

Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)

Some aspects of the population control and resistance to insecticides in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)

Marluci Monteiro Guirado, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Laboratório de Vetores. Departamento de Biologia. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, SP, Brasil

Recebido 5/3/2009 – Aprovado em: 29/4/2009

Resumo

A dengue, na forma clássica ou hemorrágica, uma das doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, é um importante problema de saúde pública. Atualmente, a área de ocorrência, bem como o número de pessoas afetadas pela doença, vem aumentando paralelamente à preocupação com o seu controle. Os esforços para produzir uma vacina efetiva na prevenção da dengue ainda não mostraram o sucesso desejado. Ao mesmo tempo, métodos para o controle do tamanho das populações utilizando técnicas genéticas modernas, como a construção de mosquitos transgênicos portadores de características apropriadas, ainda permanecem em estudo laboratorial. Assim, enquanto outros processos não estiverem disponíveis, o controle do mosquito estará quase exclusivamente dependente da conscientização das populações humanas na eliminação dos criadouros em potencial. Alguns aspectos e problemas envolvidos nesse assunto são abordados no presente texto.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; problemas de controle; perspectivas.

Abstract

Dengue in the classic or hemorrhagic form, one of the diseases transmitted by the mosquito *Aedes aegypti*, is an important public health problem. Presently, the occurrence area as well as the number of people affected by this disease is increasing in parallel with the human concern about its control. The efforts to produce a vaccine effective in the prevention of dengue did not show yet the desired success. In addition, methods for control the mosquito population size using modern genetic techniques, such as the construction of transgenic mosquitoes bearing appropriate characteristics, remain yet under laboratory studies. Thus, while other processes are not available, the mosquito control is almost exclusively dependent on the conscious involvement of the human populations for eliminating the potential mosquito breeding sites. Some aspects and problems related to this subject are dealt with in the present text.

Key words: *Aedes aegypti*; problems of control; perspectives.

***Aedes aegypti*: controle, dificuldades e perspectivas**

O controle do *Aedes aegypti*, mosquito vetor dos vírus causadores da febre amarela e dengue, na forma clássica ou hemorrágica, é hoje um dos principais problemas de saúde pública em muitas regiões do mundo, incluindo o Brasil. A gravidade dessas doenças, o fato de que apenas para a febre amarela existe vacina e, paralelamente, a dificuldade em controlar o tamanho populacional do mosquito estão na base dessas preocupações.

A dengue é encontrada em regiões tropicais e subtropicais do planeta, predominando em áreas urbanas e semiurbanas. Hoje, é endêmica em mais de cem países das Américas, África, Ilhas do Pacífico, Ásia e Mediterrâneo. A situação é agravada pelo fato de que a doença continua a se espalhar para novas áreas. Atualmente, o sudeste da Ásia e o oeste do Pacífico são consideradas as regiões mais fortemente afetadas pela doença, sendo que na maioria dos países da Ásia a dengue hemorrágica tornou-se uma das principais causas de hospitalização e morte infantil¹.

Nas últimas décadas, a incidência da doença tem crescido acentuadamente. Hoje, estima-se em 50 milhões o número total de pessoas afetadas anualmente em todo o mundo, com expressiva mortalidade devida à dengue hemorrágica¹. Mas, há estatísticas que mencionam até 100 milhões de casos ao ano².

Não há dúvida de que o recente sequenciamento do genoma do *A. aegypti*, envolvendo pesquisadores de várias universidades^{3,4}, poderá ser um auxiliar importante na detecção de processos e de ferramentas para o controle do mosquito. Porém, a experiência que já se tem com outros organismos tem levado à conclusão de que o sequenciamento gênico de um organismo é “um novo começo”, no que se refere às dificuldades iniciais que podem fazer com que resultados significativos demorem um tempo imprevisível para aparecer.

Na manipulação do genoma, complexas interações gênicas geralmente são quebradas, e por serem desconhecidas em sua extensão

geram, na maioria das vezes, resultados inesperados e ineficientes. Haja vista os vários exemplos de construção, em diferentes laboratórios, de vetores transgênicos (aqui se incluem algumas espécies de *Anopheles* e *A. aegypti*) que não se deixam infectar pelos agentes que eles normalmente abrigam e transmitem^{5,6,7}.

No Brasil também tem havido esforços nesse sentido; pesquisadores do Centro de Pesquisa René Rachou, unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em Minas Gerais, também desenvolveram uma linhagem transgênica de *Anopheles*, incapaz de se infectar pelo *Plasmodium* causador da malária⁸.

Porém, os mosquitos geneticamente modificados, que geralmente têm tido um bom desempenho em laboratório, quando estão sozinhos são rapidamente eliminados na competição com o mosquito “normal”, transmissor. Seu genoma é produto de milhares de anos de julgamento pela seleção natural, e sua capacidade reprodutiva, muito maior, tem-lhe assegurado até agora esse sucesso.

Assim, apesar da variação dos processos utilizados nos diferentes laboratórios em sua construção, os mosquitos transgênicos apresentam desvantagens, relacionadas no mínimo com a capacidade reprodutiva diminuída. Para *Anopheles* tem havido algum sucesso em resolver esse problema⁷, mas há ainda um longo caminho a percorrer. Além das dificuldades de ordem biológica, a experimentação desses organismos transgênicos na natureza esbarra em aspectos de segurança e ética, difíceis de contornar.

Por outro lado, a obtenção de uma vacina contra a dengue ainda pode demandar um tempo relativamente longo. Segundo os pesquisadores da Fiocruz, que há oito anos realizam pesquisas com esse objetivo, o Brasil poderá ter essa vacina em 5 a 10 anos. Essa construção está sendo tentada por meio de manipulação dos vírus da dengue e de combinações feitas com o da febre amarela, que é parecido com o vírus da dengue. Embora esses pesquisadores mencionem que o País gasta anualmente cerca de 10 milhões de reais em pesquisas para obtenção da vacina, o trabalho

é dificultado pela existência de quatro sorotipos diferentes da dengue, cuja vacina deverá ser eficiente para todos⁹.

Atualmente, laboratórios dos Estados Unidos, França e Cuba também estão buscando desenvolvê-la. Aparentemente, os norte-americanos estão mais adiantados nesse processo, havendo uma perspectiva de aproximadamente quatro anos para utilização da vacina, que envolverá uma parceria com o Brasil em sua etapa final¹⁰.

As dificuldades existentes indicam que ainda durante um tempo, mais ou menos longo, vamos continuar dependentes exclusivamente dos métodos de controle da dengue por meio do controle do *A. aegypti*, hoje subordinado, grandemente, ao comprometimento da população com a eliminação dos criadouros (recipientes que podem acumular água onde a fêmea ovipõe e os ovos se desenvolvem, passando pelas fases de larva, pupa e adulto). Entre os criadouros mais comuns estão os pratos e vasos de planta, bebedouros de animais, pneus, ralos externos e internos, calhas, lajes e materiais inservíveis, entre outros.

No Brasil, o *A. aegypti* foi eliminado na década de 1950. Contudo, a partir de meados dos anos 1970 o País se reinfestou e, hoje, o mosquito ocorre em todos os Estados, já tendo causado sérias epidemias em grande número de municípios. A maior e mais recente atingiu a capital do Rio de Janeiro, em 2008, causando a morte de mais de uma centena e meia de pessoas, em um total de 209.310 casos notificados em todo o Estado¹¹.

O Brasil já abriga os quatro sorotipos de vírus causadores da dengue (DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4). Embora haja ainda alguma discussão sobre a veracidade do fato, o vírus sorotipo 4 (DEN4) foi isolado de alguns doentes de Manaus (AM), em 2007, por pesquisadores da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas², e teria sido introduzido em território brasileiro a partir da Venezuela. Caso se confirme, a tendência é que o sorotipo se espalhe para as demais regiões do País.

A presença de mais um sorotipo de vírus amplia a probabilidade das pessoas contraírem um segundo acometimento de dengue, aumentando conseqüentemente a ocorrência de maior número de casos de dengue hemorrágica. Sabe-se que mesmo as pessoas infectadas pela primeira vez por um dos sorotipos de vírus da doença podem manifestar sua forma hemorrágica, mas a chance disso acontecer aumenta quando há uma nova infecção. Aparentemente, a imunização é específica para cada sorotipo.

Desde o ressurgimento da dengue no Brasil, as principais estratégias adotadas pelos municípios para controlar a proliferação do mosquito têm sido atividades educativas e a fiscalização das residências, por agentes de saúde, em busca de criadouros para eliminar os focos de reprodução do *A. aegypti*. A aplicação ou nebulização dos inseticidas organofosforados e piretróides – cujos efeitos deletérios ao homem e, especialmente, ao ambiente são bastante conhecidos^{12,13} – tem sido utilizada em situações epidêmicas. Acresce que o uso intensivo desses compostos nos últimos 25 a 30 anos tem causado o desenvolvimento de resistência em populações do mosquito em muitas regiões brasileiras¹⁴⁻¹⁹. Em outros países, a constatação tem sido a mesma²⁰⁻²⁴.

Alternativas aos inseticidas

Visando a redução ou substituição o uso de inseticidas, em razão dos seus efeitos negativos já mencionados, pesquisadores têm buscado e obtido algumas formas alternativas de controle, as quais causam a morte das larvas em seus próprios criadouros, sendo importantes especialmente quando estes não podem ser eliminados.

O primeiro método de controle a ser utilizado foi o Bti, que envolve o uso dos *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), os quais produzem proteínas conhecidas como δ -endotoxinas, tóxicas para as larvas de mosquitos e outros insetos²⁵⁻³⁰.

O uso desse tipo de bioinseticida, porém, não é desprovido de problemas. Há quem os considere mais adequado para o controle de vetores que se criam em quantidades grandes de água, como pântanos, rios e lagoas, não sendo adequado do ponto de vista prático para vetores que se reproduzem em pequenos depósitos temporários, caso do *A. aegypti*³¹. Uma desvantagem de seu uso em ambientes externos é o baixo efeito residual, devido principalmente à exposição direta à luz solar, que inativa a toxina pela luz ultravioleta^{32-35,29}.

Por outro lado, desde 1985, a literatura tem noticiado casos de resistência ao Bti, em várias regiões do mundo, em algumas espécies de mariposas que são pragas de sementes. Em laboratório, de 13 espécies de insetos analisadas 11 desenvolveram resistência a várias linhagens de Bti. *Aedes aegypti* é uma delas, mas sua resistência parece não ter sido ainda detectada no campo^{36,37}. Foi, porém, detectada resistência ao Bti em *Culex pipiens* de Syracuse, Nova York (EUA)³⁸.

Até alguns anos atrás, o Bti usado no Brasil era importado. Hoje já é produzido no País. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia produz o Bt-horus, desenvolvido a partir do *Bacillus thuringiensis*³⁹.

Cafeína e borra de café são outras alternativas aos inseticidas. O processo, desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) de São José do Rio Preto (SP), em testes repetidos dezenas de vezes desde 2000, mostra que as duas substâncias bloqueiam o desenvolvimento das larvas de *A. aegypti*, causando sua morte nessa fase^{40,41,42}. Em laboratório, a cafeína na concentração de 1,0 mg/ml causa a mortalidade de 100% das larvas do mosquito, geralmente em 24 a 48 horas de exposição^{40,41,43}, e o efeito residual observado foi de sete meses⁴³.

Já a borra do café, devido às suas características físicas, é mais indicada para criadouros em potencial nos jardins (como vasos e bromélias); é eficiente na concentração de 300 mg/ml (para uso da população, corresponde a aproximadamente quatro colheres de sopa cheias para um

copo ou 200 ml de água). Nova borra de café deve ser aplicada em intervalos de sete dias^{40,42}.

Inúmeras pesquisas com extratos de plantas, produzidas em diferentes locais, têm sido divulgadas pela mídia de maneira crescente, todas com o objetivo de realizar o controle do mosquito na fase de larva. É o caso do trabalho realizado por pesquisadores da Fiocruz, que desenvolveram um produto feito a partir de uma substância extraída da *Piper solmsianum*, planta da família das pimentas, que ocorre na Mata Atlântica. Segundo as informações⁴⁴, a fórmula já teve eficácia comprovada em laboratório. Ainda de acordo com a notícia, agora os pesquisadores vão começar a fazer testes de campo e levantamento de custos, etapas necessárias para definir a produção do larvicida, que pode chegar ao mercado em quatro anos⁴⁴.

Relatos sobre a descoberta de outras substâncias larvicidas têm sido predominantemente veiculados pela mídia. Entre eles, as pesquisas de cientistas da Universidade do Sul de Santa Catarina (USSC) envolvendo as plantas andiroba, cinamomo e uma substância sintética não revelada⁴⁵; as descobertas dos pesquisadores da Universidade Federal do Paraná (UFPR), que usam o extrato etanólico de sementes trituradas de *Melia azedarach*, popular cinamomo ou Santa Bárbara⁴⁶; de uma equipe do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) que recomenda um chá ou extrato de algumas plantas medicinais conhecidas naquela região (agrião-bravo, alfavaca, alho, capim-santo, cidreira, hortelã, limão ou mastruz)⁴⁷; e, ainda, de pesquisadores dos Departamentos de Bioquímica, Química Fundamental e Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), envolvendo o uso da proteína lectina encontrada nas sementes da *Moringa oleifera* e na madeira da aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*)⁴⁸.

Todos esses estudos e muitos outros citados na mídia visam ao controle da população do mosquito *A. aegypti* pela interrupção do ciclo biológico na fase de larva. Alguns desses relatos têm aparecido, também, em recentes publicações científicas^{49,50,51}.

A cafeína tem várias vantagens sobre muitas ou todas essas descobertas, sendo mais uma alternativa para uso em saúde pública. Entre essas vantagens estão a disponibilidade no mercado (por ser normalmente utilizada para outros fins, como a adição em numerosos medicamentos, cosméticos e bebidas) e a não necessidade de culturas específicas e da montagem de laboratórios. A borra do café, por sua vez, é um produto geralmente jogado fora depois do preparo da bebida, que é diário em grande número de lares, não só do Brasil.

Qualquer que seja o produto que se utilize para o controle do mosquito, o desenvolvimento de resistência pode se estabelecer com o tempo. Testes realizados com a cafeína em laboratório não indicaram desenvolvimento de resistência; ao contrário, houve redução da oviposição e do desenvolvimento dos ovos por gerações, até que nenhum ovo eclodiu na oitava geração⁴¹. Porém, não se pode garantir que na natureza ocorra o mesmo processo.

Mecanismos de desenvolvimento de resistência em insetos com ênfase em *Aedes aegypti*

A resistência dos insetos aos inseticidas é, hoje, um dos assuntos centrais quando se trata de vetores de doenças ou pragas da agricultura, uma vez que ela dificulta ou mesmo inviabiliza programas de controle. De modo geral, os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de resistência são ainda pouco conhecidos, podendo mesmo ser diferentes para um mesmo organismo, em diferentes localidades e em relação a diversos inseticidas.

Em *A. aegypti*, a primeira informação sobre o desenvolvimento de resistência a inseticidas data de 1950 e refere-se a uma população do mosquito originária do Caribe, em relação a organofosforados⁵². Posteriormente, foram surgindo outros trabalhos mostrando a ocorrência de resistência a organofosforados e piretróides, em regiões tropicais e subtropicais que são as de ocorrência desses mosquitos^{53,54,12,31}.

No Brasil, em vários municípios, já antes do ano 2000, foi detectado o desenvolvimento de

resistência ao inseticida organofosforado temefós usado como larvicida^{55,56,14}, assim como o Malathion[®], utilizado para o combate aos mosquitos adultos.

O nível de resistência dos organismos é dependente da concentração, da frequência e do tempo durante o qual os inseticidas são aplicados⁵⁷. Por sua vez, algumas características biológicas dos mosquitos, que incluem o curto ciclo de vida e a descendência numerosa, favorecem o desenvolvimento de resistência, pois facilitam o aparecimento de indivíduos resistentes, que são selecionados em áreas tratadas⁵⁸.

Os estudos da resistência a inseticidas têm mostrado que ela é decorrente de três tipos principais de mecanismos: (a) redução da penetração do inseticida, devido a alterações da cutícula do inseto⁵⁹; (b) aumento do metabolismo do inseticida por ação de esterases, monooxigenases ou glutatona – transferases^{60,61}; e (c) por modificação do alvo do inseticida^{62,63}. A literatura registra ainda um mecanismo de resistência comportamental, no qual os insetos evitam o contato com locais que contenham a substância tóxica⁶⁴.

As esterases estão envolvidas no desenvolvimento de resistência em vários insetos, incluindo moscas, borboletas e mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*⁶⁵⁻⁷¹. Também no gênero *Aedes* esse envolvimento já está demonstrado, como será mencionado mais adiante. As classes de esterases geralmente relacionadas ao desenvolvimento de resistência são as carboxilesterases e as colinesterases. As carboxilesterases agem na degradação do inseticida. Na maioria dos casos, a resistência que elas fornecem é decorrente de amplificação do número de genes ou aumento da atividade por ação de mecanismos de regulação, que geram aumento da síntese do produto correspondente^{72,62}.

No caso das colinesterases, a resistência surge por mutação gênica. A acetilcolinesterase (ACE) é o principal alvo dos inseticidas organofosforados e carbamatos, que agem fosforilando ou carbamitando o resíduo de serina no interior do sítio gorge⁷³. Isso compromete a

função da ACE, que é catalizar a hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor essencial para a transmissão colinérgica no sistema nervoso dos insetos. Mutações no gene da ACE tornam o produto gênico insensível à ação dos inseticidas, produzindo resistência. A insensibilidade da ACE é um mecanismo frequente de resistência em insetos, sendo que esse processo tem sido associado a mutações do gene *ace* em vários organismos, como *Drosophila*⁶², *Musca domestica*⁷⁴, *Culex pipiens* e *Anopheles gambiae*⁷⁵ e a mosca *Bactrocera dorsalis*⁷⁶.

Em geral, as populações brasileiras resistentes de *A. aegypti* têm apresentado níveis maiores da atividade esterásica, mas os perfis de ACE e da oxidase não têm mostrado alteração⁵⁶. Em uma população de Santiago de Cuba, embora tenha sido detectada a presença do mecanismo de ACE insensível, parece que não foi ainda investigada a existência de mutações no gene *ace*⁶³.

A maioria dos trabalhos em *A. aegypti* voltados à análise dos perfis esterásicos refere-se à quantificação de esterase total, avaliada no extrato de mosquitos macerados inteiros^{77,78}. Trabalhos realizados no Laboratório de Vetores do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibil-

ce/Unesp), em que as próprias bandas foram analisadas em géis de poliacrilamida, sugeriram que não ocorre apenas aumento da atividade esterásica, mas também aumento da frequência de algumas bandas esterásicas e redução da frequência de outras, sugerindo a ativação preferencial de determinadas esterasas, na presença de inseticidas^{79,80,81}.

Nesses estudos, as alterações detectadas envolveram esterasas classificadas bioquimicamente como carboxilesterases e colinesterases, que são as duas classes de enzimas já referidas como associadas ao desenvolvimento de resistência. Esses trabalhos estão sendo continuados para melhor conhecimento das proteínas correspondentes às bandas.

Observa-se, assim, que o controle do *A. aegypti* é ainda um campo aberto à experimentação científica em muitos de seus aspectos, e tem como princípio a conscientização e educação da população. Isso nos coloca, basicamente, na dependência da ação do homem na eliminação dos criadouros para escapar de sua ação vetora em relação à dengue. Com a constante intervenção química utilizada durante as epidemias, pesquisas sobre novas alternativas de controle e resistência a inseticidas neste vetor são de fundamental importância.

Referências bibliográficas

1. World Health Organization - WHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever [acesso em: 6 jul 2008]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
2. Figueiredo RMP, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Gomes MP, et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. Emerg Infect Dis [periódico na internet]. 2008 abr [acesso em 16 jun 2008]; 14(4). Disponível em: <http://www.cdc.gov/EID/content/14/4/667.htm>.
3. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu Z, et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. (research article) (Clinical report). Science. 2007;316:1718-23.
4. Severson Lab Home. The Severson *Aedes aegypti* genome project. VectorBase [acesso em 20 set 2007]. Disponível em: <http://www.nd.edu/~dseverno/genome.html>.
5. Jasinskiene NJ, Coates CJ, Benedict MQ, Comel AJ, Rafferty CS, James AA, Collins FH. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. Proc Nat Acad Sci USA. 1998;95:3748-51.
6. Franz AW, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, Olson KE. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. Proc Nat Acad Sci USA. 2006;103:4198-4203.

7. Marrelli MT, Li C, Rasgon J, Jacobs-Lorena M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on plasmodium-infected blood. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2007;104:5580-83.
8. Oliveira, W. 2006. O desafio dos mosquitos transgênicos [acesso em: 14 jul 2008]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=101&infol=112&sid=3.
9. Brasil. 2006. Brasil pode ter vacina contra a dengue em até 10 anos [acesso em: 13 jul 2008]. Disponível em: http://www.bonde.com.br/bonde.php?id_bonde=1-3--74-20060203.
10. Rodrigues, P. 2007. Vacina contra dengue poderá estar disponível em quatro anos. Brasília: Agência Brasil; 2007 [acesso em: 13 jul 2008]. Disponível em: <http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/10/25/materia.2007-10-25.4702907947/view>.
11. Rio: secretaria confirma 152 mortes por dengue [reportagem na internet]. Rio de Janeiro: JB Online; 2008 [acesso em 9 jul 2008]. Disponível em: <http://noticias.terra.com.br/brasil/interna/0,,OI2999595-EI715,00.html>.
12. Marzochi KBF. Dengue in Brazil - Situation, transmission and control: a proposal for ecological control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994;89:235-45.
13. Queiroz ML, Fernandes SMD, Valadares MC. Neutrophil function in workers exposed to organophosphate and carbamate insecticides. *International. J Immunopharmacol*. 1999;21:263-70.
14. Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MTM. Modificação da susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temefós. *Rev Pathol Trop*. 1995;24:31-40.
15. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCBL. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1999;33:521-2.
16. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:703-8.
17. Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev Saúde Pública*. 2004;38:623-9.
18. Lima JBP, Da-Cunha MP, Da Silva RCJ, Galar DO, Soares SDS, Braga IA, et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:329-33.
19. Lima EP, Oliveira Filho AM, Lima JWO, Ramos Júnior NA, Cavalcanti LPG, Pontes RJS. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará (*Aedes aegypti* resistance to temephos in countries of Ceara State). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:259-63.
20. Mouchet J, Chastel C. Resistance to insecticides in *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* in Phnom-Penh (Cambodia). *Med Trop*. 1966;26:505-15.
21. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Pan Salud Publica*. 1998;4:243-51.
22. Rodriguez MM, Bisset J, Fernandez DM, Lauzan L, Soca A. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti*. (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *J Med Entomol*. 2001;38:623-8.
23. Ocampo CB, Wesson DM. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colômbia. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:506-13.
24. Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, Yoksan S. Insecticide susceptible resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J Econ Entomol*. 2007;100:45-50.

25. Berry C, Hindley J. *Bacillus sphaericus* strain 2362: identification and nucleotide sequence of the 41.9 kDa toxin gene. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:758-64.
26. Vallejo F, González A, Posada A, Restrepo A, Orduz S. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin by batch and fed-batch culture. *Biotechnol Techn.* 1999;13:1573-84.
27. Regis L, Silva SB, Melo-Santos MA. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:207-10.
28. Melo-Santos MA, Sanches EG, Jesus FJ, Regis L. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:859-60.
29. Polanczyk RA, Garcia MO, Alves SB. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública.* 2003;37:813-816.
30. Gunasekaran K, Doss PS, Vaidyanathan K. Laboratory and field evaluation of Teknar HP-D, a biolarvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis, against mosquito vectors. *Acta Trop.* 2004;92:109-18.
31. Reyes-Villanueva F. El dengue. Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. *Ciência.* 1990;41:45-55.
32. Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich, F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis treatments. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992;8(3):285-9.
33. Obeta JA. Effect of inactivation by sunlight on the larvicidal activities of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* h-14 isolates from nigerian soils. *J Commun Dis.* 1996;28:94-100.
34. Yu-Tien L, Meng-Jiun S, Dar-Der J, I-Huan W, Chin-Chi C, Cheng-Chen C. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *J Invertebr Pathol.* 1993;62:131-36.
35. Vilarinhos PTR, Monnerat R. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis to control larval *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2004;20:311-14.
36. Goldman IF, Arnold J, Carlton BC. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies israelensis in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Invertebr Pathol.* 1986;47:317-24.
37. Neppi CC. Management of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins [monografia na internet]. Chicago; 2000 [acesso em 23 jan 2008]. Disponível em: <http://camillapede.tripod.com/bapaper.html>.
38. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG. Insecticide Resistance in *Culex pipiens* from New York. *J Am Mosq Control Assoc.* 2005;21:305-9.
39. Diniz F. 2008. Inseticida biológico desenvolvido pela Embrapa é usado com sucesso no combate da dengue [informativo eletrônico]. *Jornal Agrosoft*; 2008 [acesso em 14 jul 2008] Disponível em: www.agrosoft.org.br/?q=node/100390.
40. Laranja AT, Manzato AJ, Bicudo HEMC. Effects of caffeine and used coffee powder on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genet Mol Biol.* 2003;26:419-29.
41. Laranja AT, Manzato AJ, Bicudo HEMC. Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública.* 2006;40:1112-7.
42. Guirado MM, Bicudo HMEC. Effect of used coffee grounds on larval mortality of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): suspension concentration and age versus efficacy. *Rev Bio Assay.* 2007;2:1-7.
43. Guirado MM. Outros aspectos do efeito da cafeína e da borra do café em *Aedes aegypti* [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista; 2004.
44. Fiocruz cria novo larvicida contra dengue [reportagem na internet]. Rio de Janeiro: Globo.com 2008 [acesso em: 3 jul 2008]. Disponível em: <http://g1.globo.com/Noticias/Rio/0,,MUL373360-5606,00.html>.

45. Talamoni D. Spray no *Aedes*. Revista Vida Saúde [periódico na internet]. 2007 nov [acesso em: 9 jul 2008]. Disponível em: <http://revistavivasaude.uol.com.br/Edicoes/55/artigo65655-1.asp>.
46. Paraná, 2004. Extrato alcoólico de frutos de cinamomo mata larvas do mosquito da dengue [reportagem na internet]. Ecoviagem, 2004 jan [acesso em 9 jul 2008]. Disponível em: <http://www.ecoviagem.com.br/fique-por-dentro/noticias/ambiente/extrato-alcoolico-de-frutos-de-cinamomo-mata-larva-do-mosquito-da-dengue-3760.asp>.
47. Nogueira, D. Receita contra as larvas do mosquito. O Povo Online, 2008 mai [acesso em 9 jul 2008]. Disponível em: <http://www.opovo.com.br/opovo/fortaleza/790387.html>.
48. Barros, V. Aroeira e moringa usadas no combate à dengue [reportagem na internet]. Recife: Ascom/UFPE, jan 2008 [acesso em: 9 jul 2008]. Disponível em: <http://www.ufpe.br/new/visualizar.php?id=7366>.
49. Kamaraj C, Rahuman AA, Bagavan A. Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. Parasitol Res. 2008;103:325-31.
50. Odda J, Kristensen S, Kabasa J, Waako P. Larvicidal activity of *Combretum collinum* Fresen against *Aedes aegypti*. J Vector Borne Dis. 2008;45:321-4.
51. Maleck M, Alencar J, Guimarães AE, Kato MJ. Larvicidal activity of grandisin from *Piper solmsianum* against *Aedes aegypti*. J Am Mosq Control Assoc. 2009;25:103-5.
52. Slosek J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. Soc Sci Med. 1986;23:249-57.
53. Georghiou GP, Taylor C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. J Econ Entomol. 1977;70:319-23.
54. Rawlins SC, Wan JOHW. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11:59-65.
55. Beserra EB, Fernandes RM, Queiroga MFC, Castro Jr FP. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L) (Díptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. Neotrop Entomol. 2007;36:303-7.
56. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros A, Lima JBP, Braga IA, Valle D. Resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:467-77.
57. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol. 2000;45:371-91.
58. Poirié M, Raymond M, Pasteur N. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from mediterranean countries. Biochem Genet. 1992;30:13-26.
59. Priester TM, Georghiou GP. Penetration of permethrin and knockdown in larvae of pyrethroid-resistant and pyrethroid-susceptible strains of the southern house mosquito Diptera, Culicidae. J Econ Entomol. 1980;73:165-67.
60. Carino FA, Kopener JF, Plapp FW, Feyreisen R. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. Insect Biochem Mol Biol. 1994;24:411-418.
61. Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N. 1998 An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Phil Trans R Soc B. 1998;353:1707-11.
62. Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc Nat Acad Sci USA. 1994;91:5922-5926.
63. Bisset JA, Rodriguez MM, Fernandez D. Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) from Santiago de Cuba. J Med Entomol. 2006;43:1185-89.

64. Lockwood JA, Byford RL, Stori RH, Sparks TC, Quisenberry SS. Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera, Muscidae). *Environ Entomol.* 1985; 14:873-880.
65. Mouchès C, Pauplin Y, Agarwal M, Lemieux L, Herzog M, Abadon M, et al. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1990;87:2574-8.
66. Guillemaud T, Makate M, Raymond M, Hirst B, Callaghan A. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Mol Biol.* 1997;6: 319-27.
67. Campbell PM, Trott JF, Claudianos C, Smyth KA, Russel RJ, Oakeshott JG. Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera. *Biochem Genet.* 1997;35:17-40.
68. Hemingway J, Karunaratne SHPP. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol.* 1998;12:1-12.
69. Claudianos C, Russel RJ, Oakeshott JG. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochem Mol Biol.* 1999;29:675-86.
70. Blackman RL, Spence JM, Field LM, Devonshire AL. Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (FE4) genes in greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity.* 1999;82:180-6.
71. Brogdon WG, Mcallister J, Corwin AM, Cordon-Rosales C. Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicinae). *J Econ Entomol.* 1999;92:298-302.
72. Oakeshott JG, Van Parencht EA, Boyce TM, Healy MJ, Russel RJ. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica.* 1993; 90: 239-268.
73. Anthony NM, Rocheleau TA, Mocellin G, Lee H-L, French-Constant RH. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters.* 1995;368:461-5.
74. Kosaki T, Shono T, Kono Y. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2001;31:991-997.
75. Weill MCM, Chandre F, Mongensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raynmond M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol.* 2004;13:1-7.
76. HSU C, Haymer DS, Wu W, Feng H. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006;36:396-402.
77. Field LM, Blackman RL, Tyler-Smith C, Devonshire AL. *Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant Myzus persicae (Sulzer)*. *Biochem J.* 1999;339:737-42.
78. Gao JR, Yoon KS, Richard K, Gerald C, Marshall J, Clark F. Esterase-mediated malathion resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Pestic Biochem Physiol.* 2006;185:23-37.
79. Lima-Catelani ARA, Ceron CR, Bicudo HEMC. Genetic variation during development, revealed by esterase patterns of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Biochem Genet.* 2004;42:69-84.
80. Sousa-Polezzi RC, Bicudo HEMC. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. *Genetica (The Netherlands).* 2005;125:43-53.
81. Guirado MM. Padrões de esterases em populações resistentes e suscetíveis de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) [tese de doutorado]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista; 2008.

Correspondência/Correspondence to

Marluci Monteiro Guirado - Laboratório de Vetores - Depto. Biologia - Unesp
Rua Cristóvão Colombo, 2.265 - Jardim Nazareth - CEP: 015054-000 - São José do Rio Preto/SP - Brasil
Tel.: 55 17 3221-2200 - Ramal 2732 - E-mail: mmguirado@gmail.com