem espectro de ação contra Lepidoptera.

CryII

A proteínas CryIIA possui espectro de ação contra Lepidóptera e Diptera, enquanto as demais proteínas desta classe apresentam toxicidade somente em insetos da ordem Lepidóptera. A δ-endotoxina codificada pelos genes cryII tem peso molecular de 71kDa e forma cristais cubóides. (HÖFTE e WHITELEY 1989).

As proteínas CryIIA, B e C diferem da classe CryI por não possuírem a porção C-terminal e só apresentam o primeiro bloco conservado na porção N-terminal (LERECLUS et al.1993).

CryIII

Seus cristais apresentam uma forma romboidal e são compostos por uma única proteína de 71kDa, exceto a proteína CryIIIC, cuja massa molecular é de 130 kDa. Nem todas estirpes de *Bacillus thuringiensis* apresentam a Classe III, porém, os que contêm esta classe apresentam atividade contra insetos da ordem Coleoptera (McPHERSON et al.1988).

As proteínas CryIII são homológas a porção amino-terminal das proteínas CryI, contendo 5 blocos conservados, porém a porção carboxi-terminal presente nas pró-toxinas da classe I se mostra ausente na maior parte das proteínas dessa classe, exceto da proteína CryIIIC (LAMBERT et al. 1992). Através da análise cristalográfica da proteína CryIII, observou-se a presença de 3 domínios distintos toxina na sua forma ativa (LI et al. 1991). Segundo SCHNEPF (1995) o domínio I estaria envolvido na formação do poro, o Domínio II na especificidade e na ligação da proteína aos receptores e o domínio III na estabilidade, na formação do poro e na especificidade da toxina.

CryIV

Esta classe foi isolada a partir de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*, apresentando cristais em forma esférica e retangular com atividade contra larvas de Diptera. A classe cryIV compreende quatro genes (cryIVA, B, C e D), que codificam para proteínas de peso molecular de 135, 128, 74 e 72 kDa, respectivamente (LERECLUS et al. 1993). Além dessas proteínas, o *Bacillus thuringiensis israelensis* produz uma outra proteína de 27 kDa com atividade citolítica, que por não apresenta homologia com as δ-endotoxinas, foi classificada como Cyt. Esta proteína está também presente no cristal e é necessária para que o cristal apresente toxicidade (LERECLUS et al. 1993).

Cry V

A classe cryV foi incluída recentemente na classificação de HÖFTE e WHITELEY (1989), após a clonagem de um novo gene com atividade contra insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, designado como CryV (TAILOR et al. 1992).

Utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com primers específicos para esta classe de gene, GLEAVE et al. (1993) detectaram a presença desta classe em 7 dos 21 serotipos de *B. thuringiensis* testados. Estes autores seqüenciaram o gene cryV de *B. thuringiensis subsp. kurstaki* DSIR732 ($cryV_{732}$), e após comparação deste com o descrito por TAILOR et al. (1992), verificaram diferenças somente em dois nucleotídeos. A proteína $CryV_{732}$ possui massa molecular estimada de 81.215 Da e possui 5 blocos conservados na porção amino-terminal, assim como um sítio de clivagem potencial entre os aminoácidos 637 e 638. A clivagem da pró-toxina $cryV_{732}$ neste ponto por proteases do intestino do inseto gera o fragmento tóxico de aproximadamente 65kDa. Resultados de bioensaios utilizando a proteína de 81 kDa revelaram sua toxicidade somente contra *Epiphyas potvittana* (Lepidoptera), não sendo detectado nenhum efeito contra larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) ou *Culex pervigilans* (Diptera) (GLEAVE et al. 1993).

O isolamento de novas estirpes de *B. thuringiensis* e idetinficação de genes cry que codificam para δ-endotoxina com diferentes espectros de ação, que não se enquadravam no sistema de classificação proposto por HÖFTE e WHITELEY

(1989), levou a criação de uma nova nomenclatura baseada somente na identidade dos aminoácidos das proteínas Cry, proposta por CRICKMORE et al. (1998). Nesta nova classsificação, 96 sequências gênicas da δ-endotoxinas foram agrupadas em 17 grupos (PEFEROEN 1997), e os números romanos foram substituídos por números arábicos (quadro 1), como é o caso dos genes *cryIA(a)*, cryIB e *cryIIIA* que foram classificados como *cry1Aa*, *cry1Ba* e *cry3A*, respectivamente. Porém, alguns genes tiveram seus números alterados, como ocorreu como os genes *cryIH* e cryIIIC, que foram classificados como c*ry9Ca* e *cry7Aa*.

Quadro 1. Relação entre a nova nomenclatura dos genes *cry* (CRICKMORE et al. 1998) e a antiga classificação proposta por HÖFTE e WITHELEY (1989).

Nova Classificação	*Classificação antiga*	*Inseto alvo*
Cry1Aa1	CryIA(a)	Lepidoptera
Cry1Ab1	CryIA(b)	Lepidoptera
Cry1Ac1	CryIA(c)	Lepidoptera
Cry1Ad1	CryIA(d)	Lepidoptera
Cry1Ba1	CryIB	Lepidoptera/Coleoptera
Cry1Ca1	CryIC	Lepidoptera
Cry1Ea1	CryIE	Lepidoptera
Cry1Ia1	CryV	Lepidóptera/Coleoptera
Cry2Aa1	CryIIA	Lepidóptera/Diptera
Cry2Ac1	CryIIC	Lepidoptera
Cry3Aa1	CryIIIA	Coleoptera
Cry3Ca1	CryIIID	Coleoptera
Cry4Ba1	CryIVB	Coleoptera
Cry7Aa1	CryIIIC	Coleoptera
Cry8Aa1	CryIIIE	Coleopetra
Cry9Aa1	CryIG	Lepidoptera
Cry10Aa1	CryIVC	Diptera
Cry11Aa1	CryIVD	Diptera
Cry12Aa1	CryVB	Nematoda
Cry13Aa1	CryVC	Nematoda
Cry14Aa1	CryVD	Coleoptera

Fonte: PEFEROEN, 1997.

Estas toxinas são codificadas pelos genes cry e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto que a porção C-terminal confere a forma da estrutura do cristal (LI et al. 1991).

Os genes cry podem estar localizados tanto no cromossomo quanto em grandes plasmídeos ou em ambos (GONZÁLES et al. 1982). Sua expressão é regulada por dois mecanismos. O primeiro é dependente de fatores sigma, específicos da fase de esporulação, onde está baseada a classificação da maioria dos genes cry, e outro independente do processo de esporulação, como gene vip3, cujo fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARIS-INGLIS et al. 1998). Algumas cepas de *Bacillus thuringiensis* apresentam um único gene codificador, enquanto outras apresentam genes diferentes, porém relacionados (LERECLUS et al. 1993; SANCHIS et al. 1998).

Após a ingestão dos esporos mais os cristais pelo inseto, os cristais são solubilizados em pH alcalino, originando as pró-toxinas que em presença de enzimas digestivas (proteinases) são convertidas em 4 ou mais polipeptídios tóxicos (δ-endotoxinas). Essas toxinas hidrolizadas cruzam a membrana peritrófica, liga-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa a lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção cessa a alimentação (COPPING e MENN 2000).

O intestino dos insetos suscetíveis geralmente possuem um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos ingeridos do patógenos. Entretanto, as δ-endotoxinas causam a paralisia do intestino, retendo os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes para iniciar a germinação dos esporos. O inseto morto serve então como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria (KNOWLES 1994).

Diferentes toxinas ligam-se a diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com intensidade variada, o que explica a especificidade destas toxinas. Devido à importância do esporo na patogenicidade desta bactéria, a maioria dos produtos comercializados possui os esporos e as toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica (COPPING e MENN 2000).

KNOWLES (1994) descreve as etapas da patologia de *Bt* sobre os insetos: aumento da absorção de glicose e inicio dos sintomas histopatológicos (1-5 minutos); paralisia do intestino médio, cessa a alimentação, membrana apical permeável a corantes, aumento do volume e formação de vesículas nas células, aumento do pH da hemolinfa e redução do pH do lúmen (5-10 minutos); aumento do fluxo e concentração de K^+ da hemolinfa, diminuição do transporte de glicose e leucina para a hemolinfa, colapso metabólico celular (10-30 minutos); lise celular e ruptura da membrana basal, paralisia geral ocorre em 1 a 7 horas; morte por falta de alimento ou septicemia (1-3 dias).

Algumas cepas de *Bt* produzem outras endotoxinas denominadas de endotoxinas citolíticas (cyt), entretanto, não apresenta nenhuma homologia com as δ-endotoxinas. As toxinas citolíticas estão presentes também nos cristais, sendo necessária para que este apresente toxicidade. Os genes que codificam essas toxinas estão contidos em plasmídeos grandes que também contem genes que codificam as toxinas cry (GLARE e O'CALLAGHAM 2000; LERECLUS et al. 1993).

Alem das toxinas do cristal, essa bactéria pode produzir outras toxinas, como as β-exotoxina, também denominada, thuringiensina. Essa toxina é termoestável, sendo produzida por várias cepas deste entomopatógeno e possui atividade inseticida contra uma ampla gama de insetos, porém devido à sua toxicidade para vertebrados, a maioria dos bioenseticidas à base de *Bt* utiliza subespécies ou isolados que não produzem as β-exotoxinas (GLARE e O'CALLAGHAM 2000).

5.4.2. *Bacillus sphaericus* Neide

Bacillus sphaericus Neide é considerado um dos mais promissores agentes entomopatogênicos no controle de culicídeos (KARCH e CHARLES 1987; LACEY et al. 1988).

As primeiras estirpes entomopatogênicas descritas de *Bacillus sphaericus* foram isoladas na Califórnia a partir de larvas de *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae), e foram chamadas de estirpe K e Q (KELLEN et al. 1965).

Dentre as 300 linhagens isoladas, 17 apresentam toxicidade contra larvas de mosquitos (de BARJAC e SUTHERLAND 1990). Dessas, as linhagens 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE e MENDIS 1980), 1593M da Indonésia (de BARJAC 1990b; SINGER 1990), 2362 da Nigéria WIESER 1984), e C3-41 da China (LIU et al. 1980) têm sido objeto de vários estudos e apresentado atividade contra mosquitos do gênero *Culex*, *Anopheles*, *Psorofora*, *Mansonia*.

A maior característica deste entomopatogênico está relacionada ao espectro de ação sobre a fauna não alvo, tornando-o seguro contra espécies de mamíferos, peixes, dentre outros (MULLA et al. 1984; SIEGEL e SHADDUCH 1990).

Outra característica como a persistência de larvicidas biológicos no meio é outro aspecto importante no controle de vetores e tem sido discutido em várias situações (LACEY et al. 1984; CLARCK III e ROWLEY 1984; MULLA et al. 1984; BALARMAN et al. 1987).

Conforme MULLA et al. (2003), o *Bacillus sphaericus* quando comparado ao *Bacillus thuringiensis* produz alta mortalidade das larvas e apresenta longo efeito residual em água poluída, característica de criadouros de *Culex quinquefasciatus*. Em algumas estirpes de *B. sphaericus* como a 2362, as partículas tóxicas são encaixadas nos esporos e tornando-se mais protegido contra fatores físicos (KARCH e CHARLES 1987).

Apesar do grande espectro de ação contra insetos alvo, o *Bacillus sphaericus* conforme SILVA et al. (2002), apresenta pouca ou nenhuma eficácia sobre larvas de mosquito do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*.

Conforme a DAVIDSON (1989a), a ligação da toxina binária as células do intestino são certamente o passo determinante para atingir o hospedeiro. Relativamente insensível, larvas de *Aedes aegypti* mantém o pH alcalino do intestino necessário para a solubilização das toxinas, como possui enzimas capazes de ativar essas toxinas, mas por alguma razão, não ligam as toxinas às células do intestino.

Dentro do contexto de ação dos entomopatogênicos, a atividade do *B. sphaericus* deve-se aos cristais protéicos produzidos durante o processo de esporulação. Esses cristais são compostos por uma toxina binária (Bin A e Bin B), formada por duas proteínas de 51kDa e 42kDa, respectivamente (BAUMAN et al. 1987).

A presença simultânea desses dois compostos é necessário para uma maior toxicidade do entomopatogênico, sugerindo uma ação de sinergismo entre os dois polipeptídeos (BROADWEL et al 1990), uma vez que de acordo a NICOLAS et al. (1993), a proteína de 42kDa sozinha apresenta uma fraca ação tóxica. Além da toxina binária, foi ainda descrita uma terceira toxina de 100kDa, chamada de MTX, cuja função mosquiticida não é muito significante (THANABALU et al. 1991).

Quando os esporos e os cristais são ingeridos pelas larvas (Figura 5), os cristais protéicos são solubilizados em pH alcalino do intestino (YOUSTEN e DAVIDSON 1982), sendo em seguida, ativados pelas proteinases intestinais (NICOLAS et al. 1990). Este processo ativa a toxina binária (separadamente), que é reconhecida por receptores presentes nas microvilosidades do epitélio intestinal, causando autólise das células e morte da larva (DAVIDSON 1988; NICOLAS et al. 1990).

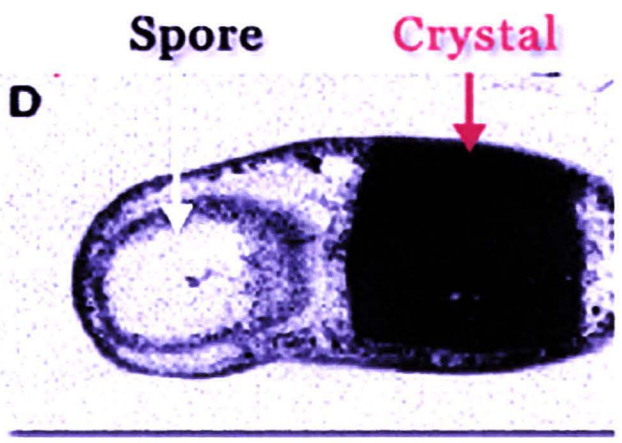

Figura 5. Visualização dos esporos e dos cristais no *Bacillus sphaericus*.
Extraído de: MICROBIAL ENGINEERING LABORATORY, 2003.

Por muitos anos, umas das vantagens do controle biológico comparado aos inseticidas químicos foi creditado que os entomopatogênicos provocariam pouca ou nenhuma resistência aos insetos alvo. Entretanto, estudos recentes mostram que o *Cx. quinquefasciatus* tem desenvolvido resistência ao *B. sphaericus* mediante contínuas

aplicações e através de seleção seletiva (SINEGRE et al 1994; RAO et al. 1995; SILVA-FILHA et al. 1995).

O modo de um componente ativo e o mecanismo de resistência está obviamente relacionado. As principais ações na interação entre a bactéria através de seu principal fator tóxico com a larva pode ser razão de mudanças, afetando a suscetibilidade dos insetos alvo. As interações entre os cristais protéicos do *Bacillus thuringiensis*, por exemplo e as células do intestino das larvas freqüentemente determinam a especificidade da proteína cristal ao inseto alvo (BRAVO et al. 1992; HOFMANN et al. 1988; VAN RIE et al. 1989).

O desenvolvimento de resistência ao *B. sphaericus* foi registrado pela primeira vez em 1994, simultaneamente na França, Índia e Brasil, quando populações de mosquitos foram intensivamente expostos ao Bacilo (SINEGRE et al. 1994; RAO et al. 1995). GEORGHIOU et al (1990b); RODCHAROEN e MULLA (1994) ressaltaram a resistência de populações de laboratório de *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus*.

Corroborando com SINEGRE et al. (1994); RAO et al. (1995); estudo desenvolvido por SILVA-FILHA et al. (1995), em Coque, área urbana de Recife, apresentou uma suscetibilidade 10 vezes menor ao *Bacillus sphaericus* comparado à população de laboratório, caracterizando com isto, uma razão de resistência (RR) igual a 10.

Estudo com colônias resistentes de *Cx. quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* tem apontado dois mecanismos de resistência ao entomopatogênico. O primeiro estaria relacionado a um gene recessivo ligado ao sexo e o segundo mecanismo ainda permanece desconhecido (NILSE-LEROUX et al. 1995). Em decorrência da resistência estar associada ao gene recessivo ligado ao sexo há implicações na suscetibilidade das populações de insetos alvo, e na reversabilidade dessa resistência, uma vez que, fisiologicamente as interações da ligação da toxina ao receptor específico do intestino torna-se alterado.

Em trabalho realizado por REGIS e NILSEN-LEROUX (2000) verificou que o cruzamento de indivíduos homozigoto recessivo (rr) com indivíduos homozigoto suscetíveis (SS) de uma população F1 não apresentou diferenças significativa na suscetibilidade de indivíduos homozigoto suscetíveis. Deste modo, em condições de campo, a migração de homozigoto sucestíveis de *Culex* em área tratada com *B. sphaericus* restauraria a suscetibilidade em 100% da progênie através do cruzamento com homozigotos resistentes (cruzamento rr com SS), e 75% da progênie através do cruzamento com indivíduos heterozigotos. Porém conforme o mesmo autor, isto não significa que mosquitos de áreas tratadas com *Bs* se tornariam rapidamente suscetíveis, mas a migração de adultos suscetíveis de áreas não tratadas diluiria a freqüência de alelos resistentes naquela população e influenciaria a estabilidade e o nível de resistência.

Neste contexto, observam-se indiscutivelmente dois aspectos importantes: a) a relação gênica no processo de resistência de populações de *Culex*, apresentando

como conseqüência fisiológica uma mudança na interação da toxina ao receptor das células do intestino; b) estratégias que visem reduzir ou impedir o desenvolvimento de resistência ao *Bacillus sphaericus*.

Apesar de estudos apontarem o desenvolvimento de resistência das estirpes 2362, 159M e C3-41 ao *B. sphaericus* em população de campo do complexo *Culex pipens* (RAO et al. 1995; SINÈGRE et al. 1994; SILVA-FILHA et al. 1995; YUAN et al. 2000; MULLA et al. 2003), de acordo a REGIS e NILSEN-LEROUX (2000) ressalta que uma estratégia de manejo da resistência deve ser o primeiro passo antes do uso do *B. sphaericus* em um programa de controle. Os mesmos autores enfatizam que tais estratégias deveriam ser baseadas em:

1. Monitoramento da suscetibilidade das populações de mosquitos antes e durante o tratamento com o entomopatogênico através da comparação com colônias de laboratório, ou com populações de área não tratada;

2. Promover a descontinuilidade da pressão seletiva usando outro ou vários agentes de controle.

Dentro dessa perspectiva, MULLA et al. (2003); YUAN et al. (2000) salientam que o controle de mosquitos resistentes ao *B. sphaericus* pode ser realizado através da rotação do *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (B.t.i) ou uma mistura de B.t.i e Bs, propiciando o retardamento ou prevenindo o surgimento de resistência.

Estudos da redução de resistência adquirida ao *B. sphaericus* mostrou um rápido declínio na seleção de resistência usando uma mistura de Bti e Bs (ZAHIRI et al. 2004).

Recentemente, novos produtos parecem apresentar novas perspectivas de sucesso no combate ao *Culex*, principalmente em populações resistentes ao *Bacillus sphaericus*. As toxinas do B.t.i são os maiores candidatos devido ao número de toxinas presentes na bactéria como também pela ausência de resistência cruzada ao *Bacillus sphaericus* (PONCET et al. 1997). O *Bacillus thuringiesis var. israelensis* produz quatro grandes endotoxinas, Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1Aa, pertencendo no mínimo a duas classes de toxinas não similares que presumivelmente ligam-se a mais de um tipo de receptor (DELÉCLUSE et al. 2000).

Linhagens do *B. sphaericus* como a 2297 tem sido testado como um recombinante em que genes que codificam as toxinas *Cry* do *B.t.i* têm sido introduzidos no cromossomo do *B. sphaericus* através de recombinação homologa (PONCET et al. 1997).

WIRTH et al. (2000b) demonstrou que larvas de *Culex quinquefasciatus* com alto nível de resistência ao *B. sphaericus* se tornaram suscetíveis contra o B.s após uma recombinação do *B. sphaericus* com a toxina citolítica (Cyt1A) do B.t.i.

Corroborando com WIRTH et al. (2000b), ZAHIRI et al. (2004), verificaram em laboratório que a utilização de um entomopatogênico recombinante de *Bacillus*

sphaericus e *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (produzindo toxinas de ambos entomopatogênicos), denominado de UCR foi igualmente eficaz ao B.t.i contra população suscetível e resistente de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, entretanto, a mesma população resistente de *Culex* e *Aedes* se mostraram refratária ao *Bacillus sphaericus* isoladamente.

De acordo a WIRTH et al. (2000a, c) misturas de *B.sphaericus* e *B. thuringiensis israelensis*, particularmente aquelas que incluem a toxinas Cyt1Aa e Cry foram mais efetivas contra espécies de mosquitos menos suscetíveis como o *Ae. aegypti* e contra populações resistentes de *Culex quinquefasciatus*. Esta atividade adicional parece ser atribuída ao sinergismo da toxina Cyt1Aa com o *B. sphaericus* e o sinergismo envolvendo a toxina *Cry*.

Além da redução de resistência ao *Bacillus sphaericus*, a utilização de entomopatogênicos recombinantes acrescenta mais um importante papel no controle de vetores conforme estudo realizado por WIRTH et al. (2000b; 2005), que seria o aumento do numero de espécies alvo suscetíveis ao *B. sphaericus* combinado ao CytIA quando comparado ao *B. sphaericus* somente.

Portanto, resultados desses estudos indicam que essas estratégias podem providenciar uma solução pratica à resistência ao *Bacillus sphaericus* em populações de mosquitos.

5.5. Mecanismos de detecção de resistência

Um efetivo manejo dos inseticidas depende da detecção precoce da resistência e da rápida assimilação desta informação, que poderá acarretar em mudanças nas ações de controle. Portanto, o monitoramento da resistência a inseticidas requer técnicas eficientes e sensíveis, para que a detecção seja feita nos estágios iniciais do seu desenvolvimento (BRACCO 1998).

Normalmente comparando a suscetibilidade a um produto em populações de campo com a resposta de uma população suscetível de referência ao mesmo produto pode fornecer um indicativo mais preciso de desenvolvimento de resistência de um inseticida sobre uma determinada população de campo (HEMINGWAY et al. 1993).

Uma variação nos testes de resistência é a utilização de doses discriminatórias ou doses diagnósticas (ROUSH e MILLER 1986). O termo dose discriminatória é comumente usado quando suficientes evidências genéticas e toxicológicas acumuladas mostram que a dose causa uma diferença na resposta entre os genótipos. Dose diagnóstica (DD) é um termo menos rigoroso e é usado quando se quer monitorar a resistência, porém é menos provável que essa dose separe os genótipos (HALLIDAY e BURNHAM 1990). Se a dose ou o tempo de exposição que irá matar todos os indivíduos suscetíveis e nenhum dos resistentes, puder ser estabelecida ou puder pelo menos aproximar a dessa situação, a dose discriminatória poderá ser

usada para determinar a proporção da população pertencente a cada genótipo. Essa técnica é também usada de forma que os genótipos possam ser separados por uma ou mais doses discriminatórias (ROUSH e MILLER 1986).

Programas de monitoramento da resistência geralmente envolvem comparações de DL_{50}, DL_{99} e coeficientes angulares da equação de regressão obtida através da análise de Probit entre populações de campo e linhagem suscetível de referência. Essa técnica pode ser útil para verificar uma resistência que tenha atingido altos níveis, mas se torna ineficiente para a detecção do desenvolvimento inicial da resistência, quando a sua freqüência é ainda baixa (ROUSH e MILLER 1986).

A utilização da análise de Probit serve como ferramenta para analisar os resultados de uma série de concentrações e assim estimar a concentração que mata 50% da população (CL_{50}) e o coeficiente angular da curva concentração-mortalidade. Os valores elevados da CL_{50} geralmente indicam reduzida suscetibilidade, ou seja, elevada resistência. O coeficiente angular da curva concentração-mortalidade é inversa ao desvio padrão da distribuição fenotípica da tolerância a um inseticida. Dessa forma, maiores coeficientes angulares indicam menor variação fenotípica na resposta da população ao inseticida (CHILCUTT e TABASHNIK 1995).

Segundo FFRENCH-CONSTANT e ROUSH (1990), bioensaios baseados em concentrações discriminatórias ou diagnósticas são mais eficientes do que os valores

de dose letal (DL_{50}) para detectar baixas freqüências da resistência podendo detectar o problema ainda no inicio da evolução da resistência. Porém, bioensaios de concentração diagnóstica baseada na CL_{99} da linhagem suscetível não proporciona informações a respeito da magnitude da resistência.

A razão de resistência (RR), é uma medida para avaliar a intensidade da resistência (tamanho da resistência em uma determinada população) através do quociente da CL_{50} da população em estudo pela CL_{50} da linhagem suscetível conforme a fórmula que se segue abaixo.

Apesar da razão de resistência seja um importante indicador da resistência em uma determinada população, vale ressaltar que uma questão de grande significado prático é definir a partir da qual (valor) resistência poderá afetar o desempenho de um determinado produto em campo. Uma RR de 1,0 indica que a população testada responde da mesma forma que a população suscetível ao produto químico (COCHRAN 1995).

$$RR = \frac{\textbf{CL}_{50}\ \textbf{da população em estudo}}{\textbf{CL}_{50}\ \textbf{da população suscetível}}$$

Além desses métodos, utilizam-se também técnicas bioquímicas para determinar se indivíduos de uma população apresentam ou não um aumento de atividade enzimática e/ou uma diminuição na sensibilidade a um determinado inseticida. Essa técnica permite detectar a resistência ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento (portanto em uma freqüência populacional muito baixa para serem detectadas pelas provas de suscetibilidade) (PASTEUR e GEORGHIOU 1981; HEMINGWAY e GERGHIOU 1984; HEMINGWAY et al. 1985; 1992; HERALTH et al. 1987; AMIN e HEMINGWAY 1989; PEIRIS e HEMINGWAY 1993; RODRIGUES et al. 1993).

Ambos os métodos de verificar o problema de resistência são complementares. Enquanto os testes de dosagem-suscetibilidade detectam a resposta ao emprego de inseticidas quando a resistência já está instalada em grande parcela da população. Os testes bioquímicos podem avaliar a freqüência gênica de um alelo quando ele ainda em valores muito baixos, além de fornecer informações sobre a genética e a evolução nas diversas populações (BRACCO 1998).

5.6. Fatores limitantes da efetividade dos entomopatogênicos

Fatores como condições climáticas (luz solar, temperatura), condições químicas e físicas (matéria em suspensão) podem afetar diretamente a efetividade e a toxicidade desses bioinseticidas (BURGES e HUSSEY 1971; CONSOLI et al. 1995).

Durante o período de aplicação, a bactéria é exposta a todo tipo de elemento físico. Durante esse período, a luz solar parece ser o maior fator deletério da efetividade dos entomopatogênicos (BURGES e HUSSEL 1971). Para *B. thuringiensis*, CANTWELL e FRANKLIN (1966) verificaram que os esporos expostos à radiação ultravioleta foram rapidamente inativado em condições de laboratório (1 min – 12%; 2 min-50%; 10 min-99,9%), e quando expostos à radiação natural (30 min – 50%; 60 min-80%). de BARJAC (1989); IGNOFFO et al. (1981); LACEY et al. (1984); PRIEST (1992); BECKER et al. (1992), observaram que a atividade do *Bti* teve uma redução de 2.5 a 4.0 vezes após 7 horas de exposição á luz solar testado contra *Cx. pipens* e *Ae. aegypti*.

Teste realizado no Brasil com a estirpe 2362 também mostrou uma progressiva redução na atividade contra *Cx. quinquefasciatus* quando diretamente exposto a 1, 2, 4,6 e 8 horas de luz solar (CARVALHO-PINTO e CONSOLI 1994a).

Além das condições citadas a cima, a temperatura é outro fator importante que age não somente nos esporos do Bs e do *Bti,* mas também no inseto e em seu desenvolvimento.Trabalho realizado por IGNOFFO (1964) mostrou que esporos de *Bacillus thuringiensis* em suspensão em água a 10°C, apresentou uma inicial redução da sua viabilidade após 30 dias de exposição. A 30°C a viabilidade dos esporos foi reduzida e a 50°C completamente destruída.

CARVALHO – PINTO e CONSOLI (1994a) testaram a estirpe 2362 de *B. sphaericus* contra *C. quinquefasciatus* na temperatura de 15°C, 20°C e 25°C e

observaram uma redução da Concentração Letal (LC_{50}) com o aumento da temperatura.

Segundo RUAS-NETO et al. (1994), fatores adicionais como interação populacional e profundidade dos criadouros podem estender o efeito residual dos larvicidas biológicos, uma vez que, segundo o mesmo autor, corpos d'agua mais profundo parece favorecer a persistência dos larvicidas biológicos no ambiente. Em contraste, criadouros mais superficiais ou onde a água está em movimento (lótico) provavelmente reduzem o efeito residual.

Conforme POLANCZYK et al. (2003), apesar dos avanços nessa área de controle, ainda há muitos impedimentos quanto ao uso desses métodos em larga escala, considerando custos e baixo efeito residual devido principalmente à exposição direta à luz solar (inativação da toxina pela radiação ultravioleta). Além disso, de acordo com VILARINHOS et al. (1998) uma grande quantidade de partículas sólidas e coliformes fecais compete com os cristais do *Bacillus thuringiensis israelensis*, reduzindo as taxas relativas de ingestão da toxina.

Face as referidas interações patógeno/fatores limitantes, o trabalho realizado por ALVES et al. (2001) figura indiscutivelmente em um importante relato sobre essas interações. No presente trabalho, ALVES et al. (2001) objetivou avaliar o efeito da formulação granulada de *Bacillus sphaericus* armazenada em temperatura ambiente e a 50°C na manutenção dos esporos e cristais do entomopatógeno. Relativo ao armazenamento, o referido trabalho apresentou redução de 65% no

produto formulado, enquanto que para o produto não formulado a redução foi de 93%. A manutenção da viabilidade de esporos de bactérias do gênero *Bacillus sp.* foi discutida também por COUCH e IGNOFFO (1981) e, segundo os autores, a baixa umidade é essencial para a preservação do patógeno, pois esta pode, quando elevada, favorecer à germinação dos esporos ou ainda permitir o crescimento de microorganismos contaminantes que contribuem para a redução do número de UFC viáveis no produto. Como foi referido anteriormente, a exposição do entomopatógeno a temperaturas mais elevadas pode levar a ocorrência de distúrbios fisiológicos do patógeno, com reflexo na redução da sua viabilidade, tal como foi constatada por ALVES et al. (2001), na qual, houve redução da viabilidade do *Bacillus sphaericus* tanto do produto formulado quanto o não formulado.

5.7. Inseticidas alternativos

Embora os inseticidas químicos sejam atualmente usados com relativo sucesso na agricultura e na saúde pública, os graves problemas relacionados ao seu uso, já amplamente conhecidos, têm incentivado o desenvolvimento de métodos alternativos de controle (LOVATTO et al. 2004).

A busca por novos inseticidas constitui-se num campo de investigação amplo. A grande variedade de substâncias presentes na flora continua sendo um enorme atrativo na área de controle de insetos, principalmente levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela de plantas foi investigada com tal finalidade (VIEIRA e FERNADEZ, 1999). Segundo BALADRIN et al. (1985), muitas plantas

acumulam substâncias orgânicas que podem ser extraídas em quantidade suficiente para serem economicamente utilizadas para as mais variadas aplicações científicas, tecnológicas e comerciais.

Na década de 50, MARANHÃO (1954) relacionou cerca de 2.000 plantas inseticidas (distribuídas em 170 famílias) com atividade tóxica para diversos insetos. De acordo com esse autor, os inseticidas comerciais de origem vegetal eram obtidos, principalmente de cinco famílias botânicas: *Solanaceae*, *Compositae*, *Leguminosae*, *Chenopodiaceae* e *Liliaceae*, das quais eram extraídos respectivamente, a nicotina, piretro, timbó, heléboro e anabasina. GRAINGE e AHMED (1988) catalogaram 2.400 espécies de plantas com propriedades úteis no controle de insetos, além de listarem cerca de 800 pragas controladas por essas plantas e, ainda, 100 plantas com outras substâncias químicas reportadas no controle de doenças e nematóides parasitas do homem e de animais.

Atualmente, vem crescendo o interesse por substâncias com propriedades decorrentes de origem vegetal para os insetos, como por exemplo, a ajugarina, a azadiractina e a imperatonina, sendo esses produtos considerados de baixo impacto para o meio ambiente (SAITO e LUCHINI 1998), de baixa nocividade ou toxicidade (SANTOS et al. 1998), e de fácil decomposição (SAITO e LUCHINI 1998).

Para o uso de princípios ativos botânicos, vários aspectos dever ser levados em consideração: extração, conservação dos extratos, dosagem eficaz, estabilidade, toxicidade e custo. Todos estes aspectos são compreendidos quando identificadas as

principais substâncias contidas no extrato. Várias são as estratégias capazes de determinar a atividade de produtos de origem natural. De uma maneira geral, inicia-se com os extratos brutos de plantas preparados com diversos solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água). Em seguida os extratos ativos são fracionados através de métodos cromatográficos existentes e as frações obtidas são retestadas, repetindo-se o processo até a obtenção do(s) princípio(s) ativo(s) (BEGNINI 2001).

Os químicos extraídos das plantas são classificados normalmente em metabólitos primários e secundários. Proteínas e ácidos nucléicos são geralmente excluídos dessa classificação. Metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo de uma forma ou de outra em praticamente todos os organismos. Nas plantas superiores os metabólitos primários se concentram freqüentemente em sementes e órgãos de armazenamento e são necessárias para o desenvolvimento fisiológico, já que possuem papel importante no metabolismo celular básico. Essas substâncias são usadas principalmente como matéria-prima industrial, alimento ou aditivo alimentar e inclui produtos tais como óleos vegetais, ácidos graxos (usados para fazer sabão e detergente) e carboidratos (amido, pectina e celulose). Normalmente os metabólitos primários são pouco valorizados no mercado, mas existem exceções como o B-caroteno, que é um produto caro em função da dificuldade de extração, isolamento e purificação (BALANDRIN et al. 1985).

Já os metabólitos secundários são compostos derivados bio-sinteticamente dos metabólitos primários, mas têm distribuição limitada a determinados grupos

taxonômicos do Reino Vegetal. Eles não têm função aparente no metabolismo primário da planta, mas freqüentemente tem um papel ecológico: atrativos a polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou servem como defensores químicos contra microorganismos, insetos e predadores superiores e até mesmo contra outras plantas (aleloquímicos). Os metabólitos secundários são freqüentemente armazenados pela plantas em quantidade menores que os metabólitos primários, além de tenderem a ser sintetizados em células especializadas e em estágios de desenvolvimento distintos, o que muitas vezes dificulta sua extração e purificação. Assim, muitos metabólitos secundários podem ser considerados como materiais especiais ou químicos refinados e são mais valorizados no mercado. Eles são usados comercialmente como compostos ativos biologicamente: farmacêuticos, conferindo sabor ou aroma e pesticidas. Esses produtos naturais secundários freqüentemente têm estruturas altamente complexas, que determinam sua atividade biológica e não pode ser economicamente sintetizados. Um bom exemplo desta situação é a azadirachtina extraída da planta conhecida como Neem (Meliácea), que possui estrutura bastante complexa e é utilizada como inseticida. Uma vantagem econômica, é que, tanto os metabólitos primários quanto os secundários podem ser obtidos através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (BALANDRIN et al. 1985).

Nesse contexto, segundo VENDRAMIM (1997), destacam-se entre as plantas com propriedades inseticidas aquelas pertencentes à família *Meliaceae*, incluindo-se, *Azadirachta indica* A.jus., comumente conhecida por nim, e *Melia azedarach* L.,

conhecida por cinamomo ou santa-bárbara, na qual, apresentam diferentes modos de ação em relação a muitas espécies de insetos (RODRIGUEZ 1995).

Originária das regiões áridas da Índia a *Azadirachta indica* é utilizada numa prática de subsistência. Nessa perspectiva, as folhas de nim são misturadas com grãos armazenados ou seus frutos são esmagados nas paredes dos armazéns para evitar danos provocados por insetos. Possui alta capacidade como inseticida e é capaz de exercer diversos modos de ação sobre os insetos, tais como: inibição alimentar, inibição da síntese de ecdisona, inibição da biosintese de quitina, deformações em pupas e adultos, redução da fecundidade e longevidade de adultos, alteração na capacidade de atração dos ferormônios, esterilização e inibição de ovoposição, diminuição da transmissão de vírus e mortalidade (KOUL et al. 1990; MORDUE e BACKELL 1993; SCHMUTTERER 1988; RODRIGUEZ 1995).

O trabalho pioneiro de Butterworth e Morgan, em 1968 (BUTTERWORTH e MORGAN 1968), foi motivado por relatos de que o meliantriol, inibidor alimentar que em concentrações extremamente baixas tem o efeito de paralisar a alimentação dos insetos. A salanina foi o terceiro terpenoide a ser isolado do Nim. Estudos indicaram que a salanina é também extremamente poderosa na sua ação anti-alimentar porem não interfere na metamorfose.

Isolado das frutas frescas de *M. azedarach* eram fagoinibidores de gafanhotos do deserto (LAVIE et al. 1967). A substância inibidora, denominada de azadiractina,

não se relacionava ao meliantriol e era dotada de notável atividade fago-repelente. Sua estrutura foi proposta mais adiante por ZANNO et al. (1975) e finalmente corrigida por KRAUS et al. (1985).

A azadiractina isolada por Butterworth e Morgan (1968), e um grupo de outros limonóides estão intimamente associados à ação supressora de apetite ou inibidora de crescimento em insetos e têm sido extensamente estudados, com o objetivo de se conhecer a química, biossíntese, toxicologia e o potencial inseticida deste grupo de compostos naturais (CHAMPAGNE et al. 1992; de PAULA et al. 1997; da SILVA et al. 1999; MAIA et al. 2000). Alguns estudos tentando estabelecer a relação estrutura-atividade permitiram concluir que limonóides com o anel C-*seco* são os mais ativos, e uma das ações mais relevantes relatadas para plantas da família *Meliaceae* é a supressora de apetite (CHAMPAGNE et al. 1992).

Além da atividade fagoinibidora já citada, a azadiractina atua interferindo no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento na fase larval. A azadiractina é estruturalmente similar ao hormônio chamado "ecdysona" que controla o processo de metamorfose das diversas fases da vida do inseto (larva, pupa e inseto adulto). O efeito inibidor de crescimento ocorre em doses de microgramas e é devido à interferência na regulação neuroendócrina de hormônios nas larvas, atuando principalmente sobre os túbulos de Malpigue e no *corpus cardiacum* do inseto. Nos *corpus cardiacum*, as azadiractinas reduzem o "turn-over" do material neurosecretório, fazendo com que os níveis de

reduzem o "turn-over" do material neurosecretório, fazendo com que os níveis de hormônios morfogenéticos dos insetos jovens e larvas sejam modificados e concomitantemente decresçam após a ingestão de azadiractina. Desta forma, a metamorfose dos insetos jovens é inibida assim como a reprodução dos adultos, sendo também conhecidos distúrbios ou inibição no desenvolvimento dos ovos (GODFREY 1994).

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos para elucidar as modificações no mecanismo de controle endócrino induzidas pela azadiractina, que provocam os efeitos observados na inibição de crescimento. Estes estudos permitiram identificar modificações nos níveis de hormônios morfogenéticos como a ecdisona. Foi identificada uma acentuada similaridade estrutural entre a ecdisona e a azadiractina, entretanto não está claro se os efeitos sobre estas taxas hormonais são diretos ou indiretos. Algumas evidências indicam que a azadiractina pode bloquear a liberação de várias substâncias localizadas no sistema nervoso central, assim como a formação de quitina, um polissacarídeo que forma o exoesqueleto de insetos, além de impedir a comunicação sexual, causa esterilidade e diminui a mobilidade (REMBOLD 1989; STONE 1992). Outro fator a favor da azadiractina é que, apesar de ser ativa frente a um enorme espectro de insetos, praticamente não afeta os predadores naturais dos mesmos (STONE 1992).

Desta forma, segundo National Research Council, demonstram que o mecanismo de ação da azadirachtina pode ser conforme abaixo relacionados:

1 – Efeito Anti-alimentar via oral;

a) Principal: inibe a atividade dos receptores de sensibilidade gustativa da cavidade oral, modificando a ingestão normal de alimentos e a capacidade alimentar prospectiva dos insetos;

b) A ingestão de princípios ativos junto com o alimento conduz a inanição e morte;

2 – Ação dermal: penetra através da cutícula dos insetos e inibe a síntese de quitina, provocando assim, desidratação e morte;

3 - Efeito repelente: Devido a mudanças no comportamento locomotor e estacionário dos insetos, em alguns casos o acasalamento, assim como a comunicação sexual é afetada;

4 – Efeito destruidor do crescimento: inibindo o crescimento normal do inseto interferindo nos ciclos de mudança. Suprime a atividade da ecdisona e a larva não efetua a mudança de fase, mas fica na fase jovem para sempre até que eventualmente morre;

5 – Efeito na sobrevivência e reprodução pela ação inibidora da ovoposição. Quando a fêmea atinge o período de postura, a ovoposição é suprimida ou inibida;

6 – Efeito no sistema endócrino: os extratos de Nim são acumulados no sistema neurosecretário do inseto, e por cruzarem a barreira cerebral, são concentrados no corpus *cardiacus*, resultando em uma menor utilização das proteínas neuro-secretórias.

Além das referidas espécies vegetais, CHAHAD e BOFF (1994) obtiveram resultados promissores na utilização de extratos de *Piper nigrum* (Pimenta-do-reino) sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus*.

Corroborando com CHAHAD e BOFF (1994), trabalho realizado por PIZARRO et al. (1999) com *Agave sisalana* apresentou atividade larvicida contra larvas de *Cx. quinquefasciatus*, e os mesmos autores reforçam que além de controlar a referida espécie vetora, este larvicida poderia contribuir para a melhoria sócio-econômica de populações carentes e de baixa renda, através do desenvolvimento de uma industria de subsistência, na qual toneladas de resíduos (sisal) são desperdiçados anualmente. Este resíduo obtido a custo zero, poderia ser aproveitado como matéria prima na produção deste larvicida.

Desta forma, a utilização de extratos vegetais como inseticidas não somente poderia contribuir no controle de insetos vetores, mas também poderia auxiliar na subsistência de populações carentes.

6. CONCLUSÃO

Os inseticidas químicos são ainda largamente utilizados no controle do *Culex quinquefasciatus*, destacando-se como os mais eficazes os Piretróides, entretanto, vale ressaltar a necessidade de um bom planejamento na utilização desses inseticidas, visando reduzir o processo de resistência.

Neste contexto, a utilização do *Bacillus sphaericus* tem apresentado resultados mais promissores no controle do *Cx. quinquefasciatus* devido a sua estabilidade em águas poluídas.

Face a utilização em massa dos inseticidas químicos e a progressiva aplicação de *Bacillus sphaericus* no controle da referida espécie, estes necessitam concomitantemente de maiores aplicações, assim, promovendo o surgimento de resistência. Neste contexto, o uso de princípios ativos provenientes de espécies vegetais como a *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* tem sido apontados como promissores inseticidas alternativos, visto que estas espécies não apresentam até o momento nenhum relato de resistência, ou mesmo implicações bioecológicas em outras espécies de insetos.

Devido a alta valência ecológica do *Cx. quinquefasciatus*, uma vez que a referida espécie possui grande capacidade de colonizar tanto criadouros eutrofizados como também criadouros com baixo grau de poluição, produtos com maior

estabilidade e efeito residual, tais como o *Bacillus sphaericus* e/ou seus recombinantes apresentam melhores resultados.

7. RECOMENDAÇÕES

Mesmo com o desenvolvimento de novos produtos de controle do *Culex quinquefasciatus*, seja reduzindo o aparecimento de resistência e/ou mesmo aumentando o espectro de ação dos mesmos, indubitavelmente, o método de controle não deve ficar restrito ao controle químico e/ou biológico, uma vez que, as interações ecológicas entre a espécie em questão e seu habitat reveste-se de relações muito mais complexas.

Em vista disso, este trabalho procura contribuir para que ações como a retirada constante da vegetação aquática que muitas vezes estão associadas ao processo de eutrofização e assim concomitantemente servido de proteção às larvas de *Culex quinquefasciatus*, possa reduzir consideravelmente o desenvolvimento de populações dessa espécie e assim, minimizando a necessidade de aplicações cada vez maior de larvicidas e adulticidas.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o tratamento dos efluentes, uma vez que, interromperia todo o processo de eutrofização e assim, contribuindo para a redução de populações dessa espécie em criadouros com alto teor de poluição, concomitantemente com o desenvolvimento de macrófitas (servindo de abrigo às larvas) e gramíneas (proteção aos adultos).

Neste contexto, essas medidas físicas de controle devem ser trabalhadas simultaneamente a aplicação dos produtos de controle, uma vez que ampliaria os

mecanismos de ação no controle de uma população adaptada ás condições precárias de saneamento básico, como é o caso do *Culex quinquefasciatus*..

8. REFERÊNCIAS

A carta da Terra. **Gráfica Editora Stamppa Ltda**. Petrópolis, Rio de Janeiro, 2004; 42p.

Addor RW. **Em Agrochemical from Natrual Products**. Goldfrey, C.R.A. ed.: Marcel Dekker Inc: New York, 1994.

Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, Washington.1995;177:6027-6032.

Aguilera L, Marquetti MC, Navarro A. Actividad biológica del diflubenzuron sobre *Blattella germânica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Revista Cubana de Medicina Tropical**.2001;53(1):48-52.

Alves LFA, Alves SB, Lopes RB, Augusto NT. Estabilidade de uma formulação de *Bacillus sphaericus* armazenada sob diferentes temperaturas. **Sci. Agric.** Piracicaba, janeiro – março.2001;58(1):1-12.

Amin AM, Peiris HT. Detection and selection of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. **Med. Vet. Entomol.** 1980;4(3):269-273.

Amin AM, Hemingway J. Preliminary investigation of the mecanisms of DDT and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae) from Saudi Arabia. **Bull. Entomol. Res.**1989;79:361-366.

Baladrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. **Science**. 1985; 228:1154-60.

Balarman K, Gunasekaran K, Pillai PKG, Manonmani AM. Field trial with different formulations of *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Indian Journal of Medical Research,** 1987;85:620-625.

Baumann P. Baumann L. Bowditch RD. Bradwell AH. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362; evidence for a family of related sequences. **J. Bacteriol.**1987;169:4061-4067.

Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* treatments. **J. Am. Mosquito Control Assoc.** 1992;8:285-289.

Begnini ML. **Potencial do uso, produção de extratos de plantas brasileiras e desenvolvimento de produtos para o controle de pragas e ectoparasitos em animais e seres humanos: plantas inseticidas.** In: Practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control.2001, Uberaba. Procedding of the 2° workshop Neem & pheromones, Universidade de Uberaba, Uberaba: Reginerio S. de Farias e H. Klebeergs. EDS.2001:59-61p.

Bennett GW, Reid BL. **Insect growth regulators.** In: Rust MK; Owens JM. Reierson DA.[ed]. Undesterstanding and controlling the German cockroach. New York: Oxford University Press. 1995;11:267-286.

Bergé J, Feyerensen R, Amichot M. Cytochrome P450 monoxygenases and insecticide resistence in insects. **Physiol. Trans. Royal. Soc.**1998;353:1701-1705.

Bloomquist JR. Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. **Comp. Biochem. Physiol.**1993;106(2):301-14.

Bloomquist JR. Ion channels as targets of inseticides. **Ann. Ver. Entomol.**1996;41:163-90.

Borges FG. Valorização econômica do meio ambiente: o caso da B. Guarapiranga – SP.In:Veiga JE da, organizador. **Ciência ambiental primeiros mestrados 1998.** São Paulo:Annablume/FAPESP; 1998.p234.

Bracco JE. **Avaliação da resistência a inseticida em população de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) do rio Pinheiros (São Paulo, Brasil).** [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP]1998.

Braga IA. **Monitoramento da resistência de populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil a inseticidas e avaliação do potencial de utilização de methoprene, um regulador de crescimento de insetos, em seu controle.**[Dissertação de Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz]2004.

Bravo A, Koen H, Jansens S, Peferoen M. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. **J. Invertebr. Pathol.** 1992;60:247-253.

Broadwell AH, Baumann L, Baumann P. Larvicidal properties of the 42 and 51 kilodalton *Bacillus sphaericus* proteins expressed in different bacterial hosts: evidence for a binary toxin. **Curr. Microbiol.**1990;21:361-366.

Brogdon WG, McAllister JC. Inseticide resistence and vector control. **Emerging Infectious Diseases.**1998;4(4):605-613.

Brown AWA. Insectiside Resistance in mosquitoes. A pragmatic review. **J. Am. mosq. Control Assoc.**1986;2:123-140.

Burges HD, Russey NW. **Microbial control of insects and mites.** Academic Press Inc. London – 2ª ed. 1973.

Butterworth J. H, Morgan ED. **Chem. Commun.** 1968:23.

Cantwell GE, Franklin BA. **J. Invertebrate Path.**1966;8:256-258.

Carvalho-Pinto CJ, Consoli RAGB. **Eficácia de *Bacillus sphaericus* 2362 frente a alguns fatores ambientais.** IV Simpósio de Controle Biológico – SICONBIOL – Gramado, RS – Anais,1994a:131p.

Casanova C. **Ecologia populacional das fases imaturas de** *Aedes scapularis* **Rondoni,1848 (Diptera; Culicidae).** [Dissertação de Mestrado-Instituto de Biologia da Unicamp]. Campinas,1994.

Cerf DC, Georghiou GP. Cross resistance to juvenile hormone analogues in insecticide-resistant strains of *Musca domestica* L. **Pestic. Sci.** 1974;5:759-767.

Chahad S, Boff MIC. Efeito de extratos de pimento preta sobre larvas de *Culex(Culex) quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Sociedade Entomológica do Brasil. Anais. Londrina. **Sociedade Entomológica do Brasil.** 1994;23(1):13-18.

Chamberlain WF. Insect growth regulating agents for control of arthropods of medical and veterinary importance. **Journal Medical Entomology**.1975;12:395-400.

Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers HN. **Phytochemistry**.1992; 31: 377.

Chau-Mei HO, Shy-Huey WU, Chin-Chen WU. Evaluation of the control of mosquitoes with insect growth regulators. **Kaohsiung Journal Medical Science.** 1990;6:366-374.

Chen A, Rogan WH. Nonmalarial infant deaths and DDT use for malaria control. **Emerg. Infect. Dis.** 2003;9(8):960-64.

Chilcutt CF, Tabashnik BE, Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line: are they related? **Journal of Economic Entomology.** 1995;88(1):11-20.

Clarck III JL, Rowley WA. Evaluation of granular *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype H14) formulations against mosquito larvae in Central Iowa. **Mosquito News.** 1984;44:502-505.

Cobertt JR, Wright K, Baille AC. The biochemical mode of action of pesticides.2ª.ed. **Academic Press:** New York.1984.

Cochran DG. Insectcide reistance. In: Rust MK; Owens JM; Reierson DA. **Uderstanding and controlling the German cockroach.** Cambridge: Oxford University Press,1995:171-192.

Consoli RAGB, Lourenço-de Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ;1994.

Consoli RAGB, Carvalho-Pinto CJ, Oliveira MA, Santos BS, Lamounier MA, Alves RSA, Silva CMB, Rabinovitch L. Some environmental and biological factors influencing the activity of entomopathogenic Bacillus on mosquito larvae in Brazil. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro.1995;90(1):121-124.

Coosemans M, Mouchet J. Consequences of rural development on vectors and their seu controle. **An. Soc. Belge. Med. Trop.** 1990;70:5-23.

Copping LG, Menn JJ. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science.** 2000;56(5):651-676.

Couch TL, Ignoffo CM. Formulation of insect pathogens. In. Burges HD.[Ed.] Microbial control of pests and plant diseases:1970-1980. **New York: Academic Press.**1981:621-634.

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** September 1998;62(3):807-813.

Cyanamid Química do Brasil – Divisão Defensivos Agrícolas / Centro de Intoxicações da UNICAMP (CCI). **Toxicologia dos agroquímicos: compostos organofosforados.** 1991;40p.

Davidson EW. Binding of *Bacillus sphaericus* toxin to midgut cells of mosquito larvae: relationship to host range. **J. Med. Entomol.**1988;25:151-157.

Davidson EW. Variation in biding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval cells of six species of mosquitoes. **J. Invertebr. Pathol.**1989a; 53:251-259.

da Silva MFGF, Agostinho SMM, de Paula JR, Oiano JN, Castro-Gamboa I, Filho ER, Feranandes JB, Vieira PC. **Pure Appl. Chem.** 1999;71:1083.

de Barjac H. New facts and trenes in bacteriological control of mosquitoes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1989;84(3):101-105.

de Barjac H, Sutherland DJ. eds. Bacterial control of mosquitoes and black flies. **New Brunswick, NJ: Rutgers Univ. Press.**1990.

de Barjac H. Classification of *Bacillus sphaericus* strains and comparative toxicity to mosquito larvae. In: de Barjac H; Sutherland DJ[eds]. **Bacterial control of mosquitoes and black flies. New Brunswick, NJ:Rutgers. Univ. Press.**1990b:228-236.

Delécluse A, Juarez-Pérez, Berry C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: Charles JF; Delécluse A. Nilsen-LeRoux C.[eds]. Entomophatogenic bacteria: from laboratory to field. **Kluwer Academic, Amsterdam, The Netherlands.**2000.

Denholm I, Rolland MW. Tatics for managing pesticides resistence in arthropods: Theory and practice. **Ann. Rev. Entomol.** 1992;37:92-112.

de Paula JR, Vieira IJC, da Silva MFGF, Fo ER, Fernandes JB, Vieira PC, Pinheiro AL, Vilela EF. **Phytochemistry,** 1997;44:1449.

Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP. New Insecticides with Ecdysteroidal and Juvenile Hormone Activity. **Annu. Rev. Entomol.**. 1998; 43:545-569.

Dorta AM, Chiong RT, Ortega AN, Quinones FAG. Estudio de la sensibilidade al Dimilin (Diflubenzuron) en una cepa de *Aedes aegypti* Linnaeus y de *Culex quinquefasciatus* Say criadas en el laboratorio. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. 1989;41:56-63.

Echobichon DJ. Organophosphorus éster inseticides. In. Ecobichon DJ;Joy RM. **Pesticides and neurological.** CRC Press, Florida; 1982:151-203.

Echobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In:Amdur MO; Doull J; Klassen CD. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons.** Pergamon Press, USA.4ª ed; 1991.

Ferrari JA. Insecticide resistence In. The Biology of Desease Vectors, **University Press of Colorado.**1996.

Ferrer A. Pesticide poisoning. **An. Sist. Sanit. Navar**. 2003;26(1):155-71.

Feyereinsen R. Insect cytochrome P450 enzymes. **Annu. Rev. Entomol.**1999; 44: 507-33.

Ffrench-Constant RH, Roush TR. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In. Rouch RT; Tabashnik BE [Ed]. **Pesticide resistance in arthropods.** New York: Chapman and Hall. 1990:4-23.

Ffrench-Constant RH. Pittendrigh B. Vaughan A. Anthony N. Why there so few resistence-associated mutation target genes? **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**1998;353:1685-1693.

FITO-INFO. [Homepage na internet]. Ljubljana,1998.[Acesso em 30 de novembro de 2005].Disponível em: http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/SI/Prirocnik/akt/021.htm

Forattini OP. **Entomologia Médica.** São Paulo:Ed. Universidade de São Paulo.v1.1962.

Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF. Feeding habits, natural infection and distribution of domiciliary triatominae bugs in the central region of Brazil. **Rev. Saúde Pública.** Aug. 1982;16(4):171-204.

Forattini OP. Mosquitos Culicidae como vetores emergentes de infecções.**Rev. Saúde. Pública.**1998;32(6):497-502.

Fournet F, Sannier C, Monteny N. Effect of the insect growth regulators OMS 2017 and Diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association.** 1993;9:426-430.

Fournet F, Sannier C, Moriniere M, Porcheron P, Monteny N. Effects of two insect growth regulators on ecdysteroid production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal Medical Entomology.** 1995;32:58-593.

Fournet F, Sannier C, Monteny N. Effeccts of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). **Journal of the American Mosquito Control Association.**1997;13: 40-42.

Frankie GW, Ehler LE. Ecology of insects in urban environments. **Ann. Rev. Entomol.**1978;23:367-87.

Gallo D, Nakano O, Neto S, Carvalho R, Baptista G, Filho E, Parra J, Zucchi R, Alves S, Vendramin J, Marchini L, Lopes J, Omoto C. Toxicologia de inseticidas. In. **Entomologia Agrícola**, FEALQ, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queirós, Piracicaba, SP, 2002:361-396.

Georghiou GP. Management of resistence in arthropods. In. Georghiou GP, Saito T. **Pest resistence to pesticides.** New York: Plenum. 1983:769-92.

Georghiou GP. Resistence potencial to biopesticides and consideration of countermeasures. In: **Pesticides and Alternatives.** JE Casida ed., 1990b:409-20.

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

Gleave AP, Willians R, Hedges RJ. Screening by Polymerase Chain Reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cryV-like insecticidal protein genes and characterisation of a cryV gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Applied and Environmental Microbiology, Washington.** 1993;59:1683-1687.

Godfrey CRA. **Agrochemical from Natural Products.** Marcel Dekker Inc. New York. 1994.

Gomes AC. The mechanisms and epidemiological significance of domiciliation. **Rev. Saúde Pública.** Oct. 1986;20(5):385-390.

Gomes AC, Forattini OP. Resting places of mosquitoes *Culex (Culex)* in rural zones (Diptera: Culicidae). **Rev. Saúde Pública.** Oct. 1990;24(5):394-397.

González JMJ, Brown BS, Calrton BC. Transfer of *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academic of Science.** 1982;79(10):6951-6955.

Graf JF. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today.** 1993;9:471-474.

Grainge M, Ahmed S. **Handbook of plants with pest-control properties.** John Winley & Sons, Inc.1998:470p.

Guedes RN, Lima JOG, Zanuncio JC. Seletividade dos inseticidas deltametrina, fenvalerato e fenitrotion para *Podisus connexivus*(Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil.** Porto Alegre. 1992;21(3):339-346.

Guedes RNC, Vilela EF. Produtos que agem na fisiologia dos insetos. In. **Novos Produtos para o manejo integrado de pragas.** E. F. Vilela[ed.], Brasília, ABEAS.1991.(módulo 4.70).p.59-70.

Hagstrum DW, Gunstream SE. Salinity, pH, and Organic Nitrogen of water in relation to presence of mosquito larvae. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 1971;64(2):465-7.

Halliday WR, Burnham KP. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insectide resistance. **Journal of Economic Entomology.** 1990;83(4):1151-1159.

Hammann I, Sirrenberg W. Laboratory evaluation of SIR 8514, a new chitin synthesis inhibitor of the benzoylated urea class. **Pflanzenschtz-Nachrichten Bayer.** 1980;33(1):1-34.

Hansen BM, Salamitou S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: Charles JF; Delécluse A; Nilsen-LeRoux C[ed]. Entomopathogenic bactéria: from laboratory to field aplication. **Netherlands: Kluwer Academic Publishers.**2000;41-64.

Hemingway J, Georghiou GP. Baseline esterase levels for *Anopheline* and *Culicine* mosquitos. **Mosquito News.**1984;44(1):33-35.

Hemingway J, Malcolm CA, Kisson KE, Boddington RG, Curtis CE, Hill N. The biochemistry of insecticide resistance in *Anopheles sacharovi*: comparative estudies with a range of insecticide susceptible and resistant Anopheles and *Culex* species. **Pest. Biochem. Physiol.**1985;24:68-76.

Hemingway J, Myamoto J, Herath PRJ. A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: Supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. **Pest. Biochem. Physiol.** 1990;39:49-56.

Hemingway J, Small GJ, Monro A, Sawyer BV, Kasap H. Insecticide resistance gene frequencies in *Anopheles sacharovi* populations of the *Cukurova olani*, Adana province, Turkey. **Med. Vet. Entomol.**1992;6:342-348.

Hemingway J, Dunbar SJ, Monro AG, Small GJ. Pyrothroid resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattelidae): resistance levels and underluing mechanisms. **Journal of Economic Entomology.**1993;86(6):1631-1638.

Hemingway J, Karunaratne SH. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular bilogy and and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med. Vet. Entomol.**1998;12(1):1-12.

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol.**2000;45:371-391.

Heralth PRJ, Hemingway J, Weerasinghe IS, Jayawardena KGI. The detection and characterization of malathion resistance in field populations of *Anopheles culicifacies* B in Sri Lanka. **Pest. Biochem. Physiol.**1987;29:157-162.

Hofmann C, Lüthy P, Hütter R, Pliska V. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (Pieris brassicae). **Eur. J. Biochem.**1988;173:85-91.

Höfte H, Whiteley HR. Inseticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**. Washington.1989; 3:242-255.

Hollingworth RM. The biochemical and physiological basis of selective toxicity. In: Wilkinson CF.(Ed). **Insecticide biochemistry and physiology**. New York: Plenum, 1976:431-506.

Hoy MA. Pesticide resistence in arthropod natural enemies: variability and selection responses. In: Roush RT; Tabashnik E.(Eds). **Pesticide resistence in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990:203 -236.

Ignoffo CM. **Mem.. Hors. Sér. Entomophaga**. 1964;2:293-298.

Ignoffo CM, Garcia C, Kroha MJ, Fukuda T, Couch TL. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* for use against mosquitoes. **Mosquito News**. 1981;41:86-93.

Institute of Cell and Molecular Biology. [Homepage na internet]. Edinburg, 2003. [Acesso em 23 de agosto de 2005]. Disponível em: http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm

Instituto Sperimental Per La Patologia Vegetale. [Homepage na internet]. Roma, 2006.[Acesso em 30 de novembro de 2005].Disponível em: http://www.ispave.it/fpdb/bancadatibiologica/dettaglio.asp?principio=21

Karch S, Charles JF. Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore/crystal complex used in the field. **Ann. Institut. Pasteur. Microbiol.** 1987;7:176-179.

Karch S, Charles JF. Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore crystal complex used in field. **Annals of Institute Pasteur / Microbiolgy**, 1987;138:485-492.

Kellen WR, Clarck TB, Lindegren JE, Ho BC, Rogoff MH, Singer S. *Bacillus sphaericus* Neide as pathogen of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York. 1965;7:442-448.

Knowles BH. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**. 1994;24(2):275-308.

Kotze AC, Sales N, Barchia IM. Diflubenzuron tolerance associated with monooxygenase activity in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). **J. Econ. Entomol.**1997;90:15-20.

Koul O, Isman MB, Ketkar CM. Proporties and use of neem, *Azadirachta indica*. Canadian **Journal of Botany**, Ottawa.1990;68(1):1-11.

Kraus W, Bokel M, Klenk A, Pohnl H. **Tetrahedron Lett.** 1985; 26:6435.

Kuhr RJ, Dorough HW. **Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry and toxicology.** CRC Press. USA. 1976.

Lacey LA, Urbina MJ, Heitzman C. Sustained release formulations of *Bacillus thuringiensis* (H-14) for control of container-breeding *Culex quinquefasciatus*. **Mosquito News**.1984;44:26-32.

Lacey LA.,Lacey CM, Peacock B, Thierry I. Mosquito host range and tield activity of *Bacillus sphaericus* isolate 2297 (sorotype 25). **Am. Mosq. Control. Assoc.** 1988;4:51-56.

Lambert B, Höfte H, Annys K, Jansens S, Soetart P, Peferoen M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Apllied and Environmental Microbiology, Washington**. 1992;58:2536-2542.

Lara WH, Batista GC. **Pesticidas**. Química Nova. 1992;15:161-166.

Lavie D, Jain MK, Shpan-Gabrielith SR. **Chem. Commun**. 1967: 910.

Lereclus D, Delécluse A, Lecadet MM. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: Entwistle PF; Cory JS; Bailey MJ. Higgs S. [ed]. *Bacillus thuringiensis*, an environment biopesticide:theory and practicide. **Chichester. John Wiley**.1993;37-69.

Li J, Carrel J, Ellar DJ. Crystal structure of insecticidal δ-endotoxin *from Bacillus thuringiensis* at 2.5A resolution. **Nature, London**. 1991;353:815-821.

Liu EY, Zhang YM, Cai CJ, Chen ZS. Development of *Bacillus sphaericus* C3-41 mosquito larvicidal formulation. **Chin J. Epidemiol**.1980;10:7-10.

Lovatto PB, Goetze M, Thomé GCH. Efeito de extratos de plantas silvestres *Solanaceae* sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*). **Cien. Rural. Santa Maria**, jul-ago,2004;34(4):971-978.

Luthy P, Wolfersberger MG. Pathogenisis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: Charles JF; Delécluse A; Nilsen-LeRoux C[ed]. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field aplication. **Netherlands: Kluwer Academic Plublishers**.2000:167-180.

Lysenko O. *Bacillus thuringiensis*: evolution of taxonomic conception. **Journal of Invertebrate Pathology**. 1983;41(2):295-98.

Maia BHLNS, de Paula JR, Sant'ana J, da Silva MFGF, Fernandes JB, Vieira PC, Costa MSS, Ohashi OS, Silva JNM. **J. Braz. Chem. Soc.** 2000;11: 629.

Maranhão ZC. Plantas inseticidas. **Revista da Agricultura.**1954:29(3-4):113-121.

Marcoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temephos. **Revista de Patologia Tropical.** 1995;24:31-40.

Mariconi FA. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas.**2ª ed., Agron. Ceres Ltda: São Paulo,1963.

Martin PJS, Clark JM, Edman JD. Preliminary study of synergism of acid rain and diflubenzuron. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** 1995;54:833-836.

Martínez AF. Inhibidores de síntesis de quitina: Control de problaciones de mosquitos con productos biorracionales. **Revista da Sociedade de Entomologia Argentina.**1999;58:232-237.

McPherson SA, Perlak FJ, Fuchs RL, Marrone PG, Lavrik PB, Fischhoff DA. Characterisation of the coleopteran-specific pretein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Bio/Technology, New York.** 1988;6:61-66.

Mekuria Y, Gwinn TA, Williams DC, Tidwell MA. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo Dominican Republican. **Journal of the American Mosquito Control Association.** 1991;79:69-72.

Mian LS, Mulla MS. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. **Res. Review**,1982;84:27-112.

Microbial Engineering Laboratory. [Homepage na internet]. Tailândia, 2003. [Acesso em 17 de setembro de 2005]. Disponível em: http://vectorcontrol.biotec.or.th/Aims.html

Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Reunião de Avaliação do Programa de controle da Filarioses Linfática no Brasil.** Brasília. 2000.88p.

Morgue (Luntz) AJ, BlackwellA. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology.** Oxford.1993;29(3-4):113-121.

Mulla MS, Darwazeh HA. New insect growth regulators against flood and stagnant water mosquitoes-effects on non target organisms. **Mosquitoes News**. 1979; 39:746-755.

Mulla MS, Darwazer HÁ, Davidson EW, Dulmaghe HT, Singer S. Larvicidal activity and field efficaccy *of Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to nontarget organism. **Mos. News**.1984;44:336-342.

Mulla MS. The future of insect growth regulators in vectors control. **Journal of the American Mosquito Control Association** .1995;11:269-273.

Mulla S, Usavadee T, Apiwat T, Jakkrawarn C, Tianyun S. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to

the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**.2003;19(1):39-46.

Nicolas L, Hamon S, Franchon E, Sebald M, de Barjac H. Partial inactivation of the mosquiticidal of *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia* by extracellular proteinases. **Applied Microbiology Biotecnology**. Berlin. 1990;34:36-41.

Nicolas L, Charles JF, de Barjac H. *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*: characterization on putative mosquito larvicidal proteins. FEMS **Microbiol. Lett.**1993;113:23-28.

Nilsen-LeRoux C, Charles JF, Thiéry I, Georghiou GP. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. **Eur. J. Biochem.** 1995;228:296-210.

Novartisfarma [homepage na internet]. São Paulo; 2006. [acesso em 13 de janeiro de 2006]. Disponínel em: http://www.novartisfarma.com.br/products/pt/ah/biflex_ 80_sc. pdf.

Oliveira-Filho AM. Chagas's disease and its control. **Public Health.** 1988;6:31-35.

Omoto C. Modo de ação dos inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. In: Guedes JC; Costa ID; Castaglioni E.[eds]. **Bases e técnicas de manejo de insetos.** Depto. Defesa Fitosanitária. Univ. Federal de Santa Maria, Sta. Maria, RS.2000:30-49.

Oppenoorth FJ. Biochemical and genetic in insecticide resistence. In. Kerkut GA. Gilbert LI [eds]. **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology.**1985;12:731-73.

Orihel TC. Filariae. In:Beaver PC & Jung RC. **Animals agentes and vectors of human disease.**5th ed. Philadelphia, Lea e Febiger.1985;12:171-91.

Ottesen EA, Ramachandran CP. Lynphatic filariasis, enfection and desease:control strategies. **Parasitol. Today**.1995;11:129-31.

Palchick S. Chemical control of vectors in: **The Biology of Desase Vectors.** University Press of Colorado, 1996.

Pasteur N, Isek A, Georghiou GP. Genetic and biochemical studies of the highly active esterases A and B associated with organophosphate resietence in mosquitoes of the *Culex pipens* comples. **Biochem. Genet.**1981;10:909-19.

Pasteur N, Georghiou GP. Filter paper test for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate resistance mosquitos. **Mosquito News.**1981;41:181-183.

Peferoen M. Insect control with transgenic plants expressing Bt crystal proteins. In: Carozzi N; Koziel M.[ed]. **Advances in insect control: the role of transgenic plants. London:Taylor & Francis.**1997: 21-48.

Peiris HTR, Hemingway J. Characterization and inheritance of elevated esterases in organophosphorus and carbamate insecticide resistance *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Sri Lanka. **Bull. Entomol. Res.** 1993;83:127-132.

Pizarro APB, Oliveira-Filho AM, Parente JP, Melo MTV, dos Santos E, Lima PR. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Rev. Brás. Méd. Trop.** jan-fev. 1999;32(1):23-29.

Plapp FW. Pest management strategies and insecticidde resistence. **Proceedings of the National Conf. On Urban Entomology** – University of Mayland, USA.1986.

Polanczyk RA. Garcia MO.Alves SB. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**. 2003;.37(6):813-816.

Poncet S, Bernard C, Dervyn E. Improvement of *Bacillus sphaericus* toxicity against Diperan larvae by integration, via homolugus recombination, of the Cry 11 toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. **Apll. Environ. Microbiol.**1997; 63:4413-4420.

Priest FG. Biological control of mosquitos and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Bacterial**. 1992;72:357-369.

Rachou RG. Transmissores da filariose bacroftiana no Brasil. **Rev. Brás. Malariol. Doenças. Trop.**1956;8:267-8.

Rao DR, Mani TR, Rajendran RJ, Joseph AS, Gajanana A, Reuben R. Develepment of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **Journal of American. Mosquito Control Association.**1995;11:1-5.

Regis L, Ninsen-LeRoux C. **Management of resistance to bacterial vector control**. In: JF Charles, Entomopatogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000:419-441.

Reisen WK, Milby MM, Presser SB, Hardy JL. Ecology of mosquitoes and st. Louis encephalitis virus in Los Angeles Basin of California, 1987-1990. **J. Med. Entomol.** 1992;29(4):582-98.

Rembold, H.; Inseticides of Plant Origin. **ACS Symp. Ser**. 1989; 387:150.

Report of an Ad Hoc Panel of the Board of Science and Technology for International Development. NEEM. A Tree For Solving Global Problems. **National Research Council, National Academy Press**, Washington, D.C. 1992:139.

Richardson RJ. Toxicology of the nervous system. In. Reeves AL. **Toxicology: principles and practice.** Vol.1. John Wiley & Sons, USA, 1981.

Rodcharoen J, Mulla MS. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus*. **J. Econ. Entomol.** 1994; 87:1133-1140.

Rodriguez M, Ortiz E, Bisset JA, Hemingway J, Saledo E. Changes in malathion and pyrethroid resistance after cypermethrin selection of *Culex quinquefasciatus* field populations of Cuba. **Med. Vet. Entomol.**1993;7:117-121.

Rodriguez HC. **Efeito de extratos aquosos de *Meliaceae* no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidóptera: Nocctuidae).** Piracicaba.[Dissertação de Mestrado –USP].1995:100p.

Rose RI. Pesticides and public health: integrated methods management. **Emerg. Infec. Dis.** 2001;7(1):17-23.

Roush RT, Miller GL. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economic Entomology.**1986;79(2):293-98.

Rozendaal JA. **Vector control methods for use by individuals and comnunities.** Genebra: World Health Organization.1997.

Ruas- Neto AL, Silveira SM, Colares ERC. Mosquito controle based on larvicides in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: choice of the control agent. **Cad. Saúde. Pública.** Rio de Janeiro,1994;10(2)222-230.

Saito ML, Luchini F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.46p.

Salles JF, Baldani JI. *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico. Seropédica: **Embrapa. Agrobiologia,** nov; 1998.31p.(Embrapa-CNPAD). Documento 54).

Sanchis V, Lereclus D, Menou G, Chaufaux J, Lecadet MM. Multiplicity of d-endotoxins genes with different insecticidal specifities *in Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**. 1998;2(2):393-404.

Santos JRH, dos Gadelha JWR, Carvalho ML, Pimentel JVF, Júlio PVMR. **Controle alternativo de pragas e doenças.** Fortaleza:UFC,1998:216p.

Schaefer CH. A practical evaluation of TH-6040 (Dimilin) as a mosquito control agent in California. **Journal of Economic Entomology.** 1975;28:183-185.

Schmutterer H. Potencial of Azadirachtin containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **Journal of Insect Physiology.**1988;34(7):713-719.

Schnepf HE. *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. **Current Opnion in Biotechnology**. Philadelphia. 1995;6:395-312.

Schnepf E, Crikmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thungiriensis* and its pesticidal cristal proreins. **Microbiology and molecular biology Revews.** 1998;2(3):775-806.

Schofield CJ. Environmental change description or prediction? **Ann. Soc. Belge. Med. Trop.**1990;70:1-3.

Scott JG. Cytochromes P450 and insecticides resistence. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**1999;29(9):757-77.

Seghal SS, Pillai MK. Preliminary studies on the chemical nature of mosquito-breeding waters in Delhi. **Bull World Health Organ.**1970;42(4):647-50.

Segnini SE, Scorza JU, Añezn N. Variaciones diurnas de algunos factores fisico-químico en un criadero de larvas de *Anopheles nuñeztovari.* Gabaldon, 1940. **Bol.Dir.Malariol.San.Amb.** 1979;19:1-19.

Severini C, Romi R, Marinucci M, Raymond M. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipens* From Italy.J. **Am. Mosq. Control Ass.**1993;9(2):164-168.

Siegel J, Shadduck J. Safety of microbial insecticides to vertebrates-humans. In: Laird M; Lacey L; Davidson E.[eds]. Safety of Microbial insecticides. **CRC Press, Boca Raton.** 1990:110-113.

Silva JJ, Mendes J. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**2002; 97:679-682.

Silva-Filha MH, Regis L, Nilsen-LeRoux C, Charles JF. Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field treated population of *Culex quinquefasciatus.* **Journal of Economic Entomology.**1995;88:525-530.

Silva SF, Dias DGS, Martins ES, Soares CMS, Dias JMCS, Monnerat RG. Prospecção de Estirpes de *Bacillus sphaericus* tóxicas contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus.* **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.** 2002;(31):24.

Sinegre G, Babinot M, Quermel JM, Gavan B. **First field occurrence of** *Culex pipens* **resistance to** *Bacillus sphaericus* **in southern France, in Proceeding of IIth European Meeting of Society for Vector Ecology, Barcelona, Spain.**1994:17.

Singer S. Introduction to study of *Bacillus sphaericus* as a mosquito control agent. In: de Barjac H; Sutherland DJ.[eds]. Bacterial control of mosquitoes and black flies. **New Brunswick, NJ: Rutgers. Univ. Press.**1990:221-227.

Stone, R. **Science** 1992;255:1070.

Straskraba M, Tundisi JG. Gerenciamento da qualidade de represas. **Diretrizes para o gerenciamento de lagos.**v 9.São Carlos: ILEC/IIE, 2000.

Surtees G. Urbanization and the epidemiology of mosquito-borne disease. **Abstr. Hyg.** 1971;46(2):121-134.

Tailor R, Tippet J, Gibb G, Pells S, Pike D, Jordan L, Ely S. Identification and characterisation of a novel *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin gene entomolcidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology, Oxford,** 1992;6:1211-1217.

Taylor P. Anticholinesteras agents. In. Goodman AG; Rail TW; Nies AS; Taylor P. **The pharmacological basis of therapeutics.** 8ª ed. Pergamon Press, USA; 1990.

Thanabalu T, Hindley J, Jackson-Yap J, Berry C. Cloning sequencing and expression of gene encoding a 100-kilodalton mosquiticidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII 1. **Journal of Bacteriology. Washington, DC.** 1991;173:2776-2785.

Thomann RV, Mueller JA. Principles of surface water quality modeling and control. New York; **Harper & Row, Publishers**; 1987. 327 p.

Timbrell J. **Principles of Biochemical Toxicology.** 3rd ed., Taylor & Francis, London. (2000).

Urbinatti PR, Sendacz S, Natal D. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. **Ver. Saúde. Públ.**35(5):2001.

Valadares-Inglis MCC, Souza MT, Shiler W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico.In: Melo IS; Azevedo JL. [ed].**Controle Biológico.EMBRAPA. Jaguariúna.**1998;102-225.

Van Rie J.,Mc Gaughey W, Johnson D, Barnette D.,Van Mellaert TH. Mechanism of resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science.**1989;247:72-74.

Vendramim JD. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: II Ciclo de Palestra sobre Agricultura Orgânica. **Fundação Cargil.** 1997:64-69.

Vieira CP, Fernandez BJ. Plantas inseticidas. In: Simões CM et al.(org). **Farmacognosia-da Planta ao medicamento.** Porto Alegre – Florianópolis:UFRGS-UFSC.1999:739-754.

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

Waliszewski SM, Gómez-Arroyo S, Infanzon RM, Villalobos-Pietrini R, Hart MM. Comparision of organochlorine pesticide levels between abdominal and breast adipose tissue. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 2003;71(1):156-62.

Ware GW. **The Pesticides Book.** Thomson Publications, Fresno, CA.1994,340p.

Ware GW. An introduction to inseticides (3rd edition) – University of Minnesota, 2000 [on line 10 abril de 2004]. Disponível em: http://ipmworld.umn.edu/chapter/ware.htm

Weiser J. A mosquitoe-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simullium danosum* from northern Nigeria. **Zentralbl Mikrobiol.**1984; 139:57-60.

Wickremesinghe RSB, Mendis CL. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. **Mosq. News.**1980;40:387-389.

Williams CM. The juvenile hormone of insects. **Nature,**1956;178:212-213.

Wirth MC, Federici BA, Walton WE. Cyt1A from *Bacillus thuringienis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2000a.;66:1093-1097.

Wirth MC, Walton WE, Federici BA. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Restores Toxicity of *Bacillus sphaericus* against resisten *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**2000b;37:401-407.

Wirth MC, Walton WE, Federici BA. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J.Med. Entomol.**2000c;37:401-401.

Wirth MC, Jiannino JÁ, Federici BA, Walton WE. Evolution of resistance to *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B. sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* in the moqsuito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Invertebrate Pathology.** 2005;88:154-162.

World Health Organization. **7th report of the world healt expert committee on insectides.** Technical Report Series, 125. Geneve, 1957.

World Health Organization. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance.** Chavesse DC & Yap HH Eds., WHO/CDT/WHOPES. Geneva, 1987.

World Health Organization. Expert committee on filariasis, 5th. **Lynphatic filariasis: the disease and it's control:report.** Geneva,1992 (WHO-Technical Reports Series,821).

World Health Organization. **Vector resistence to pesticides.** Expert Committe on Vector Biology and Control: 818° report. Genebra, World Health Organization (WHO – Techinical Report Series), 1992.

World Health Organization. **Lynphatic filariasis infection & desease control strategies.** Report of a consultative meeting at the University Sains Malaysia. Penang.1994.

Yamamoto T, Dean DH. Inseticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: Charles JF; Delécluse A; Nilsen-LeRoux C[ed]. **Entomophatogenic bacteria: from laboratory to field aplication.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers.2000;81-100.

Yuan Z, Zhang Y, Cai Q, Liu Ey. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. **Sci.& Technol.**2000:10(in press).

Yousten AA, Davidson EW. Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystal formed by *Bacillus sphaericus* 2297. **Appl. Environ. Microbiol.** 1982;44:1449-1455.

Zahiri NS, Federici B, Mulla S. Laboratory and simulated field evaluation of a new recombinant of *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* and *Bacillus sphaericus*

against *Culex mosquito* larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. 2004;41(3):423-429.

Zanno PR, Miura I, Nakanishi K, Elder DL. **J. Am. Chem. Soc.** 1975;97: 1975.

Zhang L, Harada K, Shono T. Cross resistance to insect growth regulators in pyriproxyfen-resistant housefly. **Apply. Entomol. Zool.**1998;33:195-197.