

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA - PPGENT**

**Monitoramento da Resistência e dos Efeitos em Parâmetros Biológicos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) de Manaus, Amazonas, Exposto ao Biolarvicida Espinosade, em Condições de Laboratório**

**William Ribeiro da Silva**

**Manaus, Amazonas**

**Julho, 2019**

**William Ribeiro da Silva**

**Monitoramento da Resistência e dos Efeitos em Parâmetros Biológicos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) de Manaus, Amazonas, Exposto ao Biolarvicida Espinosade, em Condições de Laboratório**

**Orientador:** Wanderli Pedro Tadei

**Coorientadora:** Rosemary Aparecida Roque

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

**Manaus, Amazonas**

**Julho, 2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

S586m Silva, William Ribeiro da  
Monitoramento da Resistência e dos Efeitos em  
Parâmetros Biológicos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762  
(Diptera: Culicidae) de Manaus, Amazonas, Exposto  
ao Biolarvicida Espinosade, em Condições de  
Laboratório / William Ribeiro da Silva; orientador  
Wanderli Pedro Tadei; coorientadora Rosemary  
Aparecida Roque. -- Manaus:[s.l], 2019.  
82 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação  
em Entomologia) -- Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação, INPA, 2019.

1. Arboviroses. 2. Insetos. 3. Resistência. I.  
Tadei, Wanderli Pedro , orient. II. Roque, Rosemary  
Aparecida , coorient. III. Título.

CDD: 595.7

**Sinopse:**

Estudou-se a taxa de resistência da população de *Aedes aegypti* da cidade de Manaus, Amazonas, submetida à pressão de seleção com um biolarvicida à base da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, em condições de laboratório. Aspectos como efeitos deletérios em parâmetros do desenvolvimento e reprodutivo também foram analisados.

**Palavras-chave:**

Suscetibilidade, Inseticidas, Arboviroses, Controle biológico.

*Dedico este trabalho a minha família e amigos, por todo apoio e carinho concedido.*

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me ajudar a superar as dificuldades para realizar este sonho, bem como conceder oportunidades de viver experiências incríveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e ao corpo docente, pelos ensinamentos e a oportunidade de prosseguir com a minha formação.

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

A Secretária Municipal da Saúde (SEMSA) na autorização da coleta e por disponibilizar o quadro técnico para auxílio em campo, em especial o seu Leão, dona Nina, Fabrício e Renata, que foram fundamentais nesta etapa do trabalho.

A Fundação de Vigilância em Saúde (FVS) pela disponibilidade em proporcionar o produto biológico espinosade.

Aos meus orientadores Dr. Wanderli Pedro Tadei e Dra. Rosemary Aparecida Roque por toda orientação, confiança e a oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao Dr. João Antonio Cyrino Zequi da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e a Dra. Joelma Soares da Silva da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) por todo apoio desde o início da minha carreira na pesquisa, pela grande amizade consolidada e por todos os ensinamentos, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

A Dra. Iléa Brandão Rodrigues e a Dra. Eleilza Litaiff de Abreu pela amizade e relevante contribuição para a realização deste trabalho, ensinamentos e discussão que me fizeram crescer.

A futura Mestre em genética Thamiles das Chagas Gonçalves, uma grande amiga que ganhei quando entrei nesta jornada, cuja a parceria foi um ponto essencial para o desenvolvimento deste trabalho, mas a troca de conhecimentos e a amizade foram muito mais importantes, pois me fizeram crescer profissionalmente e como pessoa.

A toda equipe do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue, em especial aos amigos: Leandro França, Adriano Nobre, Augusto Ferreira e

Cláudia Tavares pela parceria e apoio concedido em todos os momentos, e também aos amigos: Maria, Eunice, Elerson, Marta, Ricardo, Juan, Vera, Deidre, Laura, Sirley, Grafe, Janaina, Joaquim e aos meus estagiários Thiago Ferreira e Verônica Gonçalves.

Ao técnico Mestre Juracy de Freitas Maia, um grande amigo que ganhei nesta caminhada, sendo um parceiro por todo auxílio prestado e pela paciência de ajudar sempre que precisei.

Aos técnicos João Coelho, Walnir, Orlando e Elias do departamento de logística do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), bem como ao técnico Nonato do Laboratório de Malária e Dengue, por toda paciência e apoio nas coletas em campo.

A Mestre Rejane Simões pelo auxílio prestado na criação de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller.

A Mery Jouse e Juciane pela amizade e apoio concedido desde a época de preparação para a seleção do mestrado.

Aos amigos Daniel do Carmo e Ana Cláudia por toda a troca de informações e relevantes considerações realizadas no manuscrito.

Aos colegas da turma de Entomologia 2017, em especial aos amigos Mônica Kalid Pedroza e Matheus Bento.

Aos meus irmãos José e Hellen, assim como ao meu primo Rafael, que sempre me incentivaram a continuar firme na minha jornada.

A minha mãe Maria de Jesus e minha avó Raimunda Pereira (*in memoriam*) pelos ensinamentos, amor, apoio e conselhos concedidos, que foram fundamentais para continuar sempre firme e forte em busca dos meus objetivos.

*“ Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica:  
a vontade”.*

**(Albert Einstein)**

## RESUMO

O controle de mosquitos vetores com inseticidas é a ferramenta mais eficiente para conter a transmissão de patógenos, sendo o biolarvicida espinosade um dos agentes de controle mais utilizados no mundo, devido à sua alta toxicidade para insetos de diferentes ordens. Neste aspecto, é importante monitorar a eficácia do produto ao longo de gerações, para poder direcionar melhores estratégias de controle. O presente estudo objetivou verificar a taxa de resistência de *Aedes aegypti* submetido à pressão de seleção com o larvicida espinosade, em condições de laboratório, além de analisar os efeitos desta exposição em aspectos do desenvolvimento e da reprodução. A seleção foi realizada por seis gerações, com análises nos parâmetros biológicos das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. A CL<sub>50</sub> (0,036 mg/L) utilizada nos testes, aumentou nas gerações F<sub>3</sub> (0,114 mg/L) e F<sub>6</sub> (0,101 mg/L) da população pressionada com o biolarvicida, com diferenças significativas entre F<sub>1</sub> e F<sub>3</sub> (p= 0,0019), e entre F<sub>1</sub> e F<sub>6</sub> (p= 0,0187). No entanto, não houve diferença significativa entre os valores da F<sub>3</sub> e F<sub>6</sub> (p>0,05). Os valores de Razão de Resistência (RR) obtidos neste estudo (1,1; 1,3; 2,8; 3,2) foram considerados baixos. O tempo médio do estágio larval e do ciclo biológico da população pressionada foram maiores na F<sub>6</sub> em comparação a população controle (p= 0,0001). O peso corporal das fêmeas da população pressionada nas duas condições avaliadas (antes e após o repasto) foi inferior ao das fêmeas da população controle (p= 0,0001). A taxa de oviposição das fêmeas da população pressionada oriundas da F<sub>2</sub> foi baixa em comparação à da população controle (p= 0,0001). Contudo, mesmo ocorrendo alteração da CL<sub>50</sub> ao longo das gerações, a população ainda é considerada com baixo nível de resistência ao biolarvicida, de acordo com os valores de RR e os parâmetros da OMS. Portanto, novos experimentos são necessários para analisar a evolução da resistência, em laboratório. Além disso, após seis gerações, o espinosade afetou negativamente o tempo médio do estágio larval e do ciclo de vida de *A. aegypti*, demonstrando que os insetos da população pressionada demoraram mais tempo para se desenvolver. Além do mais, o peso corporal das fêmeas antes e após o repasto, bem como a fecundidade, foram prontamente reduzidos. Evidenciando que o larvicida afetou aspectos reprodutivos, os quais são relacionados a capacidade vetorial da espécie.

**Palavras chave:** Suscetibilidade, Inseticidas, Arboviroses, Controle biológico.



## ABSTRACT

The control of mosquito vectors with insecticides is the most efficient tool to contain the transmission of pathogens, with spinosad biolarvicida being one of the most used control agents in the world due to its high toxicity to insects of different orders. In this regard, it is important to monitor the effectiveness of the product over generations to be able to target better control strategies. This study aimed to verify the resistance rate of *Aedes aegypti* submitted to selection pressure with larvicide spinosad under laboratory conditions, and to analyze the effects of this exposure on developmental and reproductive aspects. The selection was performed for six generations, with analyzes on the biological parameters of generations F<sub>2</sub> and F<sub>6</sub>. The LC<sub>50</sub> (0.036 mg/L) used in the tests increased in the F<sub>3</sub> (0.114 mg/L) and F<sub>6</sub> (0.101 mg/L) generations of the biolarvicide pressured population, with significant differences between F<sub>1</sub> and F<sub>3</sub> (p= 0.0019), and between F<sub>1</sub> and F<sub>6</sub> (p= 0.0187). However, there was no significant difference between F<sub>3</sub> and F<sub>6</sub> values (p> 0.05). The Resistance Ratio (RR) values obtained in this study (1.1; 1.3; 2.8; 3.2) were considered low. The mean time of the larval stage and the biological cycle of the population exposed to the biolarvicida were higher in F<sub>6</sub> compared to the control population (p= 0.0001). The body weight of the females of the population exposed to the biolarvicida in the two conditions evaluated (before and after the repast) was lower than the control females (p= 0.0001). The oviposition rate of the females of the population exposed to the biolarvicida from F<sub>2</sub> was low in comparison to the control population (p= 0.0001). However, even if the LC<sub>50</sub> changes over the generations, the population is still considered to have a low level of resistance to the biolarvicide, according to the RR values and WHO parameters. Therefore, new experiments are needed to analyze the evolution of resistance in the laboratory. In addition, after six generations, spinosad negatively affected the mean larval stage and life cycle time *A. aegypti*, demonstrating that the insects of the pressured population took longer to develop. In addition, females body weight before and after the meal, as well as fecundity, were promptly reduced. Evidencing that larvicide affected reproductive aspects, which are related to the vector capacity of the species.

**Keywords:** Susceptibility, Insecticides, Arbovirus, Biological control.

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1. Mosquitos e importância médica .....	18
1.2. <i>Aedes aegypti</i> : aspectos gerais .....	19
1.3. Métodos de controle.....	21
1.4. Resistência aos inseticidas e os mecanismos envolvidos .....	25
1.5. Efeito da resistência a inseticida no <i>fitness</i> de insetos.....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1. Geral.....	29
2.2. Específicos .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1. Coleta de ovos de <i>Aedes aegypti</i> em campo .....	30
3.2. Manutenção de imaturos de <i>Aedes aegypti</i> coletados nas diferentes regiões da cidade de Manaus, em condições de laboratório .....	31
3.3. Bioensaios quantitativos com <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller .....	33
3.4. Bioensaio de concentração diagnóstica com a população de <i>Aedes aegypti</i> coletada em campo.....	34
3.5. Bioensaios quantitativos com a população de <i>Aedes aegypti</i> coletada em campo .....	35
3.6. Criação de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório e exposição ao biolarvicida espinosade .....	35
3.7. Bioensaios quantitativos com larvas de <i>Aedes aegypti</i> , das gerações F <sub>3</sub> e F <sub>6</sub> , expostas ao espinosade e controle .....	38
3.8. Ensaios para avaliação de aspectos reprodutivo e do desenvolvimento.....	39

3.8.1. Ciclo de vida dos mosquitos.....	39
3.8.2. Tempo médio do estágio larval: .....	39
3.8.3. Tempo médio do estágio de pupa.....	39
3.8.4. Peso corporal das fêmeas antes e após o repasto sanguíneo .....	40
3.8.5. Taxa de oviposição.....	41
3.9. Análise de dados .....	42
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1. Porcentagem de mortalidade e estimativa das CL <sub>50</sub> e CL <sub>99</sub> em mg/L para <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller.....	43
4.2. Concentração diagnóstica .....	44
4.3. Porcentagem de mortalidade e estimativa da CL <sub>50</sub> em mg/L para larvas da geração F <sub>1</sub> , procedentes da população de <i>Aedes aegypti</i> coletada em campo .....	44
4.4. Nível de resistência da linhagem de <i>Aedes aegypti</i> exposta ao biolarvicida espinosade, em condições de laboratório.....	46
4.5. Estimativa da CL <sub>50</sub> em mg/L do biolarvicida espinosade nas gerações F <sub>1</sub> e F <sub>6</sub> da população de controle .....	47
4.6. <i>Fitness</i> : Parâmetros de desenvolvimento.....	47
4.7. <i>Fitness</i> : Parâmetros reprodutivos.....	50
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>80</b>

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1.** Estimativa das concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{99}$ ) e intervalo de confiança de 95%, no período de 24 e 48 horas para o biolarvicida espinosade com toxicidade para larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, em condições de laboratório. .... 44
- Tabela 2.** Estimativa da  $CL_{50}$  e intervalo de confiança de 95%, no período de 24 e 48 horas para o biolarvicida espinosade com toxicidade para larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. .... 45
- Tabela 3.** Estimativa da  $CL_{50}$  e intervalo de confiança de 95% nas gerações  $F_3$  e  $F_6$  da população de *Aedes aegypti* pressionada com o biolarvicida espinosade, em condições de laboratório. .... 46
- Tabela 4.** Estimativa da  $CL_{50}$  e intervalo de confiança de 95% do biolarvicida espinosade nas gerações  $F_1$  e  $F_6$  da população controle, em condições de laboratório. . 47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: CDC (2018).....	20
<b>Figura 2.</b> Modo de ação da bactéria <i>Saccharopolyspora spinosa</i> , no sistema nervoso central das larvas dos insetos. Silva e Gonçalves (2019). .....	24
<b>Figura 3.</b> Ovitampa utilizada para a coleta de ovos de <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: Silva (2019). .....	30
<b>Figura 4.</b> Acondicionamento das palhetas em laboratório: A) Palhetas com ovos de <i>Aedes</i> spp.; B) Contagem de ovos em microscópio estereoscópico. Fonte: Silva (2019). .....	31
<b>Figura 5.</b> Criação de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório: A) Palhetas com ovos imersas em bandeja de plástico com água destilada para obtenção de larvas; B) Criação de imaturos de <i>Aedes</i> spp.; C) Captura, identificação e inserção de adultos em gaiolas de papelão; D) Repasto sanguíneo com <i>hamster</i> anestesiado; E) Acondicionamento de papéis filtro contendo ovos da geração F <sub>1</sub> ; F) Ovos imersos em bandeja de plástico com água destilada para eclosão de larvas. Fonte: Silva (2019).....	33
<b>Figura 6.</b> Disposição dos copos plástico contendo larvas de <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller na realização de um bioensaio quantitativo. Fonte: Silva (2019). .....	34
<b>Figura 7.</b> Cruzamento realizado para a obtenção das gerações referente às linhagens do insetário espinosade e controle. F= Gerações; G= Gaiolas. Fonte: Gonçalves e Silva (2019). .....	36
<b>Figura 8.</b> Disposição das bandejas de plástico contendo larvas de <i>Aedes aegypti</i> na realização do bioensaio de pressão de seleção. Fonte: Silva (2019). .....	38
<b>Figura 9.</b> Criação, manutenção e análise do ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> : A) Acondicionamento de papéis filtro, contendo ovos das gerações F <sub>2</sub> e F <sub>6</sub> expostas ao espinosade e indivíduos controle; B) Ovos imersos em bandeja de plástico com água destilada para eclosão de larvas; C) Disposição dos copos plástico, contendo larvas de <i>A. aegypti</i> para avaliação do ciclo de vida dos mosquitos. Fonte: Silva (2019). .....	39

**Figura 10.** Criação dos adultos e pesagem da proporção de sangue ingerido: A) Acondicionamento de papéis filtro contendo ovos das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub> do insetário espinosade e controle; B) Ovos imersos em bandeja de plástico com água destilada para eclosão de larvas; C) Disposição de vasilhas de plástico contendo água destilada, larvas e alimento; D) Gaiolas de papelão contendo fêmeas do grupo controle e pressionado; E) Grupo de fêmeas submetidas ao repasto sanguíneo e grupo de fêmeas sem repasto; F) Fêmeas de cada insetário (espinosade e controle) pesadas na balança analítica. Fonte: Silva (2019).

..... 40

**Figura 11.** Criação dos adultos e contagem de ovos: A) Gaiola de papelão contendo 60 machos e 60 fêmeas; B) Fêmeas de *Aedes aegypti* realizando o repasto sanguíneo em *hamster* anestesiado; C) Disposição dos copos plásticos contendo água destilada, papel filtro e uma fêmea de *A. aegypti*; D) Quantificação dos ovos em microscópio estereomicroscópio. Fonte: Silva (2019)..... 41

**Figura 12.** Comparação da mortalidade entre 24 e 48 horas das larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, nos bioensaios com o biolarvicida espinosade, em condições de laboratório. Letras diferentes entre as linhas (tempo de observação) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para cada concentração de acordo com o teste de Mann-Whitney.

..... 43

**Figura 13.** Comparação da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* da geração F<sub>1</sub>, entre os intervalos de 24 e 48 horas, nos bioensaios com o biolarvicida espinosade, em condições de laboratório. Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para cada concentração entre os tempos de observação de acordo com o teste t de Student ou Mann-Whitney. .... 45

**Figura 14.** Tempo de médio de duração do estágio larval de *Aedes aegypti* oriundos das amostras controle e das pressionadas, procedentes da F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as populações dentro de cada geração para o teste de Mann-Whitney. .... 48

**Figura 15.** Tempo médio de duração do estágio de pupa dos insetos oriundos da população controle e da pressionada, procedentes da F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre *Aedes aegypti* dentro de cada geração para o teste t de Student ou Mann-Whitney. .... 49

**Figura 16.** Tempo de desenvolvimento de *Aedes aegypti* oriundo da população controle e pressionada, procedentes das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre *A. aegypti* dentro de cada geração para o teste t de Student ou Mann-Whitney. .... 50

**Figura 17.** Peso corporal das fêmeas de *Aedes aegypti* controle e pressionado. A) Antes do repasto sanguíneo; B) após realizar o repasto sanguíneo. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras dentro de cada geração para o teste t de Student ou Mann-Whitney. .... 51

**Figura 18.** Média de ovos obtidos de *Aedes aegypti* controle e pressionado, provenientes das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras dentro de cada geração para o teste t de Student. .... 52

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*CDC – Centers for Disease Control and Prevention*

SEMSA – Secretária Municipal de Saúde

FVS – Fundao de Vigilância em Saúde

IC – Intervalo de Confiança

mg/L – Miligrama por litros

° C = Graus Celsius

OMS – Organizao Mundial de Saúde

SISBIO – Sistema de Autorizao e Informao em Biodiversidade

*WHO – World Health Organization*

*WRBU – Walter Reed Biosystematics Unit*

LCBBMD – Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue

RR – Razão de Resistência

MS – Ministério da Saúde

*IGRs – Insect Growth Regulators*

GABA – cido gama-aminobutírico

CL – Concentrao Letal

LIRAA – Levantamento Rápido do ndice de Infestao por *A. aegypti*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CEUA – Comissão de tica no Uso de Animais do INPA



SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias

F – Gerações

G – Gaiolas

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Mediana

$\chi^2$  – qui-quadrado

GL – Graus de Liberdade

SE – Erro padrão.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Mosquitos e importância médica

Os culicídeos popularmente conhecidos como mosquitos, pertencentes à família Culicidae, compreendem 3.563 espécies classificadas nas subfamílias Anophelinae e Culicinae. Estes insetos ocorrem nas cinco regiões biogeográficas do globo terrestre, sendo em ambientes de florestas tropicais, encontrada a maior diversidade de espécies (Harbach 2019; WRBU 2019).

Muitas espécies de mosquitos são vetores de agentes patogênicos ao homem, tais como bactérias, vírus, protozoários e nematódeos, causadores de importantes doenças que acometem em torno de 60% da população humana (Ferreira e Castro 2016; Fritzell *et al.* 2018; Merle *et al.* 2018). Entre as principais enfermidades que afetam os humanos, estão a Filariose, Febre Amarela Urbana, Dengue, Febre de Chikungunya e mais recentemente, doença aguda contraída pelo vírus Zika, todas bem difundidas e com muitos casos registrados nas Américas (Ebi e Nealon 2016; Donalisio *et al.* 2017; PAHO/WHO 2019).

Os mosquitos do gênero *Aedes* Meigen 1818 estão entre os principais transmissores de agentes etiológicos ao homem, sendo as espécies *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762 e *A. (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 consideradas as mais importantes do grupo, devido às implicações na transmissão de muitos arbovírus (Vega-Rua *et al.* 2014; Campbell *et al.* 2015; Marcondes e Ximenes 2016; Gould *et al.* 2017; Leta *et al.* 2018).

No Brasil, o *A. aegypti* possui grande importância epidemiológica, pois é responsável por transmitir doenças, tais como a Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela Urbana, responsáveis por elevado número de internações e óbitos (Lima-Camara 2016; SVS/MS 2019). Além de causarem prejuízos à saúde pública, essas enfermidades impactam a economia, resultando na diminuição da mão de obra e tratamento de pessoas doentes (Stahl *et al.* 2013; Shepard *et al.* 2014, 2015; Calvo *et al.* 2016; Patterson *et al.* 2016; Loconsole *et al.* 2018). O vírus Zika que adentrou primeiro na América Central e posteriormente na América do Sul, foi registrado pela primeira vez no Brasil em Salvador, capital do Estado da Bahia, onde ganhou grande notoriedade científica, principalmente por sua relação com a microcefalia (Campos *et al.* 2015; Zanluca *et al.* 2015; França *et al.* 2016; Duarte *et al.* 2017; Araújo *et al.* 2018) e a

síndrome de Guillain-Barré (Araújo *et al.* 2016; Salinas *et al.* 2017; Styczynsk *et al.* 2017), ambas consideradas graves.

O número de pessoas doentes em consequência destas arboviroses tem aumentado muito nos últimos anos. No Brasil, por exemplo, o número de casos por Febre Amarela quase duplicou em quatro anos, resultando em 778 casos entre 2016, com 262 mortes, para 1.376 casos, incluindo 483 mortes em 2019. Entre dezembro de 2018 a janeiro de 2019, 361 casos confirmados, incluindo oito mortes foram registradas em 11 municípios de dois estados do país (WHO 2019).

De acordo com os resultados da última semana epidemiológica (50<sup>a</sup>) do Ministério da Saúde, o número de casos prováveis de Dengue, Chikungunya e Zika desde dezembro 2018 a março de 2019 foram 273.193, 15.352 e 2.344, respectivamente (SVS/MS 2019). Com relação ao número de doentes pela Síndrome de Guillain-Barré (SGB), 1.708 casos foram registrados entre janeiro e novembro de 2015 no país, consistindo em três vezes mais internações por SGB que em 2014 (WHO 2016; Araújo *et al.* 2016; Malta *et al.* 2017; Nóbrega *et al.* 2018).

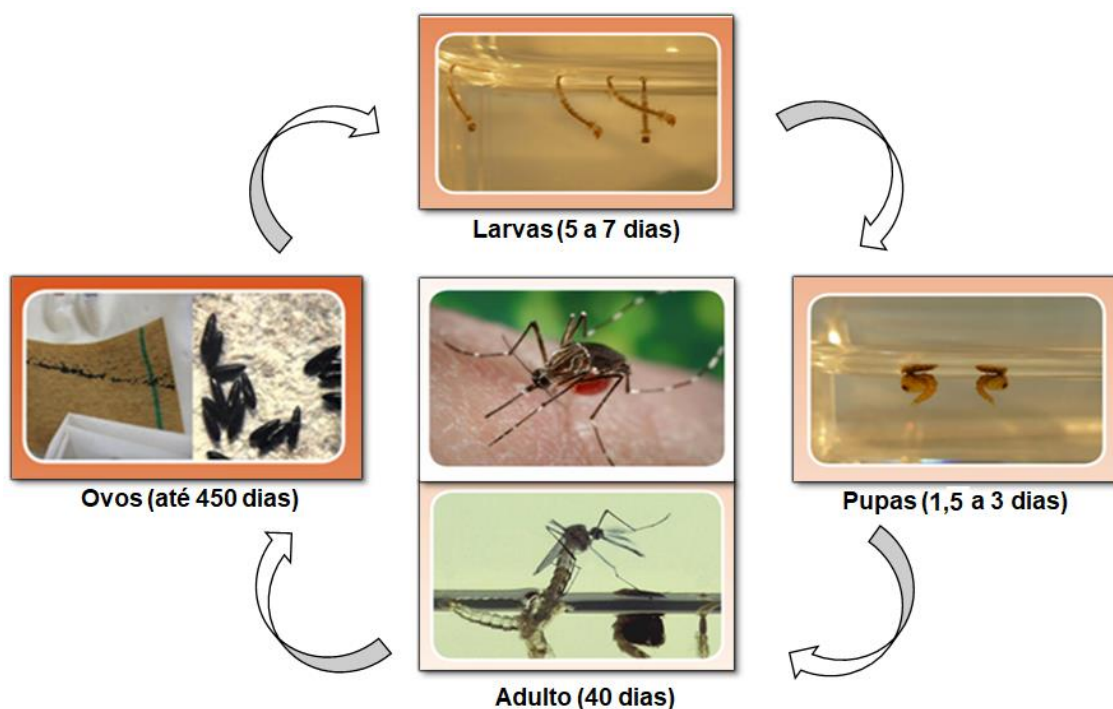
Neste contexto, ressalta-se alguns fatores principais de difusão de arboviroses como fluxo populacional constante em grandes cidades, ausência de saneamento básico adequado favorecendo a proliferação dos vetores, ressaltando entre estes o *A. aegypti*, além da ausência de educação em saúde nas escolas e da população em geral (Bhatt *et al.* 2013).

## **1.2. *Aedes aegypti*: aspectos gerais**

O mosquito *A. aegypti* é nativo da África e, posteriormente, se propagou para os demais continentes por meio de navios de comércio de escravos e, recentemente esta espécie se encontra distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Kamal *et al.* 2018; Powell *et al.* 2018). No Brasil, este mosquito adentrou possivelmente entre os séculos XVI até meados do século XIX e, atualmente, é registrado em todos os estados e no Distrito Federal (Braga e Valle 2007; Carvalho e Moreira 2017). Em Manaus, capital do Estado do Amazonas, o primeiro registro foi em novembro de 1996 nos bairros Praça 14 de Janeiro e São José e, em 1997, estava presente em 15 Bairros, incluindo todo o centro da cidade. No ano seguinte, a espécie se expandiu para 21 bairros, ocasionando consequentemente, a primeira epidemia de Dengue provocada pelo sorotipo 1 (Pinheiro e Tadei 2002). Alguns fatores ambientais e antropogênicos foram determinantes para a propagação e permanência desta espécie, além disso, a capacidade

dos ovos em resistir às condições adversas por um longo período, em virtude de um processo denominado quiescência, foi fundamental para o processo de dispersão (Soares-Pinheiro *et al.* 2017; Dickens *et al.* 2018).

A espécie possui o desenvolvimento do tipo holometábolo, ou seja, passa pelos estágios de ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (Figura 1). O ciclo de vida desde o ovo até a emergência do adulto ocorre em um período de 7 a 14 dias, dependendo das condições climáticas, da disponibilidade de alimentos e quantidade de larvas presentes no mesmo criadouro (Clements 1992; Forattini 2002; Carvalho e Moreira 2017).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Aedes aegypti*. **Fonte:** CDC (2018).

Após a emergência, os adultos realizam a cópula e alimentam-se de substâncias açucaradas como as extraídas do néctar e seiva, o que constitui parte essencial da dieta destes mosquitos. As fêmeas realizam ainda o repasto sanguíneo, o que proporciona o desenvolvimento de seus ovariolos e, conseqüentemente, o desenvolvimento e maturação dos ovos. Este comportamento hematófago ocorre ao amanhecer e pouco antes do anoitecer, mas pode ser realizado a qualquer hora do dia, caso o hospedeiro venha se aproximar de seu abrigo (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Forattini 2002; Lourenço-de-Oliveira 2015).

Morfologicamente, os adultos podem ser identificados por apresentarem um clipeo com dois tufo de escamas branco-prateadas e o escudo ornamentado com

escamas branco-prateadas formando um desenho em formato de lira. Além disso, para a diferenciação do sexo, utiliza-se a morfologia da antena e a estrutura do aparelho bucal, ou seja, os machos podem ser identificados por apresentarem antenas do tipo plumosa e palpos longos e as fêmeas por possuírem antenas do tipo filiforme e palpos curtos (Harbach 2019; WRBU 2019).

Considerando as circunstâncias enfrentadas, como a suscetibilidade de transmissão dos agentes patogênicos, associado aos aspectos biológicos desse artrópode e a grande quantidade de criadouros artificiais disponíveis, que favorece o desenvolvimento deste vetor, diversos métodos de manejo foram desenvolvidos para controle das formas imaturas e os adultos desta espécie (Braga e Valle 2007; Zara *et al.* 2016; Carvalho e Moreira 2017; Silva *et al.* 2018). Neste sentido, torna-se relevante o equacionamento das estratégias de controle a serem implementadas, as quais são específicas para as condições locais, de onde ocorre a transmissão dos patógenos, considerando o foco no vetor.

### **1.3. Métodos de controle**

Estudos acerca da biologia de *A. aegypti*, têm mostrado diversas estratégias para controle dos diferentes estágios do ciclo biológico deste inseto. Estas medidas consistem em ações educacionais, mecânicas, químicas e biológicas (Braga e Valle 2007; Boyer *et al.* 2012; Baldacchino *et al.* 2015; Benelli *et al.* 2016; Achee *et al.* 2019).

As ações educacionais buscam conscientizar as pessoas sobre os locais e atividades que visam modificar os ambientes propícios à sobrevivência da população de mosquitos e podem ainda ser complementadas com outras medidas do controle integrado (Santos *et al.* 2017; Souza *et al.* 2018). Ações mecânicas consistem na adoção de práticas capazes de eliminar os mosquitos e os criadouros, reduzindo desta forma o contato do homem com o vetor no ambiente urbano (MS 2009; Zara *et al.* 2016; Carvalho e Moreira 2017).

Em ações químicas, são utilizadas substâncias de origem orgânica ou inorgânica, sendo a estratégia mais utilizada para o controle de mosquitos vetores e insetos considerados pragas na agricultura. Os principais produtos químicos estão relacionados às classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides que agem no

sistema nervoso central, assim como os reguladores de crescimento de insetos (IGRs) (Braga e Valle 2007; Boyer *et al.* 2012; Valle *et al.* 2015; Roiz *et al.* 2018).

Os organoclorados foram os inseticidas mais utilizados pelos programas de controle da malária, durante a segunda guerra mundial. O exemplo mais conhecido desta classe é o DDT (dicloro-difenil-tricloro-etano), e o seu uso contínuo ocasionou muitos prejuízos ao ambiente, à fauna associada e aos seres humanos. Considerando estes resultados, o DDT foi excluído do programa de controle da malária, pelo Ministério da Saúde do Brasil (Bisset 2002; Moreira *et al.* 2012; Shaw e Catteruccia 2018).

Os organofosforados são os inseticidas considerados mais benéficos em relação aos produtos químicos da classe organoclorados, pois podem ser destruídos pela ação de agentes biológicos, além de não se concentrarem nos tecidos. A sua desvantagem é por ser quimicamente instável e desta forma precisa ser aplicado frequentemente. Além disso, são tóxicos para os vertebrados, mesmo em concentrações consideradas baixas. O grupo mais conhecido desta classe é o temefós, o qual foi utilizado durante anos no controle de *A. aegypti* em áreas urbanas (Braga e Valle 2007; Valle *et al.* 2015).

Os carbamatos são compostos orgânicos, divididos em classes como inseticidas, herbicidas e fungicidas, sendo os principais representantes o carbaril, carbofurano, metiocarbe, indoxacarbe e furatiocarbe. Estes produtos sintéticos são considerados bastantes letais para os insetos de importância médica e agrícola, porém em decorrência da utilização contínua, também ocasionou impacto ao ambiente, aos animais, além da seleção de insetos naturalmente resistentes (Bisset 2002; Moreira *et al.* 2012).

Os piretróides são compostos químicos que têm origem do piretro, uma substância natural produzida pelas plantas do gênero *Chrysanthemum*. Este inseticida foi utilizado como alternativa ao organofosforado, pois possui eficiência no controle de mosquitos adultos (Nkya *et al.* 2013). A contaminação do meio ambiente, a eliminação de artrópodes aquáticos, fizeram os produtos entrarem em decadência (Devine *et al.* 2008; Zara *et al.* 2016).

Outra classe de inseticida são os IGRs (*Insects Growth Regulators*), que interferem na substituição do exoesqueleto. Estes produtos atuam na fase imatura dos artrópodes, prolongado o tempo de permanência neste estágio, impedindo desta forma a emergência dos adultos (Resende e Gama 2006; Braga e Valle 2007; Gilbert 2010; Costa e Tadei 2011, 2012; Menn 2012; Shaw e Catteruccia 2018). Alguns estudos sobre o efeito de IGRs foram realizados, objetivando analisar a resistência de *A. aegypti* frente

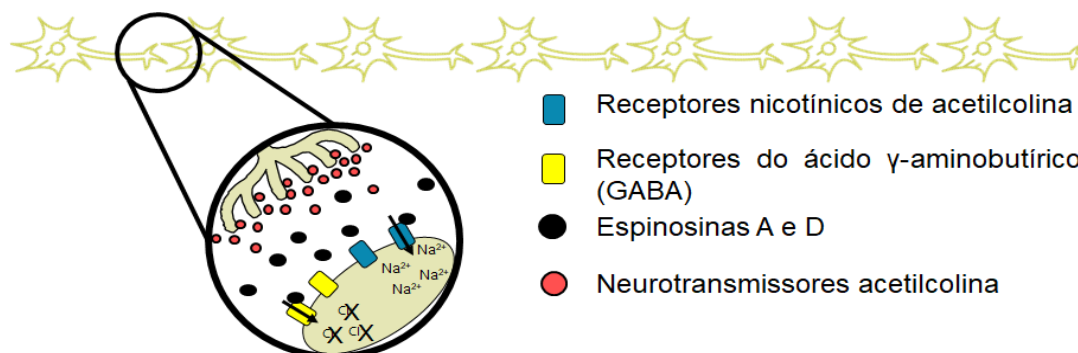
a estes compostos, associando com alguns parâmetros biológicos das populações utilizadas, porém alguns inseticidas desta classe ainda são utilizados como alternativas potenciais para o controle deste mosquito (Belinato *et al.* 2009; Belinato e Valle 2015).

Em decorrência dos efeitos negativos ocasionados pelo uso contínuo e errôneo dos inseticidas químicos, procurou-se utilizar alternativas consideradas ecologicamente mais seguras e eficientes, para controlar insetos de importância médica e agrícola. Em meio a estas, ressalta-se os agentes bióticos, tais como algumas espécies de peixes e insetos predadores, além de protozoários, bactérias, fungos, crustáceos, entre outros (Lopes 1999; Forattini 2002; Cavalcanti *et al.* 2007; Darbro *et al.* 2011; Boyer *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 2015; Soares-da-Silva *et al.* 2015; Benelli *et al.* 2016; Huang *et al.* 2017; Roiz *et al.* 2018; Seidlein *et al.* 2017; Thomas 2018).

Dentre os organismos utilizados no controle biológico, a bactéria *Saccharopolyspora spinosa* Merts e Yao 1990 é uma das mais empregadas em vários países, incluindo o Brasil, pois possui atividade tóxica para insetos de diferentes ordens (Hertlein *et al.* 2010; Allal-Benfekih *et al.* 2013; Bacci *et al.* 2016; Dias *et al.* 2017; Raghavendra e Velamuri 2018). Este agente microbiano sintetiza nove metabólitos secundários (A-H e J) denominados espinosinas, sendo os compostos orgânicos A (componente principal) e D (componente secundário) os que possuem maior atividade inseticida e ainda são produzidas em grande quantidade. O produto biológico à base desta bactéria é designado comercialmente espinosade, o qual é constituído pelos dois metabólitos que apresentam maior atividade biológica (Salgado 1998; Huseyin *et al.* 2005; Salgado e Sparks 2010; Dias *et al.* 2017).

O modo de ação deste entomopatógeno consiste em atuar no sistema nervoso central das larvas dos insetos, especificamente nos receptores nicotínicos de acetilcolina e nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA). À princípio, a toxina atua como agonista nos receptores nicotínicos de acetilcolina, ocasionando a abertura dos canais de sódio de forma permanente e, posteriormente, como antagonista nos receptores do GABA, promovendo o fechamento dos canais de cloro. Em virtude de ser uma toxina diferente que se liga em ambos receptores, esta não é reconhecida e degradada pela enzima acetilcolinesterase, permitindo com isso a passagem constante de cátions, resultando desta forma na transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos, o que causa estremeção, paralisia e morte do organismo (Figura 2) (Salgado 1998; Thompson *et al.* 2000; Watson 2001; Orr *et al.* 2009). O fato das espinosinas atuarem em sítios alostéricos nos receptores nicotínicos de acetilcolina, evita a ocorrência de

resistência cruzada com outros tipos de inseticidas que possuem modo de ação similar (Bacci *et al.* 2016; Dias *et al.* 2017).



**Figura 2.** Modo de ação da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, no sistema nervoso central das larvas dos insetos. Silva e Gonçalves (2019).

Apesar deste agente de controle ser de origem biológica, a grande preocupação em utilizá-lo no controle de insetos é o impacto negativo ao meio ambiente e à fauna associada, uma vez que o produto biológico à base desta bactéria não é seletivo e, por isso afeta os artrópodes benéficos que vivem nos ecossistemas terrestres e aquáticos (Biondi *et al.* 2012; Lumaret *et al.* 2012; Duchet *et al.* 2015; Lawler 2017; Mossa *et al.* 2018; Monteiro *et al.* 2019).

Outro aspecto relevante é a seleção de insetos naturalmente resistentes, desencadeada em decorrência do uso a longo prazo e de maneira impropriedade deste biolarvicida. Este fato foi observado nas pragas agrícolas *Spodoptera exigua*, *Tribolium castaneum*, *S. litura* e *Drosophila suzukii* (Moulton *et al.* 2000; Rinkevich e Scott 2009; Rehan e Freed 2014; Gress e Zalom 2018) e também em populações de mosquitos, como o *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, em condições de laboratório (Su e Cheng 2012, 2014a, 2014b), populações de campo de *A. albopictus* de diferentes regiões do Paquistão (Khan *et al.* 2011) e, mais recentemente, de *A. aegypti* coletadas em regiões distintas da cidade de Vientiane, capital de Laos, situada no Sudeste Asiático (Marcombe *et al.* 2018).

Considerando esse cenário, torna-se proeminente entender que os produtos de origem biológica podem também ocasionar efeitos negativos aos ecossistemas, principalmente quando empregados de maneira errada pelos programas de manejo. Além disso, a influência direta na seleção de insetos naturalmente resistentes é outro fator desencadeado, uma vez que o processo de resistência é considerado complexo e



comumente depende de múltiplos fatores (poligênicos) para aparecer (Liu 2015; Bass 2017; Karunaratne *et al.* 2018).

#### **1.4. Resistência aos inseticidas e os mecanismos envolvidos**

Segundo a OMS (2016), a resistência é definida como a capacidade que um inseto tem de sobreviver a uma concentração do inseticida que é considerada letal para uma população suscetível. Esta característica rara presente em alguns organismos, é conferida por um ou mais alelos de resistência, que possibilitam a sobrevivência dos mesmos quando expostos a inseticidas (Feyereisen *et al.* 2015). Os mecanismos que conduzem o desenvolvimento da resistência são quatro (alterações comportamentais, penetração reduzida pela cutícula, resistência metabólica e alterações nas proteínas alvo), e estão relacionados ao polimorfismo na sequência do alelo (s) de resistência ou ainda por uma modificação na expressão deste (s) (Hemingway e Ranson 2000; Bisset 2002; Brengues *et al.* 2003; Paiva 2006; Braga e Valle 2007; Boyer *et al.* 2012; Nkya *et al.* 2013).

O mecanismo de resistência por alterações comportamentais é retratado como o reconhecimento de superfícies que foram expostas aos inseticidas e, desta forma o inseto evita entrar em áreas com o tratamento, o que pode ocasionar a redução de proliferação nos locais tratados, bem como a modificação do horário de repasto sanguíneo (Mathenge *et al.* 2001; Paiva 2006; Chareonviriyaphap *et al.* 2013; Gómez-Guzmán *et al.* 2017). Esse mecanismo é extremamente questionável, por conta de muitas suposições em todos os métodos utilizados para avaliar tais resultados. A hipótese fundamental para os que procuram compreender esse tipo de mecanismo é a existência de uma fundamentação genética relacionada a característica selecionada, onde tal comportamento é provavelmente determinado por vários genes, o que torna difícil que os efeitos de seleção sejam simples. Outra hipótese é relacionada a plasticidade genética do organismo, onde o efeito observado no inseto é uma consequência de alterações fisiológicas ou morfológicas de acordo com as condições do ambiente (Zalucki e Furlong 2017).

A resistência por penetração reduzida é ocasionada por mudanças na composição proteica do tegumento do inseto, o que conduz a uma diminuição da entrada do inseticida. Essa modificação na composição da cutícula ou aumento de sua espessura, ocasionada pela crescente deposição de macromoléculas estruturais (lipídeos epicuticulares e/ou proteínas cuticulares) pode retardar o acesso das moléculas do

inseticida a seus receptores-alvo dentro das células neuronais. Isso é importante para os insetos, pois possibilita que as enzimas de desintoxicação tenham mais tempo para agir, resultando em características fenotípicas de resistência mais fortes. Estas informações, quando associadas com a compreensão das propriedades moleculares dos inseticidas, são importantes para entender como o processo de seleção de insetos naturalmente resistentes pode acontecer mais rápido (Braga e Valle 2007; Balabanidou *et al.* 2018; Karunaratne *et al.* 2018; Simma *et al.* 2018).

A resistência metabólica é um dos principais mecanismos envolvidos na resistência a inseticidas, pois abrange várias enzimas responsáveis em eliminar substâncias tóxicas ou torná-las menos tóxicas ao organismo. As principais enzimas de desintoxicação envolvidas nesta resposta do inseto são as esterases, citocromo P450 (P450s) e glutathione S-transferases (GSTs) (Bisset 2002; Poletti e Omoto 2003; Braga e Valle 2007; Liu 2015; Karunaratne *et al.* 2018; Valbon *et al.* 2019).

Já a resistência a inseticidas por alterações no sítio-alvo, ocorrem pela diminuição ou dificuldade de ligação do composto com a molécula-alvo. Esta insensibilidade ao sítio-alvo pode ser ocasionada pelas modificações na estrutura destes ou uma mutação pontual de genes que codificam as proteínas-alvo que interagem com o inseticida. Uma vez modificadas as proteínas-alvo, estas não ocasionam o mesmo nível de resistência a todos os inseticidas que pertencem a um grupo específico. As principais alterações acontecem nos canais de sódio, nos receptores nicotínicos de acetilcolina e nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Braga e Valle 2007; Liu 2015; Karunaratne *et al.* 2018).

Neste contexto, é relevante que a resistência aos inseticidas seja considerada um importante processo evolutivo, tendo como modelo os mosquitos, devido as suas características para uma resposta rápida, como ciclos de vida curtos, com descendentes abundantes e outras características inerentes. Contudo, mesmo sendo um fenômeno pré-adaptativo, essa mutação de resistência tem implicações importantes nas funções fisiológicas dos insetos, em virtude da manutenção de populações resistentes no campo, o que ocasiona prejuízos nas campanhas de controle de vetores e na aptidão dos insetos que é prejudicado significativamente (Bass 2017; Viana-Medeiros *et al.* 2017; Karunaratne *et al.* 2018).

### 1.5. Efeito da resistência a inseticidas no *fitness* de insetos

A resistência aos inseticidas conduz ainda uma série de efeitos negativos nas características biológicas de uma população de insetos. Esses agravos podem ser observados em populações submetidas ao uso contínuo de inseticidas químicos e biológicos (Bourguet *et al.* 2004; Berticat *et al.* 2008; Paris *et al.* 2011; Li *et al.* 2017). No caso dos inseticidas biológicos, observou-se que há registros de resistência de alguns insetos pragas agrícolas ao biolarvicida espinosade, com reflexos negativos sobre as seguintes características biológicas: tamanho corporal, comportamento de alimentação, taxa de emergência dos adultos, fecundidade, eclosão de larvas e tempo de desenvolvimento do inseto (Li *et al.* 2007; Abbas *et al.* 2014; Li *et al.* 2017; Khan 2018).

Em mosquitos, até o momento, não há estudos relatando efeitos negativos em aspectos da biologia do inseto, em decorrência da resistência ao biolarvicida espinosade. Todavia, o trabalho de Romi *et al.* (2006) ressalta que larvas de *A. aegypti* suscetíveis ao biolarvicida espinosade quando expostas a altas concentrações (1 e 500 ppm) deste produto, ocasionam diminuições na taxa de oviposição e viabilidade dos ovos. Resultados semelhantes foram registrados recentemente por Fernandes *et al.* (2019), analisando larvas de *A. aegypti* suscetíveis ao mesmo larvicida tratadas com diferentes concentrações subletais, o que resultou em adultos com intestino danificado, influenciando diretamente na quantidade de sangue ingerido, assim como na taxa de oviposição e viabilidade de ovos.

Neste contexto, suportar a toxicidade dos inseticidas pode ser oneroso, exigindo energia para a alocação de recursos, garantindo a adaptação e sobrevivência do organismo. Vários mecanismos comportamentais, fisiológicos e genéticos são usados por insetos para diminuir o efeito das toxinas de agentes de controle, levando na maioria das vezes à resistência. Tais ações são dispendiosas e podem ainda ocasionar vários efeitos na aptidão do inseto (Kliot e Ghanim 2012; Bass 2017).

Diante dos problemas gerados a partir das epidemias de Dengue, Chikungunya e Zika no país, é fundamental analisar aspectos relacionados à utilização de biolarvicidas, aplicados de maneira contínua para o controle de vetores. Considerando o cenário atual de resistência do *A. aegypti* aos inseticidas químicos é importante avaliar agentes de controle considerados mais eficientes, menos agressivos ao meio ambiente, à saúde

humana e que não levem à seleção de populações resistentes (Benelli *et al.* 2016; Zara *et al.* 2016; Carvalho e Moreira 2017).

Neste sentido, alguns estudos têm ressaltado o impacto negativo ao meio ambiente, à fauna associada (Biondi *et al.* 2012; Lumaret *et al.* 2012; Duchet *et al.* 2015; Lawler 2017; Mossa *et al.* 2018; Monteiro *et al.* 2019), além da seleção de populações resistentes em virtude da utilização contínua e impeciente do produto biológico espinosade, à base da bactéria *S. spinosa*, utilizado durante anos em vários países para o controle de insetos de importância médica e agrícola (Khan *et al.* 2011; Su e Cheng 2012, 2014a, 2014b; Rehan e Freed 2014; Gress e Zalom 2018; Marcombe *et al.* 2018). Diante disso, é fundamental analisar os efeitos de aplicações contínuas sobre populações selvagens de *A. aegypti* para melhor recomendá-lo aos programas de controle oficiais do governo em situações pontuais.

Embora a resistência ao espinosade seja notificada em muitas espécies de insetos pertencentes a diferentes ordens, este é o primeiro estudo de pressão de seleção desse biolarvicida realizado em laboratório, utilizando a população de *A. aegypti* da cidade de Manaus - AM, com o propósito de analisar em seis gerações se este biolarvicida pode ocasionar a seleção de espécimes resistentes em curto prazo e, conseqüentemente, alterar algumas características biológicas dos mesmos.

A avaliação do efeito subletal na população de *A. aegypti* submetida à pressão de seleção em laboratório, permitirá entender melhor a dinâmica da resistência ao biolarvicida espinosade, assim como os possíveis efeitos sobre os aspectos biológicos do mosquito, tais como a sobrevivência de adultos oriundos de larvas expostas, a quantidade e viabilidade de ovos produzidos. Estas informações são extremamente relevantes, pois possibilitarão a elaboração de estratégias de controle alternativas, em um cenário que o inseticida empregado não apresenta mais o efeito desejado.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- ✓ Avaliar a taxa de resistência da população de *Aedes aegypti* da cidade de Manaus-AM, exposta ao biolarvicida à base da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, em condições de laboratório.

### 2.2. Específicos

- ✓ Verificar o nível de suscetibilidade da população de *A. aegypti* da cidade de Manaus, ao biolarvicida espinosade.
- ✓ Detectar as concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>) do biolarvicida e seus limites para as gerações F<sub>3</sub> e F<sub>6</sub>.
- ✓ Analisar a influência da pressão de seleção do biolarvicida nas características biológicas (taxa de oviposição, tempo médio do estágio larval, tempo médio do estágio de pupa, tempo de desenvolvimento do inseto e peso corporal das fêmeas antes e após o repasto sanguíneo), referente as gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta de ovos de *Aedes aegypti* em campo

A população de *A. aegypti* utilizada neste estudo foi obtida a partir de ovos coletados em um bairro de cada uma das regiões administrativas da cidade de Manaus (Norte, Sul, Leste, Oeste, Centro-Sul e Centro-Oeste). A escolha de cada bairro foi feita levando em consideração a maior densidade vetorial, segundo os resultados do Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *A. aegypti* (LIRAA) de 2017, realizado pela Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA/Prefeitura de Manaus 2017). A escolha de seis pontos de coleta objetivou amostrar de maneira representativa, a população de *A. aegypti* do município de Manaus, assim como minimizar ao máximo o endocruzamento, fator que pode aumentar a mortalidade dos organismos durante os testes de laboratório com estas populações. A autorização para as coletas foi concedida pelo SISBIO/21264-4/2017-2018.

As coletas foram feitas utilizando armadilhas de oviposição, também conhecidas como ovitrampas (Fay e Eliason 1966). Estas consistem em vasos plásticos de coloração preta e formato circular, medindo 9 x 11 cm, com capacidade de 500 mL (Figura 3). No interior das armadilhas foram utilizadas palhetas do tipo *Duratree*, marca Eucatex®, com 5 mm de espessura, 15 cm de comprimento por 3 cm de largura, colocadas verticalmente, com a superfície áspera do material para o lado externo, de modo a facilitar a ovipostura e adesão dos ovos. O principal atrativo nas armadilhas foi uma solução contendo infusão de gramínea (10%) (Reiter *et al.* 1991), com o volume total de 300 mL, obtida a partir de capim colônio (*Megathyrsus maximus* Jacq), fermentado em água de poço artesiano por sete dias em temperatura ambiente, com média anual de  $32^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.** Ovitrapa utilizada para a coleta de ovos de *Aedes aegypti*. Fonte: Silva (2019).

As cinco semanas de amostragens foram realizadas no período entre dezembro de 2017 e janeiro de 2018 (estação chuvosa). As amostragens foram iniciadas após o deferimento dos moradores no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 1). Trinta ovitrampas foram distribuídas em cada um dos pontos de coleta, perfazendo 180 armadilhas por semana. Em cada bairro foi selecionada aleatoriamente uma residência por quarteirão, totalizando 30 residências. A instalação das armadilhas foi feita no peridomicílio, ao nível do solo, abrigada do sol e da chuva, e em local com pouca movimentação de pessoas e animais.

A cada sete dias, as palhetas foram substituídas e encaminhadas para o insetário do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia de Malária e Dengue (LCBBMD), localizado no *Campus*, I do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As palhetas foram armazenadas, etiquetadas por localidade e colocadas para secar (Figura 4A). Em seguida, foi quantificado o número de palhetas positivas para a presença de ovos (Figura 4B), referente a cada bairro.



**Figura 4.** Acondicionamento das palhetas em laboratório: A) Palhetas com ovos de *Aedes* spp.; B) Contagem de ovos em microscópio estereoscópico. Fonte: Silva (2018).

### **3.2. Manutenção de imaturos de *Aedes aegypti* coletados nas diferentes regiões da cidade de Manaus, em condições de laboratório**

Ovos da primeira e segunda semana de coleta foram imersos em bandejas de plástico (45x30x7,5 cm), contendo água destilada para estimular a eclosão das larvas (Figura 5A). As bandejas foram identificadas conforme a região de coleta. Estas larvas foram mantidas no insetário em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controlado ( $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 80-90% e 12L:12D) e alimentadas com mistura de ração para gato

(Whiskas®) e roedores (Teklab global®) na proporção 1:1, triturada em partículas finas (Figura 5B). A água das bandejas foi trocada a cada três dias, para impedir a formação de película de gordura na superfície e, conseqüentemente, o crescimento bacteriano que pode ocasionar a morte das larvas. Todas as bandejas foram cobertas com tela do tipo filó para evitar a evasão dos mosquitos.

Após a emergência, os adultos foram capturados com capturador de Castro e a identificação da espécie foi realizada utilizando caracteres morfológicos externos, principalmente do tórax, com auxílio de microscópio estereoscópico ZEISS Stemi 2000 50X e chaves de identificação propostas por Forattini (2002), Harbach (2019) e WRBU (2019). Os adultos machos e fêmeas da mesma localidade foram colocados para copular em gaiolas de papelão (17 x 20 cm) (Figura 5C). Dois copos plásticos revestidos com tiras de papel filtro e preenchidos com 70 mL de água destilada foram utilizados como substrato para oviposição. Além disso, como fonte de carboidratos foi adicionado um *erlenmeyer* contendo rolo de gaze com pedaços de algodão no centro, embebido com água açucarada a 12%, assim que estivesse seco o algodão era substituído. O repasto sanguíneo foi realizado duas vezes por semana, durante 30 minutos com a utilização de *hamster* (*Mesocricetus auratus*) devidamente anestesiado, conforme o procedimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA: 054/2018 – “Criação de mosquitos vetores, em condições de laboratório”) (Figura 5D).

Ovos da geração F<sub>1</sub> foram colocados para secar sobre papel absorvente, durante 72 horas (Silva e Silva 1999) (Figura 5E) e, em seguida, foram imersos em recipientes contendo água destilada para a eclosão das larvas (Figura 5F). Estas foram alimentadas até atingirem o terceiro estágio, e utilizadas no bioensaio de concentração diagnóstica. Os mesmos procedimentos de criação foram realizados com *A. aegypti* cepa Rockefeller, linhagem cedida pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) do município de Marília, São Paulo. Estas larvas foram utilizadas como referência de suscetibilidade para comparação de mortalidade da população de *A. aegypti* coletada em campo. As larvas de terceiro instar proveniente da geração F<sub>54</sub> desta estirpe foram separadas para realização de bioensaios quantitativos.





**Figura 5.** Criação de *Aedes aegypti* em laboratório: A) Palhetas com ovos imersas em bandeja de plástico com água destilada para obtenção de larvas; B) Criação de imaturos de *Aedes* spp.; C) Captura, identificação e inserção de adultos em gaiolas de papelão; D) Repasto sanguíneo com *hamster* anestesiado; E) Acondicionamento de papéis filtro contendo ovos da geração F<sub>1</sub>; F) Ovos imersos em bandeja de plástico com água destilada para eclosão de larvas. Fonte: Silva (2019).

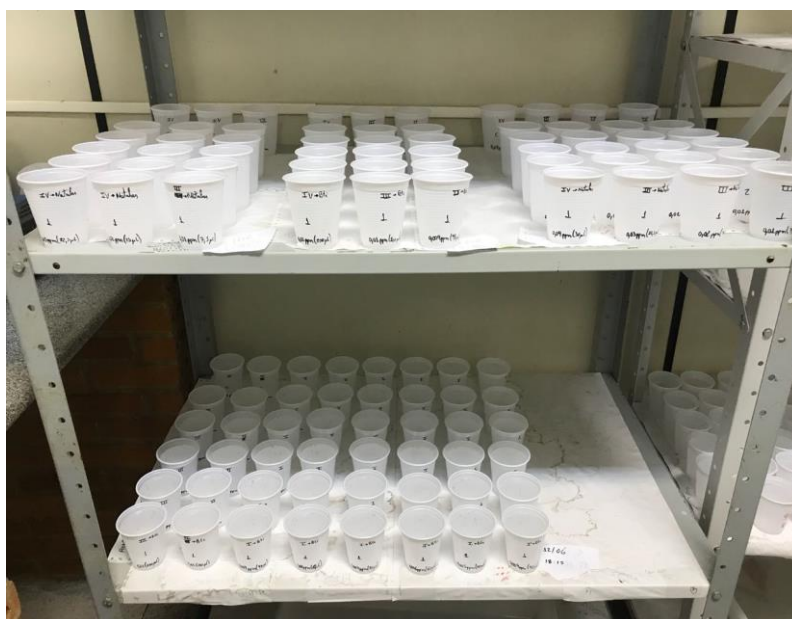
### 3.3. Bioensaios quantitativos com *Aedes aegypti* cepa Rockefeller

Os bioensaios quantitativos foram realizados para detectar a estimativa das Concentrações Letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>99</sub>) da formulação líquida do biolarvicida espinosade (Natar™ 20EC – 20,6% Spinosad a.i., Clarke Mosquito Control Products, Inc.). A primeira concentração foi utilizada no cálculo de Razão de Resistência e a última auxiliou como parâmetro para a obtenção da concentração diagnóstica do biolarvicida. Os bioensaios foram realizados conforme o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO 2005).

Os testes foram conduzidos com sete concentrações do biolarvicida (0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg/L) avaliadas de forma a obter 50-100% de mortalidade. Cada concentração foi realizada três vezes, em dias diferentes e em quintuplicata, que correspondeu a cinco copos plásticos com 150 mL de água destilada, 20 larvas de terceiro estágio, a quantidade correspondente de cada concentração do biolarvicida e alimento para larvas. Além disso, cada bioensaio era composto de um controle negativo,

com as mesmas condições de água, larvas e alimento, porém sem o biolarvicida (Figura 6). Em cada concentração foram utilizadas 360 larvas e as leituras eram realizadas em intervalos entre 24 e 48 horas, após aplicação do biolarvicida, com contagem de larvas vivas e mortas. Os recipientes foram mantidos em uma sala com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade 80-90% e fotoperíodo de 12L:12D.

As concentrações utilizadas em todos os bioensaios realizados nesse trabalho foram estabelecidas de acordo com as recomendações dos fabricantes.



**Figura 6.** Disposição dos copos plástico contendo larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller na realização de um bioensaio quantitativo. Fonte: Silva (2019).

### **3.4. Bioensaio de concentração diagnóstica com a população de *Aedes aegypti* coletada em campo**

Após constatar a estimativa da Concentração Letal ( $CL_{99}$ ) por meio dos bioensaios quantitativos com a cepa Rockefeller, o dobro desta concentração, referente ao intervalo de 48 horas, foi avaliado como concentração diagnóstica, para verificar o nível de suscetibilidade da população de *A. aegypti* da cidade de Manaus ao biolarvicida.

Os bioensaios foram realizados, conforme descrito no item 3.1, porém, utilizando larvas de terceiro instar proveniente da geração  $F_1$  e a quantidade correspondente do biolarvicida (dobro da  $CL_{99}$ ). Os experimentos foram conduzidos em

concordância com os parâmetros estabelecidos pela OMS para testes de inseticida e de suscetibilidade a larvicidas bacterianos, em condições de laboratório (WHO 1981, 2016).

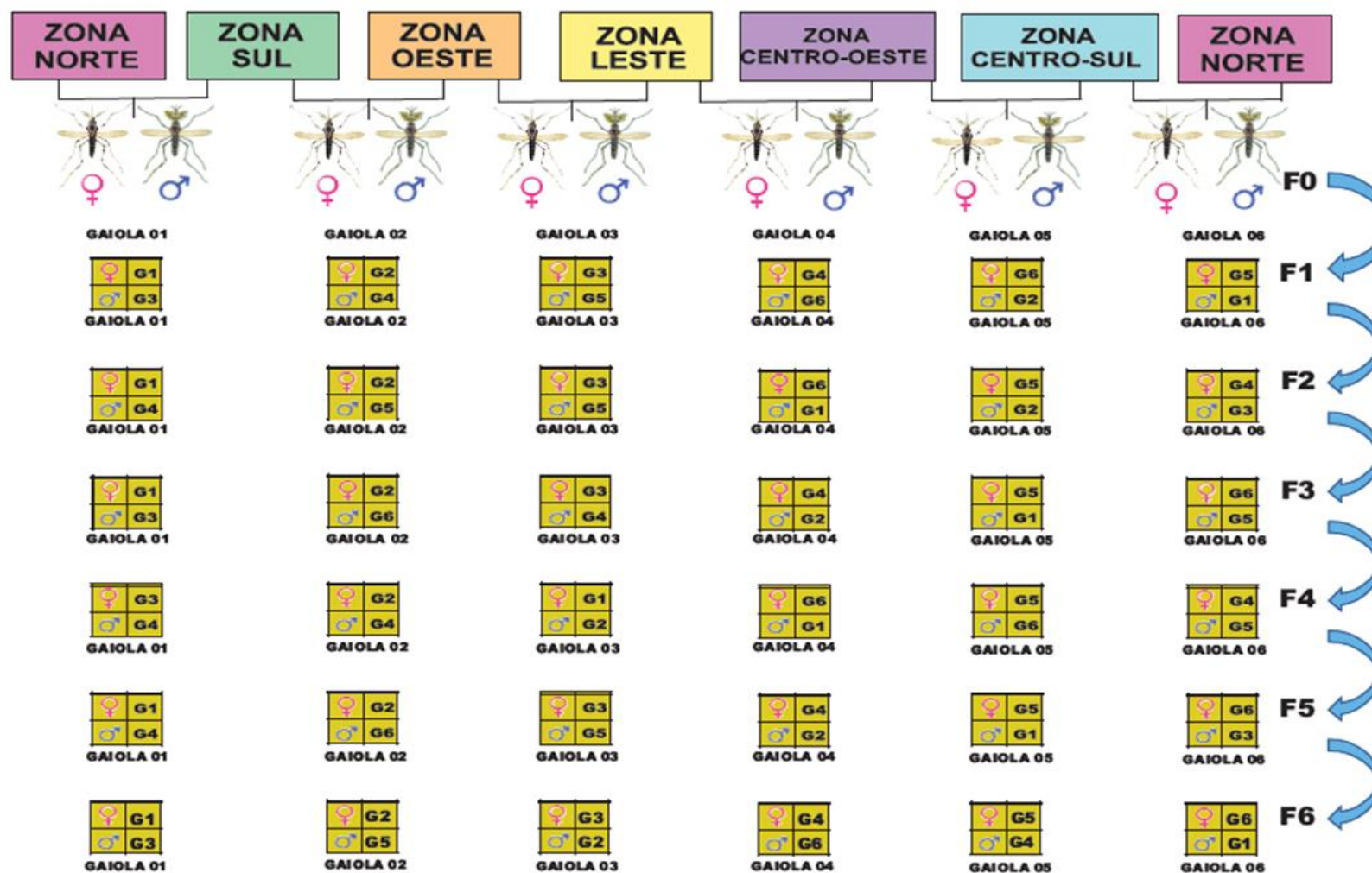
### **3.5. Bioensaios quantitativos com a população de *Aedes aegypti* coletada em campo**

O processo de criação seguiu as mesmas etapas descritas no item 2.2, porém foram utilizados 25 machos e 25 fêmeas da população de campo ( $F_0$ ) referente a cada um dos pontos de coleta. Os 50 mosquitos foram colocados em gaiola de papelão para cópula e obtenção da geração  $F_1$ . As larvas de terceiro estágio desta geração foram utilizadas nos bioensaios quantitativos para detectar a estimativa da concentração letal mediana  $CL_{50}$ , a qual foi utilizada no experimento de pressão de seleção e cálculo Razão de Resistência.

Os testes foram realizados conforme descrito no item 3.1, utilizando 10 concentrações (0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,08; 0,06 e 0,04 mg/L), estabelecidas de forma a obter mortalidade de 50-100%.

### **3.6. Criação de *Aedes aegypti* em laboratório e exposição ao biolarvicida espinosade**

Ovos da terceira a quinta semana de coleta foram utilizados para a criação de *A. aegypti* conforme descrito no item 2.2. Entretanto, para evitar o endocruzamento, uma vez que adultos machos e fêmeas de localidades diferentes foram colocados em gaiolas de papelão para copular. Este procedimento foi realizado na população de campo ( $F_0$ ) para obtenção da geração  $F_1$  (Figura 7). Cada grupo de cruzamento foi representado por uma gaiola, totalizando seis gaiolas por geração.



**Figura 7.** Cruzamento realizado para a obtenção das gerações referente às linhagens do insetário espinosade e controle. F= Gerações; G= Gaiolas. Fonte: Gonçalves e Silva (2019).

Os adultos da população de campo ( $F_0$ ) foram alimentados com solução de água açucarada a 12% e as fêmeas, duas vezes por semana realizaram repasto sanguíneo, durante 30 minutos em *hamster* (*M. auratus*) anestesiado. Após o período de oviposição, quatro dias em média, o papel filtro contendo ovos foi retirado e colocado para secar sobre papel absorvente, durante 72 horas.

Ovos da geração  $F_1$  foram divididos igualmente para a criação dos insetários espinosade e controle. Posteriormente, os ovos foram imersos em bandejas de plástico contendo água destilada e alimento para estimular a eclosão das larvas. Estas foram mantidas até atingirem o terceiro estágio e, em seguida, foram utilizadas nos bioensaios de pressão de seleção. A criação do insetário controle objetiva investigar a eficiência do esquema de cruzamento, possibilitando diminuir fatores como a endogamia e à deriva genética, principalmente na linhagem pressionada, mantendo um fundo genético comum para as linhagens provenientes dos dois insetários. Além de possibilitar que a resposta de mortalidade aconteça em virtude da pressão de seleção com o produto biológico.

Os testes foram realizados em três dias diferentes, utilizando 500 larvas em cada dia, mantidas em recipiente contendo 1 litro de água destilada, alimento e a concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) do biolarvicida, onde ficaram expostas por 48 horas. Considerando todas as gerações, 1500 larvas de cada grupo de cruzamento foram expostas ao produto biológico. As larvas do insetário controle procedentes de cada grupo de cruzamento foram utilizadas como um controle negativo, as quais ficaram mantidas em recipientes, contendo 1 litro de água destilada e alimento (Figura 8). Os testes foram realizados em salas com temperaturas de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade 80-90% e fotoperíodo de 12L:12D.

Após o tempo de exposição ao biolarvicida, as larvas sobreviventes foram transferidas para novos recipientes contendo água destilada e alimento, onde foram mantidas até atingirem o estágio adulto. Conforme a emergência, machos e fêmeas provenientes de cruzamentos diferentes foram colocados em gaiolas de papelão para copular e obter a geração  $F_2$ . Esse procedimento foi repetido até a obtenção da geração  $F_6$  (Figura 7).



**Figura 8.** Disposição das bandejas de plástico contendo larvas de *Aedes aegypti* na realização do bioensaio de pressão de seleção. Fonte: Silva (2019).

### **3.7. Bioensaios quantitativos com larvas de *Aedes aegypti*, das gerações F<sub>3</sub> e F<sub>6</sub>, expostas ao espinosade e controle**

O mesmo processo de criação foi realizado conforme descrito no item 2.2; no entanto, utilizando 25 machos e 25 fêmeas referentes aos grupos de cruzamento das gerações F<sub>3</sub> e F<sub>6</sub> (Figura 7). Os adultos de cada geração foram colocados para copular em gaiolas de papelão separadas para obter a geração F<sub>1</sub>. As larvas de terceiro instar obtidas foram utilizadas nos bioensaios quantitativos, com o propósito de verificar a modificação da estimativa da CL<sub>50</sub> e, conseqüentemente, a alteração do nível de suscetibilidade das larvas procedentes das gerações F<sub>3</sub> e F<sub>6</sub>, em relação aos mosquitos pertencentes à geração F<sub>1</sub>.

Os bioensaios foram realizados conforme descrito no item 3.1, utilizando as mesmas concentrações (0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,08; 0,06 e 0,04 mg/L), estabelecidas para detectar a estimativa das Concentrações Letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>), antes de iniciar os experimentos de pressão de seleção na geração F<sub>1</sub>.



### 3.8. Ensaios para avaliação de aspectos reprodutivo e do desenvolvimento

**3.8.1. Ciclo de vida dos mosquitos.** O delineamento amostral utilizado foi descrito por Paris *et al.* (2011), Brito *et al.* (2013) e Tabbabi e Daaboub (2018), com modificações. Ovos referentes às gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub> foram retirados dos insetários espinosade e controle (Figura 9A) e imersos em recipientes contendo 1 L de água destilada por 24 horas para estimular a eclosão das larvas (Figura 9B). Após a incubação, 600 larvas de primeiro instar (L<sub>1</sub>) foram selecionadas e divididas em 30 *pools* de 20 larvas, colocadas em copos com 150 mL de água destilada e 0,01 g de alimento (mistura de ração para gato e roedores na proporção 1:1), adicionado a cada três dias (Figura 9C). Os recipientes foram mantidos nos seus respectivos insetários, em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controlados (27±1°C, 80-90% e 12L:12D, respectivamente). O tempo de desenvolvimento dos imaturos até a emergência dos adultos foi analisado diariamente.

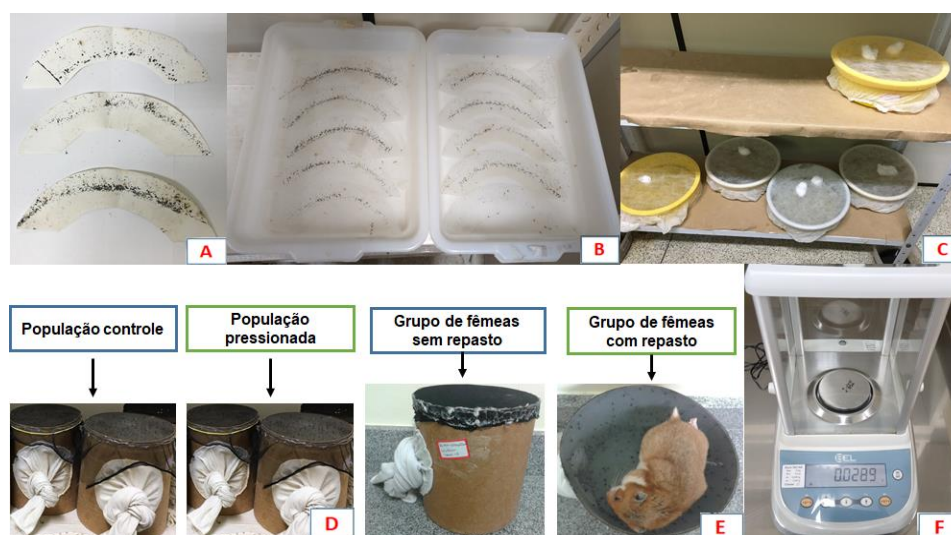


**Figura 9.** Criação, manutenção e análise do ciclo de vida de *Aedes aegypti*: A) Acondicionamento de papéis filtro, contendo ovos das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub> expostas a espinosade e indivíduos controle; B) Ovos imersos em bandeja de plástico com água destilada para eclosão de larvas; C) Disposição dos copos plástico, contendo larvas de *A. aegypti* para avaliação do ciclo de vida dos mosquitos. Fonte: Silva (2019).

**3.8.2. Tempo médio do estágio larval:** foi determinado por meio da contagem diária de larvas que atingiram o estágio de pupa.

**3.8.3. Tempo médio do estágio de pupa:** foi determinado levando em consideração o tempo que o inseto permanece neste estágio imaturo até a emergência do adulto.

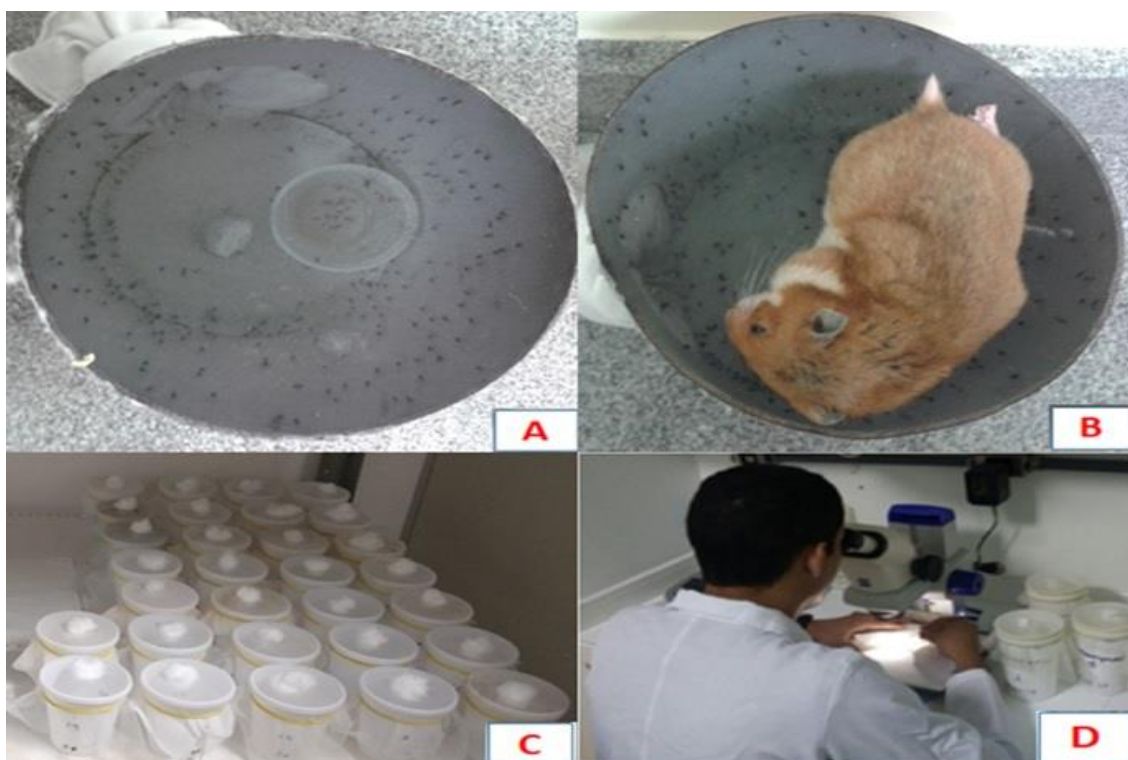
**3.8.4. Peso corporal das fêmeas antes e após o repasto sanguíneo.** O desenho experimental proposto foi realizado conforme descrito por Belinato *et al.* (2009) e Viana-Medeiros *et al.* (2017), com modificações. Ovos referentes as gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub> foram retirados de cada população (controle e pressionada) (Figura 10A) e imersos em recipientes, contendo 1 L de água destilada durante 24 horas para estimular a eclosão das larvas (Figura 10B). Após a eclosão, 2500 larvas de primeiro instar (L1) foram selecionadas e divididas em cinco grupos de 500 larvas, mantidas em recipientes contendo 1 L de água destilada e 0,5 g de ração, colocado a cada três dias até atingirem o estágio de pupa (Figura 10C). Após a emergência, 420 fêmeas e 420 machos de cada insetário foram capturados e divididos em dois grupos, contendo 210 espécimes de cada sexo, mantidos em gaiolas de papelão para copular por quatro dias (Figura 10D). Para saber o peso corporal das fêmeas antes e após o repasto sanguíneo, essas foram separadas em dois grupos, respectivamente: i) fêmeas que não realizaram o repasto sanguíneo e ii) fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo em *hamster* anestesiado durante 30 minutos (Figura 10E). Posteriormente, as fêmeas de cada grupo foram divididas em 21 *pools* de 10 mosquitos e foram colocadas no *freezer* (-20°C) por 5 minutos. Após este período, as fêmeas foram pesadas utilizando balança eletrônica de precisão - Bel Engineering Mark<sup>®</sup> M214A (Figura 10F).



**Figura 10.** Criação dos adultos e pesagem da proporção de sangue ingerido: A) Acondicionamento de papéis filtro contendo ovos das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub> do insetário espinosade e controle; B) Ovos imersos em bandeja de plástico com água destilada para eclosão de larvas; C) Disposição de vasilhas de plástico contendo água destilada, larvas e alimento; D) Gaiolas de papelão contendo fêmeas do grupo controle e pressionado; E) Grupo de fêmeas submetidas ao repasto sanguíneo e grupo de fêmeas sem repasto; F) Fêmeas de cada insetário (espinosade e controle) pesadas na balança analítica. Fonte: Silva (2019).



**3.8.5. Taxa de oviposição.** O delineamento amostral utilizado foi descrito por Martins *et al.* (2012) e Brito *et al.* (2013), com modificações. Os processos de criação, cópula e alimentação foram os mesmos descritos no item acima. No entanto, após a emergência, foram utilizados 60 fêmeas e 60 machos de cada insetário (espinosade e controle), os quais foram capturados e colocados em gaiolas para copular por quatro dias (Figura 11A). Para as fêmeas, foi oferecido um repasto sanguíneo em *hamster* anestesiado durante 30 minutos (Figura 11B). Após a alimentação sanguínea, 30 fêmeas de cada insetário foram capturadas e adicionadas individualmente em copos plástico de 180 mL cobertos com tela do tipo filó, contendo 70 mL de água destilada e papel filtro como substrato para oviposição (Figura 11C). Os recipientes foram mantidos nos seus respectivos insetários durante cinco dias e após este período, as fêmeas foram removidas e os ovos contabilizados em microscópio estereoscópico (Figura 11D). Este experimento foi realizado nas gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>.



**Figura 10.** Criação dos adultos e contagem de ovos: A) Gaiola de papelão contendo 60 machos e 60 fêmeas; B) Fêmeas de *Aedes aegypti* realizando o repasto sanguíneo em *hamster* anestesiado; C) Disposição dos copos plásticos contendo água destilada, papel filtro e uma fêmea de *A. aegypti*; D) Quantificação dos ovos em microscópio estereomicroscópio. Fonte: Silva (2019).

### 3.9. Análise de dados

Os dados de mortalidade foram analisados pelo teste de normalidade de Lilliefors (K amostras) para saber se possuem distribuição normal ou não. Para dados com distribuição normal, foi utilizado o teste t de Student, enquanto os que não apresentaram distribuição normal, foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ). Ambos os testes foram feitos com auxílio do programa BioEstat 5.0 for Windows (Ayres *et al.* 2007).

As estimativas das concentrações letais foram obtidas a partir dos dados de mortalidade, submetidos à análise de Probit  $p < 0,05$  (Finney 1981), com a utilização do programa estatístico POLO PLUS (LeOra Software 2005). As concentrações letais obtidas nas gerações avaliadas, foram analisadas no teste de normalidade Lilliefors (K amostras) e, posteriormente submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), com auxílio do programa estatístico BioEstat 5.0 for Windows (Ayres *et al.* 2007).

Os dados dos bioensaios, utilizando-se a concentração diagnóstica foram avaliados de acordo com os critérios de Davidson e Zahar (1973), Macoris *et al.* (2005) e WHO (2016), no qual ressaltam que a mortalidade de 98-100% indica suscetibilidade, mortalidade de 97-80% perda de suscetibilidade e inferior a 80% define resistência.

Os valores de Razão de Resistência (RR) foram obtidos a partir da divisão entre a  $CL_{50}$  da terceira geração ( $F_3$ ) da população pressionada ao espinosade com a  $CL_{50}$  da cepa Rockefeller (WHO 2016), assim como a partir da divisão entre a  $CL_{50}$  da terceira geração ( $F_3$ ) da população pressionada pela  $CL_{50}$  da primeira geração ( $F_1$ ) obtida na população antes da pressão de seleção desse larvicida. O mesmo cálculo foi realizado, utilizando a  $CL_{50}$  da sexta geração ( $F_6$ ) da população pressionada. Conforme os parâmetros de Mazzarri e Georghiou (1995) e WHO (2016), o nível de resistência das populações são classificados em: baixo nível de resistência quando o valor é menor que 5; resistência moderada com valores entre 5 e 10 e alto nível de resistência quando o valor estiver maior que 10.

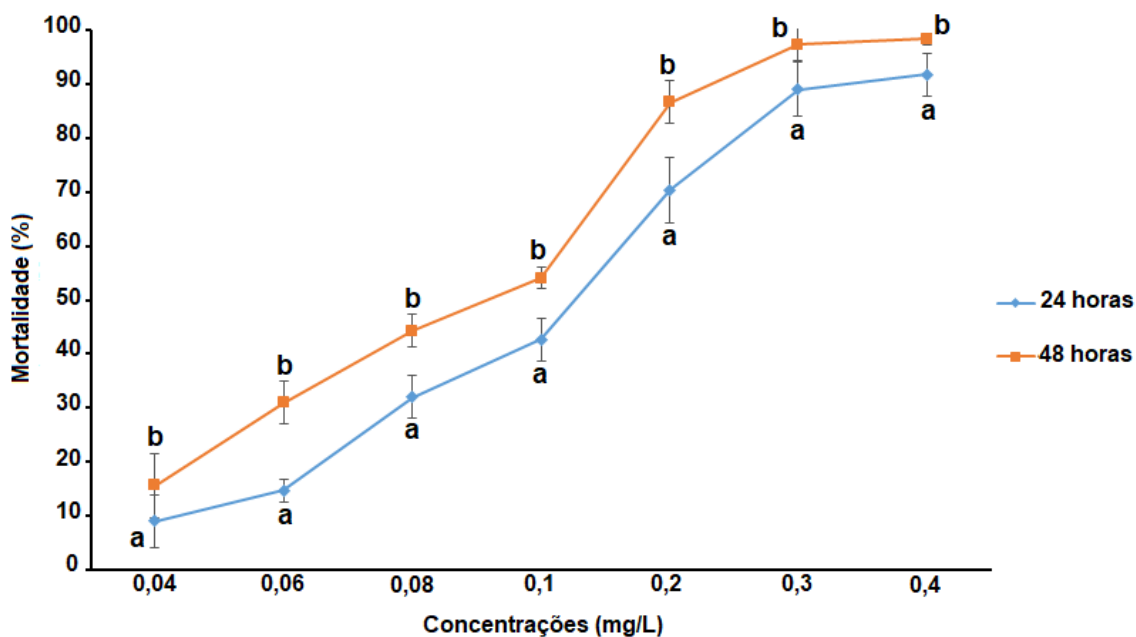
Os dados das populações controle e pressionada referente às características biológicas avaliadas (tempo de desenvolvimento do inseto, tempo médio do estágio larval, tempo médio do estágio de pupa, taxa de oviposição e peso corporal das fêmeas antes e após o repasto sanguíneo) foram analisados no teste de normalidade Lilliefors (K amostras). A partir dos testes iniciais, os dados que apresentaram normalidade,

optou-se por utilizar o teste paramétrico t de Student ( $p < 0,05$ ), enquanto os que não apresentaram normalidade, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Porcentagem de mortalidade e estimativa das $CL_{50}$ e $CL_{99}$ em mg/L para *Aedes aegypti* cepa Rockefeller

Foi observado uma relação positiva entre as concentrações utilizadas e a mortalidade observada, ou seja, quanto mais alta a concentração maior a mortalidade (Figura 12). Verificou-se ainda maior mortalidade das larvas na leitura de 48 horas, constatando diferença significativa entre os tempos de observação (24 e 48 horas) para cada concentração ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Comparação da mortalidade entre 24 e 48 horas das larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, nos bioensaios com o biolarvicida espinosade, em condições de laboratório. Letras diferentes entre as linhas (tempo de observação) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para cada concentração de acordo com o teste de Mann-Whitney.

Considerando os valores das  $CL_{50}$  nos dois intervalos de observação, verificou-se que a maior toxicidade foi obtida no intervalo de 48 horas, para o qual foi verificado o menor valor desta concentração ( $p = 0,01$ ) (Tabela 1). O mesmo resultado foi constatado para a  $CL_{99}$  ( $p = 0,0417$ ).

**Tabela 1.** Estimativa das concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>99</sub>) e intervalo de confiança de 95%, no período de 24 e 48 horas para o biolarvicida espinosade com toxicidade para larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, em condições de laboratório.

Horas	CL <sub>50</sub> mg/L	CL <sub>99</sub> mg/L	$\chi^2$	Slope $\pm$ SE
24	0,123 <sup>a</sup> (0,113 - 0,134)	0,798 <sup>a</sup> (0,640 - 1,051)	8,1424	2,866 (0,106)
48	0,089 <sup>b</sup> (0,084 - 0,094)	0,452 <sup>b</sup> (0,398 - 0,527)	3,486	3,289 (0,151)

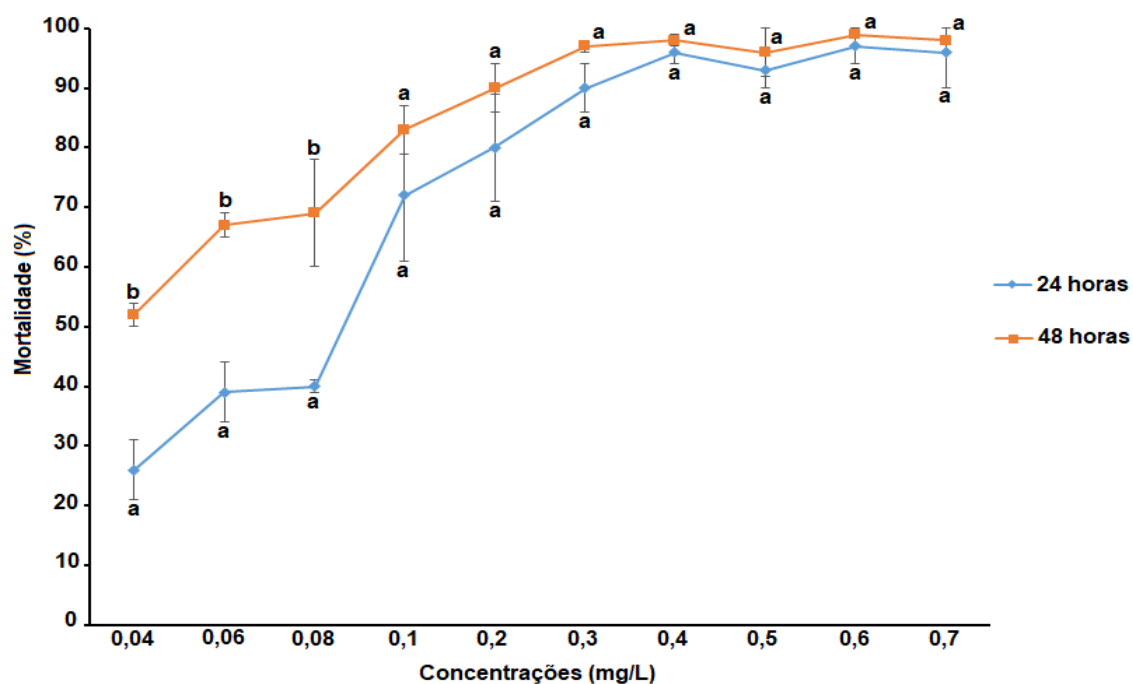
Legenda: CL= Concentração Letal;  $\chi^2$ = qui-quadrado; Graus de Liberdade (GL) - 24 horas = 5 e 48 horas = 4; SE= Erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste t de Student.

#### 4.2. Concentração diagnóstica

A concentração diagnóstica (0,904 mg/L) do biolarvicida utilizada nos bioensaios foi obtida a partir do dobro da CL<sub>99</sub> (0,452 mg/L) adquirida no intervalo de 48 horas para a cepa Rockefeller. Após utilização da concentração diagnóstica, foi verificada uma mortalidade de 100% dos insetos provenientes de cada zona administrativa da cidade de Manaus, Amazonas. O que demonstra alto nível de suscetibilidade dos mosquitos ao produto biológico, independente da região amostrada.

#### 4.3. Porcentagem de mortalidade e estimativa da CL<sub>50</sub> em mg/L para larvas da geração F<sub>1</sub>, procedentes da população de *Aedes aegypti* coletada em campo

Considerando a geração F<sub>1</sub>, observou-se uma resposta diretamente proporcional entre as concentrações empregadas e a mortalidade observada (%), ou seja, quanto mais alta a concentração, maior a mortalidade das larvas (Figura 13). Verificou-se ainda que os maiores valores de mortalidade foram observados no intervalo de 48 horas, resultando uma diferença estatística significativa ( $p = 0,0001$ ) no percentual de mortalidade entre a leitura de 24 e 48 horas para as concentrações menores (0,04; 0,06; 0,08), porém, essa diferença não foi observada nas demais concentrações ( $p > 0,05$ ).



**Figura 12.** Comparação da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* da geração F<sub>1</sub>, entre os intervalos de 24 e 48 horas, nos bioensaios com o biolarvicida espinosade, em condições de laboratório. Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para cada concentração entre os tempos de observação de acordo com o teste t de Student ou Mann-Whitney.

Analisando os valores das CL<sub>50</sub>, constatou-se que a maior toxicidade do biolarvicida foi obtida no intervalo de 48 horas, para qual foi verificado o menor valor desta concentração (Tabela 2). Todavia, não houve diferença estatística significativa quando comparada as estimativas das CL<sub>50</sub> e os respectivos intervalos de confiança, entre os períodos de observação ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Estimativa da CL<sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95%, no período de 24 e 48 horas para o biolarvicida espinosade com toxicidade para larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório.

Horas	CL <sub>50</sub> mg/L	$\chi^2$	Slope $\pm$ SE
24	0,071 <sup>a</sup> (0,032 - 0,102)	19,540	2,186 (0,134)
48	0,036 <sup>a</sup> (0,019 - 0,051)	4,831	1,956 (0,161)

Legenda: CL<sub>50</sub>= Concentração Letal Mediana;  $\chi^2$ = qui-quadrado; Graus de Liberdade (GL) - 24 e 48 horas = 3; SE= Erro padrão. Letras iguais na mesma coluna, não diferem de acordo com o teste t de Student ( $p > 0,05$ ).

Comparando a  $CL_{50}$  (0,036 mg/L) da população  $F_1$  do laboratório e a  $CL_{50}$  (0,089 mg/L) da cepa Rockefeller, verificou-se que o valor obtido nesta última população foi quase três vezes maior que o valor observado para a primeira, constatando-se diferença estatística significativa entre os respectivos valores ( $p=0,0052$ ).

#### 4.4. Nível de resistência da linhagem de *Aedes aegypti* exposta ao biolarvicida espinosade, em condições de laboratório

Considerando a estimativa da  $CL_{50}$  (0,036 mg/L) do biolarvicida utilizada em todas as gerações, verificou-se uma modificação no valor da concentração obtida nas gerações  $F_3$  e  $F_6$  de *A. aegypti* pressionada (Tabela 3), resultando em uma diferença significativa ( $p=0,0019$ ) na  $CL_{50}$  inicial (0,036 mg/L) observada na  $F_1$  antes da pressão de seleção (Tabela 2), em comparação ao valor observado na  $F_3$ . O mesmo resultado foi averiguado entre a  $CL_{50}$  da  $F_1$  e  $F_6$  ( $p=0,0187$ ). Não foi constatada diferença estatística significativa entre  $F_3$  e  $F_6$  ( $p>0,05$ ).

**Tabela 3.** Estimativa da  $CL_{50}$  e intervalo de confiança de 95% nas gerações  $F_3$  e  $F_6$  da população de *Aedes aegypti* pressionada com o biolarvicida espinosade, em condições de laboratório.

Gerações	$CL_{50}$ mg/L	$\chi^2$	Slope $\pm$ SE
$F_3$	0,114 <sup>b</sup> (0,104 - 0,124)	1,736	1,977 (0,094)
$F_6$	0,101 <sup>b</sup> (0,075 - 0,124)	7,767	2,427 (0,146)

Legenda:  $CL_{50}$ = Concentração Letal Mediana;  $\chi^2$ = qui-quadrado; Graus de Liberdade (GL) – gerações  $F_3=3$  e  $F_6=4$ ; SE= Erro padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem de acordo com o teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

De acordo com o cálculo de Razão de Resistência (RR), os valores obtidos para a  $F_3$  da linhagem pressionada foram 1,3 e 3,2 considerando a relação com a cepa Rockefeller e a população  $F_1$  do laboratório, respectivamente. Por outro lado, os valores adquiridos na  $F_6$  da cepa pressionada foram 1,1 e 2,8 utilizando a Rockefeller e a população  $F_1$  mantida em laboratório, respectivamente. Conforme os parâmetros de Mazzarri e Georghiou (1995) e WHO (2016), a população pressionada ainda é

considerada com baixo nível de resistência ao produto biológico, pois apresenta valores menores do que 5.

#### 4.5. Estimativa da $CL_{50}$ em mg/L do biolarvicida espinosade nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>6</sub> da população de controle

A  $CL_{50}$  obtida para a F<sub>6</sub> da população controle foi praticamente o dobro da  $CL_{50}$  inicial averiguada na F<sub>1</sub>, observando-se diferença estatística significativa ( $p=0,0297$ ) na comparação das estimativas das  $CL_{50}$  entre as duas gerações avaliadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Estimativa da  $CL_{50}$  e intervalo de confiança de 95% do biolarvicida espinosade nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>6</sub> da população controle, em condições de laboratório.

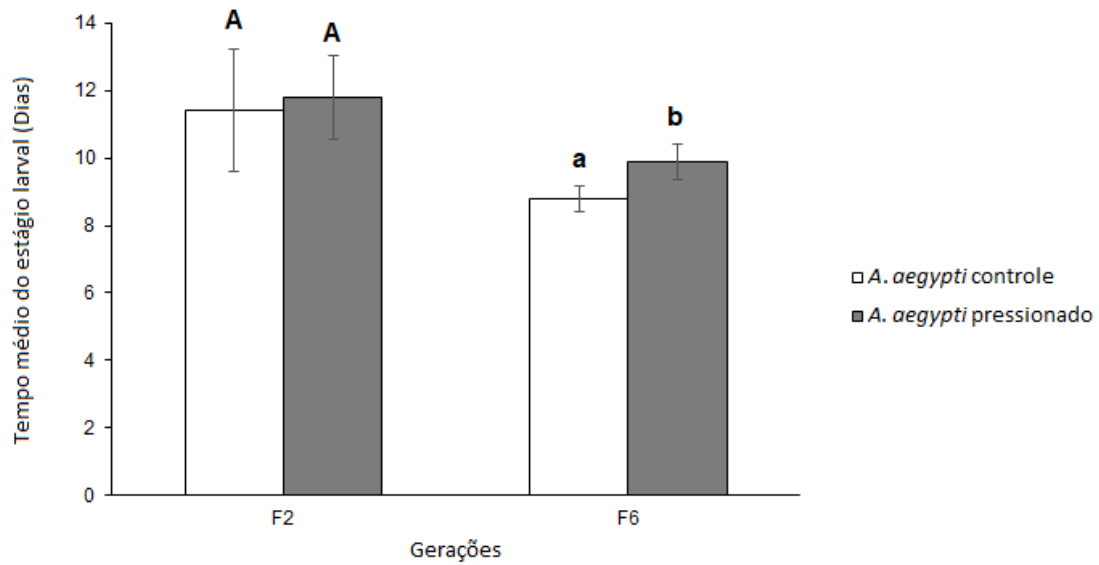
Gerações	$CL_{50}$ mg/L	$\chi^2$	Slope $\pm$ SE
F <sub>1</sub>	0,036 <sup>a</sup> (0,019 - 0,051)	4,831	1,956 (0,161)
F <sub>6</sub>	0,068 <sup>b</sup> (0,062 - 0,073)	1,434	2,592 (0,143)

Legenda:  $CL_{50}$ = Concentração Letal Mediana;  $\chi^2$ = qui-quadrado; Graus de Liberdade (GL) - gerações F<sub>1</sub>= 3 e F<sub>6</sub>= 4; SE= Erro padrão. \*Letras diferentes na mesma coluna diferem de acordo com o teste de t de Student ( $p<0,05$ ).

#### 4.6. *Fitness*: Parâmetros de desenvolvimento

##### Tempo médio do estágio larval

Não houve diferença estatística significativa entre o tempo médio do estágio larval de *A. aegypti* controle e pressionado, oriundos da F<sub>2</sub> ( $p>0,05$ ) (Figura 14). No entanto, essa diferença foi observada nas amostras de *A. aegypti* procedentes da F<sub>6</sub>, com maior tempo médio de duração do estágio larval obtido para a linhagem pressionada ( $p=0,0001$ ).

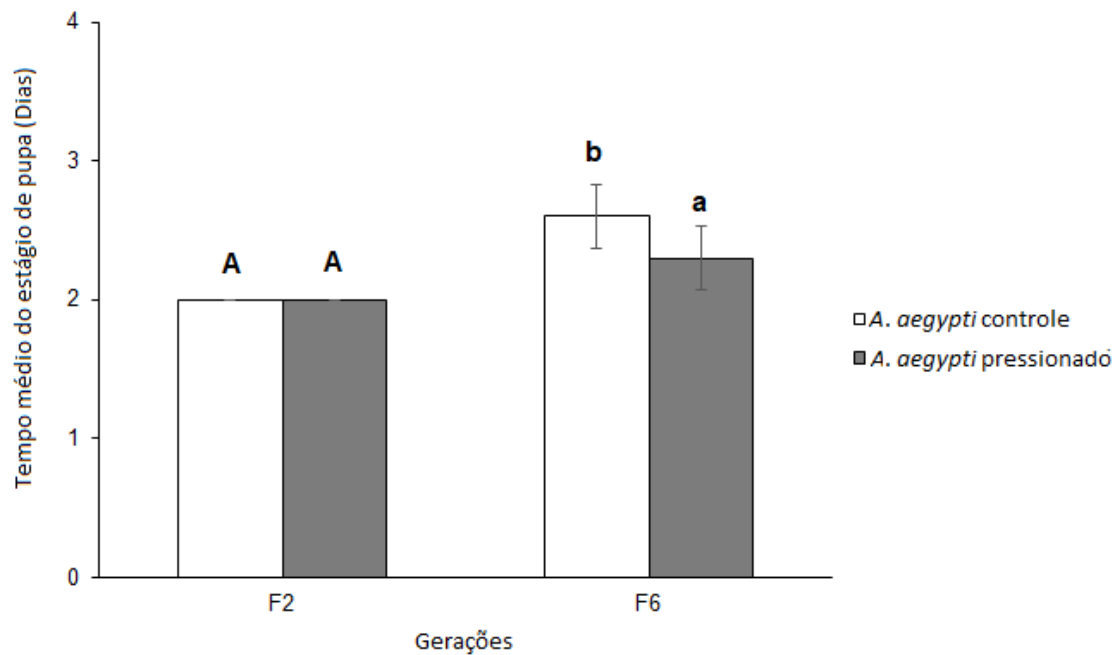


**Figura 13.** Tempo de médio de duração do estágio larval de *Aedes aegypti* oriundos das amostras controle e das pressionadas, procedentes da F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as populações dentro de cada geração para o teste de Mann-Whitney.

### Tempo médio do estágio de pupa

Considerando a geração F<sub>2</sub>, não foi observado diferença estatística significativa no tempo médio de duração do estágio de pupa entre as populações controle e pressionada ( $p > 0,05$ ) (Figura 15). Na geração F<sub>6</sub> foi observada diferença significativa entre os tratamentos, com maior média de tempo no estágio de pupa para a população controle ( $p = 0,0001$ ).

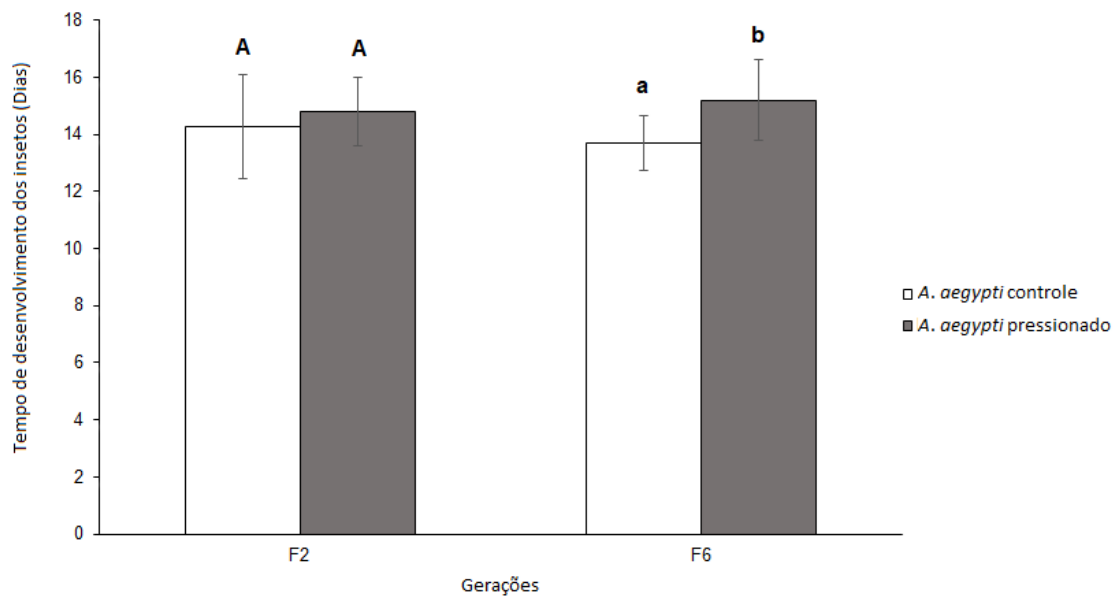




**Figura 14.** Tempo médio de duração do estágio de pupa dos insetos oriundos da população controle e da pressionada, procedentes da F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre *Aedes aegypti* dentro de cada geração para o teste t de Student ou Mann-Whitney.

### Tempo do ciclo biológico

O tempo de desenvolvimento até o estágio adulto considerando a F<sub>2</sub>, foi menor no controle em comparação a pressionada, porém, essa diferença não foi corroborada pela análise estatística ( $p > 0,05$ ) (Figura 16). Por outro lado, essa diferença foi observada entre as populações da geração F<sub>6</sub>, onde a população pressionada levou até dois dias a mais para completar o ciclo de desenvolvimento ( $p = 0,0001$ ).

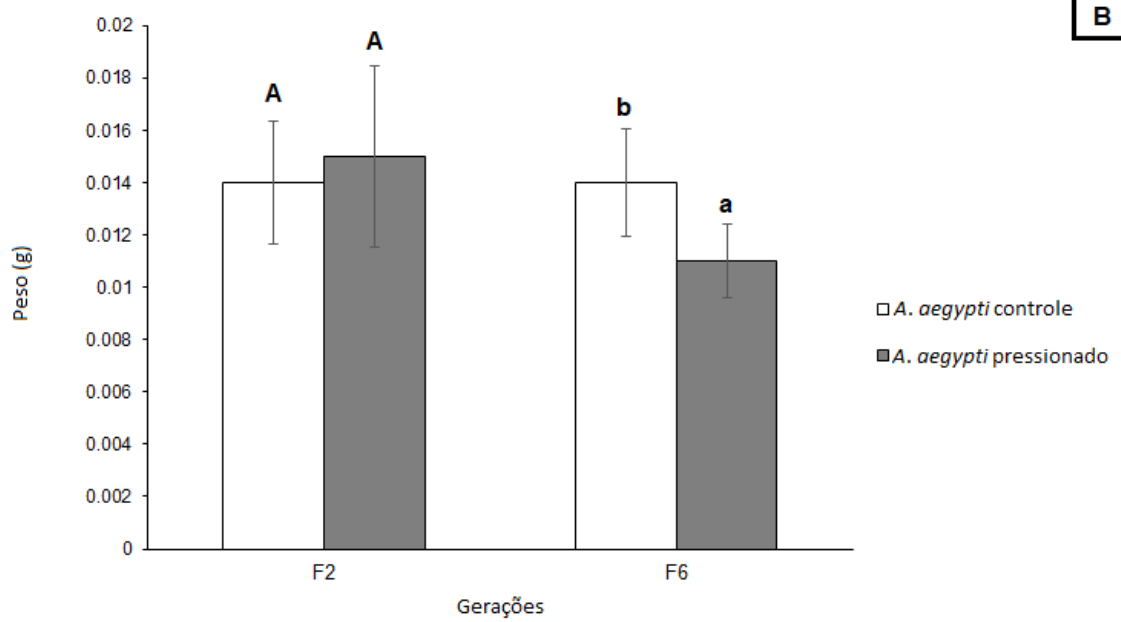
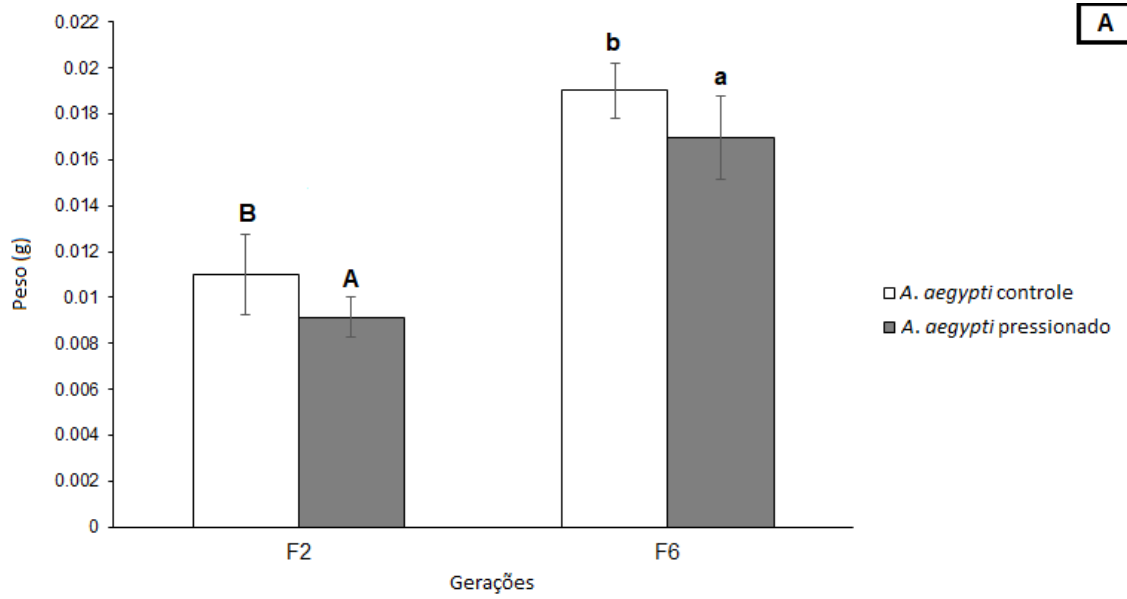


**Figura 15.** Tempo de desenvolvimento de *Aedes aegypti* oriundo da população controle e pressionada, procedentes das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre *A. aegypti* dentro de cada geração para o teste t de Student ou Mann-Whitney.

#### 4.7. *Fitness*: Parâmetros reprodutivos

##### Avaliação do peso corporal das fêmeas de *Aedes aegypti*

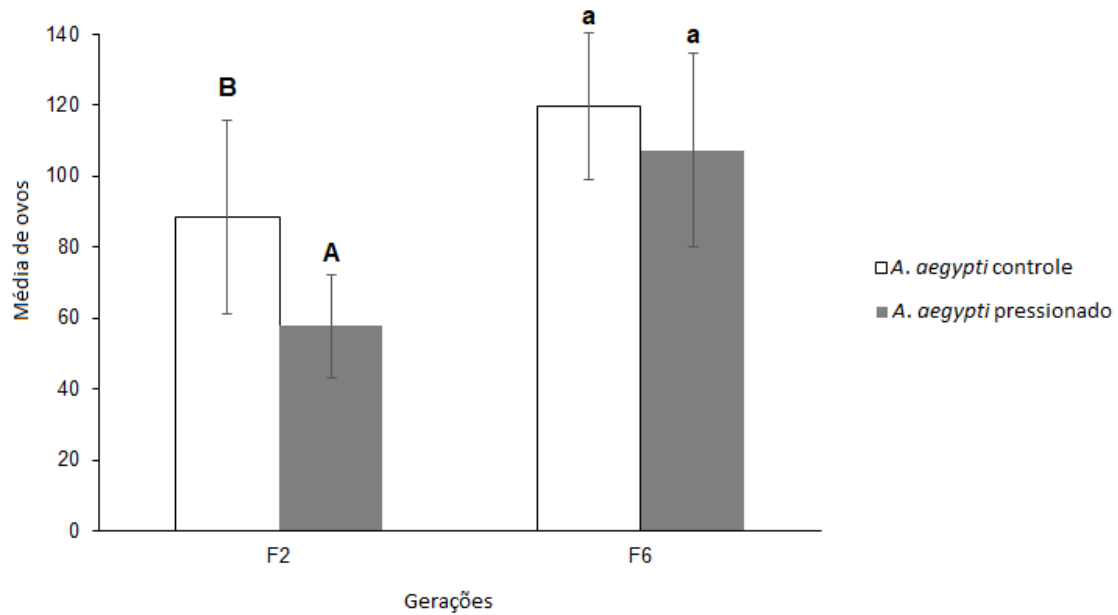
Antes do repasto sanguíneo, para as duas gerações avaliadas (F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>), as fêmeas da população pressionada apresentaram peso médio corporal inferior ao das fêmeas da população controle ( $p = 0,0001$ ) (Figura 17 A). Após realizar o repasto sanguíneo, observou-se que não houve diferença significativa entre a média de peso das fêmeas da segunda geração da população controle e pressionada ( $p > 0,05$ ) (Figura 17 B). Entretanto, essa diferença foi observada na sexta geração, com menor média de peso obtida para a população pressionada ( $p = 0,0040$ ).



**Figura 16.** Peso corporal das fêmeas de *Aedes aegypti* controle e pressionado. A) Antes do repasto sanguíneo; B) após realizar o repasto sanguíneo. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras dentro de cada geração para o teste t de Student ou Mann-Whitney.

### Taxa de oviposição das fêmeas de *Aedes aegypti* do controle e da pressionada

A média de ovos na F<sub>2</sub> foi significativamente maior para as amostras controle em comparação às pressionadas ( $p= 0,0001$ ) (Figura 18). No entanto, diferença estatística significativa não foi verificada entre os indivíduos de F<sub>6</sub> ( $p>0,05$ ).



**Figura 17.** Média de ovos obtidos de *Aedes aegypti* controle e pressionado, provenientes das gerações F<sub>2</sub> e F<sub>6</sub>. Letras diferentes entre as colunas, indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as amostras dentro de cada geração para o teste t de Student.

## 5. DISCUSSÃO

A efetividade do produto biológico espinosade para o controle de mosquitos pode ser explicada pela presença dos metabólitos secundários, as espinosinas A e D na proporção de 85:15, respectivamente. Esses metabólitos sintetizados pela bactéria *S. spinosa*, possuem elevada atividade inseticida e são produzidos em grande quantidade em relação aos outros compostos orgânicos produzidos (Bacci *et al.* 2016).

Neste estudo, observou-se alta mortalidade em 24 horas, todavia, a ação efetiva do espinosade para larvas de *A. aegypti* cepa Rockefeller foi maior no intervalo de 48 horas, uma vez que os menores valores de  $CL_{50}$  ocasionaram maior mortalidade cumulativa. Esses resultados corroboram os observados, em laboratório, por Santos *et al.* (2019) que analisaram a toxicidade do espinosade em larvas de *A. aegypti* e por Jiang e Mulla (2009) e DeLisi *et al.* (2017) em larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Estes dados confirmam os observados por Hertlein *et al.* (2010) em larvas de diferentes espécies de mosquitos de importância médica e Khan *et al.* (2011) em larvas de *A. albopictus*.

O maior percentual de mortalidade das larvas dos culicídeos no intervalo de 48 horas, pode ser atribuído a ação gradual do biolarvicida comparado a determinados inseticidas químicos sintéticos procedentes de classes distintas, utilizados no controle larval de mosquitos vetores (Khan *et al.* 2011). Esta mortalidade cumulativa é devido a vários fatores que abrangem desde a lenta penetração das toxinas através da cutícula, quantidade de toxinas ingeridas e o mecanismo de ação único do larvicida (Salgado 1998; Salgado e Sparks 2005; Orr *et al.* 2009).

A  $CL_{50}$  (0,123 mg/L) obtida neste estudo para a Rockefeller em 24 horas, é considerada maior do que os valores encontrados para cepas de referência suscetíveis em outros trabalhos. Isso pode ser constatado no trabalho de Dias *et al.* (2017), no qual detectaram para a mesma cepa, a  $CL_{50}=0,023$  mg/L do espinosade em 24 horas, assim como por Su *et al.* (2019) que detectaram a  $CL_{50}= 0,0104$  mg/L do mesmo produto em 24 horas para uma população de referência suscetível de *A. aegypti*. Além disso, o valor da  $CL_{50}$  (0,089 mg/L) para a cepa suscetível obtida em 48 horas neste estudo, é também superior aos valores observados em outros trabalhos, como constatado na revisão de Hertlein *et al.* (2010) que ressaltam seis trabalhos, nos quais analisaram a toxicidade do espinosade em larvas suscetíveis de *A. aegypti*, demonstrando variação desta concentração entre 0,01 e 0,06 mg/L.

A diferença nos valores de  $CL_{50}$  pode ser atribuída as diferentes formulações utilizadas, apresentando concentrações distintas de ingrediente ativo e compostos inertes, que podem influenciar diretamente na potência e na eficácia do efeito residual do agente de controle (Hertlein *et al.* 2010). Além do mais, essa discrepância pode ser atribuída as diferenças nos protocolos de teste utilizados em laboratório, que se diferenciam desde o número de larvas utilizadas até o tempo de exposição destas ao produto, demonstrando que tais fatores podem influenciar diretamente nos resultados, o que dificulta a comparação dos dados (Dias *et al.* 2017; Moyes *et al.* 2017).

Neste estudo, o protocolo de teste (WHO 2005) e a formulação (Natular – concentrado emulsionável) utilizados foram os mesmos empregados por Del Rio-Galvan *et al.* (2016) e Días-Martínez *et al.* (2016). Pode-se observar que a estimativa da  $CL_{50}$  (0,123 mg/L) obtida em 24 horas para a cepa de referência Rockefeller, é próximo dos valores 0,193 e 0,12 mg/L observados respectivamente, no mesmo intervalo de tempo por esses autores, que utilizaram uma população de *A. aegypti* referência em suscetibilidade. Esses achados evidenciam que a utilização de um único protocolo padrão pode promover a comparação dos resultados entre diferentes populações suscetíveis ao produto em questão, de maneira mais fidedigna.

A mortalidade de 100% no bioensaio com a concentração diagnóstica do biolarvicida, evidencia que o *A. aegypti* da cidade de Manaus são suscetíveis ao agente de controle. É importante ressaltar que a concentração diagnóstica obtida neste estudo, foi estimada pela utilização da cepa Rockefeller como referência de suscetibilidade, devido *A. aegypti* ser utilizado no Programa Nacional de Monitoramento da Resistência. Por ser mantida em condições de laboratório há anos, esta linhagem é utilizada como padrão em vários trabalhos (Mazzarri e Georghiou 1995; Canyon 1999; Campos e Andrade 2001; Belinato *et al.* 2009; Brito *et al.* 2013; Macoris *et al.* 2014; Viana-Medeiros *et al.* 2017).

A alta suscetibilidade de *A. aegypti* da cidade de Manaus pode ser explicada pelo fato do espinosade ainda não ser utilizado no programa de controle deste mosquito, na região. Esses dados podem ainda demonstrar que os experimentos de pressão do biolarvicida foram realizados desde o início com insetos suscetíveis. Neste sentido, a evolução para um processo de resistência na linhagem pressionada pode acontecer como uma resposta natural, onde os alelos de resistência serão selecionados e os indivíduos que os possuem sobreviverão e passarão para seus descendentes, aumentando suas frequências na população.

A detecção da concentração diagnóstica depende da escolha do fator de multiplicação (2, 3 ou 4) para obter a discriminação desejada (Macoris *et al.* 2005; WHO 2016). Neste estudo, o menor fator de multiplicação (dobro da  $CL_{99}$ ) foi suficiente para ocasionar 100% de mortalidade de *A. aegypti*. Diante destes resultados, a concentração pode ser recomendada como parâmetro para uso dos programas de controle da cidade de Manaus, e no monitoramento anual da taxa de suscetibilidade de *A. aegypti* oriundo do campo, quando esse produto biológico for empregado efetivamente em campanhas de controle.

Comparando com a cepa Rockefeller, as  $CL_{50}$  obtidas nos intervalos de 24 e 48 horas para *A. aegypti*, da cidade de Manaus foram menores no mesmo período de observação. Isso pode ser explicado pelo *background* genético destes mosquitos, sendo que a primeira linhagem é oriunda do município de Marília, São Paulo, mantida há mais de 50 anos no laboratório (Dias *et al.* 2017), enquanto a segunda é proveniente da cidade de Manaus, Amazonas. Alguns estudos ressaltam que o *background* genético é uma característica importante nas linhagens de mosquitos, pois estas podem apresentar respostas de suscetibilidade diferentes frente ao inseticida em questão (Marcombe *et al.* 2018; Su *et al.* 2019). Apesar da diferença, as duas linhagens são consideradas suscetíveis ao biolarvicida e os valores adquiridos para cada população mostram apenas variações de concentrações letais em populações suscetíveis (Hertlein *et al.* 2010; Dias *et al.* 2017).

Neste estudo, o valor da  $CL_{50}$  (0,071 mg/L) obtido em 24 horas para a geração  $F_1$  da população coletada em campo, é próximo do valor (0,069 mg/L) encontrado no mesmo período por Marcombe *et al.* (2018) em larvas de *A. aegypti* coletadas em Vientiane, Laos - Ásia, tratadas com o espinosade em laboratório. Por outro lado, o valor da  $CL_{50}$  (0,036 mg/L) de 48 horas encontrado neste estudo, foi quase três vezes menor que o valor (0,0853 mg/L) observado por Santos *et al.* (2019) no mesmo intervalo, utilizando uma população de *A. aegypti* coletada em diferentes bairros da cidade de Uberlândia, Minas Gerais, e exposta ao espinosade no laboratório. Embora ocorram variações de  $CL_{50}$ , todas as populações são suscetíveis, conforme a razão de resistência baseada na linhagem de referência, demonstrando novamente que populações de origens distintas apresentam variações quanto à sensibilidade ao produto em questão.

Os bioensaios quantitativos realizados para a obtenção das  $CL_{50}$  nos dois intervalos de observação (24 e 48 horas) são considerados testes iniciais para confirmar

o período correto do registo de mortalidade. Comparando as  $CL_{50}$  obtidas nos dois períodos, foi observado uma sobreposição no intervalo de confiança, indicando que as diferenças encontradas não foram significativas, possibilitando manter a  $CL_{50}$  (0,036 mg/L) de 48 horas como ideal para o experimento de pressão do biolarvicida.

A modificação no valor da  $CL_{50}$  ao longo das gerações do experimento com o espinosade, pode ser atribuída a perda de suscetibilidade. Apesar desta mudança, a linhagem ainda é caracterizada com baixo nível de resistência, uma vez que os valores obtidos na Razão de Resistência ( $RR_{50}$ ) são considerados baixos. Esses resultados corroboram com os observados por Su e Cheng (2012), onde pressionaram uma população de *Cx. quinquefasciatus* com o espinosade por 17 gerações e verificaram mudanças no valor da  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  nas gerações iniciais ( $F_3$ ,  $F_5$ ,  $F_7$  e  $F_9$ ), demonstrando a perda de suscetibilidade. No entanto, os valores de  $RR_{50}$  e  $RR_{90}$  se apresentaram baixos, mostrando que *A. aegypti* ainda estava com baixa resistência, apresentando resistência moderada somente a partir da geração  $F_{11}$ .

É importante ressaltar que o parâmetro RR utilizado neste estudo foi analisado de acordo com as recomendações de Mazzarri e Georghiou (1995) e WHO (2016). No entanto, outros protocolos de Razão de Resistência também são utilizados como parâmetros para diagnosticar o nível de resistência de mosquitos, como observados nos trabalhos de Khan *et al.* (2011), Su e Cheng (2012, 2014a, 2014b) e Viana-Medeiros *et al.* (2017). A diferença de protocolos empregados para caracterizar populações pressionadas com inseticidas em laboratório, dificulta a comparação dos resultados. Demonstrando desta forma, a necessidade da padronização de um único documento para ser utilizado como referência em estudos de monitoramento da resistência, de modo a viabilizar a comparação dos resultados entre os diferentes trabalhos.

Neste estudo, os resultados obtidos ao longo de seis gerações do experimento de pressão deste biolarvicida espinosade, demonstram que é necessário aumentar o número de gerações *A. aegypti* para detectar a característica de resistência moderada ou completa deste mosquito da cidade de Manaus. Essas informações podem ser evidenciadas em amostras de *Cx. quinquefasciatus* pressionadas com o espinosade, onde a resistência moderada ao produto foi observada apenas na geração  $F_{11}$ , enquanto a característica de altamente resistente foi constatada na geração  $F_{37}$  (Su e Cheng 2014b). Este achado assemelha-se ao observado em uma população de mosca-das-frutas (*Ceratitis capitata*) pressionada com o espinosade em laboratório, que apresentou níveis



moderados e altos de resistência nas gerações F<sub>25</sub> e F<sub>29</sub>, respectivamente (Ureña *et al.* 2019).

Analisar a eficiência do agente de controle, antes de sua aplicação em operações de campo, é aconselhável para explorar o potencial desenvolvimento de resistência e estratégias de manejo antes que a resistência ocorra em populações de mosquitos selvagens (Dias *et al.* 2017; Marcombe *et al.* 2018). A seleção controlada de inseticidas no laboratório permite o estudo da dinâmica de resistência, assim como os seus efeitos sobre vários parâmetros adaptativos. Tais respostas norteiam aspectos relacionados a correta utilização do inseticida, a possível exclusão deste em programas de manejo ou ainda a indicação em situações específicas, isto é, onde não foi utilizado anteriormente, além do monitoramento devido a seu uso excessivo.

No presente estudo, o *A. aegypti* pressionado com espinosade em F<sub>6</sub>, apresentou aumento no tempo médio do estágio larval e do ciclo de vida. Estes resultados corroboram os achados por Li *et al.* (2017), no qual verificaram que *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) resistente ao espinosade, apresentou efeitos deletérios significativos na duração do desenvolvimento larval, no ciclo biológico, longevidade dos adultos e fecundidade. O mesmo resultado foi constatado por Khan (2018), analisando o efeito da resistência ao espinosade em vários aspectos do desenvolvimento e da reprodução da *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em condições de laboratório.

Nos mosquitos, o tempo de desenvolvimento é um aspecto fundamental para a densidade populacional. Cada atraso no desenvolvimento, reduz as chances de sobrevivência dos imaturos, uma vez que estes podem facilmente virar alvos na presença de predadores naturais e parasitas. Além de serem eliminados tanto pela remoção de criadouros, quanto por falta de alimento em virtude da baixa eficiência em competir com espécimes suscetíveis, ocasionando desta forma, a diminuição de gerações e, conseqüentemente, da população de adultos (Agnew e Koella 1999; Bourguet *et al.* 2004; Rivero *et al.* 2010; Van Uitregt *et al.* 2012; Belinato e Martins 2016).

Os efeitos subletais de inseticidas sintéticos no tempo de desenvolvimento das larvas de mosquitos são relatados em diversos estudos, os quais ressaltam que os imaturos são incapazes de evitar os efeitos tóxicos em um criadouro contendo inseticida, como os adultos fazem em campo (Chareonviriyaphap *et al.* 2013; Rahim *et al.* 2017; Tabbabi e Daaboud 2018), demonstrando que a sobrevivência do inseto

depende especialmente de fatores genéticos, condições ambientais e as interações entre eles (Grech *et al.* 2007; Kliot e Ghanim 2012).

A diferença de um dia a mais no tempo médio do estágio de pupa observado na sexta geração controle, provavelmente está atribuída a determinadas características fisiológicas de cada linhagem. Apesar deste resultado, o achado demonstra que não ocorreu influência direta no tempo de desenvolvimento destes insetos, ou seja, considerando desde a imersão dos ovos na água até a emergência dos adultos, uma vez que o maior tempo do ciclo biológico foi obtido para os insetos provenientes da população pressionada.

O baixo peso das fêmeas antes e após o repasto sanguíneo, observado na segunda e sexta geração de *A. aegypti* pressionado, corrobora os dados observados por Fernandes *et al.* (2019) em que verificaram larvas de *A. aegypti* tratadas com o biolarvicida espinosade produzem adultos com intestino médio danificado, o que ocasiona conseqüentemente, fêmeas com peso inferior, fecundidade reduzida e apoptose no intestino médio, diminuindo a proliferação de células-tronco e o número de células enteroendócrinas.

Os efeitos deletérios sobre os vários aspectos reprodutivos, podem ser atribuídos a má formação do intestino médio durante o desenvolvimento. Fêmeas adultas com intestino médio danificado têm sua digestão sanguínea e absorção de nutrientes prejudicadas e seus efeitos negativos parecem afetar a ativação do ovário em mosquitos hematófagos, que dependem da digestão de sangue e assimilação de nutrientes para desencadear a produção de ovos (Briegel 1990; Attardo *et al.* 2005; Blanford *et al.* 2011; Gulia-Nuss *et al.* 2011; Sugiharto *et al.* 2016; Fernandes *et al.* 2019).

A quantidade de sangue ingerido é certamente um parâmetro essencial em relação à capacidade vetorial e à aptidão geral, pois influencia diretamente na quantidade de agentes patogênicos adquiridos e transmitidos, bem como no número de ovos colocados nos criadouros (Martins *et al.* 2012; Viana-Medeiros *et al.* 2017; Wen *et al.* 2018). Neste último aspecto, o sucesso reprodutivo da espécie está diretamente relacionado tanto ao número de descendentes obtidos, quanto às chances de sobrevivência destes em um ambiente considerado extremo, devido à presença de diversos fatores bióticos e abióticos (Clements 1992; Forattini 2002).

Neste estudo, a maior taxa de oviposição observada na segunda geração da população controle em comparação à população pressionada, assemelha-se com os resultados observados em outros trabalhos, nos quais verificaram que fêmeas maiores e

suscetíveis a inseticidas tendem a ingerir mais sangue e colocar mais ovos (Blackmore e Lord 2000; Belinato *et al.* 2009, 2012; Belinato e Valle 2015). No entanto, a ausência de diferença significativa entre as médias de ovos obtidas para as duas populações da sexta geração, possivelmente está relacionada ao processo de adaptação dos insetos oriundos da linhagem pressionada, como uma resposta de diminuir os prejuízos na aptidão, garantindo desta forma, o sucesso reprodutivo da espécie frente a exposição contínua ao biolarvicida.

Apesar de vários estudos ressaltarem que os aspectos biológicos dos insetos são afetados de forma negativa em decorrência dos inseticidas, a literatura mostra que a resistência a determinado produto químico ou biológico não, necessariamente, ocasiona efeitos deletérios na aptidão. Isso foi observado em uma população de *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) resistente ao espinosade, que apresentou maior taxa de emergência de adultos, fecundidade e na eclosão de larvas; e menor duração do estágio larval, do estágio de pupa e no tempo de desenvolvimento em comparação com a população suscetível (Abbas *et al.* 2014).

É essencial levar em consideração que as características biológicas dos insetos quando avaliadas em laboratório, subestimam a extensão dos efeitos em termos de resistência ou suscetibilidade. Em campo, onde as condições são mais rigorosas, como mudanças drásticas de temperatura, umidade, nutrição, competição e até mesmo predação, podem desencadear consequências mais severas, em virtude da compensação de resistência aos inseticidas (Kishony e Leibler 2003; Hardstone *et al.* 2009; Belinato e Martins 2016). Apesar desses fatores, uma análise detalhada em laboratório sobre o efeito da resistência na biologia de *A. aegypti*, pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de novas estratégias de controle, assim como para o manejo da resistência desse mosquito em campo.

## 6. CONCLUSÕES

A concentração diagnóstica (0,904 mg/L) do larvicida mostrou-se efetiva para *A. aegypti*, demonstrando que pode ser recomendada para uso nos programas de controle, para monitorar anualmente o nível deste mosquito.

As alterações no valor da  $CL_{50}$  ao longo das gerações de *A. aegypti*, demonstra a perda de suscetibilidade da população pressionada ao larvicida, tanto na geração  $F_3$  como na  $F_6$ . Logo, mais experimentos são necessários para analisar a evolução da resistência, em condições de laboratório.

Após seis gerações, o espinosade afetou negativamente o tempo médio do estágio larval e do ciclo de vida de *A. aegypti*, demonstrando que os insetos desta população demoraram mais tempo para se desenvolver. Além disso, o peso corporal das fêmeas antes e após o repasto, bem como a fecundidade, foram prontamente reduzidos. Evidenciando que o larvicida afetou aspectos reprodutivos, os quais são relacionados a capacidade vetorial da espécie.

## 7. REFERÊNCIAS

Abbas, N.; Mansoor, M.M.; Shad, S.A.; Pathan, A.K.; Waheed, A.; Ejaz, M.; Zulfiqar, M.A. 2014. Fitness cost and realized heritability of resistance to spinosad in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Bulletin of entomological research* 104: 707-715.

Achee, N.L.; Grieco, J.P.; Vatandoost, H.; Seixas, G.; Pinto, J.; Ching-Ng, L.; David, J.P. 2019. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS neglected tropical diseases* 13: e0006822.

Agnew, P.; Koella, J.C. 1999. Life history interactions with environmental conditions in a host–parasite relationship and the parasite’s mode of transmission. *Evolutionary Ecology* 13: 67-91.

Allal-Benfekih, L.; Aoudia, B.; Mostefaoui, H.; Belguendouz, R. 2013. Comparative evaluation of the toxicity of lambda cyhalothrin and spinosad on the insect pests and auxiliary fauna in an orange orchard of the central Mitidja (Blidean Atlas, Algeria). *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 7: 21-26.

Araújo, L.M.; Ferreira, M.L.B.; Nascimento, O.J.M. 2016. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 74: 253-255.

Araújo, T.V.B.; Alencar Ximenes, R.A.; Barros Miranda-Filho, D.; Souza, W.V.; Montarroyos, U.R.; Melo, A.P.L.; Vazquez, E. 2018. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *The Lancet infectious diseases* 18: 328-336.

Attardo, G.M.; Hansen, I.A.; Raikhel, A.S. 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for an autogeny. *Insect biochemistry and molecular biology* 35: 661-675.

Ayres, M.; Ayres Jr.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. 2007. BioEstat versão 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: MCT/CNPQ, Belém, Pará, Brasil.

Bacci, L.; Lupi, D.; Savoldelli, S.; Rossaro, B. 2016. A review of Spinosyns, a derivative of biological acting substances as a class of insecticides with a broad range of action against many insect pests. *Journal of Entomological and Acarological Research* 48: 40-52.

Balabanidou, V.; Grigoraki, L.; Vontas, J. 2018. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current opinion in insect science* 27: 68-74.

Baldacchino, F.; Caputo, B.; Chandre, F.; Drago, A.; della Torre, A.; Montarsi, F.; Rizzoli, A. 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest management science* 71: 1471-1485.

Bass, C. 2017. Does resistance really carry a fitness cost?. *Current opinion in insect science* 21: 39-46.

Belinato, T.A.; Martins, A.J. 2016. *Insecticide resistance and fitness cost*. In: *Insecticides resistance*. IntechOpen, 243-261.

Belinato, T.A.; Martins, A.J.; Lima, J.B.P.; Lima-Camara, T.N.D.; Peixoto, A.A.; Valle, D. 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 43-47.

Belinato, T.A.; Martins, A.J.; Valle, D. 2012. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 916-922.

Belinato, T.A.; Valle, D. 2015. The impact of selection with diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. *PloS One* 10: e0130719.

Benelli, G.; Jeffries, C.L.; Walker, T. 2016. Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. *Insects* 7: 1-18.

Berticat, C.; Bonnet, J.; Duchon, S.; Agnew, P.; Weill, M.; Corbel, V. 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC evolutionary biology*, 8: 104.

Bhatt, S.; Gething, P.W.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Farlow, A.W.; Moyes, C.L.; Myers, M.F. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504-507.

Biondi, A.; Mommaerts, V.; Smagghe, G.; Vinuela, E.; Zappala, L.; Desneux, N. 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest management science* 68: 1523-1536.

Bisset, J.A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54: 202-219.

Blackmore, M.S.; Lord, C.C. 2000. The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology* 25: 212-217.

Blanford, S.; Shi, W.; Christian, R.; Marden, J.H.; Koekemoer, L.L.; Brooke, B.D.; Coetzee, M.; Read, A.F.; Thomas, M.B. 2011. Lethal and pre-lethal effects of a fungal biopesticide contribute to substantial and rapid control of malaria vectors. *PLoS One* 6: e23591.

Bourguet, D.; Guillemaud, T.; Chevillon, C.; Raymond, M. 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 58: 128-135.

Boyer, S.; Zhang, H.; Lempérière, G. 2012. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of entomological research* 102: 213-229.

Braga, I.A.; Valle, D. 2007. *Aedes Aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 279-93.

Brengues, C.; Hawkes, N.J.; Chandre, F.; McCarroll, L.; Duchon, S.; Guillet, P.; Hemingway, J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 87-94.

Briegel, H. 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 36: 165-172.

Brito, L.P.; Linss, J.G.; Lima-Camara, T.N.; Belinato, T.A.; Peixoto, A.A.;

Lima, J.B.P.; Martins, A.J. 2013. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS One* 8: e60878.

Calvo, E.P.; Coronel-Ruiz, C.; Velazco, S.; Velandia-Romero, M.; Castellanos, J.E. 2016. Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos. *Biomédica* 36: 35-43.

Campbell, L.P.; Luther, C.; Moo-Llanes, D.; Ramsey, J.M.; Danis-Lozano, R.; Peterson, A.T. 2015. Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370: 20140135.

Campos, G.S.; Bandeira, A.C.; Sardi, S.I. 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases* 21: 1885-6.

Campos, J.; Andrade, C.F.S. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública* 35: 232-236.

Canyon, D.V.; HII, J.L.K. 1999. Insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Townsville. *Australian Journal of Entomology* 38: 40-43.

Carvalho, F.D.; Moreira, L.A. 2017. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species?. *Neotropical Entomology* 46: 243-55.

Cavalcanti, L.P.G.; Pontes, R.J.S.; Regazzi, A.C.F.; Júnior, F.J.P.; Frutuoso, R.L.; Sousa, E.P.; Lima, J.W.O. 2007. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. *Revista de Saúde Pública* 41: 638-644.

Chareonviriyaphap, T.; Bangs, M.J.; Suwonkerd, W.; Kongmee, M.; Corbel, V.; Ngoen-Klan, R. 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & vectors* 6: 280.

Clements, A.N. 1992. *The Biology of Mosquitoes: development, nutrition and reproduction*. Chapman & Hall, London, 1: 509.

Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L. 1994. *Principais mosquitos de importância*



*sanitária no brasil*. Rio de Janeiro: Fio Cruz, 228p.

Costa, F.M.; Tadei, W.P. 2011. Laboratory toxicity evaluation of Diflubenzuron, a chitin-synthesis inhibitor, against *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae). *Journal Research in Biology* 6: 444-450.

Costa, F.M.; Tadei, W.P. 2012. Morphological alterations caused by Diflubenzuron in *Anopheles darlingi* root (Diptera, Culicidae). *Journal Research in Biology* 3: 215-221.

Darbro, J.M.; Graham, R.I.; Kay, B.H.; Ryan, P.A.; Thomas, M.B. 2011. Evaluation of Entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Science Technology* 21: 1027-1047.

Davidson, G.; Zahar, A.R. 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. *Bulletin of the World Health Organization* 49: 475-1973.

Del Rio-Galvan, S.L.; Flores, A.E.; Barrera, R.; Lopez-Monroy, B.; Felix, G.; Amador, M.; Ponce-Garcia, G. 2016. Susceptibility to temephos and spinosad in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Journal of medical entomology* 53: 1211-1217.

DeLisi, N.; Ottea, J.; Healy, K. 2017. Susceptibility of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Southern Louisiana to Larval Insecticides. *Journal of economic entomology* 110: 2562-2567.

Devine, G.J.; Eza, D.; Ogusuku, E.; Furlong, M.J. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública* 25: 74-100.

Dias, L.S.; Marcoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Otrera, V.C.G.; Dias, A.S.; Bauzer, L.G.S.R.; Rodovalho, C.M.; Martins, A.J.; Lima, J.B.P. 2017. Toxicity of Spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in brazil. *PLoS One* 12: e0173689.

Díaz-Martínez, S.; Rodríguez-Maciél, J.C.; Lagunes-Tejeda, Á.; Tejeda-Reyes,

M.A.; Silva-Aguayo, G. 2016. Susceptibilidad Diferencial a Spinosad en Huevo, Instares Larvales, Pupa, y Hembra de *Aedes aegypti* (L.) 1. *Southwestern Entomologist* 41: 1111-1121.

Dickens, B.L.; Sun, H.; Jit, M.; Cook, A.R.; Carrasco, L.R. 2018. Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global distribution of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *BMJ global health* 3: e000801.

Donalisio, M.R.; Freitas, A.R.R.; Von Zuben, A.P.B. 2017. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Revista de Saúde Pública* 51: 1-6.

Duarte, G.; Moron, A.F.; Timerman, A.; Fernandes, C.E.; Neto, C.M.; Almeida Filho, G.L.; Junior, H.W.; Santo, H.F.B.E.; Steibel, J.A.P.; Filho, J.B.; *et al.* 2017. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics* 39: 235-248.

Duchet, C.; Franquet, E.; Lagadic, L.; Lagneau, C. 2015. Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and spinosad on adult emergence of the non-biting midges *Polypedilum nubifer* (Skuse) and *Tanytarsus curticornis* Kieffer (Diptera: Chironomidae) in coastal wetlands. *Ecotoxicology and environmental safety* 115: 272-278.

Ebi, K.L.; Nealon, J. 2016. Dengue in a changing climate. *Environmental Research* 151: 115-123.

Fay, R.W.; Eliason, D.A. 1966. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 26: 531-534.

Fernandes, K.M.; Tomé, H.V.V.; Miranda, F.R.; Gonçalves, W.G.; Pascini, T.V.; Serrão, J.E.; Martins, G.F. 2019. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere* 221: 464-470.

Ferreira, F.A.D.S.; Arcos, A.N.; Sampaio, R.T.D.M.; Rodrigues, I.B.; Tadei, W.P. 2015. Effect of *Bacillus sphaericus* Neide on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and associated insect fauna in fish ponds in the Amazon. *Revista Brasileira de Entomologia*

59: 234–239.

Ferreira, M.U.; Castro, M.C. 2016. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria journal*, 15: 284.

Feyereisen, R.; Dermauw, W.; Van Leeuwen, T. 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pesticide biochemistry and physiology* 121: 61-77.

Finney, D.J. 1981. *Probit Analysis*. London, Cambridge University, 333p.

Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora USP, São Paulo-SP. 860p.

França, G.V.; Schuler-Faccini, L.; Oliveira, W.K.; Henriques, C.M.; Carmo, E.H.; Pedi, V.D.; Barros, F.C. 2016. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *The Lancet* 388: 891-897.

Fritzell, C.; Rousset, D.; Adde, A.; Kazanji, M.; Van Kerkhove, M.D.; Flamand, C. 2018. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS neglected tropical diseases* 12: e0006533.

Gilbert, L.I.; Gill, S.S. 2010. (Ed.). *Insect control: biological and synthetic agents*. San Diego: Academic Press, 451p.

Gómez-Guzmán, J.A.; García-Marín, F.J.; Sáinz-Pérez, M.; González-Ruiz, R. 2017. Behavioural Resistance in Insects: Its Potential Use as Bio Indicator of Organic Agriculture. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 95: 042038.

Gould, E.; Pettersson, J.; Higgs, S.; Charrel, R.; Lamballerie, X. 2017. Emerging arboviruses: why today?. *One Health* 4: 1-13.

Grech, K.; Maung, L.A.; Read, A.F. 2007. The effect of parental rearing conditions on offspring life history in *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal* 6: 130.

Gress, B.E.; Zalom, F.G. 2018. Identification and risk assessment of spinosad resistance in a California population of *Drosophila suzukii*. *Pest management science* 75: 1270-1276.

Gulia-Nuss, M.; Robertson, A.E.; Brown, M.R.; Strand, M.R. 2011. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS One* 6: e20401.

Harbach, R.E. 2019. Mosquito Taxonomic Inventory (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>). Acesso em 21/ 01/ 2019.

Hardstone, M.C.; Lazzaro, B.P.; Scott, J.G. 2009. The effect of three environmental conditions on the fitness of cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *BMC Evolutionary Biology* 9: 42.

Hemingway, J.; Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology* 45: 371-391.

Hertlein, M.B.; Mavrotas, C.; Jousseau, C.; Lysandrou, M.; Thompson, G.D.; Jany, W.; Ritchie, S.A. 2010. A review of Spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 26: 67-87.

Huang, Y.J.; Higgs, S.; Vanlandingham, D. 2017. Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. *Insects* 8: 21.

Huseyin, C.; Yanikoglu, A.; Cilek, J.E. 2005. Evaluation of the naturally derived insecticide spinosad against *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) larva in septic tank water in Antalya, Turkey. *Journal of vector ecology* 30: 151-154.

Jiang, Y.; Mulla, M.S. 2009. Laboratory and field evaluation of spinosad, a biorational natural product, against larvae of *Culex* mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 25: 456-467.

Kamal, M.; Kenawy, M.A.; Rady, M.H.; Khaled, A.S.; Samy, A.M. 2018. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. *PLoS one* 13: e0210122.

Karunaratne, P.; De Silva, P.; Weeraratne, T.; Surendran, N. 2018. Insecticide resistance in mosquitoes: Development, mechanisms and monitoring. *Ceylon Journal of Science* 47: 299-309.

Khan, H.A.A. 2018. Spinosad resistance affects biological parameters of *Musca domestica* Linnaeus. *Scientific reports* 8: 14031.

Khan, H.A.A.; Akram, W.; Shehzad, K.; Shaalan, E.A. 2011. First report of field evolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. *Parasites & vectors* 4: 146.

Kishony, R.; Leibler, S. 2003. Environmental stresses can alleviate the average deleterious effect of mutations. *Journal of biology* 2: 14.

Kliot, A.; Ghanim, M. 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest management science* 68: 1431-1437.

Lawler, S.P. 2017. Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. *Ecotoxicology and environmental safety* 139: 335-343.

Leora Software. 2005. POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOra-Software, Petaluma, CA.

Leta, S.; Beyene, T.J.; De Clercq, E.M.; Amenu, K.; Kraemer, M.U.; Revie, C.W. 2018. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases* 67: 25-35.

Li, X.; Wan, Y.; Yuan, G.; Hussain, S.; Xu, B.; Xie, W.; Wu, Q. 2017. Fitness Trade-Off Associated With Spinosad Resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of economic entomology* 110: 1755-1763.

Li, Z.M.; Liu, S.S.; Liu, Y.Q.; Ye, G.Y. 2007. Temperature-related fitness costs of resistance to spinosad in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bulletin of entomological research* 97: 627-635.

Lima-Camara, T.N. 2016. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 50.

Liu, N. 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual Review of Entomology* 60: 537–59.

Loconsole, D.; Metallo, A.; De Robertis, A.L.; Morea, A.; Quarto, M.; Chironna, M. 2018. Seroprevalence of Dengue Virus, West Nile Virus, Chikungunya Virus, and Zika Virus in International Travelers Attending a Travel and Migration Center in 2015–2017, Southern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 18: 331-334.

Lopes, J. 1999. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do norte do Paraná, Brasil. VIII. Influência das larvas predadoras (*Toxorhynchites* sp., *Limatus durhamii* e *Culex bigoti*) sobre a população de larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Culex eduardoi*. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 821-6.

Lourenço-de-Oliveira, R. 2015. *Biologia e comportamento do vetor*. Valle, D.; Pimenta, D.N.; Cunha, R.V.; organizadores. *Dengue teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 76-92.

Lumaret, J.P.; Errouissi, F.; Floate, K.; Rombke, J.; Wardhaugh, K. 2012. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13: 1004-1060.

Macoris, M.D.L.D.G.; Andrighetti, M.T.M.; Wanderley, D.M.V.; Ribolla, P.E.M. 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47: 573-578.

Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Nalon, K.C.R.; Garbeloto, V.C.; Junior, A.L.C. 2005. Standardization of Bioassays for Monitoring Resistance to Insecticides in *Aedes aegypti*. *Dengue Bulletin* 29: 7.

Malta, J.M.A.S.; Vargas, A.; Leite, P.L.; Percio, J.; Coelho, G.E.; Ferraro, A.H.A.; Saad, E. 2017. Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 26: 9-18.

Marcombe, S.; Chonephetsarath, S.; Thammavong, P.; Brey, P.T. 2018. Alternative insecticides for larval control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Lao PDR: insecticide resistance and semi-field trial study. *Parasites & vectors* 11: 616.

Marcondes, C.B.; Ximenes, M.D.F.F.D. 2016. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia) mosquitoes*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 49: 4-10.

Martins, A.J.; Ribeiro, C.D.M.; Bellinato, D.F.; Peixoto, A.A.; Valle, D.; Lima, J.B.P. 2012. Effect of insecticide resistance on development longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One* 7: e31889.

Mathenge, E.M.; Gimnig, J.E.; Kolczak, M.; Ombok, M.; Irungu, L.W.; Hawley, W.A. 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *Journal of medical Entomology* 38: 531-536.

Mazzarri, M.B.; Georghiou, G.P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal American Mosquito Control Association* 11: 315-322.

Menn, J. (Ed.). (2012). *Insect juvenile hormones: chemistry and action*. Elsevier.

Merle, H.; Donnio, A.; Jean-Charles, A.; Guyomarch, J.; Hage, R.; Najjioullah, F.; Cabié, A. 2018. Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. *Journal francais d'ophtalmologie* 41: e235-e243.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (MS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2009. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde (Série A. Normas e Manuais Técnicos.)

Monteiro, H.R.; Pestana, J.L.; Novais, S.C.; Soares, A.M.; Lemos, M.F. 2019. Toxicity of the insecticides spinosad and indoxacarb to the non-target aquatic midge *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment* 666: 1283-1291.

Moreira, M.F.; Mansur, J.F.; Figueira-Mansur, J. 2012. Resistência e inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. *Tópicos avançados em entomologia molecular* 15: 1-23.

Mossa, A.T.H.; Mohafrash, S.M.; Chandrasekaran, N. 2018. Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. *BioMed research international* 2018: 17.

Moulton, J.K.; Pepper, D.A.; Dennehy, T.J. 2000. Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest Management Science* 56: 842-848.

Moyes, C.L.; Vontas, J.; Martins, A.J.; Ng, L.C.; Koou, S.Y.; Dusfour, I.; Weetman, D. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS neglected tropical diseases* 11: e0005625.

Nkya, T.E.; Akhouayri, I.; Kisinza, W.; David, J.P. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect biochemistry and molecular biology* 43: 407-416.

Nóbrega, M.E.B.D.; Araújo, E.L.D.L.; Wada, M.Y.; Leite, P.L.; Dimech, G.S.; Pércio, J. 2018. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 27: e2017039.

Orr, N.; Shaffner, A.J.; Richey, K.; Crouse, G.D. 2009. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 1-5.

PAHO-Pan American Health Organization / WHO-World Health Organization. [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_joomlabook&view=topic&id=1](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=1). Acessado em 17 de janeiro de 2019.

Paiva, M.H.S. 2006. *Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de Aedes aegypti do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco. 89pp.



Paris, M.; David, J.P.; Despres, L. 2011. Fitness costs of resistance to Bti Toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* 20: 1184-1194.

Patterson, J.; Sammon, M.; Garg, M. 2016. Dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine* 17: 671.

Pinheiro, V.C.S.; Tadei, W.P. 2002. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 44: 245-250.

Poletti, M.; Omoto, C. 2003. Resistência de inimigos naturais a pesticidas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 30: 16-26.

Powell, J.R.; Gloria-Soria, A.; Kotsakiozi, P. 2018. Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. *BioScience* 68: 854-860.

Raghavendra, K.; Velamuri, P.S. 2018. Spinosad: A biorational mosquito larvicide for vector control. *The Indian journal of medical research* 147: 4.

Rahim, J.; Ahmad, A.H.; Maimusa, A.H. 2017. Effects of temephos resistance on life history traits of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), a vector of arboviruses. *Revista Brasileira de Entomologia* 61: 312-317.

Rehan, A.; Freed, S. 2014. Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *CropProtection* 56: 10-15.

Reiter, P.; Amador, M.A.; Colon, N. 1991. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7: 52-55.

Resende, M.C.D.; Gama, R.A. 2006. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 72-5.

Rinkevich, F.D.; Scott, J.G. 2009. Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect molecular Biology*, 18: 233-242.

Rivero, A.; Vezilier, J.; Weill, M.; Read, A.F.; Gandon, S. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem?. *PLoS pathogens* 6: e1001000.

Roiz, D.; Wilson, A.L.; Scott, T.W.; Fonseca, D.M.; Jourdain, F.; Müller, P.; Corbel, V. 2018. Integrated Aedes management for the control of Aedes-borne diseases. *PLoS neglected tropical diseases* 12: e0006845.

Romi, R.; Proietti, S.; Di Luca, M.; Cristofaro, M. 2006. Laboratory evaluation of the bioinsecticide spinosad for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22: 93-97.

Salgado, V.L. 1998. Studies on the mode of action of Spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 60: 91-102.

Salgado, V.L.; Sparks, T.C. 2010. *The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance*. In: GILBERT, L.I.; GILL, S.S. (eds). *Insect control: biological and synthetic agents*. 1 ed. London: Academic Press, 207-243.

Salgado, V.L.; Sparks, T.C. 2005. *The spinosyns: Chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance*. In: Gilbert. L.I., Latrou, K. and Gill, S.S., Eds., *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, Oxford, 137-173.

Salinas, J.L.; Walteros, D.M.; Styczynski, A.; Garzón, F.; Quijada, H.; Bravo, E.; Arteta, Z. 2017. Zika virus disease-associated Guillain-Barré syndrome—Barranquilla, Colombia 2015–2016. *Journal of the neurological sciences* 381: 272-277.

Santos, M.E.M.; Batista, W.S.; Oliveira, J.V.F.; Jansen, I.C.C.; de Sousa Santos, K.F.S.; Santos, E.C.R. 2017. Ações educativas para o combate ao mosquito *Aedes aegypti* em uma escola da região metropolitana de são luís. *Revista Caderno Pedagógico* 14:8-27.

Santos, V.S.V.; Silva, C.E.; Oliveira, C.M.; Morais, C.R.; Limongi, J.E.; Pereira, B.B. 2019. Evaluation of toxicity and environmental safety in use of spinosad to

rationalize control strategies against *Aedes aegypti*. *Chemosphere* 226: 166-172.

Secretária de Vigilância em Saúde-SVS / Ministério da Saúde-MS. 2019. Boletim Epidemiológico-Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (Dengue, Chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 11 de 2019. Volume 50. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/25/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-publicacao-25-03-2019.pdf>. Acesso em: 22 de abril de 2019.

Secretária de Vigilância em Saúde-SVS / Ministério da Saúde-MS. 2019. Boletim Epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionado à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018. Volume 49. Nº 54. ISSN 9352-7864. Disponível em: [file:///C:/Users/Nexw/Downloads/Artigos%20para%20a%20introdu%C3%A7%C3%A3o/Boletim%20epidemiol%C3%B3gico\\_2018\\_microcefalia.pdf](file:///C:/Users/Nexw/Downloads/Artigos%20para%20a%20introdu%C3%A7%C3%A3o/Boletim%20epidemiol%C3%B3gico_2018_microcefalia.pdf). Acesso em: 14 de fevereiro de 2019.

Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA); Prefeitura de Manaus. 2017. <http://www.manaus.am.gov.br/noticia/prefeitura-convoca-a-sociedade-para-ajudar-no-combate-ao-aedes-aegypti/>. Acesso em: 29 de novembro de 2017.

Shaw, W.R.; Catteruccia, F. 2018. Vector biology meets disease control: Using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature microbiology*, 1.

Shepard, D.; Halasa, Y.; Undurraga, E. 2014. Global cost of dengue in the professional healthcare system. Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. New Orleans, Louisiana, USA.

Shepard, D.; Halasa, Y.; Undurraga, E.; Stanaway J. 2015. Global economic cost of dengue illness American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Philadelphia, USA.

Silva, H.H.G.D.; Silva, I.G.D. 1999. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32:

349-55.

Silva, W.R.D.; Soares-da-Silva, J.; Ferreira, F.A.D.S.; Rodrigues, I.B.; Tadei, W.P.; Zequi, J.A.C. 2018. Oviposition of *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 and *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) under laboratory and field conditions using ovitraps associated to different control agents, Manaus, Amazonas, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 62: 304-310.

Simma, E.A.; Dermauw, W.; Balabanidou, V.; Snoeck, S.; Bryon, A.; Clark, R.M.; Van Leeuwen, T. 2018. Genome-wide gene expression profiling reveals that cuticle alterations and P450 detoxification are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles arabiensis* populations from Ethiopia. *bioRxiv* 451336.

Soares-da-Silva, J.; Pinheiro, V.C.S.; Litaiff-Abreu, E.; Polanczyk, R.A.; Tadei, W.P. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de entomologia* 59: 1-6.

Soares-Pinheiro, V.C.; Dasso-Pinheiro, W.; Trindade-Bezerra, J.M.; Tadei, W.P. 2017. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 77: 396-401.

Souza, K.R.; Santos, M.L.R.; Guimarães, I.C.S.; Ribeiro, G.D.S.; Silva, L.K. 2018. Saberes e práticas sobre controle do *Aedes aegypti* por diferentes sujeitos sociais na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 34: e00078017.

Stahl, H.C.; Butenschoen, V.M.; Tran, H.T.; Gozzer, E.; Skewes, R.; Mahendradhata, Y.; Farlow, A. 2013. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. *BMC public health* 13: 1048.

Styczynski, A.R.; Malta, J.M. Krow-Lucal, E.R.; Percio, J.; Nóbrega, M.E.; Vargas, A.; Lanzieri, T.M.; *et al.* (2017). Increased rates of Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus outbreak in the Salvador metropolitan area, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 11: e0005869.

Su, T.; Thieme, J.; Lura, T.; Cheng, M.L.; Brown, M.Q. 2019. Susceptibility Profile of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) from Montclair, California, to

Commonly Used Pesticides, With Note on Resistance to Pyriproxyfen. *Journal of medical entomology* 56: 1047-1054.

Su, T.; Cheng, M.L. 2012. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* to spinosad: a preliminary report. *Journal of the American Mosquito Control Association* 28: 263-267.

Su, T.; Cheng, M.L. 2014a. Cross Resistances in Spinosad-Resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 51: 428-435.

Su, T.; Cheng, M.L. 2014b. Laboratory selection of resistance to spinosad in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 51: 421-427.

Sugiharto, V.A.; Grieco, J.P.; Murphy, J.R.; Olsen, C.H.; Colacicco-Mayhugh, M.G.; Stewart, V.A.; Achee, N.L.; Turell, M.J. 2016. Effects of preexposure to DEET on the downstream blood-feeding behaviors of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 53: 1100-1104.

Tabbabi, A.; Daaboub, J. 2018. Fitness cost in field *Anopheles labranchiae* populations associated with resistance to the insecticide deltamethrin. *Revista Brasileira de Entomologia* 62: 107-111.

Thomas, M.B. 2018. Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities. *BioControl* 63: 61-69.

Thompson, G.D.; Dutton, R.; Sparks, T.C. 2000. Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science* 56: 696-702.

Ureña, E.; Guillem-Amat, A.; Couso-Ferrer, F.; Beroiz, B.; Perera, N.; López-Errasquín, E.; Hernández-Crespo, P. 2019. Multiple mutations in the nicotinic acetylcholine receptor Cca6 gene associated with resistance to spinosad in medfly. *Scientific Reports* 9: 2961.

Valbon, W.R.; Haddi, K.; Souza, R.A.; Carvalho, G.A.; Guedes, R.N.C.; Martins, G.F.; Oliveira, E.E. 2019. “Armed to the teeth”: The multiple ways to survive

insecticidal and predatory challenges in *Aedes aegypti* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 156: 87-95.

Valle, D.; Belinato, T.A.; Martins, A.J. 2015. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In: Valle D (ed) Dengue: teorias e práticas. Fiocruz, Rio de Janeiro, 93–126.

Van Uitregt, V.O.; Hurst, T.P.; Wilson, R.S. 2012. Reduced size and starvation resistance in adult mosquitoes, *Aedes notoscriptus*, exposed to predation cues as larvae. *Journal of Animal Ecology* 81: 108-115.

Vega-Rúa, A.; Zouache, K.; Girod, R.; Failloux, A.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2014. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of Virology* 88: 6294-6306.

Viana-Medeiros, P.F.; Bellinato, D.F.; Martins, A.J.; Valle, D. 2017. Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. *Medical and Veterinary Entomology* 31: 340-50.

Seidlein, L.V.; Kekulé, A.S.; Strickman, D. 2017. Novel vector control approaches: the future for prevention of Zika virus transmission?. *PLoS Medicine*, 14: e1002219.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). 2019. Mosquito identification resources. Disponível em: <[http://www.wrbu.org/VecID\\_MQ.html](http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html). Acesso em: 21 de janeiro de 2019.

Watson, G.B. 2001. Actions of insecticidal spinosyns on gaminobutyric acid receptors from small-diameter cockroach neurones. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 71: 20–28.

Wen, D.; Li, S.; Dong, F.; Zhang, Y.; Lin, Y.; Wang, J.; Zou, Z.; Zheng, A. 2018. Nglycosylation of viral E protein is the determinant for vector midgut invasion by flaviviruses. *mBio* 9: e00046-18.

World Health Organization-WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides world health organization communicable disease control, prevention and eradication who pesticide. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.

World Health Organization-WHO. 1981. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides, WHO/VBC/ 81.807.

World Health Organization-WHO. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/csr/don/8-february-2016-gbs-brazil/en/>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2019.

World Health Organization-WHO. 2016. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations, WHO/ZIKV/VC/16.1.

World Health Organization-WHO. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/csr/don/11-february-2019-yellow-fever-brazil/en/>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2019.

Zalucki, M.P.; Furlong, M.J. 2017. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Current Opinion in Insect Science* 21: 19-25.

Zanluca, C.; Melo, V.C.A.D.; Mosimann, A.L.P.; Santos, G.I.V.D.; Santos, C.N.D.D.; Luz, K. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110: 569-572.

Zara, A.L.D.S.A.; Santos, S.M.D.; Fernandes-Oliveira, E.S.; Carvalho, R.G.; Coelho, G.E. 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 25: 391-404.

## 8. ANEXO

### *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

---

**Projeto de Pesquisa:** Monitoramento da resistência e efeitos em parâmetros biológicos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae), exposto ao biolarvicida espinosade, em condições de laboratório, Manaus, Amazonas, Brasil

Caro morador,

A Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela Urbana são doenças importantes transmitidas por mosquitos, sendo *Aedes aegypti* o principal transmissor desses vírus nas Américas. Com o objetivo de aprofundar os estudos envolvendo o controle destes insetos, será realizado um projeto de pesquisa com o objetivo de analisar a resistência destes mosquitos ao larvicida biológico espinosade, objetivando melhorar as ações de controle.

Dessa forma, pedimos que leia com atenção os itens abaixo com relação às etapas do projeto:

#### **01 – Do Estudo**

Esse estudo será realizado nas seis zonas administrativas da cidade de Manaus (Norte, Sul, Leste, Oeste, Centro-Sul e Centro-Oeste), onde alunos de mestrado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e Agentes de Combate a Endemias da Prefeitura Municipal, devidamente identificado, visitarão as residências durante o trabalho de pesquisa. As casas visitadas receberão armadilhas para captura de ovos de *A. aegypti*. O monitoramento das armadilhas será semanal, por um período de quatro semanas e após este tempo serão recolhidas e encaminhadas para o Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue do INPA para a realização dos estudos.



Esse estudo é uma parceria entre o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (FVS/AM) e a Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA).

## **02 – Das Armadilhas**

As armadilhas instaladas nas residências serão do tipo ovitrampa, especialmente desenvolvidas para a captura de ovos do mosquito transmissor dos vírus Dengue/Chikungunya/Zika.

A armadilha é composta por um recipiente plástico de cor preta e formato circular, medindo 10 cm de diâmetro e 12 cm de altura, com capacidade de 500 mL. No interior da armadilha será adicionado uma palheta de madeira do tipo *Duratree*, marca Eucatex<sup>®</sup>, com cinco mm de espessura, 15 cm de comprimento por três cm de largura, colocadas verticalmente e uma solução que serve como atrativo para o mosquito, obtida a partir de capim coloniã (*Megathyrsus maximus* Jacq) fermentado em água de torneira por 07 dias em temperatura ambiente. A armadilha é um método de monitoramento e controle de mosquitos, pois retira ovos do ambiente e não possui material tóxico que apresente risco à saúde de pessoas ou animais.

**Importante:** deve-se evitar mexer na armadilha ou mesmo impedir que crianças e animais se aproximem para garantir o perfeito andamento do projeto. Somente os pesquisadores responsáveis pela pesquisa, os Agentes de Endemias ou os Técnicos da Secretaria de Saúde farão a instalação e retirada das armadilhas.

## **03 – Dos Responsáveis**

Qualquer dúvida em relação ao projeto ou relacionado às armadilhas, por favor, entre em contato com: William Ribeiro da Silva; Thamiles das Chagas Gonçalves; Dr. Wanderli Pedro Tadei; ou Dra. Rosemary Aparecida Roque.

## **04 – Da Declaração**

a) Declaro para os devidos fins que recebi informações a respeito do projeto, sendo estas explicitadas neste documento por mim assinado;

b) Declaro que, para participar deste projeto, nenhum tipo de gratificação ou pagamento em dinheiro me foi oferecido, sendo de livre e espontânea vontade a minha participação e de minha família;

c) Declaro que tenho o direito de me retirar desse estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de retaliação ou danos.

d) Declaro que, uma vez lido e assinado o presente termo, cumprirei todas as recomendações com relação ao cuidado com as armadilhas.

e) Comprometo-me a avisar aos responsáveis pelo estudo, qualquer problema com relação ao funcionamento das armadilhas.

<b>Local: Data:</b>	
<b>Nome do morador (legível):</b>	
<b>Assinatura do MORADOR:</b>	<b>Assinatura do ENTREVISTADOR:</b>

**Obrigado por sua participação!!!**