



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE COMUNITÁRIA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA

UTILIZAÇÃO DE PEIXES LARVÓFAGOS PARA O CONTROLE DAS FORMAS
IMATURAS DO *A. aegypti* EM DEPÓSITOS DOMICILIARES DE ÁGUA.

Aluno: Clemilson Nogueira Paiva

Orientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

FORTALEZA

2013

CLEMILSON NOGUEIRA PAIVA

UTILIZAÇÃO DE PEIXES LARVÓFAGOS PARA O CONTROLE DAS FORMAS
IMATURAS DO *A. aegypti* EM DEPÓSITOS DOMICILIARES DE ÁGUA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, do Departamento de Saúde Comunitária da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- P167u Paiva, Clemilson Nogueira.
Utilização de peixes larvófagos para o controle das formas imaturas do *A. aegypti* em depósitos domiciliares de água. / Clemilson Nogueira Paiva. – 2013.
167 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Comunitária, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Mestrado em Saúde Pública, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Saúde Coletiva.
Orientação: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Goés Cavalcanti.
1. Dengue. 2. Aedes. 3. Controle Biológico de Vetores. I. Título.

CDD 616.921

CLEMILSON NOGUEIRA PAIVA

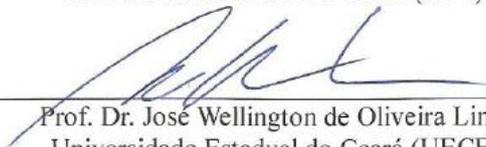
UTILIZAÇÃO DE PEIXES LARVÓFAGOS PARA O CONTROLE DAS FORMAS
IMATURAS DO *A. aegypti* EM DEPÓSITOS DOMICILIARES DE ÁGUA.

Aprovada em: 06 / 11 / 2013

BANCA EXAMINADORA



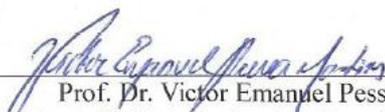
Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. José Wellington de Oliveira Lima
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof. Dr. Carlos Henrique Morais de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Victor Emanuel Pessoa Martins
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

À minha esposa e filhos, que me dão
ânimo para continuar cada dia.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos anos de estudo, e desde cedo, apesar de ainda não ter definido que seria biólogo, mas uma certeza eu tinha, queria trabalhar com pesquisa, contribuir de alguma forma com a sociedade. Muitas barreiras foram ultrapassadas, por alguns momentos vi o sonho de entrar na carreira acadêmica bem distante, por alguns momentos até desisti, pensei que não seria mais possível, mas aqui estou, concluindo uma importante etapa neste processo e não poderia deixar de citar pessoas que foram muito importantes neste processo, as quais listarei abaixo.

A Deus por ter me conduzido até este momento, por não ter deixado o sonho morrer em meu coração. Por ter me acompanhado em todos os momentos sem nunca ter me abandonado.

Aos meus pais pelo esforço para me darem a melhor educação. Pelo amor e carinho de meu pai, que infelizmente seus problemas de saúde não lhe permitem estar se alegrando comigo, mas tenho certeza que se estivesse em pleno gozo de saúde estaria muito orgulhoso. Pelas repreensões de minha mãe, obrigado pelas palmadas, por não ter permitido sair de casa todas as vezes que quis os banhos no açude, os jogos de futebol. Vinte anos atrás confesso que em muitos momentos senti raiva, pois queria sair mais, mas hoje vejo o quão foi importante o rigor de sua educação, pois hoje posso usufruir muito mais do que seria possível naqueles momentos. Eu os amo muito.

À minha irmã, Cléa, pelo apoio dado desde antes de entrar na graduação, quando insistiu para que eu saísse de Quixadá e fosse morar em Fortaleza. Me acolheu em sua casa (como um filho) e deu o suporte para que concluísse a graduação e também o mestrado. Tenho um grande carinho por você e minhas lindas sobrinhas Patrícia e Priscila.

Aos colegas de mestrado, em especial a Kedimam e Beto.

Aos amigos Eduardo, Fabíola e Juliana pelos momentos vividos desde a graduação, e apesar de distantes hoje, ainda nutro um carinho bem especial por vocês.

A todos os professores e funcionários do mestrado por toda a dedicação durante o período em que estive ligado ao programa.

Aos professores Dr. Carlos Henrique e Dr. José Wellington tanto pela ajuda na análise estatística como pelas preciosíssimas sugestões dadas na qualificação e defesa.

À toda equipe do laboratório de entomologia pelo apoio nos experimentos, em especial ao Hugo, Sara e Camila. Sem vocês não teria conseguido.

À Secretaria municipal de saúde de Quixadá, por ter me proporcionado este processo de crescimento profissional.

Ao meu irmão em Cristo e amigo Francisco Oseas, foi muito importante sua colaboração nas atividades da Secretaria Municipal de Saúde nos momentos em que precisei ficar ausente

A FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro dado por meio dos editais **Primeiros Projetos de Pesquisa** (Nº PP1-0033-00105.01.01.00/10) e pelo edital **PPSUS/REDE/MS/CNPq/FUNCAP/SESA 03/2012**, processo Nº 12535699-4.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro para Apoio técnico através do edital – MCT/CNPq 10/2010 - AT-NM, processo No. 503222/2010-0.

Ao professor Dr. Luciano Pamplona, por não ter sido simplesmente um orientador, ou professor, foi muito mais, foi um amigo, exemplo a ser seguido. Hoje eu posso dizer que tenho um professor, um orientador e um ser humano em quem me espelhar. Muito obrigado por ter me ajudado a me tornar um professor e um profissional de saúde melhor. Espero que possamos continuar desenvolvendo projetos juntos, pois vejo que ainda tenho muito a aprender.

E por último ficou o mais importante, o alicerce de tudo, minha família. Este anjo que DEUS colocou em minha vida a quase 12 anos atrás, que mudou completamente o meu rumo, que me ajudou a ser o homem que sou hoje, **Sonia**, minha amada esposa. Sou muito feliz por te ter ao meu lado, por ser minha companheira, amiga, amante, meu tudo. Não poderia ter escolhido uma mãe melhor para meus filhos. Você, **João Felipe** e **Ana Sofia** são o que eu tenho de mais importante, fazem com que eu não tenha uma casa e sim um lar, para o qual anseio voltar sempre que viajo. Os amo de todo meu coração.

Não temas porque eu sou contigo, não te assombres porque eu sou o teu Deus, eu te fortaleço e te ajudo e te sustento com a minha destra fiel.

Is 43:10

RESUMO

O dengue permanece como importante problema de saúde pública e a principal estratégia de controle empregada permanece sendo o uso de larvicidas contra as formas imaturas de seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Por conta das limitações existentes com o uso desses larvicidas é importante a busca por outras alternativas de controle. O uso de peixes larvófagos, como mecanismo de controle biológico, tem sido incentivado e desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* na presença de peixes larvófagos e a possibilidade de sua utilização em consórcio com os larvicidas recomendados pelo Programa Nacional de Controle do Dengue (PNCD). Foi adaptada a fórmula de Kramer e Mulla (1979) para cálculo do Índice de Atividade de Oviposição (IAO), com três diferentes situações. Foram testadas três espécies de peixe (*Betta splendens*, *Trichogaster trichopterus* e *Poecilia reticulata*) e três diferentes larvicidas (*Bti*, novaluron e temefós). Para determinar a capacidade de repelência utilizamos uma gaiola com volume de 6m³, em que foram colocados nove tambores com capacidade para 70 litros de água. Em três tambores foi colocado somente água (controle), em outros três um peixe e nos outros três o larvicida a ser testado. Após uma semana os mosquitos postos nessa gaiola eram retirados e os ovos contados com auxílio de um microscópio entomológico. Cada associação peixe/larvicida foi repetida 5 vezes, perfazendo um total de 30 experimentos. Para avaliar a sobrevivência dos peixes utilizou-se 15 caixas d'água com 250 litros de água. Em 10 caixas foi colocado o peixe com o respectivo larvicida a ser testado e em outras cinco, somente o peixe (controle). Cada associação peixe/larvicida foi repetida 4 vezes. Os peixes *T. trichopterus* e *P. reticulata* não apresentaram nenhuma influência na atividade de oviposição das fêmeas de *A. aegypti*, o mesmo acontecendo com os larvicida novaluron e temefós. Já o peixe *B. splendens* apresentou repelência à postura de ovos, enquanto o larvicida *Bti* atraiu a postura por parte das fêmeas grávidas. Todos os peixes avaliados sobreviveram aos larvicidas recomendados pelo PNCD, sugerindo ser viável sua utilização em consórcio, em programas integrados de controle de vetores.

Palavras-chave: Dengue, *Aedes aegypti*, peixes larvófagos, controle biológico

ABSTRACT

Dengue remains an important public health problem and the main control strategy employed remains the use of larvicides against the immature forms its principal vector, the mosquito *Aedes aegypti*. Because of limitations with the use of these larvicides is important to search for other alternatives control. The use of larvivorous fish, such as biological control mechanism, has been encouraged in the world and thus the objective of this study was to evaluate the oviposition behavior of pregnant females of *Aedes aegypti* in the presence of larvivorous fish and usability in consortium with larvicides recommended by the Program National Control Dengue (PNCD). Was adapted formula Kramer and Mulla (1979) for calculation of Oviposition Activity Index (OAI), with three different situations. We tested three species of fish (*Betta splendens*, *Trichogaster trichopterus* and *Poecilia reticulata*) and three different larvicides (Bti, novaluron and temefos). To determine the repellency use a cage with a volume of 6m³, where drums were placed nine with 70 liters of water. Three barrels were placed in water only (control), one in three other fish and other three larvicides to be tested. After a week the mosquitoes put this cage eggs were removed and counted with the aid of a microscope entomological. Each association fish / larvicide was repeated 5 times for a total of 30 experiments. To evaluate the survival of fish we used 15 water tanks with 250 liters of water. In 10 cases the fish was placed with its larvicide to be tested and in five, only the fish (control). Each association fish / larvicide was repeated 4 times. Fish *T. trichopterus* and *P. reticulata* showed no influence on oviposition activity of females of *A. aegypti*, the same happening with the larvicide temefos and novaluron. Already the fish *B. splendens* showed repellency to oviposition while the larvicide Bti attracted posture on the part of pregnant females. All fish survived the evaluated recommended larvicides PNCD, suggesting feasible to use in consortium programs in integrated vector control.

Key-words: Dengue, *Aedes aegypti*, larvivorous fish, biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de casos e Incidência (/100.000 hab.) de dengue no Brasil, 1990 a 2012.....	25
Figura 2	Número de casos e Incidência (/100.000 hab.) de dengue no Ceará, 1986 a 2013.....	26
Figura 3	Casos confirmados, óbitos e letalidade por FHD no Ceará, 2001 a 2013.....	27
Figura 4	Casos, óbitos e letalidade por Dengue com complicação (DCC) no Ceará, 2001 a 2013.....	27
Figura 5	Proporção entre dengue clássico (DC) e casos de dengue grave (DCC + FHD) no Ceará, 2001 a 2013.....	28
Figura 6	<i>Betta splendens</i>	40
Figura 7	<i>Poecilia reticulata</i>	41
Figura 8	<i>Trichogaster trichopterus</i>	41
Figura 9	Tambor com papel filtro na borda.....	42
Figura 10	Gaiola utilizada nos experimentos de repelência com volume de 6m ³	43
Figura 11	Esquema da distribuição dos tambores dentro da gaiola.....	43
Figura 12	Distribuição dos tambores dentro da gaiola.....	44
Figura 13	Ganchos para colocar a solução açucarada e as codornas.....	45
Figura 14	Esquema dos experimentos de <i>B. splendens</i> X temefós.....	45
Figura 15	Esquema dos experimentos de <i>B. splendens</i> X Bti.....	46
Figura 16	Esquema dos experimentos de <i>B. splendens</i> X Novaluron.....	46
Figura 17	Esquema dos experimentos de <i>P. reticulata</i> X temefós.....	47
Figura 18	Esquema dos experimentos de <i>P. reticulata</i> X Bti.....	47
Figura 19	Esquema dos experimentos de <i>P. reticulata</i> X novaluron.....	48
Figura 20	Derivação da fórmula de Kramer e Mulla (1979).....	50
Figura 21	Sobrevivência do peixe <i>B. splendens</i> na presença do larvicida temefós.....	51
Figura 22	Sobrevivência do peixe <i>B. splendens</i> na presença do larvicida <i>Bti</i>	52

Figura 23	Sobrevivência do peixe <i>B. splendens</i> na presença do larvicida novaluron.....	52
Figura 24	Sobrevivência do peixe <i>P. reticulata</i> na presença do larvicida temefós.....	52
Figura 25	Sobrevivência do peixe <i>P. reticulata</i> na presença do larvicida <i>Bti</i>	53
Figura 26	Sobrevivência do peixe <i>P. reticulata</i> na presença do larvicida novaluron.....	53
Figura 27	Sobrevivência do peixe <i>T. Trichopterus</i> na presença do larvicida temefós.....	53
Figura 28	Sobrevivência do peixe <i>T. trichopterus</i> na presença do larvicida <i>Bti</i>	54
Figura 29	Sobrevivência do peixe <i>T. trichopterus</i> na presença do larvicida novaluron.....	54
Figura 30	Distribuição do número de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartilico e análise estatística pelo método Bonferroni.....	57
Figura 31	Mediana e intervalo interquartilico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos com <i>B. splendens</i> X temefós.....	57
Figura 32	Gráfico da distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartilico e análise estatística pelo método Bonferroni.....	60
Figura 33	Medianas e intervalo interquartilico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos <i>B. splendens</i> X <i>Bti</i>	60
Figura 34	Gráfico da distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartilico e análise estatística pelo método Bonferroni.....	63
Figura 35	Medianas e intervalo interquartilico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos <i>B. splendens</i> X Novaluron.....	63
Figura 36	Gráfico da distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartilico e análise estatística pelo método Bonferroni.....	66
Figura 37	Medianas e intervalo interquartilico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos <i>P. reticulata</i> X Temefós.....	66
Figura 38	Gráfico da distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo	

	interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni.....	69
Figura 39	Medianas e intervalo interquartílico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos <i>P. reticulata</i> X Bti.....	69
Figura 40	Gráfico da distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni.....	72
Figura 41	Medianas e intervalo interquartílico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos <i>P. reticulata</i> X Novaluron.....	72
Figura 42	Estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier para os experimentos de <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> , com o larvicida Temefós.....	75
Figura 43	Estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier para os experimentos de <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> , com o larvicida novaluron.....	78
Figura 44	Estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier para os experimentos de <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> , com o larvicida Bti.....	81

LISTA DA TABELAS

Tabela 1	Número de ovos de <i>A. aegypti</i> por depósito nos experimentos de <i>B. splendens</i> X temefós.....	55
Tabela 2	Índice de Atividade de Oviposição (IAO) nos depósitos com <i>B. splendens</i> temefós e controle.....	56
Tabela 3	Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.....	56
Tabela 4	Número de ovos postos por depósito nos experimentos de <i>B. splendens</i> X Bti....	58
Tabela 5	Índice de Atividade de Oviposição (IAO) nos depósitos com <i>B. splendens</i> , Bti e controle.....	59
Tabela 6	Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.....	59
Tabela 7	Número de ovos de <i>A. aegypti</i> por depósito nos experimentos de <i>B. splendens</i> X Novaluron.....	61
Tabela 8	Índice de Atividade de Oviposição (IAO) nos depósitos com <i>B. splendens</i> , Novaluron e controle.....	62
Tabela 9	Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.....	62
Tabela 10	Número de ovos <i>A. aegypti</i> por depósito nos experimentos de <i>P. reticulata</i> X temefós.....	64
Tabela 11	Índice de Atividade de Oviposição (IAO) nos depósitos com <i>P. reticulata</i> , temefós e controle.....	65
Tabela 12	Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.....	65
Tabela 13	Número de ovos postos por depósito nos experimentos de <i>P. reticulata</i> X Bti....	67
Tabela 14	Índice de Atividade de Oviposição (IAO) nos depósitos com <i>P. reticulata</i> , Bti e controle.....	68
Tabela 15	Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.....	68
Tabela 16	Número de ovos postos por depósito nos experimentos de <i>P. reticulata</i> X Novaluron.....	70
Tabela 17	Índice de Atividade de Oviposição (IAO) nos depósitos com <i>P. reticulata</i> ,	

	Novaluron e controle.....	71
Tabela 18	Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.....	71
Tabela 19	Sobrevivência dos peixes <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> ao larvicida temefós.....	74
Tabela 20	Média de dias em que permaneceram vivos os peixes nos experimentos com o larvicida temefós.....	74
Tabela 21	Sobrevivência dos peixes <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> ao larvicida novaluron.....	76
Tabela 22	Média de dias em que permaneceram vivos os peixes nos experimentos com o larvicida novaluron.....	77
Tabela 23	Sobrevivência dos peixes <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> ao larvicida Bti.....	80
Tabela 24	Média de dias em que permaneceram vivos os peixes nos experimentos com o larvicida Bti.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bti – *Bacillus thuringiensis israelenses*

CL₅₀ – Concentração Letal para 50% dos indivíduos expostos

DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano

FHD – Febre Hemorrágica do Dengue

IAO – Índice de Atividade de Oviposição

OMS – Organização Mundial de Saúde

PEAa – Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*

PNCD – Programa Nacional de Controle da Dengue

TL₅₀ – Tempo Letal para 50% dos indivíduos expostos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	Epidemiologia da dengue.....	23
2.1.1	Dengue no Brasil.....	24
2.1.2	Dengue no Ceará.....	26
2.2	Biologia e classificação do vetor.....	28
2.3	Estratégias reprodutivas.....	29
2.4	O desafio do controle vetorial.....	30
2.4.1	Controle químico.....	31
2.4.2	Controle mecânico.....	32
2.4.3	Controle biológico	
a)	Vírus, bactérias e fungos.....	32
b)	Peixes.....	33
3.	OBJETIVOS	
3.1	Geral.....	38
3.2	Específicos.....	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	
4.1	Local de estudo e condições gerais.....	39
4.2	Avaliação da preferência de oviposição	
4.2.1	Material	
4.2.1.1	Peixes utilizados.....	39
4.2.1.2	Larvicidas utilizados.....	42
4.2.2	Experimento.....	42
4.2.3	Análise de dados.....	48
4.3	Validação da fórmula de Kramer e Mulla (1979) para 3 diferentes ofertas	48
4.4	Determinação da sobrevivência aos inseticidas.....	50
4.4.1	Material	

4.4.1.1	Peixes utilizados.....	50
4.4.1.2	Larvicidas utilizados.....	51
4.4.2	Experimento.....	51
4.4.3	Análise de dados.....	54
5.	RESULTADOS	
5.1	Comparação do padrão de oviposição entre os depósitos com peixes larvófagos, com larvicidas e os controles.....	55
5.1.1	<i>Betta splendens</i> X temefós.....	55
5.1.2	<i>Betta splendens</i> X Bti.....	58
5.1.3	<i>Betta splendens</i> X novaluron.....	61
5.1.4	<i>Poecilia reticulata</i> X temefós.....	64
5.1.5	<i>Poecilia reticulata</i> X Bti.....	67
5.1.6	<i>Poecilia reticulata</i> X novaluron.....	70
5.2	Determinação da sobrevivência de peixes larvófagos na presença dos larvicidas utilizados em saúde pública.....	73
5.2.1	Sobrevivência dos peixes larvófagos <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> ao larvicida temefós.....	73
5.2.2	Sobrevivência dos peixes larvófagos <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> ao larvicida Novaluron.....	75
5.2.3	Sobrevivência dos peixes larvófagos <i>B. splendens</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. tricopterus</i> ao larvicida Bti.....	79
6.	DISCUSSÃO.....	82
7.	CONCLUSÃO.....	90

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	100

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob o risco de contrair dengue, principalmente em países tropicais em que o clima favorece a proliferação do vetor, o *Aedes aegypti* (TAUIL, 2002). Este vetor está presente em todos os continentes, inclusive na Europa, onde causou surto recentemente (SOUSA, 2012). Nas Américas se distribui dos Estados Unidos ao Uruguai, não tendo sido encontrado ainda no Canadá e Chile (DELGADO et. al., 2008). Esses fatores colocam o dengue como a principal arbovirose no mundo, com mais de 80 milhões de casos novos anualmente (WHO, 1986; KOURI, 2006).

Esta ampla distribuição do *A. aegypti* se dá devido a fatores que propiciam a sua proliferação, o que dificulta o controle. Dentre os fatores que facilitaram esta dispersão, está a falta de uma legislação pertinente que facilite a ação dos agentes de endemias e de saúde em residência que normalmente estão fechadas no horário comercial e em locais com grande disponibilidade de criadouros, tais como sucatas (TAUIL, 2002). Além disso, também contribui o crescimento desorganizado das cidades, fazendo com que o contingente populacional urbano crescesse em um curto intervalo de tempo, sem que houvesse a cobertura adequada de serviços essenciais, tais como a coleta de lixo e o fornecimento contínuo de água, o que favoreceu o aumento de possíveis criadouros (TAUIL, 2001).

Para Brassolatti e Andrade (2002), os principais criadouros presentes no ambiente doméstico não deveriam ser um grande problema, pois com atitudes mínimas poderiam ser cobertos, tais como caixas e potes, ou até mesmo eliminados, tais como pneus velhos e latas.

Além da grande disponibilidade de depósitos, outros fatores que dificultam o controle do vetor são os aspectos biológicos inerentes à espécie, tal como a sua grande capacidade de adaptação ao ambiente. Esta adaptação fica bem evidente quando observamos que os ovos de *A. aegypti* podem permanecer viáveis por até 492 dias em ambientes secos (SILVA e SILVA, 1999), além de relatos ainda não publicados de ovos viáveis por períodos superiores (Martins VEP, Comunicação Pessoal). Silva e Silva (1999) analisaram o tempo em dias em que os ovos de *A. aegypti* tinham uma máxima eclosão após a oviposição, tendo observado que até 121 dias após a oviposição havia uma boa taxa de eclosão (97,2%), com 154 dias a taxa já era somente de 1,3%, nas observações subsequentes variou um pouco para mais e um pouco para menos até

chegar em 0,2% no dia 492.

O Programa Nacional do Controle da Dengue (PNCD) aponta 10 tópicos para se conseguir controlar o dengue. Um desses é o controle vetorial, que pode ser realizado de forma mecânica, biológica ou química (BRASIL, 2002).

Das formas de controle vetorial citadas pelo PNCD, a que apresenta uma cobrança mais sistemática sobre os municípios por parte do Ministério da Saúde é a química, porém, este mecanismo pode trazer danos ao meio ambiente, além do desenvolvimento de mecanismos de resistência através da seleção natural (LIMA *et al.*, 2006; BRASIL, 2002).

Em virtude do exposto anteriormente torna-se extremamente necessário o desenvolvimento de mecanismos alternativos para o controle do *A. aegypti* que não seja somente a utilização de larvicidas.

Uma ferramenta que tem sido vista com bons olhos pelas autoridades em saúde pública nos últimos anos é o controle biológico, já tendo sido desenvolvidas diversas metodologias para o controle de doenças transmitidas por vetores. Vários micro-organismos tem sido utilizados com este propósito. Scholte *et al.* (2005) observaram que a utilização do fungo *M. anisopliae* conseguiu reduzir em até 75% a infecção de malária pelo *Anopheles*. Pesquisas com a bactéria *Wolbachia* mostraram o seu potencial em inviabilizar ovos de *A. aegypti* infectadas (XI *et al.*, 2005).

A utilização do *Bacillus thuringiensis* tem se mostrado efetivo tanto contra o mosquito *Aedes aegypti*, por até 40 dias, com renovação de água (PONTES *et al.*, 2010) e também contra *Culex* e Anofelinos (ANDRADE, 1992).

Outra estratégia que tem se mostrado bastante eficiente é a utilização de peixes larvófagos, como foi sugerido por Pamplona *et al.* (2004) com o peixe *Betta splendens*, no município de Canindé (CE), que, após monitorar 2.071 tanques de cimento, os quais inicialmente tinham uma infestação de 70,4%, após 24 meses caiu para 0,2%, equivalente a uma redução em 360 vezes na infestação inicial.

Além do *B. splendens* outras espécies também apresentaram potencial para predação das larvas do *A. aegypti*, destacando-se os peixes: *Trichogaster trichopteros*, *Astyanax fasciatus*, *Poecilia sphenops* e *P. reitulated* (CAVALCANTI *et al.*, 2007; FIMIA DUARTE *et al.*, 2009; WIJESINGHEA *et al.*, 2009).

O peixe *B. splendens* além de ter uma alta capacidade de predação de larvas (CAVALCANTI *et al.*, 2007), ser resistente ao cloro (PAMPLONA *et al.*, 2009a) ainda mostrou um potencial para repelir a oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, quando testado em pequenos aquários com volume de 15 litros, ao passo que o *P. reticulata* não demonstrou nenhum efeito nessas mesmas condições (PAMPLONA *et al.*, 2009b).

Observando todo o potencial do *B. splendens* de atuar no controle biológico de formas imaturas de *A. aegypti*, ser resistente ao cloro e ainda apresentar este potencial de repelência para a oviposição de fêmeas grávidas, suscitou o interesse em averiguar se este potencial também se repetiria em depósitos com maior volume, visto que na prática, em campo, em sua maioria depósitos com volume de 50 L ou mais (PAIVA *et al.*, 2011; BRASSOLATTI, 2002).

Outro ponto importante a ser observado é a possibilidade de utilização de forma concomitante de peixes larvófagos e dos larvicidas recomendados pelo PNCD, visto que em algumas situações o peixe pode ficar vulnerável à morte e o depósito ficaria “desprotegido” até que houvesse a reposição do peixe. Portanto, torna-se necessário determinar se os larvicidas utilizados em saúde pública são tóxicos para os peixes. Além disso, faz-se necessário observar se a capacidade de repelência observada repetir-se-á em depósitos maiores, pois esta informação poderá direcionar melhor as atividades dos programas de controle.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE

O dengue é uma doença infecciosa viral, febril aguda tendo por agente etiológico arbovírus da família flaviviridae. Os vetores são insetos hematófagos culicídeos do gênero *Aedes*, sendo que as duas espécies de vetores identificadas atualmente foram o *A. aegypti* e o *A. albopictus*, este último sem importância epidemiológica nas Américas (TORRES, 2005).

Existem quatro sorotipos, sendo denominadas de acordo com a ordem de identificação DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A contaminação por uma desses sorotipos causa imunidade temporária para os 3 sorotipos restantes e permanente para aquela que causou a infecção (SOUZA, 2008).

O dengue pode ter uma manifestação assintomática, passando por um quadro leve de febre com dores no corpo e chegando até a sua forma hemorrágica (FHD), podendo levar o paciente a óbito (BRASIL, 2011; SOUZA, 2008).

As formas de manifestação clínica tem se transformado bastante nos últimos anos, apresentando características que dez anos atrás jamais seriam associados à dengue, tais como coriza, complicações neurológicas, miocardite, pancreatite e acometimento pulmonar com insuficiência respiratória (SOUZA, 2008).

Devido ao sucesso obtido em meados do século passado na erradicação do *A. aegypti* no Brasil, em 1997 o ministério da saúde lançou o Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa). Devido principalmente às mudanças demográficas passadas pelo país, o Programa mostrou-se totalmente ineficiente. Em 2002, em substituição ao PEAa, foi lançado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Neste Programa, reconhecendo a total incapacidade de erradicar o vetor, passou-se a priorizar as estratégias do seu controle, assim como a redução da letalidade pela febre hemorrágica do dengue (FHD) (TAUIL, 2001; BRASIL, 2002). As três principais metas definidas no PNCD foram: reduzir a menos de 1% a infestação predial nos municípios prioritários; reduzir o número de casos a cada ano e reduzir a letalidade por FHD a menos de 1% (BRASIL, 2002). Pessanha *et al.* (2009) analisando os dados fornecidos

pelo Ministério da Saúde no período de 2003 a 2006 nas regiões sudeste e Centro-Oeste, observou que as metas não só não foram alcançadas como em muitos municípios os valores aumentaram substancialmente, com a ocorrência de diversas epidemias. Apesar dos resultados negativos, não podemos condenar o programa, visto que a execução fica a cargo dos municípios e caso os mesmos não implementem as ações devidas, os resultados realmente não poderão ser alcançados.

Para que seja possível reduzir a letalidade pela FHD é de suma importância que haja um atendimento rápido e os procedimentos de emergência sejam tomados, sendo de fundamental importância uma rápida avaliação médica indicando a forma de hidratação com o intuito de evitar o choque hipovolêmico (BRASIL, 2011).

Vários fatores interagem favorecendo a gravidade ou não com que o dengue irá se manifestar, sendo os três principais descritos abaixo:

a) Vírus – o sorotipo viral evolvida na infecção é determinante para o desenrolar da doença. Apesar de existirem somente 4 sorotipos do vírus, já foram identificadas variações genéticas de um mesmo sorotipo, com alguns se apresentando mais virulentos que outros.

b) Vetor – fatores ambientais e genéticos podem estar relacionados diretamente com a capacidade do vetor em transmitir o vírus. Estudos mostram que a espessura da lâmina basal do intestino pode interferir nesta capacidade.

c) Hospedeiro – sabe-se que em uma infecção secundária os riscos da dengue se manifestar com uma forma grave é maior. A idade é um fator de risco, observando-se por exemplo que nos últimos anos tem aumentado o número de casos em menores de um ano. A presença de doenças crônicas, como asma brônquica, anemia falciforme e diabetes mellitus, têm estado associadas com casos graves de dengue (BRASIL, 2011).

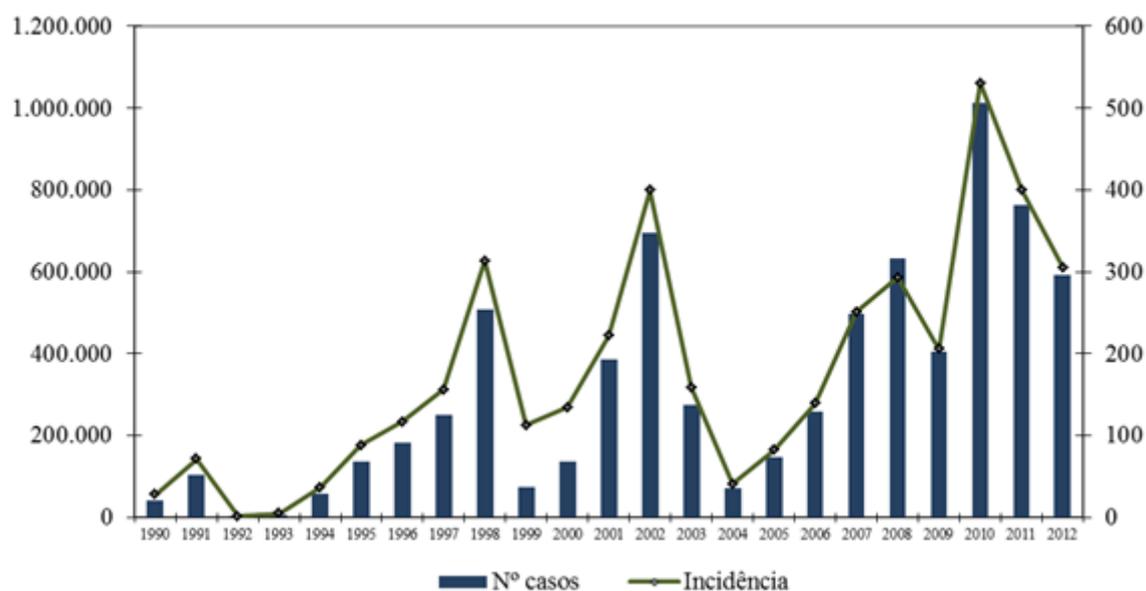
2.1.1 DENGUE NO BRASIL

A primeira epidemia confirmada laboratorialmente de dengue no Brasil foi em 1981, iniciando com um surto ocorrido em Roraima, pelas cepas virais 1 e 4. A partir desta data nenhum ano se passou sem que houvesse registro de casos no país

(SOUZA, 2008).

Com passar dos anos o *A. aegypti* foi se disseminando dentre os municípios do Brasil e a incidência de casos de dengue aumentou substancialmente, principalmente na primeira e início da segunda década do século XXI, como podemos observar na figura 1 (BRASIL, 2013), manifestando-se de forma cíclica, com picos epidêmicos intercalados por anos de baixa incidência. O ano de 2010 apresentou um recorde histórico de incidência, ultrapassando o valor de 500 casos por 100.000 habitantes. Neste mesmo ano pela primeira vez no país confirmou-se mais de 1.000.000 de casos de dengue, o que corresponde a 0,53% da população brasileira. Dados referentes ao ano de 2013, ainda não publicados, apontam esse ano como o de maior número de casos e maior incidência na história do Brasil.

Figura 1 – Número de casos e Incidência (/100.000 hab.) de dengue no Brasil, 1990 a 2012.

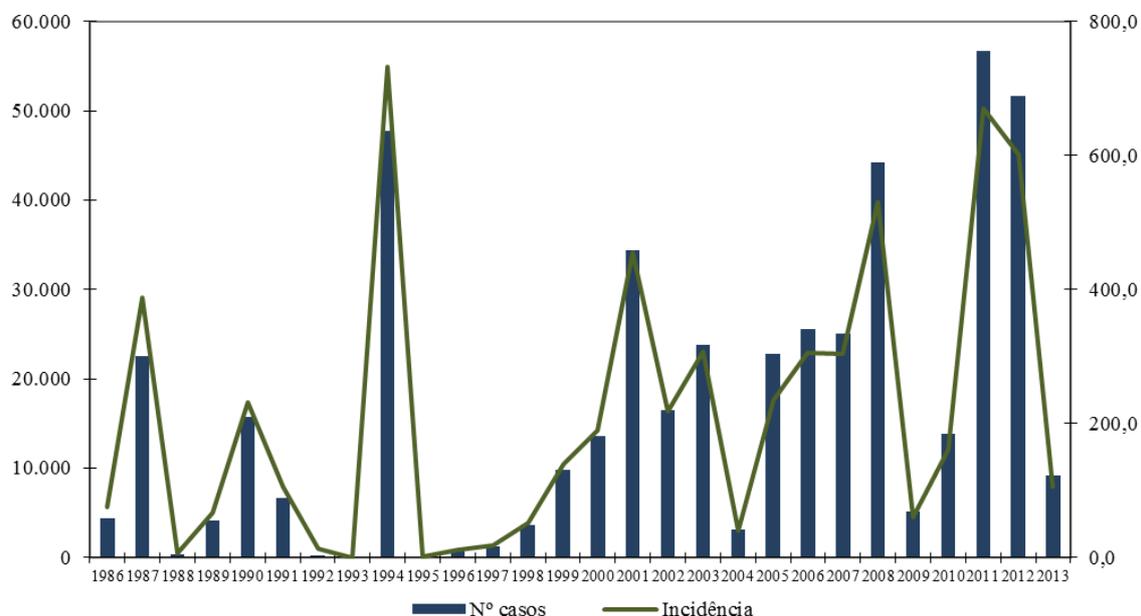


FONTE: SVS/MS. Dados atualizados em janeiro de 2013, sujeitos à revisão.

2.1.2 DENGUE NO CEARÁ

O Ceará registra casos de dengue desde 1986 e não foge às tendências nacionais com o aumento da incidência de casos de dengue nos últimos anos. Os anos de 2011 e 2012 apresentaram os maiores valores de casos de dengue registrados dentro toda a série histórica, com 56.714 e 51.701, respectivamente. A incidência também foi maior nestes anos, sendo registrado 748 e 637 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (Figura 2) (CEARÁ, 2013). Na maioria das vezes, a incidência no Estado tem sido maior que no resto do país, percebe-se este fato ao se comparar as figuras 1 e 2.

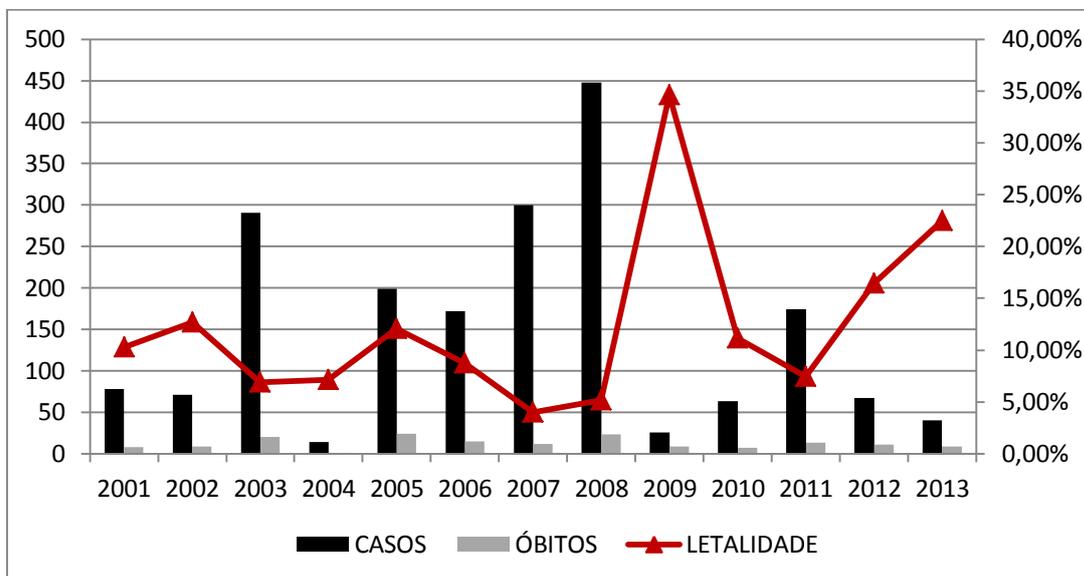
Figura 2 – N° de casos e Incidência (/100.000 hab.) de dengue no Ceará, 1986 a 2013.



O ano com o maior número de casos de FHD no Ceará foi o de 2008, registrando 448 casos e 23 óbitos, gerando uma letalidade de 5,13%. No ano de 2009 houve um aumento na letalidade, registrando-se 34,6%, o que não significa necessariamente uma piora no quadro, pois neste ano houve somente 9 óbitos e 26 casos. Nos últimos 5 anos, com exceção do ano de 2011, registrou-se menos de 100 casos de FHD (Figura 3). Os casos de dengue com complicação (DCC) têm apresentado um comportamento cíclico semelhante aos casos clássicos, apresentando picos em 2007, 2008 e 2011 (Figura 4). Um fator preocupante é a redução na proporção de dengue clássico (DC) e grave. No ano de 2001, houve um caso de dengue grave para cada 383 de DC, esta proporção foi 1 caso de dengue grave para cada 41 de DC no ano de 2007

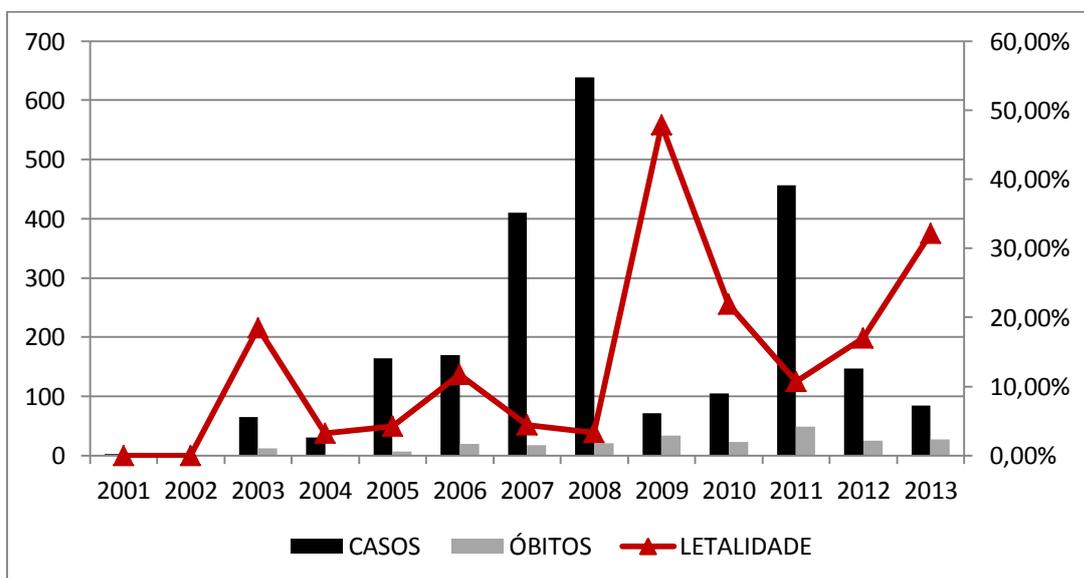
(Figura 5) (CEARÁ, 2013).

Figura 3 – Casos confirmados, óbitos e letalidade por FHD no Ceará, 2001 a 2013*.



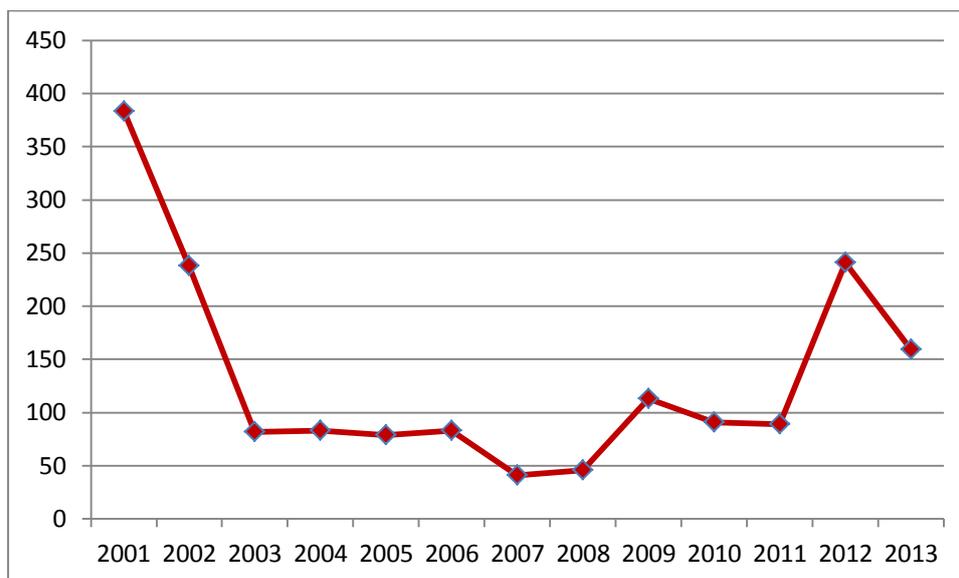
Fonte: SESA/COPROM/NUVEP. *Dados atualizados em setembro de 2013, sujeitos a revisão

Figura 4 – Casos, óbitos e letalidade por DCC no Ceará, 2001 a 2013*.



Fonte: SESA/COPROM/NUVEP. *Dados atualizados em setembro de 2013, sujeitos a revisão.

Figura 5 – Proporção entre dengue clássico (DC) e dengue grave (DCC + FHD) no Ceará, 2001 a 2013*.



Fonte: SESA/COPROM/NUVEP. *Dados atualizados em setembro de 2013, sujeitos a revisão.

2.2 BIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO VETOR

Os mosquitos são animais pertencentes ao filo Artrópoda, que tem como principal característica a presença de patas articuladas e a necessidade de realizar periodicamente a troca de seu exoesqueleto (ecdise), permitindo, assim, o seu crescimento. Desta forma o crescimento dos artrópodes ocorre de forma descontínua (CONSOLI e OLIVEIRA, 1998).

No filo Artrópoda, os insetos estão agrupados na classe *insecta* ou *hexapoda* (3 pares de patas), a ordem é a Diptera (1 par de asas) e a família é a Culicidae. O gênero *Aedes* é o que engloba as duas espécies responsáveis pela transmissão da dengue, *A. aegypti* e *A. albopictus* (REY, 2008).

Os mosquitos do gênero *Aedes* têm a necessidade da hematofagia para retirar nutrientes do sangue que auxiliarão na maturação dos ovos, sendo assim somente a fêmea alimenta-se de sangue e por consequência transmite o vírus durante o repasto sanguíneo (SOUZA, 2008).

Após a cópula e o repasto sanguíneo, a fêmea procura um local úmido para ovipor. O ciclo de vida passa por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. O estágio larval é dividido em 4 estádios em que a larva troca seu exoesqueleto, passando pela L1, L2, L3 e L4. Em condições ideais, o período que vai do ovo ao adulto apresenta dez

dias de duração (CONSOLI e OLIVEIRA, 1998).

Poucas horas após eclodir, a forma alada já tem o potencial de copular, realizar o repasto sanguíneo, transmitir o vírus (casos esteja infectada) e ovipor. Esta alta capacidade de reprodução do vetor tem dificultado bastante o seu controle (TORRES, 2005).

O elo mais vulnerável dentro de toda a cadeia de transmissão são as larvas, mas infelizmente as ações tornam-se mais intensas somente em momentos epidêmicos em que o combate deve ser realizado contra a forma alada, sendo bem menos efetivo (BRASIL, 2002).

2.3 ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS

O potencial de sobrevivência de uma espécie está diretamente relacionado a três fatores principais: disponibilidade de alimentos, habitat e parceiros para reprodução. Ao longo do processo evolutivo diversos mecanismos foram desenvolvidos para se identificar as melhores condições que abrangessem esses fatores (FUTUYMA, 1997; ODUM e BARRET, 2007).

Para escolher um habitat a espécie leva em consideração vários aspectos, tais como a disponibilidade de alimento, ausência de concorrentes e também a ausência de predadores, principalmente nos casos em que não existe cuidado parental e os filhotes já terão que sobreviver sozinhos no ambiente (FUTUYMA, 1997; ODUM e BARRET, 2007).

O período em que a reprodução irá ocorrer é também muito importante, pois além dos fatores bióticos relatados anteriormente (predadores, competidores), fatores abióticos também interferem (temperatura, umidade, pluviosidade) na escolha do habitat para a oviposição. Este fator explica, por exemplo, porque em determinados períodos temos epidemias de certa doença transmitida por um vetor e em outro praticamente não temos notificação (SHAMAN; DAY; STIEGLITZ, 2002; RUDOLF & RODEL, 2005; SHAMAN; DAY; STIEGLITZ, 2005).

No caso das espécies que colocam ovos, o local onde a oviposição irá ocorrer será de fundamental importância para a sobrevivência da nova geração, pois é importante tanto a disponibilidade de alimentos como a ausência de predadores naturais. Binckley e Resetarits (2002), observaram este comportamento em sapos, os quais evitaram ovipor em lagos com peixes, predadores dos indivíduos jovens.

Este comportamento também foi descrito em diversos artrópodes, tais como ácaros, que conseguiam detectar a presença de predadores através de odores deixados no ar (CHOH e TAKABAYASHI, 2010) e aranhas em que além do risco mínimo de predação para os ovos, também foi levado em consideração a temperatura (REGUERA e GOMENDIO, 2002).

Os mosquitos não fogem a regra, buscam também um ambiente que seja favorável ao desenvolvimento de sua prole e o conhecimento dessas estratégias torna-se de fundamental importância para o planejamento do controle populacional destes indivíduos (KERSHENBAUM *et al*, 2012).

As condições ambientais são preponderantes para a oviposição do *A. aegypti*, tais como umidade e temperatura. Chadee (2009) observou que no período chuvoso há uma maior propensão para a oviposição.

A escolha para o local de oviposição por mosquitos se dá pela percepção de sinais químicos, tanto que possam indicar predadores, como a presença de alguma substância nociva, como um larvicida por exemplo (TORRES-ESTRADA *et al.*, 2001; VAM DAM & WALTON, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2012).

Várias substâncias já foram isoladas tanto com potencial para repelir a oviposição como para atrair (SEENIVASAGAN *et al*, 2010; XUE; BARNARD; ALI, 2001). Em alguns experimentos observou-se que o extrato de ovos de indivíduos da mesma espécie quando em uma baixa concentração atraem a oviposição e quando em alta concentração repelem, possivelmente esta é uma estratégia que evita a competição intraespecífica (GANESAN *et al*, 2006).

2.4 O DESAFIO DO CONTROLE VETORIAL

Os insetos são responsáveis pela transmissão de diversas enfermidades para os seres humanos. Doenças como malária, Chagas, febre amarela, calazar, elefantíase e dengue têm ocasionado milhares de óbitos pelo mundo anualmente (REY, 2008).

O controle populacional destes insetos tem sido um dos grandes desafios para a saúde pública atualmente, sendo que os principais mecanismos de controle utilizados são o químico, mecânico e biológico. Entretanto, o tratamento químico é o que mais vem sendo utilizado ao longo dos anos, devido à rapidez com que ameniza o problema (BRASIL, 2001).

2.4.1 Controle químico

O controle químico é fundamentado na utilização de compostos que irão interferir nas formas imaturas, seja afetando o seu sistema nervoso ou impedindo a sua metamorfose, ou na forma alada (SOUZA, 2008).

A utilização de inseticidas para combater as formas aladas que são eminentemente urbanas só devem ser utilizadas em períodos epidêmicos, visto que são altamente tóxicos. Nos momentos em que não está havendo a transmissão do agente etiológico é preconizado o uso de larvicidas (BRASIL, 2002).

Os principais inseticidas utilizados em saúde pública podem ser divididos em quatro grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, sendo que no Brasil não tem sido utilizados os organoclorados desde 1985 (REY, 2008).

Dentre os organoclorados, o mais conhecido e amplamente utilizado durante décadas foi o DDT, mas devido a sua alta toxicidade foi abandonado em muitos países, mas mesmo assim ainda é recomendado seu uso pela OMS onde não existe outra alternativa para o controle da malária, sendo uma meta para o futuro desenvolver métodos alternativos, deixando, assim, de usá-lo (WHO, 2004).

O DDT está classificado no grupo de compostos orgânicos persistentes, tendo sua forma de ação no sistema nervoso, interferindo no transporte de íons na membrana dos neurônios prejudicando o impulso nervoso (BRASIL, 2001).

Os organofosforados são derivados do ácido fosfórico e agem competindo com o neurotransmissor acetilcolina pela ligação com a enzima acetilcolinesterase, interferindo na transmissão do impulso nervoso. Ao contrário do DDT, possuem uma baixa persistência no ambiente. O temefôs é um dos organofosforados que por mais tempo foi utilizado no país (REY, 2008), mas que tem sido substituído nos últimos anos devido ao desenvolvimento de resistência pelos insetos (LIMA, 2006).

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico agindo também na enzima acetilcolinesterase, mas, diferentemente dos organofosforados, ligam-se de forma reversível com a enzima, sendo menos tóxico (BRASIL, 2001).

Os piretróides têm um baixo potencial de toxicidade para o ambiente, mas, em muitos casos, podem promover reações alérgicas. Este grupo de inseticidas tem sido utilizado principalmente nas campanhas de controle de Chagas e calazar (BRASIL, 2001).

Como relatado até aqui, a utilização de inseticidas tem sido indispensável para a realização do controle de vetores de muitas enfermidades, mas o fim desta longa

batalha não está próximo, pois os insetos desenvolvem resistência (LIMA *et al.*, 2006; BRAGA *et al.*, 2004) além dos danos ambientais causados, e principalmente intoxicação em alguns animais (CRIVELENTI *et al.*, 2011; HEDAYATI; TARKHANI e SHADI, 2012).

Harischandra; Karunaratne & Rajakaruna (2011) observaram que o larvicida organofosforado temefôs, em determinadas concentrações pode culminar em mal formação em sapos.

Desta forma, o desenvolvimento de estratégias que evitem ou pelo menos reduzam a utilização de inseticidas trará grandes contribuições para o controle destes vetores, especificamente em relação a dengue, que já é uma doença eminentemente urbana (TAUIL, 2001).

2.4.2 Controle mecânico

O controle mecânico é uma das alternativas para a redução da utilização de inseticidas. Esta estratégia tem como princípio básico tornar o depósito inviável para a oviposição das fêmeas, seja cobrindo os depósitos de forma permanente ou temporária, ou mesmo inutilizando-o (BRASIL, 2002).

Ações de educação em saúde podem contribuir também com este objetivo, pois tem o potencial de trazer a população a colaborar com as ações preventivas, agindo como atores principais e não coadjuvantes (CHIARAVALLOTTI *et al.*, 2002).

Ações educativas realizadas de uma maneira objetiva, tentando levar não somente conhecimento à população, mas também um sentimento de que é necessário mudar hábitos, podem contribuir para a diminuição do uso de inseticidas. Com o auxílio da população, muitos depósitos inservíveis (latas, garrafas, potes quebrados) serão eliminados, e outros solucionáveis (potes, caixas d'água, cisternas) irão ser protegidos, reduzindo, assim, os locais para oviposição do *A. aegypti* (CHIARAVALLOTTI NETO *et al.*, 2003; BRASSOLATTI e ANDRADE, 2002).

2.4.3 Controle biológico

2.4.3.1 Vírus, bactérias e fungos

Outra estratégia muito utilizada como alternativa ao uso de inseticidas é o controle biológico. Vários micro-organismos têm sido empregados com o intuito de

controlar populações de insetos transmissores de patógenos para os seres humanos.

Alguns vírus foram encontrados com o potencial de contaminar larvas de *A. aegypti*, causando-lhes a morte (LEDERMANN *et al.*, 2004; CARLSON; SUCHMAN & BUCHATSKY, 2006). Ren e Rasgon (2010) obtiveram o mesmo resultado contaminando *Anopheles gambiae* na fase adulta.

Monnerat *et al.* (2005) testaram 210 cepas de *Bacillus thuringiensis*, avaliando o seu potencial como larvicida para larvas de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, encontrando 6 variedades com potencial para uso em campo. Pontes *et al.* (2010) observaram que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, apresentou um bom efeito tóxico para larvas de *A. aegypti* por um período de 30 dias, mesmo havendo renovação de água.

Bactérias do gênero *Wolbachia* apresentaram potencial de infecção de mosquitos *A. aegypti* reduzindo a sua capacidade reprodutiva por incompatibilidade citoplasmática, e podendo ser transmitida até a sétima geração (ZHIYONG *et al.*, 2005; AHANTARIG *et al.*, 2008). McMeniman & O'Neill (2010) observaram um atraso no desenvolvimento de machos de *A. aegypti* contaminados com *Wolbachia*, enquanto as fêmeas não apresentaram retardo no desenvolvimento, mas passavam por uma redução no potencial de oviposição, o que é de muita valia para o controle populacional dos mosquitos.

Sprays contendo esporos de fungos entomopatogênicos com potencial de infectar *Anopheles* provocando a morte de adultos ou reduzindo o potencial de transmissão têm sido utilizados no controle da malária (SCHOLTE *et al.*, 2005; HANCOCK; THOMAS & GODFRAY, 2009).

2.4.3.2 Peixes

Além de bactérias, vírus e fungos utilizados no controle de insetos transmissores de patógenos, diversas espécies de peixes têm sido utilizadas e, em muitos casos aparecendo como uma alternativa bem promissora (PAMPLONA *et al.*, 2004; FIMIA DUARTE *et al.*, 2009; WIJESINGHEA *et al.*, 2009).

Dentre os vários peixes que já foram descritos na literatura com o potencial para predação de larvas de *A. aegypti*, *A. albopictus*, *Culex*, e *Anopheles* pode-se citar os gêneros: *Gambusia*, *Betta*, *Poecilia*, *Trichogaster*, *Aphanius*, *Rasbora*, *Cnesterodon*, *Aphyosemion* e *Puntius* (CAVALCANTI *et al.* 2007; QUITANS; SCASSO; OMAR,

2010; HAQ e YADAV, 2011; ANAYELE e OBEMBE, 2011; WIJESINGHEA *et al.* , 2009; GOSH *et al.* , 2011).

A capacidade de predação de larvas de algumas espécies de peixe impressiona pela quantidade consumida em um dia, em algumas situações mesmo após o peixe está saciado ele mata a larva mesmo sem comê-la. Fêmeas de *Betta splendens* apresentaram a capacidade de predação até 500 larvas de *A. aegypti* por dia. A espécie *Trichogaster tricopterus* apresentou uma média de 200 e na espécie *Poecilia reticulata* as fêmeas apresentaram um potencial maior que os machos com 456 e 307 larvas predadas em 24 horas, respectivamente. Este último dado do *P. reticulata* sugere haver uma diferença na capacidade de predação entre machos e fêmeas (CAVALCANTI *et al.* 2007).

Wijesinghea *et al.* (2009) comparou a eficácia de predação de três peixes larvófagos (*Poecilia reticulata*, *Puntius bimaculatus* e *Rasbora caveri*) com larvas L4 do culicídeo *Toxorhynchites splendens*. Em seus experimentos comparou o tempo levado para predação de 10 larvas de 4º estágio de *Aedes albopictus*, constatando então que o peixe *Poecilia reticulata* apresentou o melhor resultado, seguido de *Rasbora caveri*, *Puntius bimaculatus* e as larvas de *Toxorhynchites splendens*, com os tempos médios de consumo das 10 larvas de 16,6 minutos, 24 minutos, 27,3 minutos e 330 minutos respectivamente. Nestes experimentos não se observou diferença significativa entre as três espécies de peixe ($p=0,062$), mas existiu entre as espécies de peixe e as larvas de *T. splendens* ($p<0,05$).

Haq e Yadav (2011) avaliaram o potencial de predação peixe larvófago *Aphanius dispar* e observaram uma preferência por larvas de *Anopheles*, com 204 larvas consumidas por dia, enquanto as larvas de *Aedes* foram consumidas a um ritmo de 68 larvas por dia e as larvas de *Culex* com uma média de 58 larvas por dia.

Outro trabalho que demonstrou haver uma preferência por algumas larvas em detrimento de outras foi o realizado por Anayele e Obembe (2011). Neste trabalho testou-se a preferência do peixe *Aphyosemion gularis* e oferecendo como opção de alimento larvas de *Culex*, larvas e pupas de *Anopheles* e larvas de Chironomídeo (díptero) em diferentes associações. Quando foram dadas como opção as larvas de *Culex* e *Anopheles* houve uma preferência por esta última, com um consumo de 62% das larvas de *Culex* e 99% das larvas de *Anopheles*. Os peixes *A. gularis* apresentaram uma preferência pelas larvas em detrimento das pupas de *Anopheles* com um consumo médio de 55% e 35%, respectivamente. Quando foi colocado como opção de

alimentação larvas de *Anopheles*, *Culex* e Chironomídeos, as larvas de *Anopheles* continuaram sendo as mais predadas (64%), seguida por *Culex* (35%) e as larvas de Chironomídeos (25%). Quando as opções dadas são de larvas de *Culex* e Chironomídeos, houve uma maior preferência pelo primeiro, principalmente com o aumento da quantidade de larvas. Quando colocou-se 50 larvas de *Culex* e 50 larvas de Chironomídeos, houve um consumo de 100% e 92%, respectivamente. Quando o valor subiu para 150 larvas o consumo caiu para 73% e 48%, respectivamente.

Quitans; Scasso; Omar (2010), encontraram diferença tanto no que diz respeito ao tipo de alimentação como também em relação ao tamanho dos peixes. Utilizando a espécie *Cnesterodon decemmaculatus*, separou-se em três classes de acordo com o tamanho, pequeno (12mm), médio (26mm) e grande (31mm) e colocados em contato com cinco opções de alimento a saber: *Cladocerans* (microcrustáceos), copépodes, larvas de 1° e 4° estádios de *Culex* e larvas de *Chironomidae* (dípteros). Quando os peixes pequenos tiveram como opção *Cladocerans* e as larvas, houve preferência pelos microcrustáceos ($p < 0,001$), não apresentando diferença estatística com copépodes. Os peixes médios tiveram preferência por *Cladocerans* e larvas de chironomídeos ($p < 0,001$), os peixes grandes tiveram preferência por *Cladocerans* ($p < 0,001$). Todos os tamanhos apresentaram preferência por *Cladocerans*, mas com uma maior força para os peixes maiores.

Os peixes *Aphanius chantrei* além de apresentaram uma forte relação entre tamanho e a capacidade de predação demonstraram uma diferença entre os períodos noturno e diurno. Os peixes também foram divididos em três classes, de acordo com o tamanho grandes (47mm) apresentando um potencial 2,2 vezes maior que os peixes médios (40mm) e 8,3 vezes que os menores (27mm), no período diurno. Quando se analisou o período noturno a diferença foi menor, mas mesmo assim continuou significativa ($p < 0,05$), sendo 2 e 5 vezes maior o consumo dos peixes grandes em relação aos médios e pequenos, respectivamente. Durante o dia os peixes pequenos consumiram em média 29 larvas por dia, os médios 73 e os grandes 151 larvas por dia (YILDIRIM e KARACUHA, 2007).

Anayele e Obembe (2011) também encontraram diferença de predação entre os períodos do dia e também de acordo com a quantidade de alimento para o peixe *Aphyosemion gularis*. Quando foi oferecido 50 larvas de *Culex* houve 100% de consumo tanto no claro como no escuro, mas quando a densidade aumentou para 150 larvas o consumo foi de 73% (claro) e 34% (escuro), quando foi oferecido 250 larvas o

consumo caiu para 55% e 36%, no período claro e escuro respectivamente.

Tudo o que foi descrito até aqui sobre os peixes larvófagos indicando todo o potencial de predação de larvas de culicídeos, como também haver diferenças na capacidade predatória de acordo com a espécie, sexo, tamanho, período do dia e tipo de presa disponível, foi realizado em laboratório, mas muitos experimentos já foram realizados em campo mostrando a efetividade na redução da infestação por estes insetos.

Fimia Duarte *et al.* (2009) ao realizar uma intervenção em uma zona rural de Havana, Cuba, utilizando as espécies de peixe larvófago *Gambusia punctata*, *Gambusia puncticulata* e *Poecilia reticulata* em depósitos de água com volume acima de 150 litros conseguiu após um ano reduzir a infestação nestes depósitos por *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus* e *Aedes aegypti* a menos de 1%, algo que nunca havia sido registrado nesta região.

Em pesquisa realizada em duas localidades na Índia em que dois terços das famílias armazenam água em tanques de cimento, utilizou-se o *Poecilia reticulata* em 514 tanques em uma localidade e o *Gambusia affinis* em 337 tanques em outra localidade. Contatou-se que o *Poecilia* foi melhor aceito pelos moradores ($p=0,001$) e o principal motivo alegado para a rejeição ao *Gambusia* foi o mal cheiro liberado na água pelo mesmo ao morrer ($p=0,001$). Após uma semana de terem sido colocados nos tanques observou-se uma sobrevivência de praticamente 100% dos peixes e um mês após o início dos experimentos houve uma sobrevivência de 86% dos *Poecilia* e 16% dos *Gambusia*. Antes da distribuição dos peixes o índice médio de infestação nas localidades era de 10%, uma semana após a liberação dos peixes não existia mais infestação, mas como a partir daí houve uma grande mortalidade dos peixes o índice voltou a subir para em média 7,8%, somente na localidade em que 86% dos peixes sobreviveram a infestação ficou em 0,2%. Desta forma o *Poecilia* apresentou uma melhor resistência e conseqüentemente melhor capacidade de predação que o *Gambusia*. Um mês após a intervenção houve uma redução de mais de 68% dos casos confirmados de chikunkunha em todas as áreas trabalhadas, mas não sendo possível associar esta redução a intervenção (GOSH *et al.*, 2011).

Wijesinghe *et al.* (2009) utilizando as espécies *Poecilia reticulata*, *Puntius bimaculatus* e *Rasbora caveri* em tanques de cimento no Sri Lanka conseguiu uma redução de 100% na infestação nestes depósitos. Trabalho semelhante foi realizado na cidade de Canindé, Ceará-Brasil, entre janeiro de 2001 e dezembro de 2002, dois mil e setenta e um tanques com volume acima de 200 litros receberam o peixe *Betta*

splendens. A infestação inicial destes depósitos era de 70,4% e ao final do estudo era de 0,2%. Observou-se uma redução concomitante na infestação de outros depósitos que não receberam peixes, tais como, caixas d'água (de 30,2% para 0,6%) e potes (de 6,3% para 0,4%) (PAMPLONA *et al.*, 2004).

Outro trabalho realizado no Ceará, mas desta vez na cidade de Fortaleza, no bairro Serviluz, avaliou-se a eficácia do peixe *Betta splendens* frente ao larvicida Bti, acompanhando o trabalho que já vinha sendo desenvolvido pela secretaria de saúde do município. Detectou-se neste trabalho que 97,6% dos peixes ficaram presentes nos depósitos no intervalo de 45 a 60 dias e que os depósitos em que os peixes passaram mais tempo vivos foram com as seguintes características: tanques feitos com tijolo e cimento ($p < 0,001$), em recipientes situados fora da casa ($p < 0,038$) e naqueles situados a 1 metro acima do solo ($p < 0,002$). Observou-se também que nos depósitos em que os peixes estavam presentes o índice de infestação foi 85% menor que nos depósitos com Bti ($p < 0,001$) mas quanto o peixe por algum motivo não ficava presente, não houve diferença estatística entre o grupo peixe e o grupo Bti (LIMA *et al.*, 2010).

Desta forma, é importante investigar o potencial e as possíveis limitações para o uso de peixes larvófagos, como alternativa de controle biológico, em Programas integrados de controle de vetores.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar a utilização de peixes larvófagos para o controle das formas imaturas do *A. aegypti* em depósitos domiciliares de água.

3.2 ESPECÍFICOS

- Propor uma adaptação à fórmula de Kramer & Mulla (1979) para calcular o Índice de Atividade de Oviposição (IAO), em situações que envolvam mais de dois grupos;
- Avaliar o comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* em depósitos domiciliares com volume de 70 litros de água, com diferentes peixes larvófagos;
- Avaliar o comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* em depósitos domiciliares com volume de 70 litros de água tratados com os larvicidas utilizados no PNCD;
- Comparar o comportamento de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* diante de três diferentes opções (presença de peixes, presença dos larvicidas e água).
- Estimar a sobrevivência de peixes larvófagos na presença dos larvicidas recomendados pelo PNCD.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO E CONDIÇÕES GERAIS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia do departamento de Saúde Comunitária da UFC (Universidade Federal do Ceará), em que a temperatura média é de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade $80 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h.

Os peixes utilizados, assim como todas as larvas de *A. aegypti*, foram mantidas nesse laboratório durante o período de realização dos testes. Durante os experimentos, os mosquitos foram alimentados diariamente, utilizando-se codornas (*Nothura maculosa*), como fonte sanguínea, e solução de sacarose. Todas as normas de segurança para o laboratório de entomologia foram respeitadas.

Foram utilizados peixes adultos, sem preferência por sexo, coletados em criadouros naturais ou adquiridos em casas de peixes ornamentais. No laboratório, esses peixes foram submetidos a um período de adaptação/quarentena por 30 dias, em caixas com 250 litros de água oriunda de um poço artesiano, desclorada e sem tratamento prévio. Os peixes foram alimentados diariamente com larvas de *A. aegypti*, de 3° e 4° estágio.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para experimentos com animais da Universidade Estadual do Ceará, com número 11223820-3/59 em dezembro de 2011 (ANEXO 1).

4.2 AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA DE OVIPOSIÇÃO

4.2.1 MATERIAL

4.2.1.1 PEIXES UTILIZADOS

Os peixes avaliados nesta etapa foram *Betta splendens* (Regan, 1910) e *Poecilia reticulata* (Peters, 1859). Inicialmente tentou-se utilizar o *Trichogaster trichopterus* (Pallas, 1770), porém por algum motivo que não se conseguiu explicar, ele não sobrevivia dentro da gaiola, sendo assim não foi dado seguimento os experimentos de preferência de oviposição com o *T. trichopterus*. Estes peixes são bastante utilizados como controle biológico de culicídeos (CAVALCANTI *et al*, 2007; FIMIA DUARTE *et al* 2009; GOSH *et al.*, 2011).

O peixe *B. splendens* (Regan, 1910) (Figura 6) pertencente a subordem Anabantoidei, é originário da Ásia, habitando originalmente regiões alagadiças ricas em matéria orgânica e pobres em oxigênio. Estes animais são ovíparos e o indivíduo adulto pode chegar a 7 cm. Normalmente estes peixes são utilizados como ornamentais ou para competições de luta. Além de sua respiração branquial o peixe *B. splendens* possui um órgão acessório, o labirinto, o qual permite o peixe captar oxigênio atmosférico (FARIA *et al*, 2006).

Figura 6 – *Betta splendens*



O peixe *P. reticulata* (Peters, 1859) (Figura 7), tal qual o *B. splendens*, é bastante valorizado como ornamental. Apresenta dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos, sendo o comprimento médio de 31 mm e 19 mm, respectivamente. Uma característica marcante deste grupo é a viviparidade (VALÉRIO; SUAREZ; LIMA-JÚNIOR, 2006).

Figura 7 – *Poecilia reticulata*



O *T. trichopterus* (Pallas, 1770) é um peixe de água doce da família Osphronemidae, também conhecido como gourami. Tal qual o *B. splendens*, apresenta um órgão chamado labirinto, que auxilia na respiração do ar atmosférico. É um peixe muito apreciado para utilização em aquários (Figura 8).

Figura 8 - *Trichogaster trichopterus*



4.2.1.2 LARVICIDAS UTILIZADOS

Os larvicidas utilizados, com suas respectivas concentrações, foram:

- Temephos Fersol 1G, na formulação granulada na concentração de 100 mg/l;
- Novaluron Bayer CE, na formulação emulsionável, na concentração de 2%;
- Bti (*Bacillus thuringiensis israelenses*), na formulação granulada e concentração de 20 mg / l.

4.2.2 EXPERIMENTO

Utilizou-se nove tambores com capacidade de 70 litros de água, sendo que o depósito não ficou totalmente cheio, ficando livre um pequeno espaço em que foi colocado papel filtro, no qual foi realizada a oviposição (Figura 9).

Figura 9 – Tambor com papel filtro na borda



Os tambores foram dispostos em uma gaiola com volume de 6m³ (Figura 10) e dispostos de forma alternada de acordo com o tratamento como indicado nas figuras 11 e 12. Três tambores receberam peixe, outros três tambores receberam larvicida e os outros três somente água desclorada, servindo como controle.

Figura 10 – Gaiola utilizada nos experimentos de repelência com volume de 6m³



Figura 11 – Esquema da distribuição dos tambores dentro da gaiola



Legenda:

 (Peixe)

L1 (Larvicida)

Cont. (controle)

Figura 12 – Distribuição dos tambores dentro da gaiola.



Após a distribuição dos tambores dentro da gaiola e realizado os devidos tratamentos nos tambores, foi acrescentado 200 pupas. Dois dias depois com as pupas já eclodidas, foi fornecido uma solução açucarada (diariamente) e codornas como fonte sanguínea (a cada dois dias, por duas horas). Tanto a solução açucarada como as codornas foram colocadas em ganchos específicos presentes na parte superior da entrada da gaiola (Figura 13).

Após uma semana os mosquitos foram recolhidos, os papéis foram retirados da borda dos tambores e os ovos foram contados em uma lupa entomológica. O mesmo procedimento foi repetido 5 vezes para cada associação peixe / larvicida, como mostrado nas figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

Figura 13 – Ganchos para colocar a solução açucarada e as codornas



Figura 14 – Esquema dos experimentos de *B. splendens* X temefós

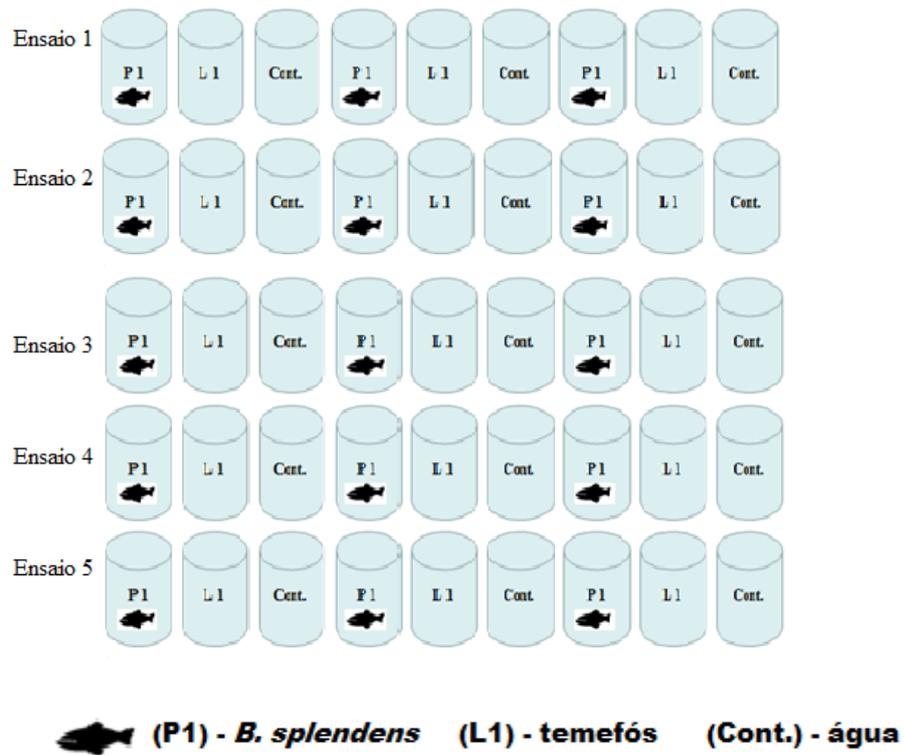


Figura 15 – Esquema dos experimentos de *B. splendens* X Bti

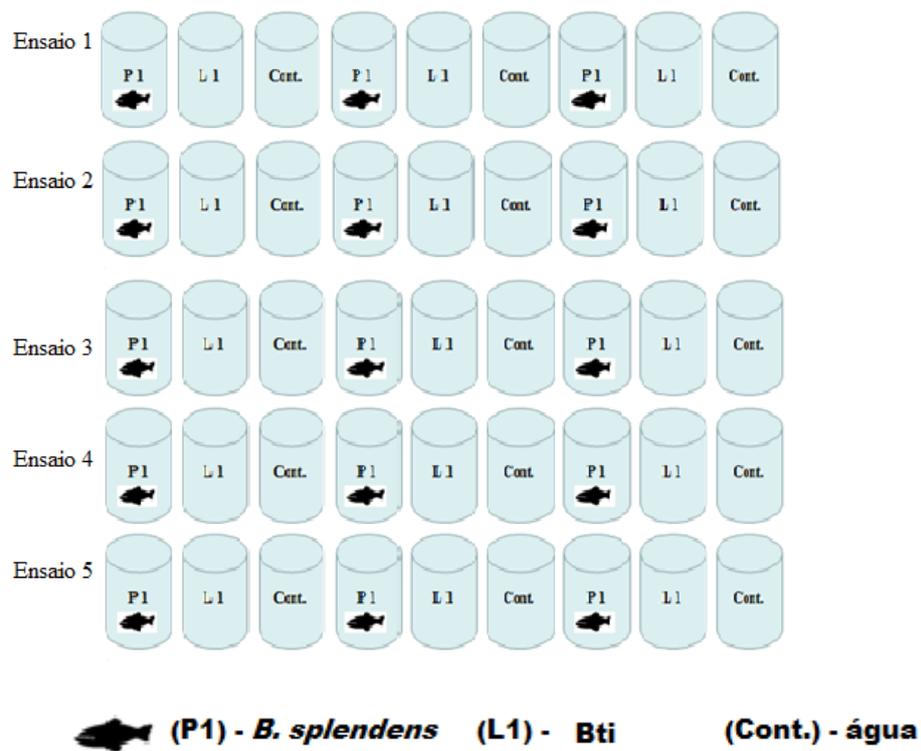


Figura 16 – Esquema dos experimentos de *B. splendens* X novaluron

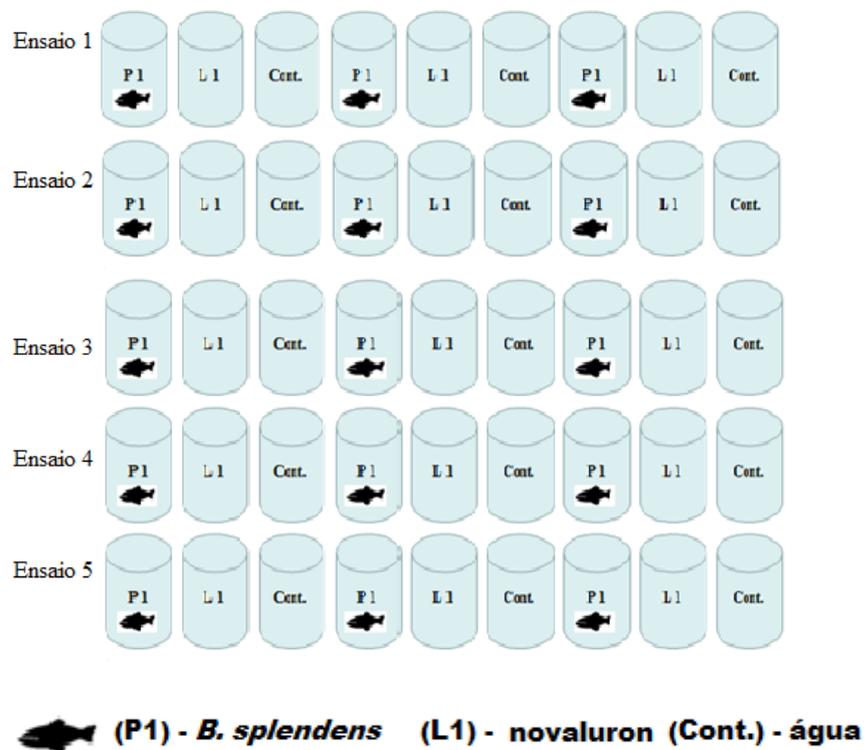


Figura 17 – Esquema dos experimentos de *P. reticulata* X temefós

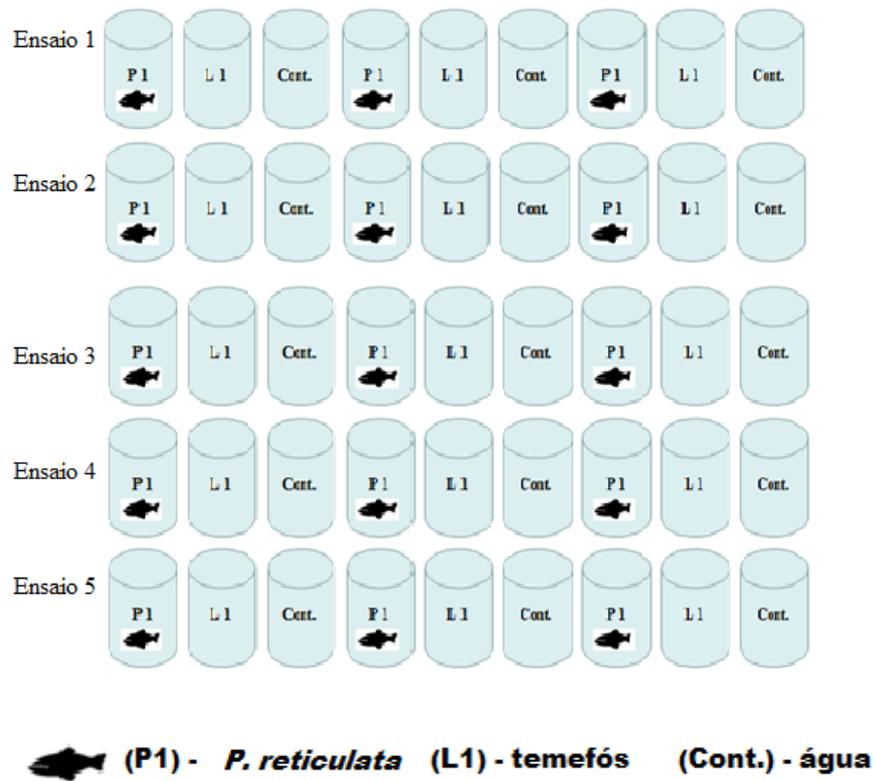


Figura 18 – Esquema dos experimentos de *P. reticulata* X Bti

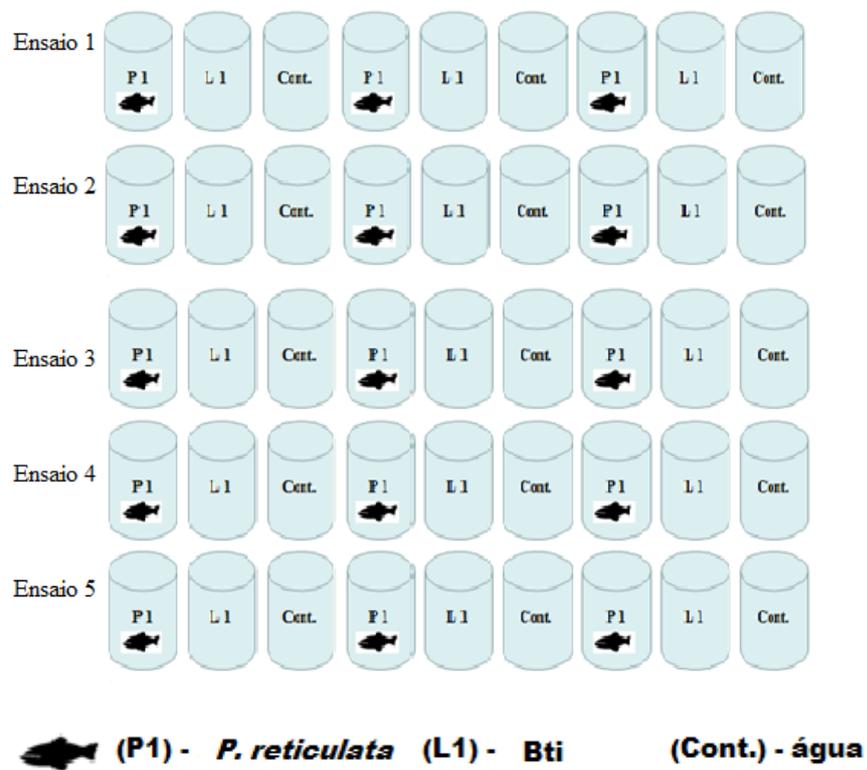
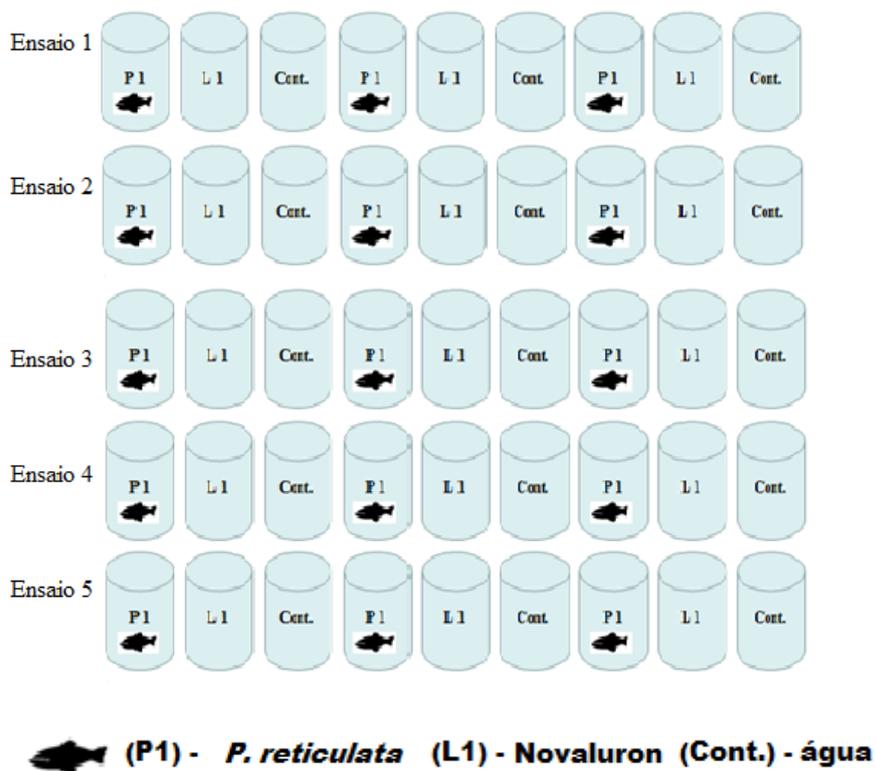


Figura 19 – Esquema dos experimentos de *P. reticulata* X novaluron



4.2.3 ANÁLISE DOS DADOS

A comparação da distribuição do número de ovos foi realizada pela análise de variância e aplicou-se o método de Bonferroni para avaliar a existência de diferenças entre os grupos. Foram comparadas as medianas, amplitude e quartis do número de ovos. Utilizamos o software STATA, versão 11.2 (Stata Corporation, College Station, USA). Foi avaliado também o Índice de Atividade de Oviposição (IAO), a partir de uma variação da fórmula de Kramer e Mulla (1979). Os gráficos foram confeccionados usando o programa Graphpad Prisma e STATA 11.2.

4.3 VALIDAÇÃO DA FÓRMULA DE KRAMER E MULLA (1979) PARA 3 DIFERENTES OFERTAS

A fórmula desenvolvida por Kramer e Mulla (1979), $N_T - N_C / N_T + N_C$, para a determinação do Índice de Atividade de Oviposição é muito utilizada em experimentos em que se dispõe para as fêmeas de mosquitos duas opções para ovipor. A

intensão de Kramer e Mulla (1979) ao propor a fórmula foi considerar que se houvesse mais ovos no N_T teríamos um valor positivo (atração), se houvesse mais ovos no N_C o valor seria negativo (repelência) e se os valores de N_T e N_C fossem próximos teríamos um valor zero (sem interferência na atividade de oviposição) (TORRES-ESTRADA *et al* 2001; GANESAN *et al.*, 2006; VAN DAM e WALTON, 2007, PAMPLONA *et al.* 2009a; SEENIVASAGAN *et al.*, 2010). Na metodologia desenvolvida neste trabalho optamos por oferecer aos mosquitos três opções de oviposição N_{T1} (larvicida), N_{T2} (peixe) e N_C (controle). Desta forma, aplicando a fórmula original poderíamos ter algum problema na análise com os resultados, visto que as fêmeas de mosquito agora não teriam somente duas opções, caso houvesse alguma atividade de oviposição, uma repelência, por exemplo, ela poderia não ficar tão evidente pois ao invés de ter uma opção para ovipor em relação ao depósito que está repelindo, elas teriam duas, dividindo desta forma os ovos colocados, dificultando ser observado alguma diferença estatística entre os depósitos.

Para tentar resolver o problema observado anteriormente vamos imaginar uma situação com as três opções em que não há interferência na atividade de oviposição. Deveremos ter nesta situação hipotética aproximadamente o mesmo número de ovos nos três recipientes. Considerando a quantidade de ovos nos três recipientes como “X”, “Y” e “Z”, não podemos simplesmente subtrair um pelo outro como feito na fórmula de Kramer e Mulla (1979), mas se pegarmos uma variável multiplicarmos por 2 e subtrair pela soma das outras duas, teremos o resultado esperado quando não há influência na atividade de oviposição, que é zero ($2X - (Y + Z)$), visto que os valores serão próximos. Para compensar o acréscimo da multiplicação no numerador, faremos a mesma coisa no denominador. Espera-se em torno de 33% dos ovos em um experimento em que não há atividade de oviposição, caso haja atração, e ocorra em torno de 40% dos ovos ovipostos em um recipiente, ao multiplicarmos por dois teremos 80% subtraídos pelos 60% restantes ($100\% - 40\%$), teremos um valor positivo indicando atração. Caso aconteça o contrário, em um dos depósitos tenha uma quantidade menor de ovos, por exemplo 25%, multiplicando por dois teremos 50%, subtraídos pelos 75% restantes ($100\% - 25\%$), teremos um valor negativo, indicando repelência. Na fórmula proposta por Kramer e Mulla (1979) havia o cálculo de somente um IAO, pois bastava saber se havia mais ovos postos no controle ou no teste, neste caso precisamos calcular o IAO dos dois testes e do controle e comparar os três, para

que possamos avaliar se o número baixo de ovos em um depósito se deve ao fato de haver repelência ou o outro depósito que teve um forte poder de atração e reduziu a quantidade de ovos naquele recipiente. A fórmula adaptada de Kramer e Mulla (1979) encontra-se na figura 20.

Figura 20 – Derivação da fórmula de Kramer e Mulla (1979)

$$\mathbf{IAO_{NT1} = \frac{((N_{T1} * 2) - (N_{T2} + N_c))}{((N_{T1} * 2) + (N_{T2} + N_c))}}$$

$$\mathbf{IAO_{NT2} = \frac{((N_{T2} * 2) - (N_{T1} + N_c))}{((N_{T2} * 2) + (N_{T1} + N_c))}}$$

$$\mathbf{IAO_{NC} = \frac{(N_c * 2) - (N_{T1} + N_{T2})}{(N_c * 2) + (N_{T1} + N_{T2})}}$$

4.4 DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA AOS INSETICIDAS

4.4.1 MATERIAL

4.4.1.1 PEIXES UTILIZADOS

Os peixes avaliados, nessa fase, foram o *Betta splendens* (Regan, 1910), *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) e o *Trichogaster trichopterus* (Pallas, 1770) (Figuras 6, 7 e 8).

4.4.1.2 LARVICIDAS UTILIZADOS

Os larvicidas utilizados, com suas respectivas concentrações, foram:

- Temephos Fersol 1G, na formulação granulada na concentração de 100 mg/l;
- Novaluron Bayer CE, na formulação emulsionável, na concentração de 2%;
- Bti (*Bacillus thuringiensis israelenses*), na formulação granulada e concentração de 20 mg / l.

4.4.2 EXPERIMENTO

Para determinar a toxicidade aos peixes, utilizou-se 15 caixas d'água, com 250 litros de água em cada. Em cada uma havia um espécime do peixe a ser testado. As caixas foram distribuídas de forma agrupada na área aberta do laboratório. Em cinco dessas caixas continha apenas água desclorada (controle) com um peixe e nas outras 10 caixas, a água foi tratada com o larvicida a ser testado com um peixe em cada, como apresentado nas figura 21 a 29.

Figura 21. Sobrevivência do peixe *B. splendens* na presença do larvicida temefós.

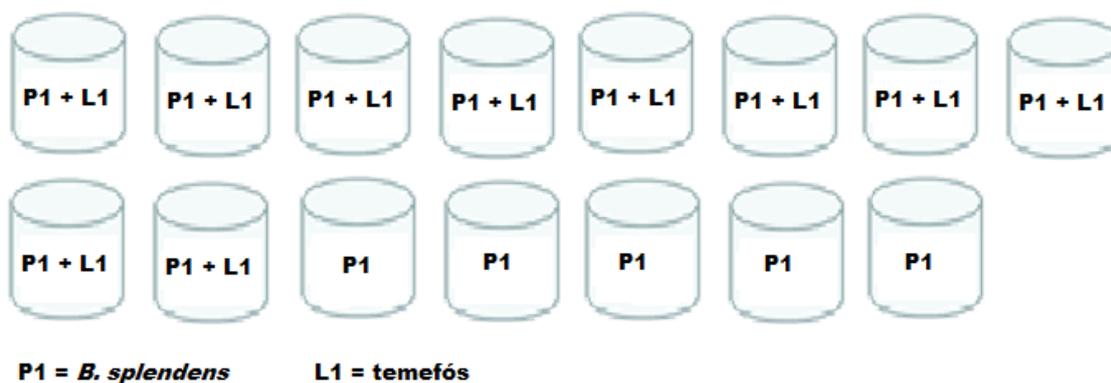


Figura 22. Sobrevivência do peixe *B. splendens* na presença do larvicida *Bti*.

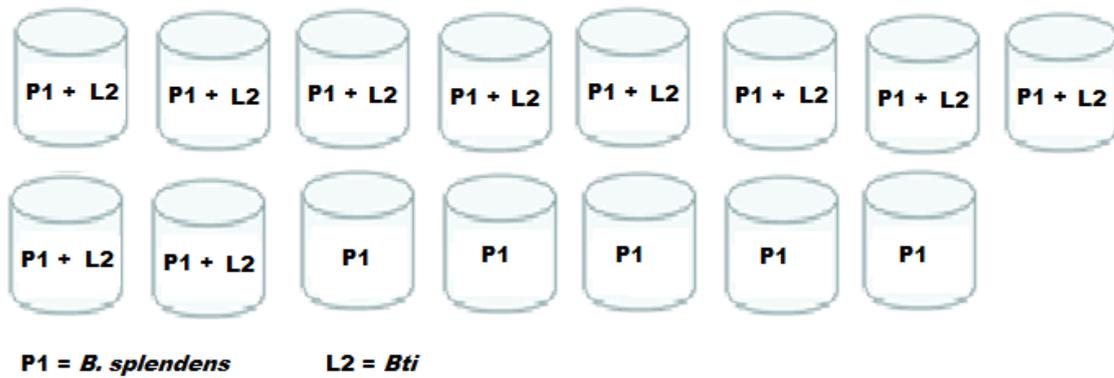


Figura 23. Sobrevivência do peixe *B. splendens* na presença do larvicida novaluron.

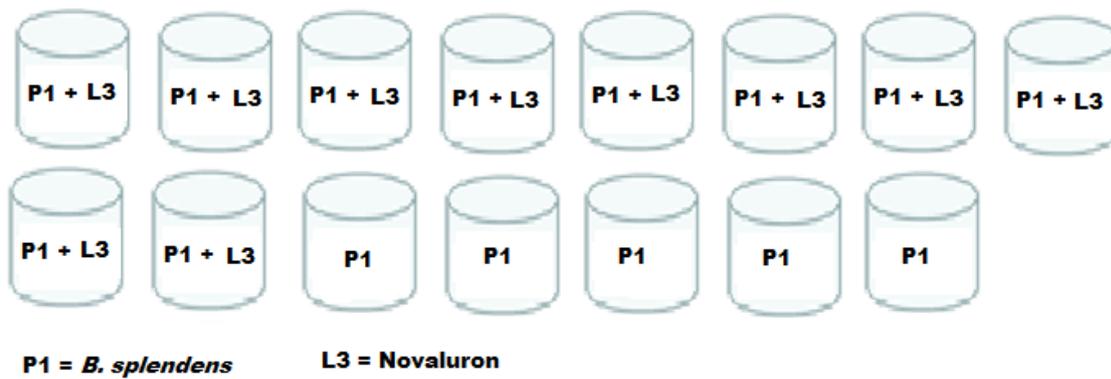


Figura 24. Sobrevivência do peixe *P. reticulata* na presença do larvicida temefós.

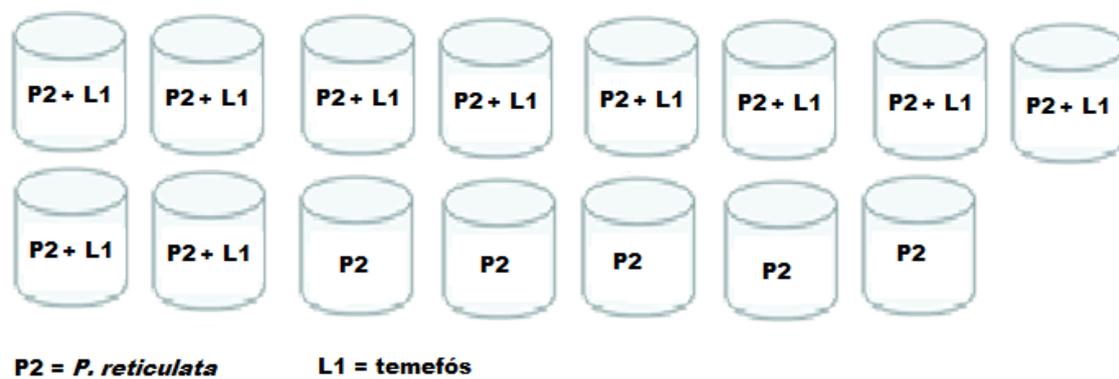


Figura 25. Sobrevivência do peixe *P. reticulata* na presença do larvicida *Bti*.

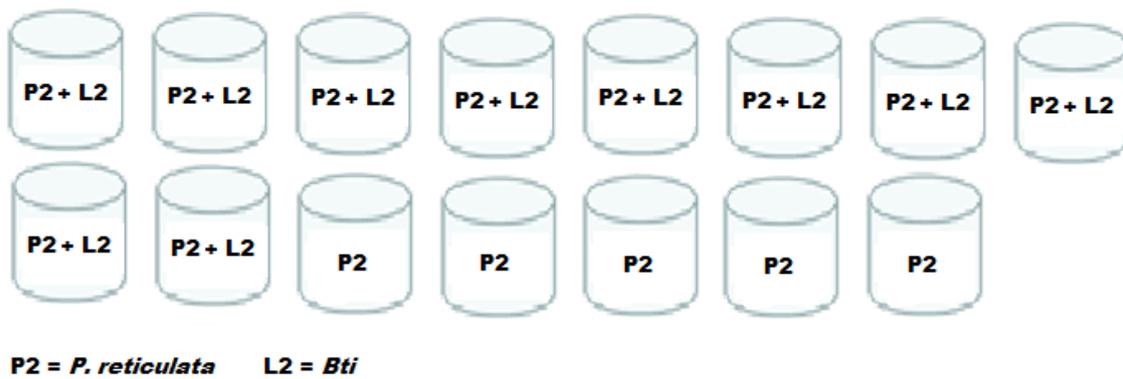


Figura 26. Sobrevivência do peixe *P. reticulata* na presença do larvicida novaluron.

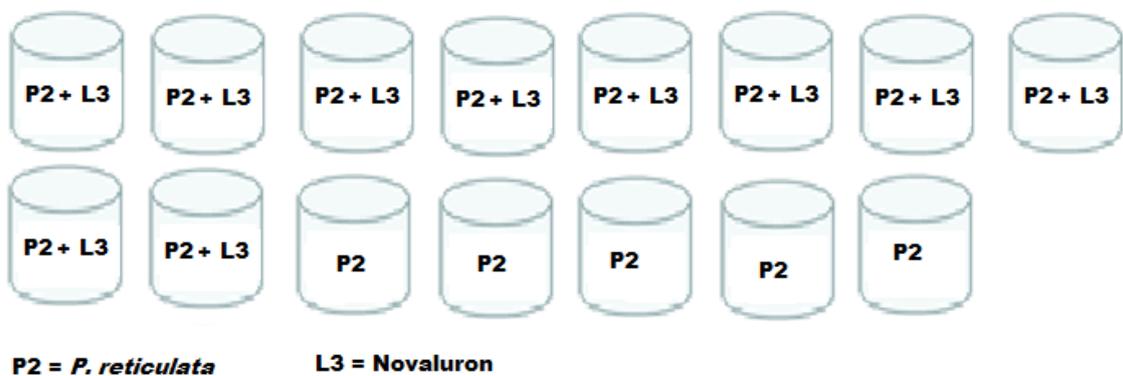


Figura 27. Sobrevivência do peixe *T. trichopterus* na presença do larvicida temefós.

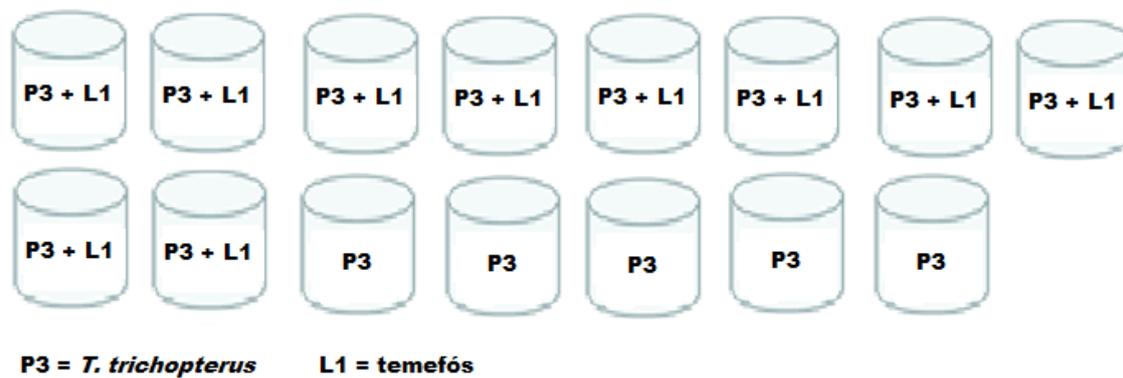


Figura 28. Sobrevivência do peixe *T. trichopterus* na presença do larvicida *Bti*.

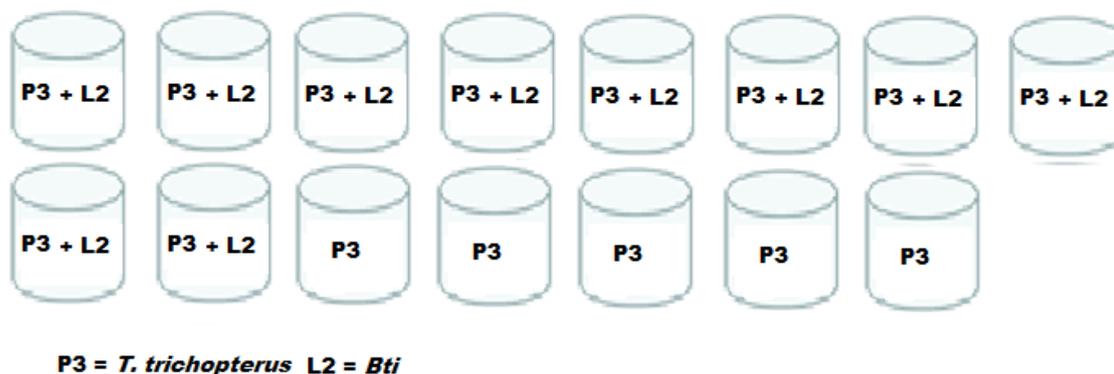
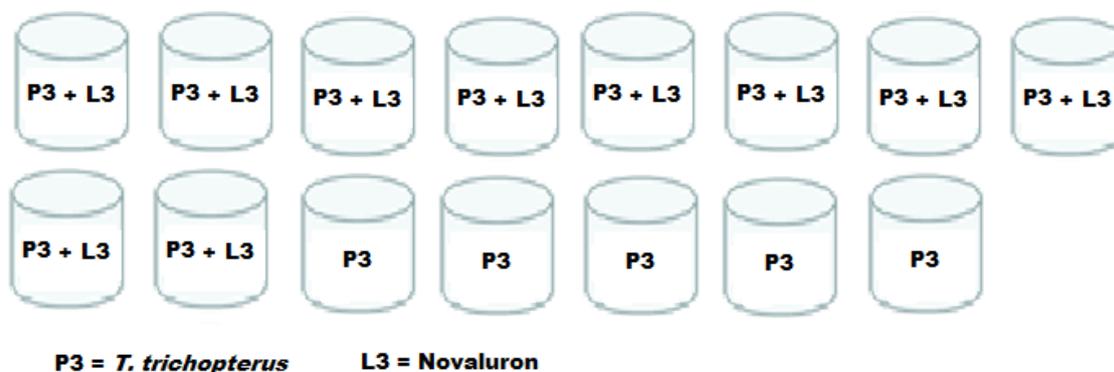


Figura 29. Sobrevivência do peixe *T. trichopterus* na presença do larvicida novaluron.



As caixas foram observadas diariamente, por um período de uma semana. Em caso de morte de algum peixe foi registrado o dia e se foi da caixa teste ou da caixa controle. Cada combinação peixe / larvicida foi repetido por quatro semanas consecutivas. Como foram analisados 3 espécies de peixe e 3 tipos diferentes de larvicidas, tivemos 9 combinações. Cada combinação (espécie de peixe x larvicida) foi repetida 4 vezes, totalizando 36 semanas de observação.

4.4.3 ANÁLISE DOS DADOS

Nesse caso a análise foi feita de forma observacional, sendo os peixes avaliados diariamente se estavam vivos ou mortos. Realizou-se também a estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier para determinar a significância do teste.

5. RESULTADOS

5.1 Comparação do padrão de oviposição entre os depósitos com peixes larvófagos, com larvicidas e os controles.

5.1.1 *Betta splendens* X temefós

Nos testes em que se avaliou a preferência de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* tendo como opções depósitos com o peixe *B. splendens* e depósitos com o larvicida temefós, utilizou-se 15 peixes. Houve um total de 20.343 ovos postos. Destes, 3.241 (15,93%) foram nos depósitos com peixe, 7.907 (38,87%) nos depósitos controle e 9.195 (45,20%) nos depósitos com larvicida (Tabela 1). A média de ovos nos depósitos com peixes foi de 216, nos depósitos controle a média foi de 527 e nos depósitos com Temefós a média de ovos foi de 613 (Tabela 3).

Tabela 1 – Número de ovos postos por depósito nos experimentos de *B. splendens* X temefós

	<i>B. splendens</i>				Controle				Temefós			
	P1	P2	P3	TOTAL	C1	C2	C3	TOTAL	L1	L2	L3	TOTAL
Semana 1	68	6	95	169	30	387	5	422	250	171	211	632
Semana 2	174	351	114	639	549	561	286	1.396	1585	750	646	2981
Semana 3	347	280	78	705	585	1338	252	2175	1319	143	521	1983
Semana 4	115	343	18	476	360	1037	9	1406	518	508	228	1254
Semana 5	150	913	189	1252	971	1229	308	2508	962	547	836	2345
TOTAL	854	1893	494	3241	2495	4552	860	7907	4634	2119	2442	9195

De acordo com o índice de atividade de oviposição (IAO) o *B. splendens* apresentou uma alta capacidade de repelência para fêmeas grávidas de *A. aegypti*, oscilando entre os valores de -0,32 e -0,55; e levando-se em consideração as 5 semanas o IAO foi de -0,45 (Tabela 2).

Tabela 2 – Índice de Atividade de Oviposição (IAO)* nos depósitos com *B. splendens*, temefós e controle.

	<i>Betta splendens</i>	Controle	Temefós
Semana 1	-0,51	0,03	0,36
Semana 2	-0,55	-0,13	0,49
Semana 3	-0,49	0,24	0,16
Semana 4	-0,47	0,24	0,14
Semana 5	-0,32	0,16	0,11
TOTAL	-0,45	0,12	0,25

*Adaptado a partir de Kramer e Mulla (1979)

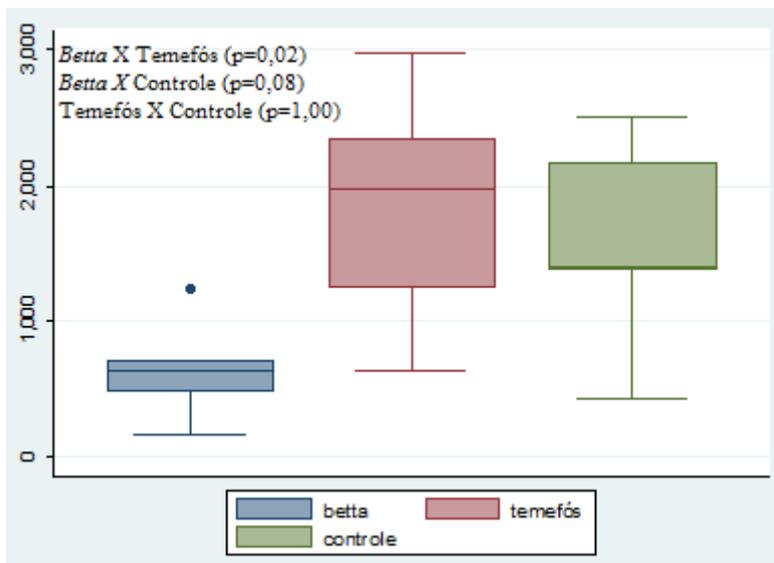
Levando-se em consideração os nove depósitos, analisados durante cinco semanas, foram comparadas as médias do número de ovos pela análise de variância, encontrando-se um p valor de 0,014 (Tabela 3). Aplicando-se o método de Bonferroni constatou-se diferença significativa entre os depósitos com o peixe *B. splendens* e o larvicida Temefós ($p=0,02$), mas não existindo diferença entre *B. splendens* e controle ($p=0,08$) e nem entre o larvicida e o controle (Figura 30).

Tabela 3 – Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância

Experimentos	Média	Desvio padrão	Anova		
			MQ entre	MQ dentro	F Valor - p
<i>B. splendens</i>	216	225	654.229	139.591	4,69
Temefós	613	425			0,014
Controle	527	433			

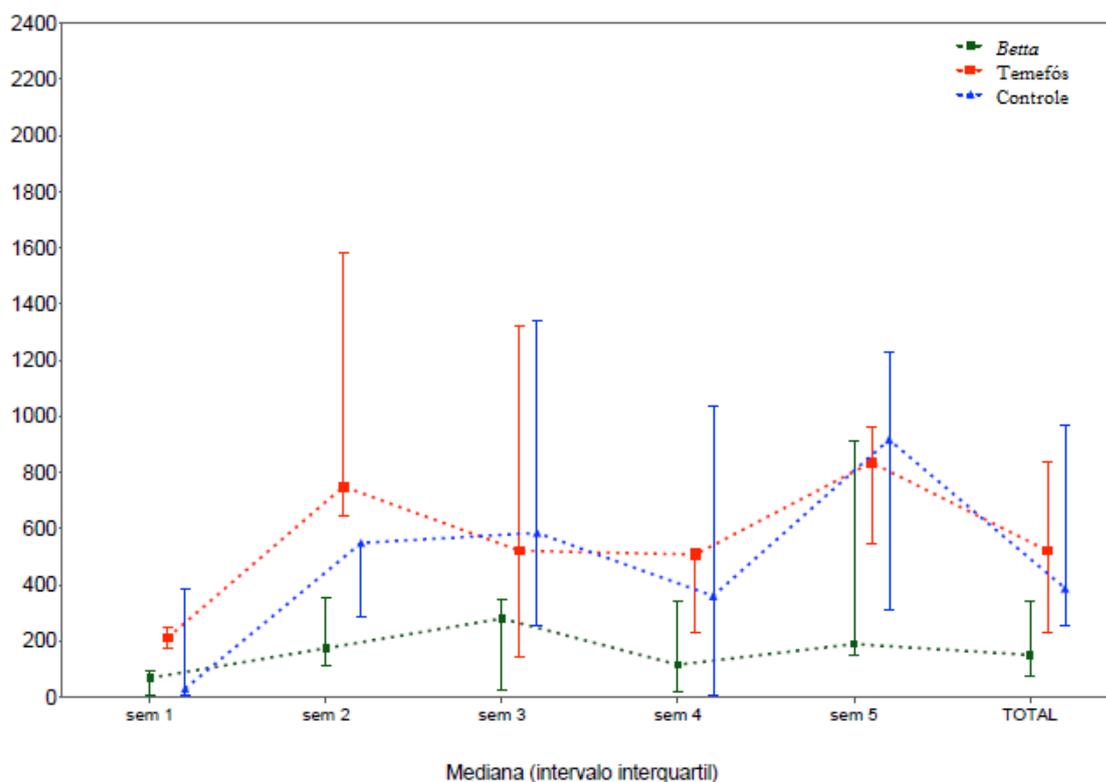
*MQ – Média ao Quadrado

Figura 30 – Distribuição do número de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni.



Ao analisar o intervalo interquartílico por semana, observamos uma sobreposição entre os intervalos (Figura 31).

Figura 31 – Mediana e intervalo interquartílico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos com *B. splendens* X temefós.



5.1.2 *Betta splendens* X Bti

Nos testes em que se avaliou a preferência de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* tendo como opções depósitos com o peixe *B. splendens* e depósitos com o larvicida Bti, utilizou-se 15 peixes. Houve um total de 10.090 ovos postos, destes, 1.770 (17,5%) foram nos depósitos com peixe, 3.536 (35%) nos depósitos controle e 4.784 (47,5%) nos depósitos com larvicida. A média de ovos nos depósitos com peixes foi de 118, nos depósitos controle a média foi de 236 e nos depósitos com abate a média de ovos foi de 319 (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de ovos postos por depósito nos experimentos de *B. splendens* X Bti

	<i>Betta splendens</i>				Controle				Bti			
	P1	P2	P3	TOTAL	C1	C2	C3	TOTAL	L1	L2	L3	TOTAL
Semana 1	21	142	4	167	274	524	45	843	598	649	558	1805
Semana 2	25	64	5	94	117	182	56	355	50	152	163	365
Semana 3	445	374	41	860	398	647	194	1239	421	235	449	1105
Semana 4	102	262	12	376	216	247	187	650	360	139	198	697
Semana 5	23	150	100	273	101	240	108	449	277	184	351	812
TOTAL	616	992	162	1770	1106	1840	590	3536	1706	1359	1719	4784

De acordo com o índice de atividade de oviposição (IAO) o *B. splendens* apresentou uma alta capacidade de repelência para fêmeas grávidas de *A. aegypti*, oscilando entre os valores de -0,15 e -0,78, e levando-se em consideração as 5 semanas o IAO foi de -0,40, bem próximo dos valores encontrados nos experimentos com o temefós. Na primeira e na quinta semana o controle apresentou valores ligeiramente negativos, mas sempre se aproximando do zero, sendo que no geral ficou em 0,04, indicando uma repelência por parte do *B. splendens* e atração por parte do Bti o qual apresentou um IAO variando entre 0,03 e 0,56 (Tabela 5).

Tabela 5 - Índice de Atividade de Oviposição (IAO)* nos depósitos com *B. splendens*, Bti e controle

	<i>Betta splendens</i>	Controle	Bti
Semana 1	-0,78	-0,08	0,56
Semana 2	-0,59	0,21	0,24
Semana 3	-0,15	0,12	0,03
Semana 4	-0,28	0,10	0,15
Semana 5	-0,40	-0,09	0,38
TOTAL	-0,40	0,04	0,29

*Adaptado a partir de Kramer e Mulla (1979)

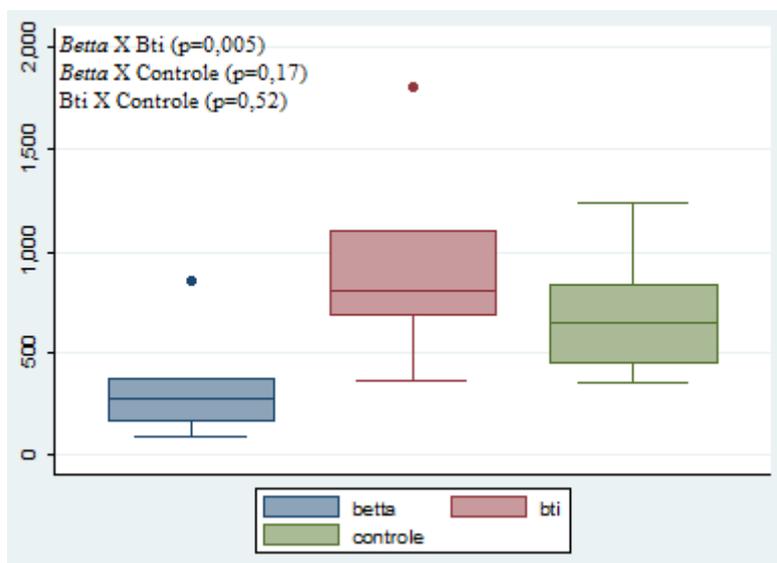
Levando-se em consideração os nove depósitos, analisados durante cinco semanas, foram comparadas as médias do número de ovos pela análise de variância, encontrando-se um p valor de 0,007 (Tabela 6). Aplicando-se o método de Bonferroni constatou-se diferença significativa entre os depósitos com o peixe *B. splendens* e o larvicida Bti ($p=0,05$), mas não existindo diferença entre *B. splendens* e controle ($p=0,17$) e nem entre bti e controle ($p=0,52$) (Figura 32).

Tabela 6 – Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância

Experimentos	Média	Desvio padrão	Anova		
			MQ entre	MQ dentro	F Valor - p
<i>B. splendens</i>	118	138	152.894	27.278	5,61
Abate	319	184			0,007
Controle	236	170			

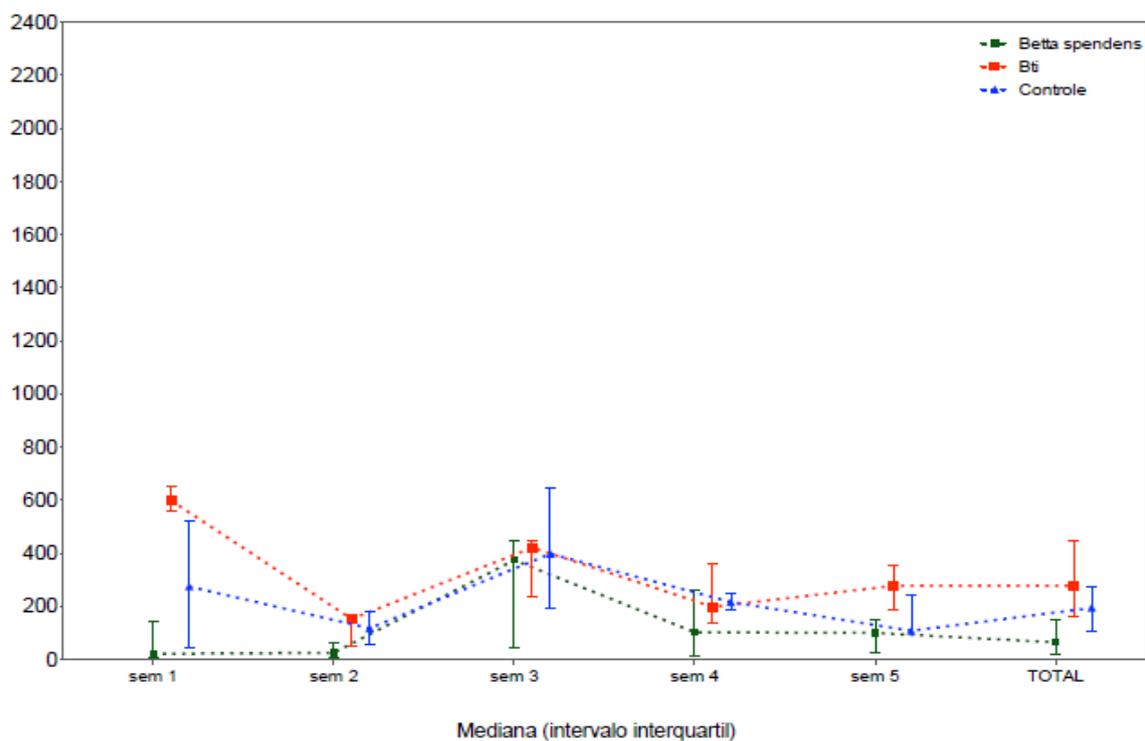
*Média ao Quadrado

Figura 32 – Gráfico distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni



Ao analisar o intervalo interquartílico por semana, observamos uma sobreposição entre os intervalos (Figura 33).

Figura 33 – Medianas e intervalo interquartil por semana da distribuição dos ovos nos experimentos *B. splendens* X Bti



5.1.3 *Betta splendens* X novaluron

Nos testes em que se avaliou a preferência de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* tendo como opções depósitos com o peixe *B. splendens* e depósitos com o larvicida novaluron, utilizou-se 15 peixes. Houve um total de 14.316 ovos postos, destes, 2.715 (19%) foram nos depósitos com peixe, 5.630 (39,3%) nos depósitos controle e 5.971 (41,7%) nos depósitos com larvicida. A média de ovos nos depósitos com peixes foi de 181, nos depósitos controle a média foi de 375 e nos depósitos com temefós a média de ovos foi de 398 (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de ovos postos por depósito nos experimentos de *B. splendens* X Novaluron

	<i>Betta splendens</i>				CONTROLE				NOVALURON			
	P1	P2	P3	TOTAL	C1	C2	C3	TOTAL	L1	L2	L3	TOTAL
Semana 1	53	43	93	189	60	324	32	416	172	267	221	660
Semana 2	30	72	261	363	173	91	122	386	136	245	236	617
Semana 3	41	655	63	759	379	426	509	1314	194	341	242	777
Semana 4	271	159	344	774	1233	296	758	2287	939	1095	948	2982
Semana 5	219	220	191	630	527	763	474	1764	455	244	236	935
TOTAL	614	1149	952	2715	2187	1815	1628	6167	1896	2192	1883	5971

De acordo com o índice de atividade de oviposição (IAO) os depósitos com *B. splendens*, tal e qual ocorreu com os outros dois larvicidas, apresentou capacidade de repelência para fêmeas grávidas de *A. aegypti*, oscilando entre os valores de (-0,16) e (-0,55), e levando-se em consideração as 5 semanas o IAO foi de -0,38. Em relação aos depósitos controle a variação foi de -0,12 e 0,39 e no geral 0,17. Valores muito próximos ao do controle foram os dos depósitos do novaluron em que o IAO variou entre -0,14 e 0,37 e no geral 0,15 (Tabela 8).

Tabela 8 - Índice de Atividade de Oviposição (IAO)* nos depósitos com *B. splendens*, Novaluron e controle

	<i>Betta splendens</i>	Controle	Novaluron
Semana 1	-0,48	-0,01	0,37
Semana 2	-0,16	-0,12	0,24
Semana 3	-0,16	0,26	-0,14
Semana 4	-0,55	0,10	0,32
Semana 5	-0,36	0,39	-0,12
TOTAL	-0,38	0,17	0,15

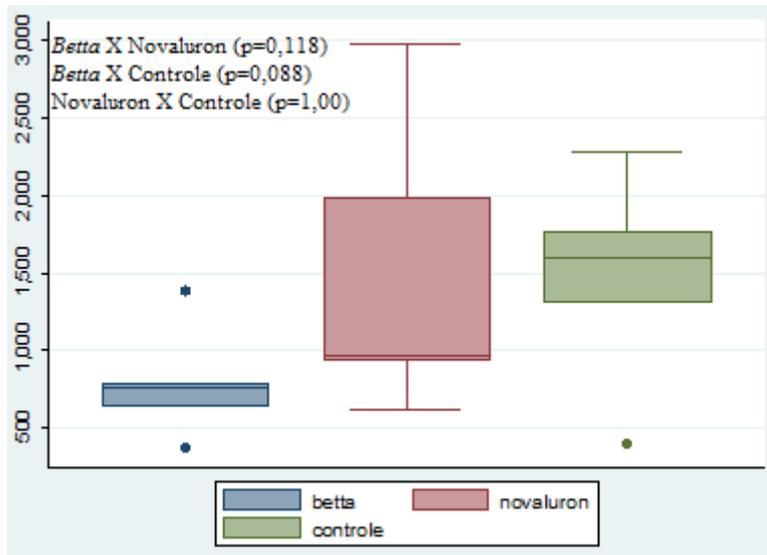
Levando-se em consideração os nove depósitos analisados durante as cinco semanas, foi comparada a média do número de ovos pela análise de variância, encontrando-se um p valor de 0,05 (Tabela 9). Aplicando-se o método de Bonferroni não constatou-se diferença significativa entre os grupos, com os valores de p sendo os seguintes: peixe *Betta splendens* e novaluron ($p=0,088$), *B. splendens* e controle ($p=0,128$) e entre novaluron e controle ($p=1,00$) (Figura 34).

Tabela 9 – Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância

Experimentos	Média	Desvio padrão	Anova		
			MQ entre	MQ dentro	F Valor - p
<i>B. splendens</i>	181	165	250.625	78.105	3,21
Novaluron	398	319			0,05
Controle	411	325			

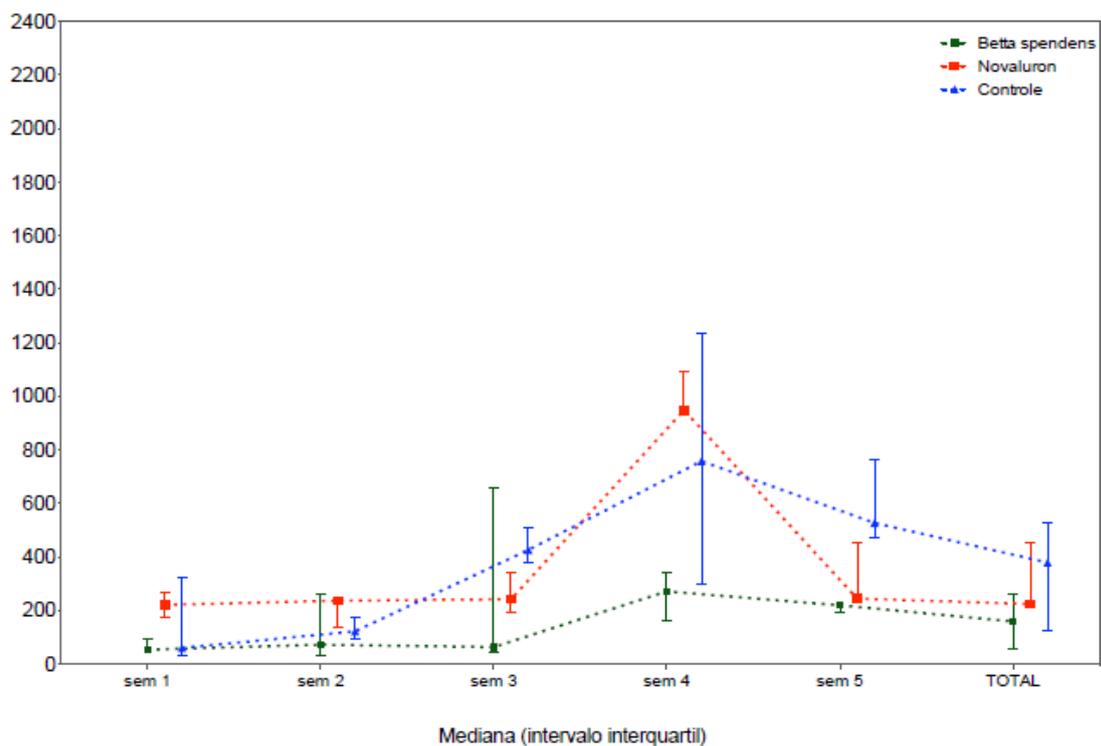
*Média ao Quadrado

Figura 34 – Gráfico distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni



Ao analisar o intervalo interquartílico por semana, observamos uma sobreposição entre os intervalos, exatamente o que ocorreu nos outros dois experimentos, porém com uma maior sobreposição (Figura 35).

Figura 35 – Medianas e intervalo interquartil por semana da distribuição dos ovos nos experimentos *B. splendens* X Novaluron.



5.1.4 *Poecilia reticulata* X temefós

Nos testes em que se avaliou a preferência de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* tendo como opções depósitos com o peixe *P. reticulata* e depósitos com o larvicida Temefós, utilizou-se 15 peixes. Houve um total de 29.286 ovos postos. Destes, 8.687 (29,7%) foram nos depósitos com peixe, 9.791 (33,4%) nos depósitos controle e 10.808 (36,9%) nos depósitos com larvicida. A média de ovos nos depósitos com peixes foi de 579, nos depósitos controle a média foi de 652 e nos depósitos com Temefós a média de ovos foi de 720 (Tabela 10).

Tabela 10 – Número de ovos postos por depósito nos experimentos de *P. reticulata* X Temefós

	<i>Poecilia reticulata</i>				Controle				Temefós			
	P1	P2	P3	TOTAL	C1	C2	C3	TOTAL	L1	L2	L3	TOTAL
Semana 1	1207	850	562	2619	721	1103	248	2072	556	1078	778	2412
Semana 2	180	212	496	888	604	357	279	1240	79	690	664	1433
Semana 3	1391	905	950	3246	2198	1285	561	4044	1142	2217	1041	4400
Semana 4	182	179	34	395	218	228	33	479	279	204	72	555
Semana 5	631	366	542	1539	958	440	558	1956	408	905	695	2008
TOTAL	3591	2512	2584	8687	4699	3413	1679	9791	2464	5094	3250	10808

De acordo com o índice de atividade de oviposição (IAO) o *P. reticulata* apresentou uma discreta repelência nas semanas 2,3,4 e 5, com valores de IAO variando entre -0,13 e -0,20, mas quando observa-se o valor geral todos os depósitos (*P. reticulata*, Temefós e controle) possuem IAO bem próximo a zero (Tabela 11).

Tabela 11 – Índice de Atividade de Oviposição (IAO)* nos depósitos com *P. reticulata*, Temefós e controle.

	<i>Poecilia reticulata</i>	Controle	Temefós
Semana 1	0,08	-0,10	0,01
Semana 2	-0,20	0,03	0,15
Semana 3	-0,13	0,03	0,09
Semana 4	-0,13	0,00	0,12
Semana 5	-0,13	0,05	0,07
TOTAL	-0,08	0,00	0,08

* Adaptado a partir de Kramer e Mulla (1979)

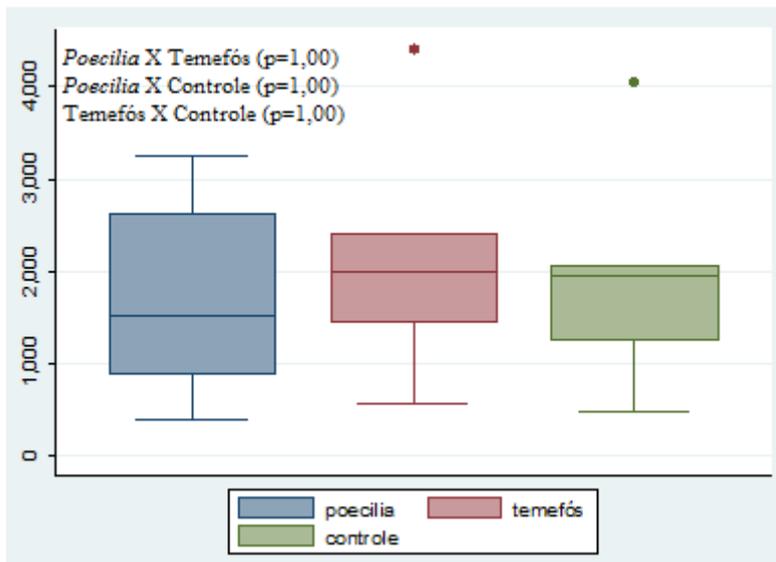
Levando-se em consideração os nove depósitos, analisados durante cinco semanas, foram comparadas as médias do número de ovos pela análise de variância, não sendo encontrada nenhuma diferença estatística ($p=0,747$) (Tabela 12). Aplicando-se o método de Bonferroni também não foi constatada nenhuma diferença entre os depósitos (Figura 36).

Tabela 12 – Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.

Experimentos	Média	Desvio padrão	Anova		
			MQ entre	MQ dentro	F Valor - p
<i>P. reticulata</i>	579	409	75.019	255.766	0,29
Temefós	721	542			0,747
Controle	653	554			

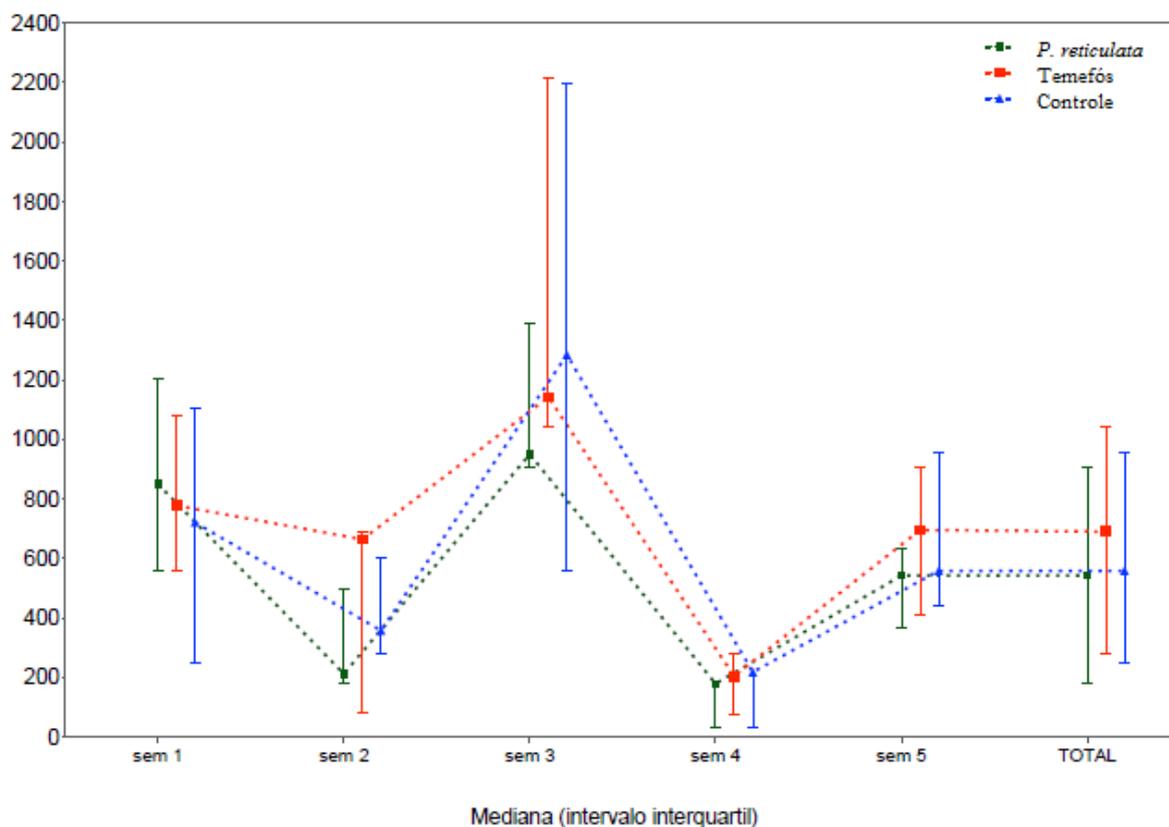
*Média ao Quadrado

Figura 36 – Gráfico distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni



Ao analisar o intervalo interquartílico por semana, observamos uma grande sobreposição entre os intervalos (Figura 37).

Figura 37 – Medianas e intervalo interquartílico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos *P. reticulata* X Temefós



5.1.5 *Poecilia reticulata* X Bti

Nos testes em que se avaliou a preferência de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* tendo como opções depósitos com o peixe *P. reticulata* e depósitos com o larvicida Bti, utilizou-se 15 peixes. Houve um total de 12.824 ovos postos. Destes, 2.881 (22,5%) foram nos depósitos com peixe, 2.485 (19,3%) nos depósitos controle e 7.458 (58,2%) nos depósitos com larvicida. A média de ovos nos depósitos com peixes foi de 192, nos depósitos controle a média foi de 165 e nos depósitos com Temefós a média de ovos foi de 497 (Tabela 13).

Tabela 13 – Número de ovos postos por depósito nos experimentos de *P. reticulata* X Bti

	<i>Poecilia reticulata</i>				Controle				Bti			
	P1	P2	P3	TOTAL	C1	C2	C3	TOTAL	L1	L2	L3	TOTAL
Semana 1	519	716	200	1435	278	242	107	627	645	1889	1965	4499
Semana 2	57	242	87	386	229	100	4	333	344	462	409	1215
Semana 3	31	268	36	335	183	193	230	606	22	202	146	370
Semana 4	191	235	186	612	331	308	212	851	114	442	392	948
Semana 5	63	14	36	113	32	21	15	68	42	197	187	426
TOTAL	861	1475	545	2881	1053	864	568	2485	1167	3192	3099	7458

De acordo com o índice de atividade de oviposição (IAO) o Bti apresentou valores positivos variando de - 0,12 (atípico na semana 3) a 0,65, e levando-se em consideração as 5 semanas o IAO foi de 0,47, o que possivelmente justifique os valores negativos dos depósitos com *P. reticulata* (-0,27) e controle (-0,35) (Tabela 14).

Tabela 14 – Índice de Atividade de Oviposição (IAO)* nos depósitos com *P. reticulata*, Bti e controle

	<i>Poecilia reticulata</i>	Controle	Bti
Semana 1	-0,28	-0,65	0,63
Semana 2	-0,33	-0,41	0,54
Semana 3	-0,19	0,26	-0,12
Semana 4	-0,19	0,04	0,13
Semana 5	-0,37	-0,60	0,65
TOTAL	-0,27	-0,35	0,47

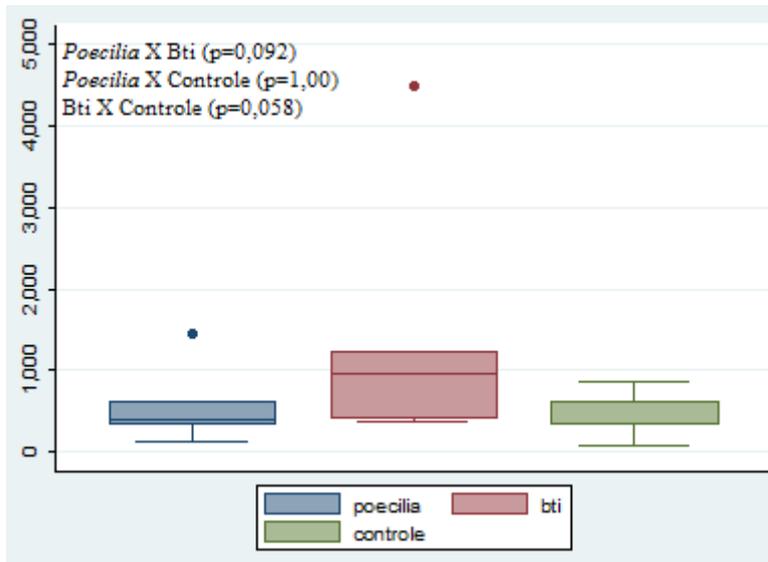
Levando-se em consideração os nove depósitos, analisados durante cinco semanas, foram comparadas as médias do número de ovos pela análise de variância, encontrando-se um p valor de 0,034 (Tabela 15). Aplicando-se o método de Bonferroni não constatou-se diferença significativa entre nenhum dos depósitos (Figura 38).

Tabela 15 – Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.

Experimentos	Média	Desvio padrão	Anova		
			MQ entre	MQ dentro	F Valor - p
<i>P. reticulata</i>	192	197	509.294	139.366	3,65
Bti	497	606			0,034
Controle	166	111			

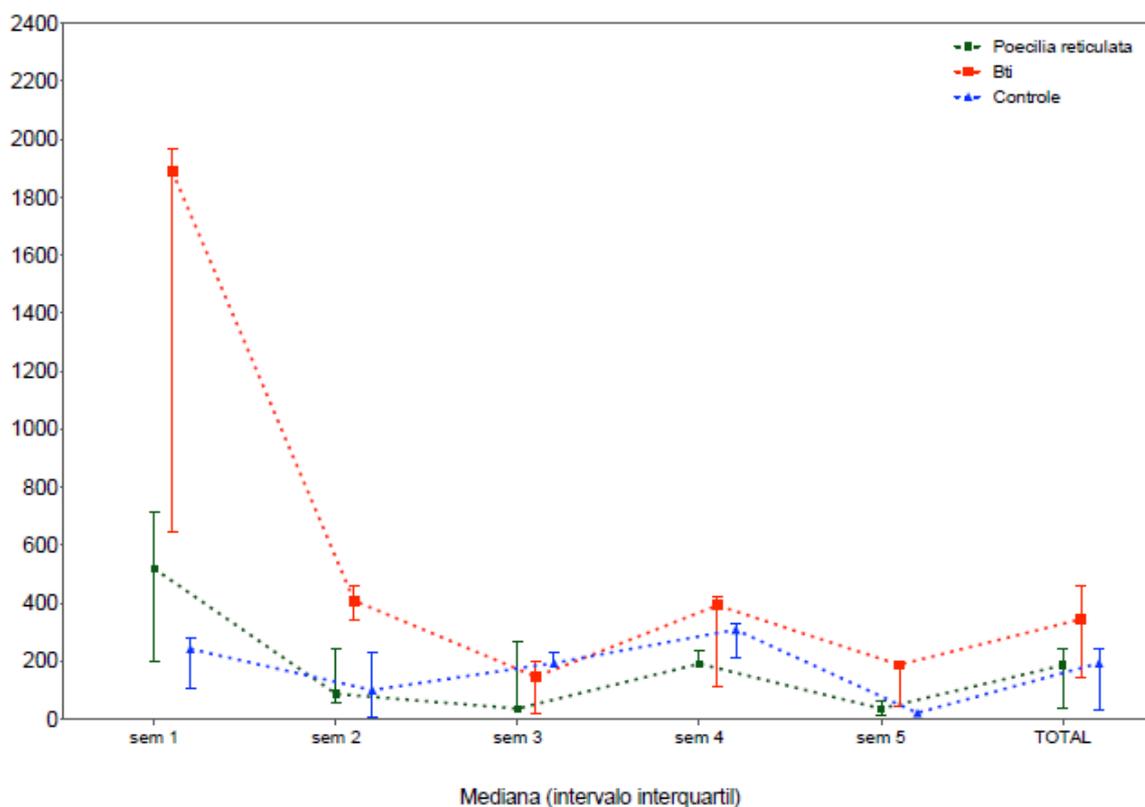
*Média ao Quadrado

Figura 38 – Gráfico distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni



Ao analisar o intervalo interquartílico por semana, observamos uma sobreposição entre os intervalos (Figura 39).

Figura 39 – Medianas e intervalo interquartílico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos *P. reticulata* X Bti



5.1.6 *Poecilia reticulata* X novaluron

Nos testes em que se avaliou a preferência de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* tendo como opções depósitos com o peixe *P. reticulata* e depósitos com o larvicida Novaluron, utilizou-se 15 peixes. Houve um total de 9.614 ovos postos. Destes, 3.494 (36,35%) foram nos depósitos com peixe, 3.469 (36,08%) nos depósitos controle e 2.651 (27,57%) nos depósitos com larvicida (Tabela 16). A média de ovos nos depósitos com peixes foi de 233, nos depósitos controle a média foi de 231 e nos depósitos com Novaluron a média de ovos foi de 177 (Tabela 18).

Tabela 16 – Número de ovos postos por depósito nos experimentos de *P. reticulata* X Novaluron

	<i>Poecilia reticulata</i>				Controle				Novaluron			
	P1	P2	P3	TOTAL	C1	C2	C3	TOTAL	L1	L2	L3	TOTAL
Semana 1	158	429	292	879	173	60	295	528	166	277	146	589
Semana 2	18	296	191	505	210	128	167	505	83	234	12	329
Semana 3	269	82	246	597	288	98	230	616	134	319	139	592
Semana 4	603	253	274	1130	67	889	175	1131	168	323	237	728
Semana 5	71	102	210	383	196	392	101	689	118	145	150	413
TOTAL	1119	1162	1213	3494	934	1567	968	3469	669	1298	684	2651

De acordo com o índice de atividade de oviposição (IAO) os depósitos com Novaluron apresentaram uma discreta repelência, variando o IAO entre -0,22 e -0,01, mas quando observa-se o valor geral todos os depósitos (*P. reticulata*, Novaluron e controle) possuem IAO bem próximo a zero (Tabela 17).

Tabela 17 – Índice de Atividade de Oviposição (IAO)* nos depósitos com *P. reticulata*, Novaluron e controle

	<i>Poecilia reticulata</i>	Controle	Novaluron
Semana 1	0,22	-0,16	-0,09
Semana 2	0,10	0,10	-0,21
Semana 3	-0,01	0,02	-0,01
Semana 4	0,10	0,10	-0,22
Semana 5	-0,18	0,27	-0,13
TOTAL	0,07	0,06	-0,14

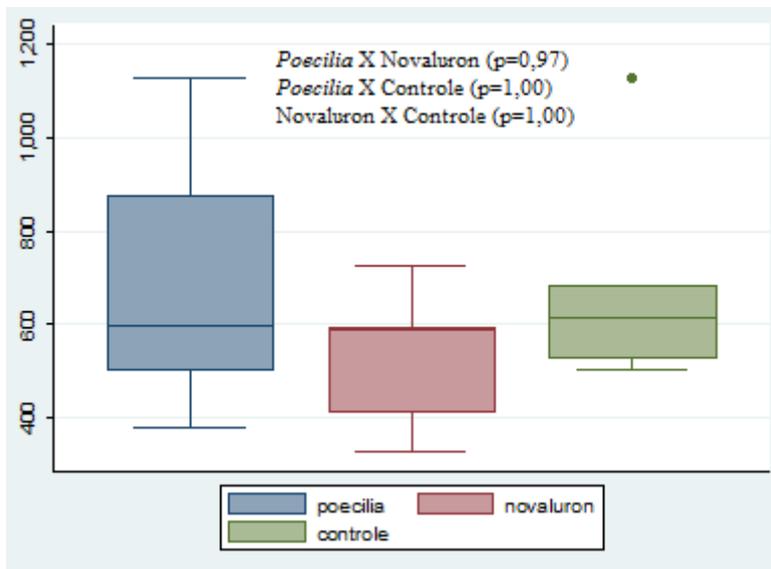
Levando-se em consideração os nove depósitos, analisados durante cinco semanas, foram comparadas as médias do número de ovos pela análise de variância, encontrando-se um p valor de 0,527 (Tabela 18). Aplicando-se o método de Bonferroni constatou-se não existir diferença significativa entre (Figura 40).

Tabela 18 – Comparação da distribuição do número de ovos pela análise de variância.

Experimentos	Média	Desvio padrão	Anova		
			MQ entre	MQ dentro	F Valor - p
<i>P. reticulata</i>	233	148	15.338	23.585	0,65
Novaluron	177	186			0,527
Controle	231	204			

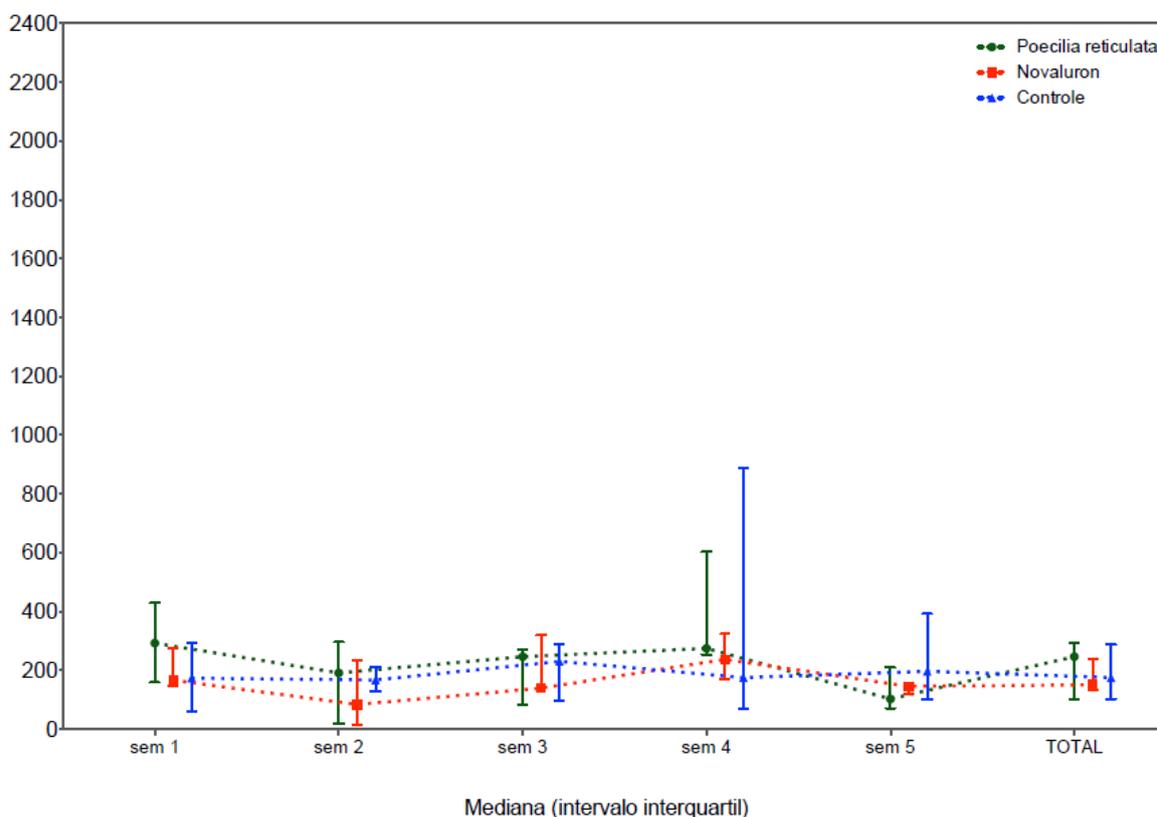
*Média ao Quadrado

Figura 40 – Gráfico distribuição de ovos, de acordo com as medianas, intervalo interquartílico e análise estatística pelo método Bonferroni



Ao analisar o intervalo interquartílico por semana, observamos uma sobreposição entre os intervalos (Figura 41).

Figura 41 – Medianas e intervalo interquartílico por semana da distribuição dos ovos nos experimentos *P. reticulata* X Novaluron



Comparando-se o Índice de Atividade de oviposição entre os peixes *B. splendens* e *P. reticulata* nos experimentos com os larvicidas Bti, novaluron e temefós observamos que o *B. splendens* foi negativo em todos, sendo que o menor valor foi observado quando associado com o larvicida temefós que foi de -0,45. O *P. reticulata* apresentou valores negativos quando associado com os larvicidas Bti e temefós e positivo com o novaluron.

Quando comparou-se o IAO dos larvicidas e controles, observamos que o Bti apresentou valores positivos em todos os experimentos, com o maior valor apresentado quando associado com o peixe *P. reticulata*. Valores negativos apareceram somente no controle dos experimentos do Bti e *P. reticulata* e novaluron também nos experimentos com *P. reticulata*.

5.2 Estimativa da sobrevivência de peixes larvófagos na presença dos larvicidas utilizados em saúde pública

5.2.1 Sobrevivência dos peixes larvófagos *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus* ao larvicida temefós.

O larvicida temefós não apresentou nenhuma interferência na sobrevivência dos peixes *P. reticulata* e *T. tricopterus*, com todos os peixes sobrevivendo às quatro semanas de testes, tanto nos controles como nos depósitos tratados. Em relação ao peixe *Betta splendens* houve apenas uma morte na terceira repetição no quinto dia de experimento nas caixas tratadas, ao passo que nos depósitos controle 100% dos peixes sobreviveram (Tabela 19), não apresentando diferença significativa entre o grupo tratado e o controle.

Avaliando-se a média de dias vivo por peixe, temos o valor de 6,95 para o *B. splendens* e o valor máximo possível para *P. reticulata* e *T. tricopteros* que foi 7 (Tabela 20). Pela análise de estimativa de sobrevivência de Kaplan Meier observamos apenas uma pequena alteração na terceira semana dos experimentos com o *B. splendens* nas caixas tratadas, nos demais não constatou-se nenhuma alteração (Figura 42). Aplicando-se o método Chi^2 encontrou-se um valor de $p > 0,05$ (em todos os testes ficaram acima de 0,1) em todas as semanas, indicando não haver diferença estatística entre o teste e o controle.

Tabela 19 – Sobrevivência dos peixes *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus* ao larvicida temefós

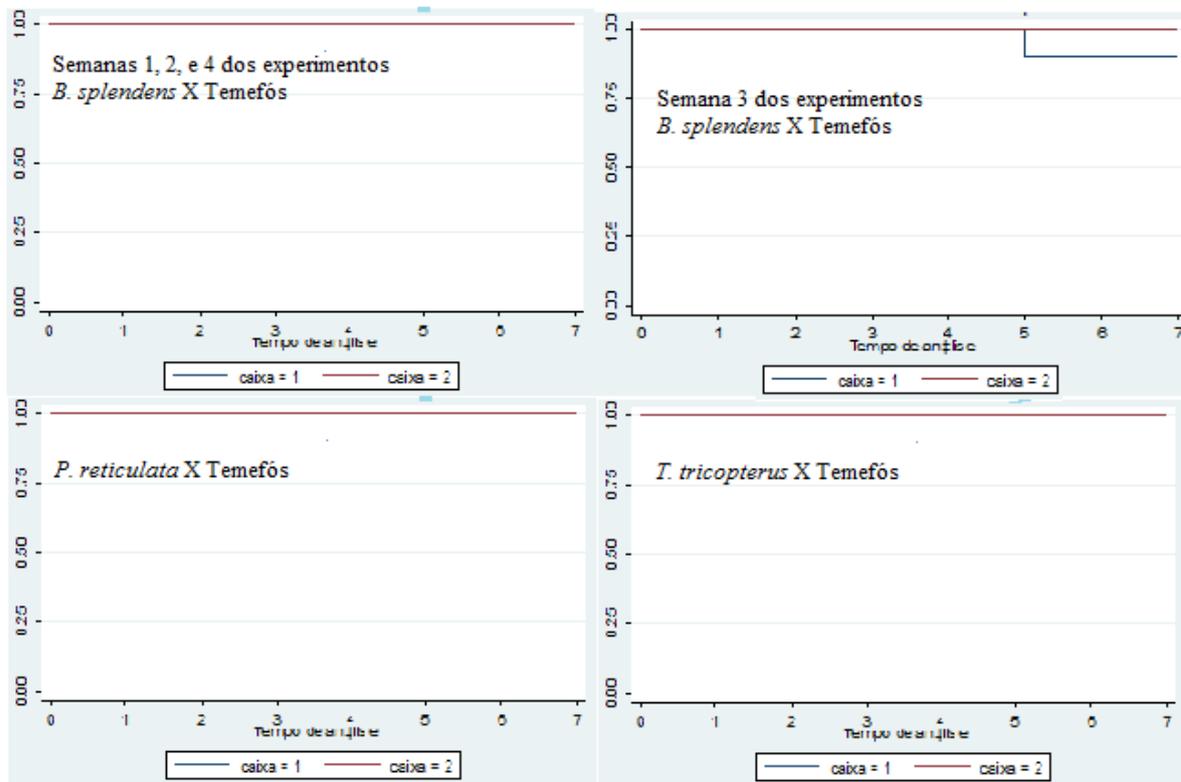
		<i>Betta splendens</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Trichogaster tricopterus</i>
Semana 1	Teste	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Semana 2	Teste	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Semana 3	Teste	9 (90%)	10 (100%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Semana 4	Teste	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
TOTAL	Teste	39 (97,5%)	40 (100%)	40 (100%)
	Controle	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

Tabela 20 – Média de dias em que permaneceram vivos os peixes nos experimentos com o larvicida Temefós.

		<i>Betta splendens</i>	<i>Poecilia Reticulata</i>	<i>Trichogaster tricopterus</i>
Semana 1	Teste	7,0	7,0	7,0
	Controle	7,0	7,0	7,0
Semana 2	Teste	7,0	7,0	7,0
	Controle	7,0	7,0	7,0
Semana 3	Teste	6,8	7,0	7,0
	Controle	7,0	7,0	7,0
Semana 4	Teste	7,0	7,0	7,0
	Controle	7,0	7,0	7,0
TOTAL	Teste	6,95	7,0	7,0
	Controle	7,0	7,0	7,0

* O tempo máximo de observação foi de 7 dias

Figura 42 – Estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier para os experimentos de *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus*, com o larvicida temefós.



* Caixa 1 – Teste / Caixa 2 – Controle

5.2.2 Sobrevivência dos peixes larvófagos *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus* ao larvicida novaluron.

O larvicida Novaluron não apresentou nenhum efeito tóxico aos peixes *P. reticulata*, com todos os peixes sobrevivendo às quatro semanas de testes, tanto nos controles como nos depósitos tratados. Em relação ao peixe *Betta splendens*, ocorreram 4 mortes, 3 nos depósitos tratados e uma no depósito controle. Das três mortes observadas nos depósitos tratados, uma ocorreu na primeira semana no sexto dia de observação, outra na segunda semana no quinto dia e a outra na quarta semana também no quinto dia. O único peixe a morrer nos depósitos controle foi na terceira semana no terceiro dia. Em relação ao peixe *Trichogaster tricopterus*, houve sete mortes, destas, seis ocorreram nos depósitos tratados e uma no depósito controle. As mortes nos depósitos tratados ocorreram durante as três primeiras semanas de experimentos, sendo duas em cada. Na primeira semana morreram um peixe com três dias e outro com cinco dias, na segunda semana morreram um peixe com cinco dias e outro com seis dias e na terceira semana morreram um peixe com quatro dias e outro com cinco dias. O único

peixe que morreu nos depósitos controle foi na terceira semana com cinco dias (Tabela 21).

Avaliando-se a média de dias vivo por peixe, temos o valor de 6,87 para o *B. splendens* e 6,80 para o seu controle; 6,65 para o *T. tricopterus* e 6,90 para o seu controle; *P. reticulata* apresentou o valor máximo, sete, visto que nenhum peixe morreu nem nos depósitos controle e nem nos tratados (Tabela 22). Pela análise de estimativa de sobrevivência de Kaplan Meier observamos apenas uma pequena alteração nos experimentos com o *B. splendens* e *T. tricopterus* (Figura 43). Aplicando-se o método Chi^2 encontrou-se um valor de $p > 0,05$ (em todos os teste ficou acima de 0,1) em todas as semanas, indicando não haver diferença estatística entre o teste e o controle.

Tabela 21 – Sobrevivência dos peixes *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus* ao larvicida Novaluron..

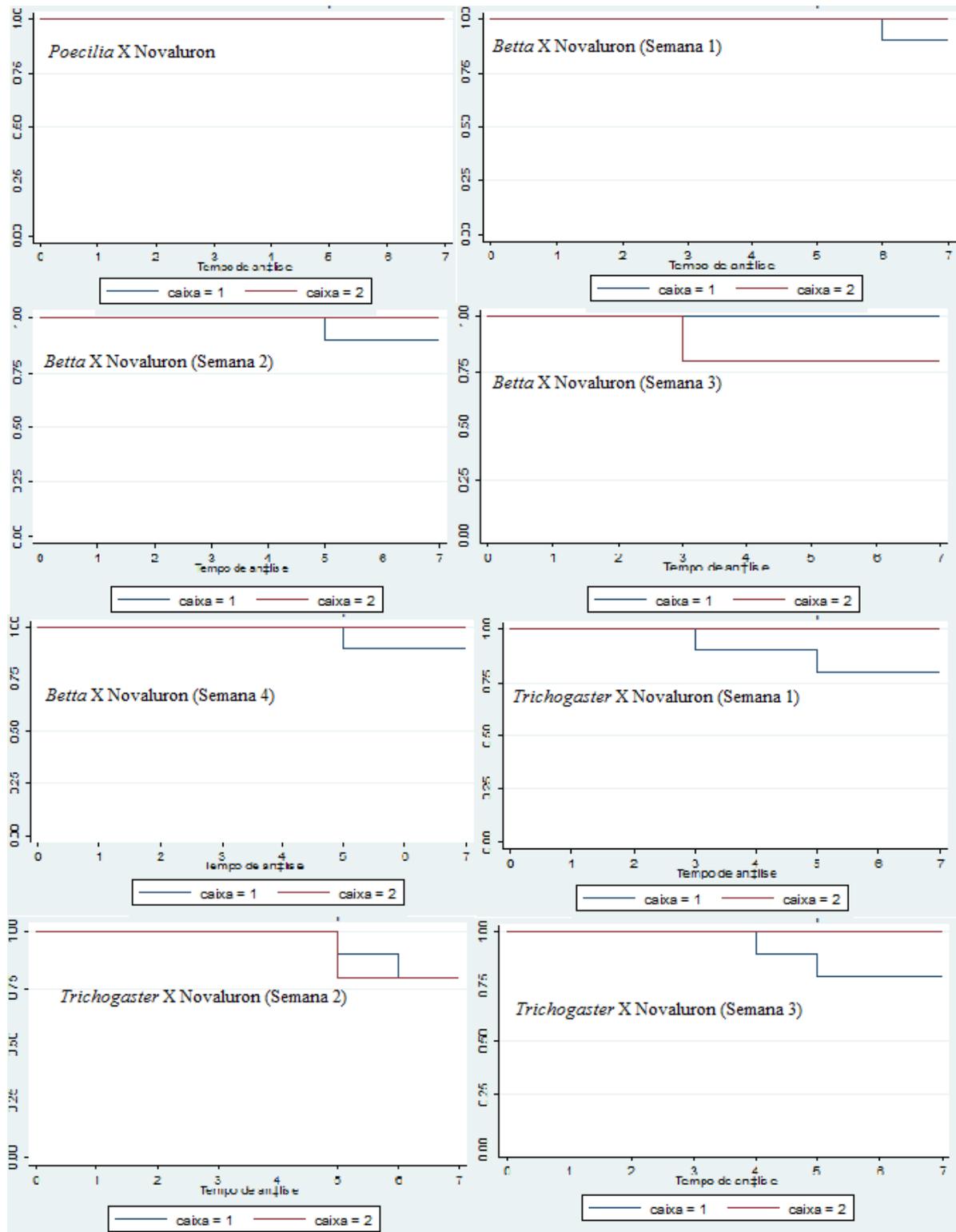
		<i>Betta splendens</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Trichogaster tricopterus</i>
Semana 1	Teste	9 (90%)	10 (100%)	8 (80%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Semana 2	Teste	9 (90%)	10 (100%)	8 (80%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)
Semana 3	Teste	10 (100%)	10 (100%)	8 (80%)
	Controle	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)
Semana 4	Teste	9 (90%)	10 (100%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
TOTAL	Teste	37 (92,5%)	40 (100%)	34 (85%)
	Controle	19 (95%)	20 (100%)	19 (95%)

Tabela 22 – Média de dias em que permaneceram vivos os peixes nos experimentos com o larvicida Novaluron.

		<i>Betta splendens</i>	<i>Poecilia Reticulata</i>	<i>Trichogaster tricopterus</i>
Semana 1	Teste	6,90	7,00	6,40
	Controle	7,00	7,00	7,00
Semana 2	Teste	6,80	7,00	6,70
	Controle	7,00	7,00	7,00
Semana 3	Teste	7,00	7,00	6,50
	Controle	6,20	7,00	6,60
Semana 4	Teste	6,80	7,00	7,00
	Controle	7,00	7,00	7,00
TOTAL	Teste	6,87	7,00	6,65
	Controle	6,80	7,00	6,90

* O tempo máximo de observação foi de 7 dias

Figura 43 – Estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier para os experimentos de *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. trichopterus*, com o larvicida novaluron.



* Caixa 1 – Teste / Caixa 2 – Controle

5.2.3 Sobrevivência dos peixes larvófagos *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus* ao larvicida Bti.

O larvicida Bti praticamente não provocou nenhum efeito sobre os peixes *T. tricopterus*, apresentando somente uma morte nas caixas controle na segunda semana no 3º dia de observação, nas caixas com o larvicida não houve morte. Atividade semelhante teve com o peixe *B. splendens*, sendo registrada uma morte nas caixas com o larvicida na primeira semana, no quinto dia de observação e outra morte na terceira semana na caixa controle também com cinco dias de observação. Dentre os *P. reticulata* seis morreram ao longo dos experimentos, destes, quatro foram no grupo teste e dois no controle. As mortes no grupo teste ocorreram na primeira semana (5º dia) e três mortos na quarta semana, com seis, cinco e quatro dias de observação. No controle as mortes foram na primeira semana, quarto dia e segunda semana sexto dia (Tabela 23).

Avaliando-se a média de dias vivo por peixe, temos o valor de 6,95 para o *B. splendens* e 6,90 para o controle; *P. reticulata* apresentou uma média de dias vivos de 6,80 igual ao seu controle; *T. tricopteros* apresentou a média máxima, sete, e o seu controle apresentou uma média de 6,8 de dias (Tabela 24). Pela análise de estimativa de sobrevivência de Kaplan Meier observamos apenas uma pequena alteração na semana 3 dos experimentos com o *T. tricopterus*, semanas 1 e 3 com o *Betta* e semanas 1, 2 e 4 com o *P. reticulata*, terceira semana dos experimentos com o *B. splendens* nas caixas tratadas, nos demais não constatou-se nenhuma alteração (Figura 44). O último quadro da figura 44 representa além da semana 3 com o *Poecilia*, as demais semanas que não apresentaram mortes. Aplicando-se o método Chi^2 encontrou-se um valor de $p > 0,05$ (em todos os teste ficou acima de 0,1) em todas as semanas, indicando não haver diferença estatística entre o teste e o controle.

Tabela 23 – Sobrevivência dos peixes *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus* ao larvicida Bti.

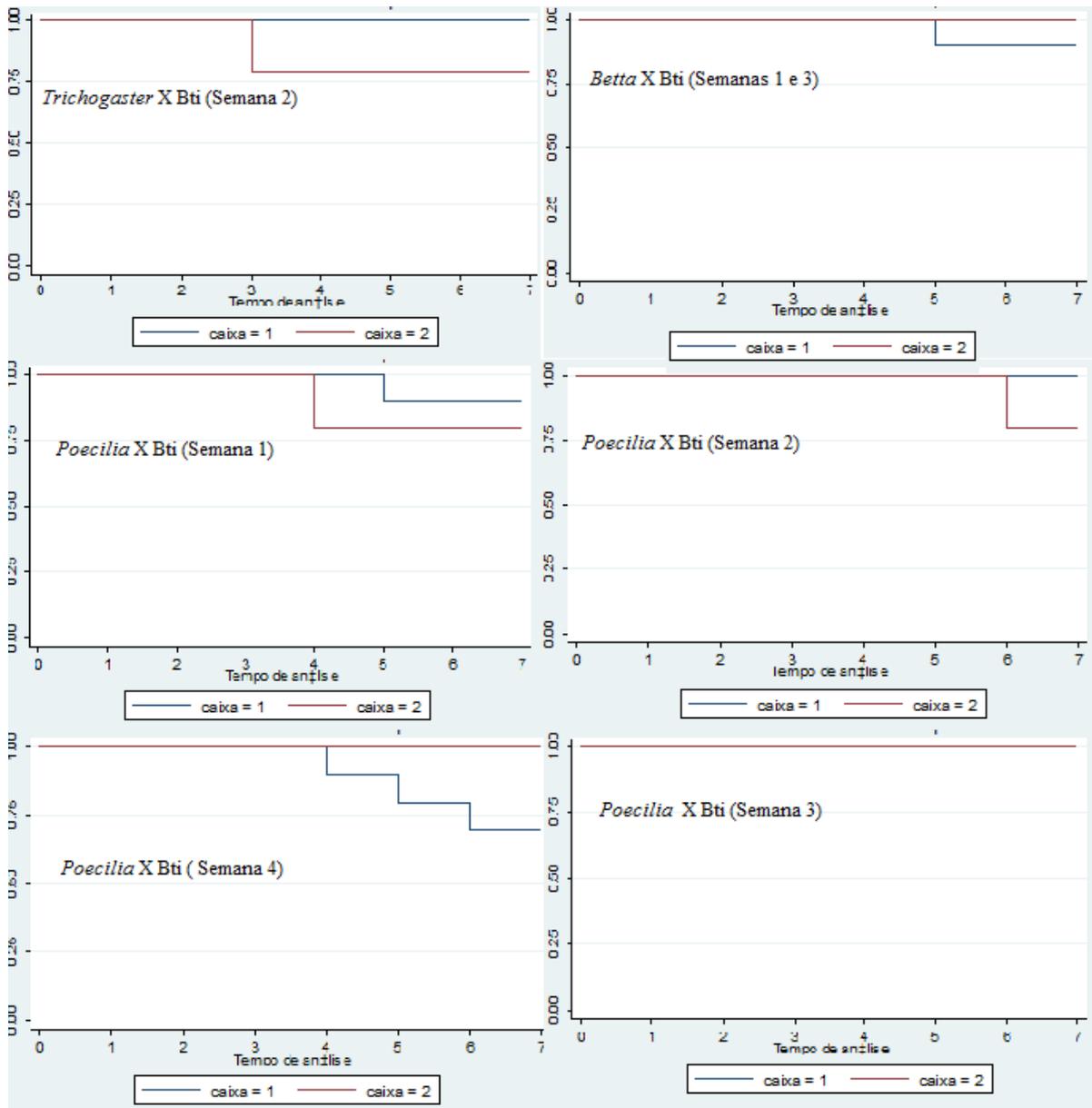
		<i>Betta splendens</i>	<i>Poecilia Reticulata</i>	<i>Trichogaster tricopterus</i>
Semana 1	Teste	9 (90%)	9 (90%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)
Semana 2	Teste	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)
Semana 3	Teste	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Controle	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)
Semana 4	Teste	10 (100%)	7 (70%)	10 (100%)
	Controle	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
TOTAL	Teste	39 (97,5%)	36 (90%)	40 (100%)
	Controle	19 (95%)	18 (90%)	19 (95%)

Tabela 24 – Média de dias em que permaneceram vivos os peixes nos experimentos com o larvicida Bti.

		<i>Betta splendens</i>	<i>Poecilia Reticulata</i>	<i>Trichogaster tricopterus</i>
Semana 1	Teste	6,80	6,80	7,00
	Controle	7,00	6,40	7,00
Semana 2	Teste	7,00	7,00	7,00
	Controle	7,00	6,80	6,20
Semana 3	Teste	7,00	7,00	7,00
	Controle	6,60	7,00	7,00
Semana 4	Teste	7,00	6,40	7,00
	Controle	7,00	7,00	7,00
TOTAL	Teste	6,95	6,80	7,00
	Controle	6,90	6,80	6,80

* O tempo máximo de observação foi de 7 dias

Figura 44 – Estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier para os experimentos de *B. splendens*, *P. reticulata* e *T. tricopterus*, com o larvicida Bti.



6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* evitam colocar seus ovos em depósitos com a presença do peixe larvófago *Betta splendens*. Em relação ao peixe *Poecilia reticulata* não houve interferência alguma na atividade de oviposição. O larvicida *Bti* apresentou capacidade atrativa para oviposição. O mesmo não ocorreu com os larvicidas temefós e novaluron que não apresentaram nenhuma atividade sobre a oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Em relação a sobrevivência dos peixes *B. splendens*, *P. reticulata* e *Trichogaster trichopterus* em contato com os larvicidas novaluron, temefós e *Bti*, nas concentrações em que são utilizadas nas atividades de campo, não houve ação destes sobre os peixes, apesar de terem ocorrido algumas mortes ao longo dos testes, mas não foi encontrada diferença significativa entre as caixas teste e controle.

Conseguiu-se também com este trabalho desenvolver uma variação consistente da fórmula de Kramer e Mulla (1979) para a determinação do IAO utilizando três variáveis, visto que a fórmula original é aplicável somente para duas variáveis.

A utilização de peixes larvófagos para o controle de mosquitos transmissores de patógenos aos seres humanos está bastante difundida pelo mundo. Além de sua capacidade larvófaga, muitos estudos tem demonstrado que eles podem ter um forte potencial de repelir a oviposição de fêmeas de mosquitos (ALLAN e KLINE, 1995; VAM DAM e WALTON, 2008; PAMPLONA *et al.*, 2009).

Há indícios que o peixe *B. splendens* libera alguma substância na água que pode ser percebida pelo mosquito e evita colocar seus ovos no local. Não podemos concluir definitivamente pelos resultados deste trabalho. Serão necessários novos experimentos para responder de forma definitiva essa nova hipótese.

Allan e Kline (1995) determinaram com a utilização de um olfactômetro que fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* são influenciadas pelo olfato no momento de tomar a decisão em que local irão ovipor. Resultados semelhantes encontraram Seenivasagan *et al.* (2010) através de um eletroantenograma, que alguns ácidos graxos tinham o

potencial de estimular as antenas de *A. albopictus*, *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* reduzindo a oviposição nos recipientes com estes ácidos.

Blaustein *et al.* (2004) observando o comportamento de oviposição de *Culiseta longiareolata* em corpos d'água naturais na presença do predador *Notonecta maculata*, constatou que somente 8% dos ovos eram colocados nos ambientes com a presença do predador. Os mosquitos continuaram evitando ovipor nos corpos d'água mesmo uma semana após os predadores terem sido retirados dos corpos d'água, sugerindo que os mosquitos tinham a capacidade de perceber alguma substância liberada na água pelo predador.

Considerando que os insetos utilizam o olfato no momento de escolha dos locais de oviposição, as pesquisas sobre substâncias que poderiam interferir neste comportamento e que possivelmente viessem a ser eliminadas por alguns predadores ou até mesmo por indivíduos da mesma espécie passaram a ter atenção de muitos pesquisadores. Ganesan *et al* (2006), isolou 13 substâncias a partir de extratos de ovos de *A. aegypti*, dentre essas substâncias estavam presentes 6 ácidos graxos com cadeia carbônica variando de 13 a 18 carbonos, 6 ésteres metílicos e uma lactona. Dentre as substâncias citadas, o ácido dodecanóico teve sua capacidade de atração de oviposição a fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* aumentada significativamente, quando a concentração do extrato de ovos passou de 10 mg/l para 100 mg/l. Já com o ácido hexadecenóico houve um aumento proporcional até a concentração de 10 mg/l, acima disso não houve mais nenhuma influência. Os ésteres apresentaram capacidade de repelência dose dependente e a lactona não apresentou nenhum efeito significativo.

Serpa; Monteiro; Voltolini (2008) determinaram que a água onde foram mantidas larvas de *Aedes aegypti* apresentaram capacidade de atrair a oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*. Estes resultados associados ao de Ganesan *et al* (2006) indicam que a presença de outros indivíduos da mesma espécie são um sinal que o ambiente é propício ao desenvolvimento das formas imaturas.

Angelon e Petranka (2002) utilizando o peixe *Gambusia affinis* observaram ser possível inibir a oviposição de *Culex pipiens*, mesmo o peixe não estando diretamente presente, mas somente com a utilização da água em que eles foram mantidos. Para chegar a tal conclusão, colocaram como opção de oviposição recipientes com volume de 2 litros com diferentes proporções de água desclorada e água de onde

estavam presentes os peixes, com as seguintes proporções, respectivamente: 2:0 (controle), 1,5:0,5 (baixa concentração); 1:1 (média concentração) e 0:2 (alta concentração). Houve uma maior presença de larvas de *C. pipiens* nos recipientes controle e com baixa concentração de água de peixe, reforçando a teoria de que o mosquito não coloca seus ovos guiado apenas pela visão.

Vam Dam e Walton (2008) observaram que a presença do peixe larvófago *Gambusia affinis* teve a capacidade de repelir a oviposição de *Culex quinquefasciatus* e *Culex tarsalis* e não apresentando nenhuma atividade sobre o *Aedes aegypti*. O peixe *Betta splendens* apresentou uma alta capacidade de repelir a oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, o mesmo não ocorrendo com o peixe larvófago *Poecilia reticulata*; quando testados em recipientes de vidro com pequeno volume de água (15 litros) (PAMPLONA *et al.*, 2009b).

Os resultados deste estudo foram semelhantes aos obtidos por Pamplona *et al.* (2009) em relação ao *P. reticulata*, não apresentando nas duas pesquisas influência na atividade de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Nos experimentos realizados por Pamplona *et al.* (2009) o IAO para o *P. reticulata* foi de -0,005 e nestes experimentos foi de (-0,08) quando associado ao temefós, (-0,27) quando associado ao Bti e (0,07) quando associado ao novaluron (Tabelas K, N, Q). A aparente repelência do *P. reticulata* quando associado ao Bti se dá não por que o peixe estivesse repelindo a oviposição mas porque o Bti apresentou uma atividade atrativa, como discutiremos mais adiante. O *B. splendens* apresentou atividade de repelência. O IAO encontrado foi de (-0.45), (-0.38) e (-0.40), respectivamente para os larvicidas temefós, novaluron e Bti. Pamplona *et al.* (2009b) encontrou IAO de -0,63 para o *B. splendens*. Essa diferença no IAO se deu, provavelmente, pela oferta de mais de uma opção de depósitos para postura e pelo aumento no volume dos depósitos, passando de 15 litros para 70 litros. Isso reforça a hipótese de que o peixe libera alguma substância na água e como houve um aumento do volume de água essa substância estaria mais diluída. Um desenho experimental para comprovar esta hipótese seria aumentar a quantidade de peixe por depósito e observar se a capacidade de repelência aumenta também. Seria interessante analisar a capacidade de repelência quando se usa somente a água onde os peixes estavam presentes, semelhante ao que fez Angelon e Petranka (2002) com o peixe *Gambusia affinis*.

Ao realizar a análise de variância pelo método Bonferroni, houve diferença significativa entre *B. splendens* e temefós, *B. splendens* e Bti, não existindo diferença entre *B. splendens* e os controles e nem entre *B. splendens* e novaluron. Estes resultados sugerem que quando há uma maior oferta de depósitos há uma redução na capacidade de repelência de *B. splendens*, ou pelo menos ela é menos perceptível, diferente do que encontrou Pamplona *et al.* (2009a). O principal motivo para esta diferença foi que neste trabalho avaliamos duas variáveis, peixe e larvicida, ao passo que Pamplona *et al.* (2009a) avaliou somente a presença do peixe, sendo assim os ovos que seriam ovipostos nos depósitos controle poderiam ser depositados também nos depósitos com larvicida. Este ponto fica claro quando foi realizada a análise de variância do experimento 3 (tabela I) observamos que há diferença no experimento ($p=0,05$), mas quando aplicamos o método de Bonferroni não encontramos diferença entre os grupos (figura 26). Isso ocorre possivelmente porque quando passamos analisar os grupos individualmente o “n” diminui e a diferença desaparece.

Após ser determinado que alguns peixes larvófagos tem a capacidade de repelir a oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, uma pergunta importante ficou sem ser respondida, a redução na infestação nos depósitos com peixe se dá porque o peixe come a larva ou porque o mosquito muda o local de oviposição. Pamplona *et al.* (2004), utilizando o peixe *B. splendens* em tanques com no mínimo 200 litros, conseguiu em um período de dois anos reduzir a infestação nestes depósitos de 70,4% para 0,2%. O interessante a ser observado, foi que houve uma redução na infestação dos demais depósitos, não tão significativa como a dos tanques, mas reduziu, principalmente em caixas e potes. Indicando que o mosquito não está sendo repelido pelo peixe e mudando o local de oviposição. O que reforça os achados deste trabalho, pois como em campo é utilizado normalmente um peixe por depósito, ele não seria capaz de repelir a oviposição.

Não foi encontrado na literatura um consenso sobre quantos peixes utilizar em relação ao volume de água. O que existe são diferentes experimentos, mas sem hipótese para sustentar. Diante disso observamos a necessidade de averiguar até que volume de água um peixe *B. splendens* tem um menor poder de repelência e ainda mantêm uma efetividade na predação de larvas.

Da mesma forma que os insetos adaptam-se, desenvolvendo mecanismos para evitar ovipor em locais com presença de predadores, estes também, por seleção natural desenvolvem formas de atrair suas presas. Os microcrustáceos copépodes apresentaram um potencial de atrair fêmeas grávidas de *A. aegypti* com um IAO de 0,70 (TORRES-ESTRADA *et al.*, 2001). Alguns larvicidas também apresentaram potencial atrativo para oviposição de mosquitos. Carrieri *et al.* (2009) observou que o Bti possui atividade atrativa para *A. albopictus*, com um IAO de 0,17. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho com o Bti apresentando um IAO de 0,28 com o *B. splendens* e 0,47 com o *P. reticulata*, indicando um forte poder atrativo para este larvicida. Curiosamente o poder atrativo com o *P. reticulata* foi maior que quando associado com o *B. splendens*, pois esperava-se um poder maior com este último pois estava associado um com poder atrativo (Bti) e outro com poder de repelência (peixe). Zahiri;Mulla (2005) observou que a concentração de 1 mg/l de Bti tem o potencial de repelir a oviposição de *Culex quinquefasciatus*, resultados estes que diferem dos encontrados neste trabalho, muito provavelmente seja uma diferença de comportamento entre as espécies de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*.

Esta característica do Bti em atrair a oviposição pode ser uma descoberta importante, pois poderemos pensar em associar a utilização do Bti com um peixe, contanto que seja utilizado uma quantidade de água que reduza o poder repelente do peixe. Com isso as fêmeas seriam atraídas a ovipor em um recipiente em que o predador estaria presente. Outro dado importante encontrado neste trabalho foi que o Bti não apresentou efeito na sobrevivência dos peixes no período de tempo analisado, viabilizando a utilização dos dois de forma concomitante.

Novaluron e temefós não apresentaram influência na oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, diferente do que foi encontrado por Martinez *et al.* (2012) que utilizando frascos com 200 ml e uma concentração de 100 mg/l de temefós observou um forte potencial para repelir a oviposição, obtendo um IAO de -0,49 ($p = 0,05$). Possivelmente a discordância se dá pela diferença na metodologia, pois neste trabalho foram oferecidos três opções de oviposição e Martinez *et al.* (2012) ofereceu somente duas, como também a diferença entre o volume dos recipientes.

Diversos estudos indicam que o larvicida organofosforado temefós pode ocasionar intoxicações em seres humanos e em outros animais, principalmente devido a

sua atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (Cavaliere *et al.*, 1996; Hamm *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2004).

Os resultados deste trabalho mostram que o larvicida temefós não possui interferência na sobrevivência dos peixes *Poecilia reticulata*, *Trichogaster trichopterus* e *Betta splendens* pelo período de uma semana. BA-OMAR; AL-JARDANE; VICTOR (2011) expuseram o peixe *Aphanius díspar* a 4 diferentes concentrações de temefós, 1, 5, 10 e 25 mg/l, por um período de 7 dias. Em todas as concentrações os peixes apresentaram inicialmente sinais de inquietação, natação errática, convulsões e perda de equilíbrio. Nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/l não houve diferença na mortalidade entre o grupo teste e o controle. Os peixes que sobreviveram voltaram a normalidade após terem saído do contato com o larvicida. Quando a concentração utilizada foi a de 25 mg/l, 50% dos peixes morreram. Os peixes sobreviventes foram sacrificados e suas brânquias foram analisadas. Constatou-se que mesmo aqueles peixes que foram expostos à concentração de 1 mg/l, houve alteração na estrutura das brânquias. Os principais eventos observados foram hemorragias e hipertrofia epitelial. Na concentração de 5 mg/l a hipertrofia provocou fusão das lamelas branquiais. Em 10 mg/l houve elevada morte celular e em 25 mg/l houve danos em grande escala, com boa parte da epiderme descamando deixando a cartilagem exposta na região das brânquias.

Crivelenti *et al.* (2011) avaliaram a toxicidade do larvicida temefós em alevinos de *Poecilia reticulata*. Em seus experimentos utilizou 4 diferentes concentrações de temefós, 0,375, 0,5, 0,625 e 0,75 mg/l, em cada tratamento foram acrescentados 4 alevinos e realizado 9 repetições. O menor tempo para a morte do primeiro alevino foi de 217 minutos na concentração de 0,75 mg/l e o maior tempo para a morte do primeiro alevino foi de 383 minutos na concentração de 0,375 mg/l. Em todas as concentrações as médias de mortalidade foram maiores que nos grupos controle ($p < 0,001$). A CL_{50} (concentração em que morreram 50% dos peixes) observada foi de 0,375 mg/l. Os alevinos que sobreviveram foram observados por um período de 24 h, a única concentração que apresentou um número significativo de larvas mortas foi a de 0,75 mg/l, em que morreram 8 das 10 larvas sobreviventes. Estes resultados diferem dos encontrados neste trabalho, mesmo tendo sido usado uma concentração maior. O ocorrido se deve provavelmente por os estágios larvais serem mais sensíveis que a forma adulta.

Hurst *et al.* (2007) observaram que os organofosforados temefós e pirimiphos-methyl nas concentrações de 0,33 mg/l e 0,5 mg/l, respectivamente, interferiram na capacidade natatória do peixe larvófago *Melanotaenia duboulayi*, o que não estava no objetivo destes experimentos observar tal comportamento mas mesmos assim a concentração que ocasionou tal efeito foi 3,3 maior do que a utilizada nestes experimentos.

Pelos dados dos trabalhos de Hurst *et al.* (2007) e Ba-Omar; Al-Jardane;Victor (2011) observa-se que um dos efeitos da exposição ao larvicida temefós é a alteração da capacidade de natação. Com isso identificamos uma limitação deste trabalho, pois somente observamos se o peixe sobrevivia ou não. Utilizamos a concentração de 100 mg/l, cem vezes maior que a concentração que Ba-Omar. Al-Jardane;Victor (2011) encontrou causando alteração no nado de *Aphanius dispar*. Podemos supor, por estes resultados, que existem diferentes formas de reagir de acordo com a espécie, pois a concentração de 25 mg/l provocou 50% de mortes em *Aphanius dispar*, ao passo que a concentração de 100 mg/l, não apresentou nenhum efeito sobre a sobrevivência dos peixes *Poecilia reticulata*, *Trichogaster trichopterus* e *Betta splendens*. Outra limitação deste trabalho foi não termos avaliado os peixes após o período do contato com o larvicida, pois é possível que ocorra um efeito tardio como o observado por Crivelenti *et al.* (2011) em alevinos de *P. reticulata* ou um dano nas brânquias como o observado por Ba-Omar; Al-Jardane;Victor (2011).

Hedayati *et al.* (2012) observaram que o organofosforado diazinon causava 100% de morte de *T. trichopterus* na concentração de 50 mg/l num período de 24h, este então se mostrando muito mais tóxico que o temefós.

Hurst *et al.* (2007) observaram que os larvicidas a base de bactéria Bti e Bs como também o regulador de crescimento s-METHOPRENE, não apresentaram nenhum efeito tóxico ao peixe larvófago *Melanotaenia duboulayi*. Já seria de se esperar que os reguladores de crescimento não tivessem influência nos peixes, visto que eles agem nos hormônios que atuam na ecdise dos artrópodes, reação que não ocorre nos vertebrados. Estes resultados coadunam com os obtidos neste trabalho, as diferenças apresentadas entre teste e controle não são significantes.

Para que os achados deste trabalho tenham uma importância maior para o desempenho das atividades de controle de dengue em campo, seria importante avaliar a

sobrevivência dos peixes por um período máximo de 60 dias, visto que este é o período que leva entre uma visita domiciliar e outra do agente de endemias. Assim poderíamos determinar com maior certeza se estas duas ferramentas poderiam ser utilizadas em consórcio. Sendo importante também averiguar em estudos posteriores se os larvicidas irão interferir de alguma maneira na capacidade predatória do peixe, visto que Ravidran *et al.* (2012) observaram que quando os peixes *Oryzias carnaticus* foram submetidos a concentração de 0,5 mg/l do inseticida agrícola hostathion (triazofó) e 1mg/l do fungicida katazin (Iprobenfos), houve uma redução de até 4 vezes da sua capacidade em predação larvas.

7. CONCLUSÕES

- O peixe *Betta splendens* apresenta alguma característica que repeli a oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*.
- Possivelmente o aumento do volume do depósito e o aumento de opções para oviposição reduziram essa capacidade de repelência por parte do *Betta splendens*.
- O *Poecilia reticulata* não apresentou nenhuma interferência na atividade de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*.
- O larvicida *Bti* apresentou atividade atrativa para oviposição das fêmeas grávidas de *A. aegypti*.
- Os larvicidas novaluron e temefós não apresentaram interferência na atividade de oviposição de *A. aegypti*.
- As três espécies de peixes testadas sobrevivem por até 7 dias aos larvicidas, desde que utilizados na concentração sugerida pelo PNCD.
- É possível a utilização em consórcio de larvicidas e peixes larvófagos no mesmo depósito por um período de 7 dias, sendo necessário novos experimentos para determinar se este período pode ser maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHANTARIG, A. *et al.* *Wolbachia* and *Bacteriophage WO-B* Density of *Wolbachia* A-Infected *Aedes albopictus* Mosquito. *Folia Microbiological*. **53** (6), 547–550, 2008.
- ALLAN, S.A. e KLINE, D.L. Evaluation of organic infusions and synthetic compounds mediating oviposition in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (diptera: culicidae). *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 21, No. 11, 1995.
- ANDRADE, CFS. Susceptibilidade de *Anopheles triannulatus* (Neiva e Pinto, 1922) e espécies não alvo a larvicidas a base de Temephos e de *Bacillus thuringiensis* H-14. *Acta Amazônica*, 22 (4): 595 – 604. 1992.
- ANGELON, K.A. e PETRANKA, J.W. Chemicals of predatory mosquitofish (*Gambusia affinis*) influence selection of oviposition site by *Culex* mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 28, No. 4, 2002.
- ANYAELE, O. e OBEMBE, A. Comparative studies of the feeding capacity and preference of *Aphyosemion gularis* (Boulenger 1901) on some aquatic macroinvertebrates. *Journal of Vector Borne Diseases*. 48, pp. 231–235, 2011.
- BA-OMAR, T.A.; AL-JARDANE, S.; VICTOR, R. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue and Cell* 43: 29–38, 2011.
- BINCKLEY CA e RESETARITS WJ. Reproductive decisions under threat of predation: squirrel treefrog (*Hyla squirella*) responses to banded sunfish (*Enneacanthus obesus*). *Oecologia* 130:157–161, 2002.
- BLAUSTEIN, L., KIFLAWI, M., EITAM, A., MANGEL, M., COHEN, J.E. Oviposition habitat selection in response to risk of predation in temporary pools: mode of detection and consistency across experimental venue. *Oecologia*, 138: 300–305, 2004.
- BRAGA, IA *et al.* *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 199-203, 2004.
- BRASIL. DENGUE: Instruções para o pessoal de combate ao vetor. Manual de Normas técnicas. Brasília, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, 2001.
- BRASIL. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília, Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Dengue: Diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança. 4 ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525. Acesso em 13 de fevereiro de 2013.

BRASSOLATTI, RC. & ANDRADE, CFS. Avaliação de uma intervenção educativa na prevenção da dengue. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7(2):243-251, 2002.

CARLSON, J., SUCHMAN, E. & BUCHATSKY, L. Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes. *Adv. Virus Res.* 68:361–392, 2006.

CARRIERI, M., MASETTI, A., ALBIERIA, A., MACCAGNANI, B., BELLINI, R. Larvicidal activity and influence of bacillus thuringiensis var. israelensis on *Aedes albopictus* oviposition in ovitraps during a two-week check interval protocol. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(2):149–155, 2009.

CARVALHO, M. S. L., CALDAS, E. D., DEGALLIER, N., VILARINHOS, P. T. R., SOUZA, L. C. K. R., YOSHIZAWA, M. A. C., KNOX, M. B. & OLIVEIRA, C., 2004, Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev. Saude Publica*, 38:623-629, 2004.

CAVALCANTI, LPG. *et al.* Efficacy of fish as predators of *Aedes aegypti* larvae, under laboratory conditions *Rev Saúde Pública*, 41(4), 2007.

CAVALIERE, M. J., CALORE, E., PEREZ, N. M. & PUGA, F. R., Organophosphate myotoxicity. *Rev. Saude Publica*, 30:267-272, 1996.

CEARÁ. Informe Semanal dengue – 2013 (08\02\13). Disponível em: <http://geolivres.saude.ce.gov.br/dengue/dengue.html>. Acesso em 13 de fevereiro de 2013.

CHADEE, DD. Oviposition strategies adopted by gravid *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies (2002–2006). *Acta Tropica*, 111, 279–283, 2009.

CHIARAVALLOTI NETO, F. *et al.* Controle do vetor do dengue e participação da comunidade em Catanduva, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, 2003 .

CHIARAVALLOTI NETO, VB. *et al.* Avaliação sobre a adesão às práticas preventivas do dengue: o caso de Catanduva, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, 2002.

CHOH, Y. & TAKABAYASHI, J. Predator Avoidance by Phytophagous Mites is Affected by the Presence of Herbivores in a Neighboring Patch. *J Chem Ecol* 36:614–619, 2010.

CONSOLI, R.A.G.B. & OLIVEIRA, R.L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Fiocruz, 487p. Rio de Janeiro, 1998.

CRIVELENTI, L. Z. *et al.* Toxicidade do Inseticida Organofosforado Abate® em Alevinos de *Poecilia reticulata*. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 6, n. 1, 65-68, 2011.

DELGADO MJP. *et al.* Imported Dengue Hemorrhagic Fever, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, p. 1329-1330, 2008.

FARIA, PMC *et al.* Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens* (Regan, 1910). *Revista Brasileira de reprodução animal*. v.30, p. 134-149, 2006. Disponível em: www.cbra.org.br.

FIMIA DUARTE, R. *et al.* Eficacia del control de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) con peces larvívoros. *Rev Cubana Med Trop, Ciudad de la Habana*, v. 61, n. 2, 2009 .

FUTUYMA, D.J. *Biologia evolutiva*. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 637p. São Paulo-SP, 1997.

GANESAN, K., MENDKI, MJ, SURYANARAYANA, MVS., PRAKASH, S. & MALHOTRA, RC. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. *Australian Journal of Entomology* 45, 75–80, 2006.

GHOSH , SK. *et al.* Comparative efficacy of two poeciliid fish in indoor cement tanks against chikungunya vector *Aedes aegypti* in villages in Karnataka, India . *BMC Public Health*, 11:599, 2011.

HAMM, J. T., WILSON, B. W. & HINTON, D. E., Organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the Teleost (*Oryzias latipes*). *Neurotoxicology*, 19:853-870, 1998.

HANCOCK, PA., THOMAS, MB. & GODFRAY, HCJ. An age-structured model to evaluate the potential of novel malaria-control interventions: a case study of fungal biopesticide sprays. *Proc. R. Soc. B*, 276, 71–80, 2009.

HARISCHANDRA, H.K.S.P., KARUNARATNE, S.H.P.P. & RAJAKARUNA, R.S. Effect of mosquito larvicide Abate® on the developmental stages of the Asian common toad, *Bufo melanostictus*. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)* 40 (2): 133-140, 2011.

HAQ, S. & YADAV, R.S. Geographical distribution and evaluation of mosquito larvivorous potential of *Aphanius dispar* (Rüppell), a native fish of Gujarat, India. *J. Vector Borne Dis* 48, pp. 236–240, 2011.

HEDAYATI, A., TARKHANI, R. & SHADI, A. Investigation of Acute Toxicity of Two Pesticides Diazinon and Deltamethrin, on Blue Gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Global Veterinaria*, 8 (5): 440-444, 2012.

HURST, T.P., KAY, B.H., RYAN, P.A. & BROWN, M.D. Sublethal Effects of Mosquito Larvicides on Swimming Performance of Larvivorous Fish *Melanotaenia duboulayi* (Atheriniformes: Melanotaeniidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(1):61-65. 2007.

KERSHENBAUM, A., SPENCER, M., BLAUSTEIN, L. & COHEN, JE. Modelling evolutionarily stable strategies in oviposition site selection, with varying risks of predation and intraspecific competition. *Evol. Ecol.* 26:955–974, 2012.

KOURI GP. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. *Panam. J. Public Health*, v. 19, n. 3, p. 143-145, 2006.

KRAMER W. & MULLA MS. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: oviposition responses of *Culex* mosquitoes to organic infusions. *Environmental Entomology* 8, 1111–1117, 1979.

LEDERMANN, JP., *et al.* Infection and pathogenicity of the mosquito densovirus AeDNV, HeDNV, and APeDNV in *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* 97:1828–1835, 2004.

LIMA, EP. *et al.* Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.39, n.3, pp. 259-263, 2006.

LIMA, JWO, PAMPLONA, LGC, PONTES, RJS, HEUKELBACH, J. Survival of *Betta splendens* fish (Regan, 1910) in domestic water containers and its effectiveness in controlling *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762) in Northeast Brazil. *Tropical Medicine and International Health*, Vol. 15, 1525–1532, 2010.

MARTINEZ, H.Q., RODRIGUEZ, M.I.G., GONZALEZ, M.I.T., CAVAZOS, I.G.Z., AGUILON, I.S. & PERALES, J.F.M. Selection of oviposition sites by female *aedes aegypti* exposed to two larvicides. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(1):47–49, 2012.

MCMENIMAN, CJ. & O'NEILL, SL. A Virulent *Wolbachia* Infection Decreases the Viability of the Dengue Vector *Aedes aegypti* during Periods of Embryonic Quiescence. *Neglected Tropical Diseases*. Vol. 4, Issue 7, 2010.

MONNERAT, RG. *et al.* Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 40, n. 2, 2005 .

ODUM, E.P. & BARRET, G.W. Fundamentos de ecologia. 5ª edição, ed. Thomson, 788p. São Paulo-SP, 2007.

PAMPLONA, L.G.C. *et al.* Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de cimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(5):400-404, 2004.

PAMPLONA, LGC. *et al.* Survival of Larvivorous Fish Used for Biological Control of *Aedes aegypti* Larvae in Domestic Containers With Different Chlorine Concentrations. JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY, p.841-844, Vol. 46, no. 4, 2009a.

PAMPLONA, LGC. *et al.* Reduced oviposition of *Aedes aegypti* gravid females in domestic containers with predatory fish. Tropical Medicine and International Health, volume 14 no 11 pp 1347–1350, 2009b.

PESSANHA, JEM; CAIAFFA, WT; CÉSAR, CC; PROIETTI, FA. Avaliação do Plano Nacional do Controle da Dengue. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 25(7):1637-1641, jul, 2009.

PONTES, RJS. *et al.* Impact of water renewal on the residual effect of larvicides in the control of *Aedes aegypti*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. Vol.105, n.2, pp. 220-224, 2010.

QUITANS, F., SCASSO, F. & OMAR, D. Unsuitability of *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) for mosquito control in Uruguay: evidence from food-preference experiments. Journal of vector ecology. Vol 35 : 333-338, 2010.

RAVINDRAN, K.J., DANIEL, R., KUMARI, S., GEORGE, S. & EAPEN, A. Effect of Agricultural Pesticides, Hostathion and Kitazin on the Larvivorsity of the Carnatic Rice Fish, *Oryzias carnaticus* (Jerdon, 1849). American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences 4 (2): 56-59, 2012

REGUERA, P. & GOMENDIO, M. Flexible oviposition behavior in the golden egg bug (*Phyllomorpha laciniata*) and its implications for offspring survival. Behav Ecol 13:70–74, 2002.

REN, X. & RASGON, JL. Potential for the *Anopheles gambiae* Densonucleosis Virus To Act as an “Evolution-Proof” Biopesticide. Journal of virology, vol. 84, No.15 , p. 7726–7729, 2010.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed., Guanabara Koogan, 713p. São Paulo – SP, 2008.

RUDOLF, VHW & RODEL, MO. Oviposition site selection in a complex and variable environment: the role of habitat quality and conspecific cues. Oecologia, 142: 316–325, 2005.

SCHOLTE, EJ. *et al.* An Entomopathogenic Fungus for Control of Adult African Malaria Mosquitoes. Science, Vol. 308, 2005.

SEENIVASAGAN, T., SHARMA, KR., GANESAN, K. & PRAKASH, S. Electrophysiological, Flight Orientation and Oviposition Responses of Three Species of Mosquito Vectors to Hexadecyl Pentanoate: Residual Oviposition Repellent Activity. J. Med. Entomol. 47(3): 329-337, 2010.

SERPA, L.L.N., MONTEIRO, S.D.B. & VOLTOLINI, J.C. Efeito da água de criação larval na oviposição de *Aedes aegypti* em laboratório. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(5):515-517, set-out, 2008

SHAMAN, J., DAY, JF & STIEGLITZ, M. Drought-Induced Amplification of Saint Louis encephalitis virus, Florida. Emerging Infectious Diseases. Vol. 8 N° 6, 2002.

SHAMAN, J., DAY, JF & STIEGLITZ, M. Drought-Induced Amplification and Epidemic Transmission of West Nile Virus in Southern Florida. JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY. Vol. 42 N° 2, 2005.

SILVA, HHG. DA & DA SILVA, IG. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [online]. vol.32, n.4, pp. 349-355, 1999.

SOUSA, C.C.; CLAIROUIN, M.; SEIXAS, G.; VIVEIROS, B.; NOVO, M.T.; SILVA, A.C.; ESCOVAL, M.T.; ECONOMOPOULOU A. Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. Euro Surveill. 17: 1-4, 2012.

SOUZA, L.J. Dengue – diagnóstico, tratamento e prevenção. 2 edição. Editora Rubio. 412p. Rio de Janeiro, 2008.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

_____ Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, 2002.

TORRES, E.M. DENGUE. Editora Fiocruz. 457p. Rio de Janeiro, 2005.

TORRES-ESTRADA, J.L., RODRIGUEZ, M.H., CRUZ-LOPEZ, L. & ARREDONDO-JIMENEZ, J.I. Selective Oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Response to *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopoidea) Under Laboratory and Field Conditions. Journal of Medical Entomology, 38(2):188-192, 2001.

YILDIRIM, O. & KARACUHA, A. A preliminary study on determination of *Aphanius chantrei*'s feeding behaviour on mosquito larvae. Acta tropica 102, 172-175, 2007.

WIJESINGHEA, WMGS. *et al.* Studies on the efficacy of Toxorhynchites larvae and three larvivorous fish species for the control of *Aedes* larval populations in water-storage tanks in the Matale district of Sri Lanka. Dengue Bulletin – Volume 33, pag. 141-147, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Things you need to know about DDT use under the Stockhoml convention, 2004. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_HTM_RBM_2004.55.pdf. Acesso em 20 de outubro de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of Control of Tropical Diseases. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** 1986. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acesso em: 20 junho de 2011.

VALÉRIO, SB; SUAREZ, YR; LIMA-JÚNIOR, SE. Aspectos da biologia populacional de *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) no riacho Paragem, Dourados – MS. Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul. Disponível em: http://www.uems.br/portal/biblioteca/repositorio/2012-07-06_16-44-03.pdf. Acesso em 21.05.2013.

VAM DAM, A.R. ; WALTON, W.E. The effect of predatory fish exudates on the ovipositional behaviour of three mosquito species: *Culex quinquefasciatus* , *Aedes aegypti* and *Culex tarsalis*. Medical and Veterinary Entomology, **22**, 399–404, 2008.

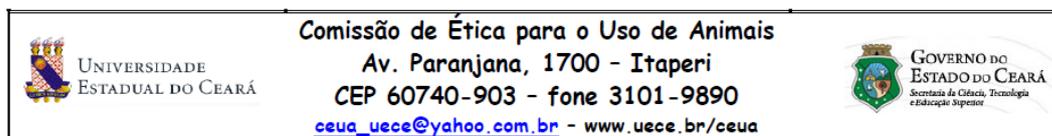
XI, Z. et al. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. Science 310, 326, 2005.

X U E, R.D., B A R N A R D. D.R. & A L I, A. Laboratory and field evaluation of insect repellents as oviposition deterrents against the mosquito *Aedes albopictus*. Medical and Veterinary Entomology, 15, 126-131, 2001.

ZAHIRI, N.S. & MULLA, M.S. Non-larvicidal effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* on oviposition and adult mortality of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Journal of Vector Ecology 30 (1): 155-162. 2005.

ZHIYONG, X. et al. *Wolbachia* Establishment and Invasion in an *Aedes aegypti* Laboratory Population. Science Vol. 310, 2005.

Anexo



CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa** intitulado “**CAPACIDADE DE REPELÊNCIA DE PEIXES LARVÓFAGOS PARA O Aedes aegypti, EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO E SUA RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS UTILIZADOS EM SAÚDE PÚBLICA**” registrado sob o número 11223820-3/59, tendo como pesquisador principal CLEMILSON NOGUEIRA PAIVA está de acordo com os **Princípios Éticos de Experimentação Animal** adotados pela **Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará** sendo aprovado em 25 de janeiro de 2012. Este certificado expira-se em 25 de janeiro de 2016.

Fortaleza, 09 de dezembro de 2011.



José Mário Girão Abreu
Coordenador CEUA-UECE