UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LUCIANO PAMPLONA DE GÓES CAVALCANTI

EFICÁCIA DE PEIXES LARVÓFAGOS NA REDUÇÃO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* EM DEPÓSITOS DOMICILIARES COM ÁGUA

FORTALEZA

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANO PAMPLONA DE GÓES CAVALCANTI

EFICÁCIA DE PEIXES LARVÓFAGOS NA REDUÇÃO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* EM DEPÓSITOS DOMICILIARES COM ÁGUA

Tese apresentada ao curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Epidemiologia e Avaliação em Saúde.

Orientador: Jorg Heukelbach

Co-orientador: José Wellington de Oliveira Lima

FORTALEZA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pelo autor

C366e Cavalcanti, Luciano Pamplona de Góes

Eficácia de peixes larvófagos na redução de larvas de *Aedes aegypti* em depósitos domiciliares com água / Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti. – Fortaleza-Ce, 2009.
117 f. : il.

Orientador: Profº. Dr. Jorg Heukelbach
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

1. Dengue 2. *Aedes* 3. Controle Biológico de Vetores 4. Peixes Larvífagos I. Heukelbach, Jorg (Orient.) II. Título.

CDD: 616.921

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ATA DE SESSÃO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE **LUCIANO PAMPLONA DE GÓES CAVALCANTI**, REALIZADA NO DIA TRINTA DE NOVEMBRO DE DOIS MIL E NOVE.

Às **nove horas** do dia **trinta de novembro de dois mil e nove**, no Auditório Paulo Marcelo, da Universidade Federal do Ceará, realizou-se a 15ª. Sessão de Defesa de Tese de Doutorado de autoria de **LUCIANO PAMPLONA DE GÓES CAVALCANTI**. O trabalho tinha como título: "EFICÁCIA DE PEIXES LARVÓFAGOS NA REDUÇÃO DE LARVAS DE Aedes aegypti EM DEPÓSITOS DOMICILIARES COM ÁGUA". Compunham a Banca Examinadora os professores doutores: **JORG HEUKELBACH (ORIENTADOR), MARIA DA GLÓRIA LIMA CRUZ TEIXEIRA, ROBERTO DE ANDRADE MEDRONHO, CÉLIA MARIA DE SOUZA SAMPAIO E RICARDO JOSÉ SOARES PONTES**, A sessão foi aberta pela coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas professora doutora **GEANNE MATOS DE ANDRADE**, que apresentou a Banca Examinadora e passou a palavra ao orientador afim de que apresentasse o candidato. Após a exposição, seguiu-se o processo de argüição do doutorando. A primeira examinadora foi a professora doutora **Maria da Glória Lima Cruz Teixeira**. Logo após procederam à argüição os professores doutores **Roberto de Andrade Medronho, Célia Maria de Sousa Sampaio** e **Ricardo José Soares Pontes**. Em seguida a Banca Examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar o desempenho do candidato. Por unanimidade a Banca Examinadora considerou **APROVADO** o trabalho do doutorando. Nada mais havendo a relatar a sessão foi encerrada às **treze horas.**

Prof. Dr. Jorg Heukelbach
(Orientador UFC)

Profa. Dra. Célia Maria de Sousa Sampaio
(UFCE)

Profa. Dra. Maria da Glória Lima Cruz Teixeira
(UFBA)

Prof. Dr. Ricardo José Soares Pontes
(UFC)

Prof. Dr. Roberto de Andrade Medronho
(UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Muita coisa foi pensada, discutida, testada e realizada desde a concepção inicial dessa linha de pesquisa em 1999 envolvendo professores da UECE e técnicos da FUNASA. Desafios surgiram, muitas dúvidas também ocorreram, vários colaboradores deixaram seu legado durante esses anos de pesquisa. A bolsa de iniciação científica foi fundamental durante o período acadêmico, o financiamento no mestrado foi estratégico para compra dos equipamentos de laboratório, o financiamento para o doutorado "quase certo" não saiu... Enfim, de uma coisa eu sempre estive certo... Sozinho, eu não conseguiria cumprir esta etapa profissional e nem realizar esse sonho tão importante em minha vida. Desta forma, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuiram para que o dia de hoje chegasse.

Agradecimentos especiais

Aos **estudantes de graduação** e bolsistas dos cursos de medicina da Universidade Federal do Ceará e do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará pela importante colaboração nas atividades realizadas no laboratório de entomologia.

Ao amigo ***Roberto Varela***, laboratorista da Fundação Nacional de Saúde-CE, pela colaboração na leitura das palhetas do teste preliminar.

Ao ex-aluno, orientando e agora colega ***Francisco José de Paula Júnior***, pela importante parceria de trabalho durante os experimentos de sobrevivência ao cloro, por me substituir em alguns sábados no laboratório e pelos momentos de discussão dos nossos resultados.

Aos membros da banca de qualificação ***Maria Izabel Florindo Guedes*** *e* ***Geanne Matos de Andrade Cunha*** por terem aceitado colaborar no aperfeiçoamento de meu trabalho e pelas valiosas críticas. Vocês foram fundamentais naquele momento e serei sempre muito grato.

Aos professores ***Roberto Medronho, Glória Teixeira, Ricardo Pontes, Célia Sampaio*** *e* ***Margarida Pompeu*** por terem aceitado o convite para participar da banca examinadora desta tese de doutoramento. Todas as considerações foram muito bem vindas e ajudaram muito.

Ao professor ***Eddie Wiliam de Pinho Santana*** que me deu a 1ª oportunidade de iniciação científica, a quem eu lamento o distanciamento nesse momento importante. Uma parte dessa história começou ainda com ele. Não esquecerei disso.

Aos técnicos do Ministério da Saúde do Brasil: ***Isaias Teixeira Neto, Heloíza Machado de Souza, Giovanini Evelim Coelho*** e ***Rodrigo Lins Frutuoso***, pela colaboração na prestação de informações acerca dos custos operacionais do PNCD.

A todos os agentes de endemias e supervisores de área dos programas de controle do dengue nos muninícipios de Fortaleza e Canindé, com os quais aprendi muito sobre controle de *Aedes aegypti* e sobre a prática diárria de uso de peixes larvófagos. ***ESSE TRABALHO É PARA VOCÊS***.

Aos professores do Departamento de Saúde Comunitária da UFC que me incentivaram em toda a jornada, em especial a professora ***Ligia Regina Sangiollo Kerr*** pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos de ausência.

As minhas colegas de trabalho da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, especialmente ***Gláucia, Mazé, Kiliana*** e ***Susana*** que tornaram imperceptíveis minhas ausências durante o período de elaboração desse trabalho. ***SOU SINCERAMENTE GRATO À VOCÊS***.

Aos colegas do doutorado pela caminhada conjunta, mesmo que às vezes distantes pelas diferentes disciplinas; em especial à ***Fernanda Montenegro*** pelo carinho e à ***Liana Ariza***, que em um momento bastante importante no doutorado me deu "abrigo".

Ao professor ***Ricardo José Soares Pontes***, pela confiança, apoio e conselhos desde o primeiro dia que entrei para esta "Grande Família da Academia". Posso afirmar que aprendi muito aqui e com você. Agradeço pela estrutura existente para a realização deste trabalho. Sei o quanto ela lhe custou e lhe custa esforço e dedicação. Espero não ter decepcionado em nada e por tudo isso sou muito grato; ***MEU PROFESSOR***.

À Coordenação do PPGCM que não mediu esforços para viabilizar nosso curso, em especial às funcionárias ***Ivone*** e ***Rita*** e à professora ***Geanne Matos*** pela delicadeza e competência na coordenação do curso, meus sinceros sentimentos de admiração e respeito.

A minha querida Supervisora na SESA, ***Dina Cortez Lima Feitosa Vilar***, pela compreensão às minhas ausências ao trabalho e imensurável carinho "quase materno", respeito e estímulo. Aprendi muito com a senhora e nunca esquerecei isso, ***MINHA CHEFINHA***.

Aos mestres na vida profissional ***Ernani Wilson Bezerra Carneiro*** e ***Oswaldo Farias*** que muito me ensinaram sobre decência, ética e responsabilidade na gestão pública. Esses foram meus grandes exemplos desde que iniciei minha vida profissional no serviço público.

Ao meu orientador ***Jorg Heukelbach***, cujo nome demorei para aprender a escrever corretamente, mas que com muita sabedoria me conduziu nesse aprendizado necessário de escrever e “tornar-me doutorando”. O senhor não foi responsável pelos meus equívocos neste trabalho.

Ao meu grande amigo ***Carlos Henrique Morais de Alencar***, com quem pude discutir esse projeto e as experiências de campo desde o tempo da graduação até hoje e com o qual tenho o imenso prazer de dividir meu local de trabalho, pesquisa e breves momentos de lazer. Você foi e é fundamental em minha caminhada ***MEU GRANDE AMIGO***.

Ao inominável ***José Wellington de Oliveira Lima***, meu quase tudo nesse processo... Ao senhor eu devo a oportunidade de aprender a ser ético, descente, dedicado, incansável, determinado, enfim: um PESQUISADOR. Aprendi quando o senhor me falava e quando o senhor se calava aprendia ainda mais. Não tenho palavras para lhe agradecer por tudo e estarei sempre por perto tentando demonstrar diariamente a gratidão pela oportunidade de seu convívio. Sem o senhor nada disso teria sentido ***MEU ETERNO MESTRE***.

Aos meus pais não poderia deixar de agradecer pela formação e principalmente pelas oportunidades que me foram dadas de estudar nas melhores escolas. Além disso, pelo grande estímulo manifestado pelo orgulho em dizer que seu filho havia passado no vestibular para ***BIOLOGIA***, entrado em uma especialização, depois no mestrado e finalmente tornar-se doutorando. O detalhe é que às vezes nem sabiam o que isso queria dizer, mas enxergavam o brilho nos meus olhos pelos resultados alcançados. ***EU AMO VOCÊS POR TUDO ISSO***.

Por último, mas não menos importante, meu especial e carinhoso agradecimento a ***Fernanda Andrade Lima***, minha namorada/noiva e sempre companheira ao longo de todo este trabalho. Foi um exemplo pessoal e que esperou com tanta paciência minha defesa para que pudéssemos marcar a data de nosso casamento. Obrigado pelo amor, companheirismo, críticas e por me fazer sentir que sempre poderei contar com você. A você Fernanda, ***O MEU SINCERO AMOR***.

“Aquilo que você faz fala tão alto,

que o que você diz ninguém escuta”

Autor ignorado

*“Um dia você aprende que o importante não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que **bons amigos** são a família que nos permitiram escolher.”*

William Shakespeare

RESUMO

O dengue permanece como problema de saúde pública no Brasil. No nordeste brasileiro, os grandes depósitos domiciliares utilizados para acumular água são importantes criadouros para reprodução do *Aedes aegypti*, o principal transmissor do dengue. O uso de alternativas ao controle químico desse vetor vem sendo incentivado. Os objetivos desse trabalho foram avaliar se a presença de peixes larvófagos altera o padrão de postura do *A. aegypti*, identificar a sobrevivência de peixes larvófagos ao cloro e descrever a eficácia do peixe *Betta splendens* em condições de campo. O padrão de postura foi avaliado em uma gaiola com 6 m^3. Os peixes avaliados foram *Poecilia reticulata* e *B. splendens*. Na gaiola foram inseridos oito depósitos, sendo quatro com peixes, quatro sem peixes (controle) e 100 mosquitos. Em cada depósito tinha água e uma palheta de eucatex para postura dos ovos. Ao final de cada semana os ovos postos nessas palhetas foram contados. Os ensaios foram replicados por sete semanas consecutivas para cada espécie. A sobrevivência do *B. splendens* e *P. reticulata*, ao cloro, foi avaliada para três concentrações (1,0; 1,5 e 2,0 mg/L) utilizando tambores com 35 litros de água. Foram utilizados 105, 140 e 175 peixes para cada concentração testada, na proporção de 6 depósitos com cloro para cada controle (sem cloro). A eficácia foi avaliada a partir de dados gerados pelo Programa Municipal de Controle do Dengue, na cidade de Fortaleza. Foi avaliada a permanência dos peixes em depósitos domiciliares e a infestação nesses depósitos com *B. splendens* e o larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis*. A presença do *B. splendens* inibiu a postura de ovos pelas fêmeas de *Aedes aegypti* com um Índice de Atividade de Oviposição (IAO) de -0,627. O número médio de ovos postos em depósitos com *B. splendens* (32,5/semana) foi menor que nos depósitos com o *P. reticulata* (200,5/semana) e os controles (186,5/semana; $p < 0,0001$). Todos os *B. splendens* sobreviveram a concentração de cloro de 1,0 mg/L; 72,5 e 39,3% sobreviveram as concentrações de 1,5 e 2,0 mg/L. Por outro lado, apenas 4,4% do *P. reticulata* sobreviveram a concentração mínima de 1,0 mg/L. Em campo foram encontrados três depósitos com a presença do *B. splendens* e larvas de mosquitos (1,6%), infestação significativamente menor que nos depósitos com o *Bti*, onde essa infestação foi de 10,9% ($p < 0,001$). Nos depósitos onde o peixe não permaneceu a infestação foi de 27,8%, maior que nos depósitos com *Bti* ($p < 0,010$). Nos depósitos onde o peixe permaneceu ele foi 85% mais eficaz que o larvicida. A permanência dos peixes foi maior nos tanques de alvenaria (48,5%), localizados no peridomicílio (47,5%) e ao nível do solo (53,3%). Concluímos que o *B. splendens* pode ser apropriado para controle biológico de larvas de *Ae. aegypti* em grandes reservatórios domiciliares, desde que possa ser atestada sua permanência nesses depósitos.

Palavras-chave: Dengue. *Aedes aegypti*. Controle biológico. Peixes larvófagos. Cloro. Oviposição. *Betta splendens. Poecilia reticulata*.

ABSTRACT

Dengue fever remains an important public health problem in northeast Brazil. Large domestic containers used to store water are important breeding sites of *Aedes aegypti*, the main vector. The use of alternatives to chemical vector control has increased in the last years. The objectives of this study were: to evaluate the inhibition of oviposition by female *Ae. aegypti* in domestic containers with larvivorous fish; to describe the survival of larvivorous fish to different chlorine concentrations; and to describe the efficacy of *Betta splendens* fish under field conditions. Oviposition was assessed in a cage of 6 m^3 of size. The fish species *Poecilia reticulata* and *B. splendens* were used in the laboratory assays. In the cage, eight water containers were placed - four with fish, four without fish (control), and 100 mosquitoes. In each container with 15 l water eucatex strips were placed to facilitate oviposition. At the end of each week, eggs laid on these strips were counted. For each species, the assays were repeated for seven consecutive weeks. Survival of *B. splendens* and *P. reticulata* to different concentrations of chlorine (1.0, 1.5 and 2.0 mg / L) was assessed in drums with 35 liters of water. We used 105, 140 and 175 fish for each concentration: six test containers with chlorine for each control without chlorine. Secondary data of the Municipal Dengue Control Program of the city of Fortaleza were analyzed to assess the efficacy of *B. splendens* under field conditions. The presence of fish in household containers was verified after several weeks. Infestation of containers with mosquito larvae was compared to containers with the larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis*. The presence of *B. splendens* inhibited oviposition by *Ae. aegypti* with an activity oviposition index of -0.627. The mean number of eggs laid in deposits with *B. splendens* (32.5 / week) was lower than in deposits with *P. reticulata* (200.5 / week) and controls (186.5 / week, $p < 0.0001$). All *B. splendens* specimens survived a chlorine concentration of 1.0 mg / L, and 72.5% and 39.3% survived concentrations of 1.5 and 2.0 mg / L, respectively. On the other hand, only 4.4% of *P. reticulata* survived a concentration of 1.0 mg / L. Under field conditions, three containers were encountered with *B. splendens* and mosquito larvae (1.6%), significantly less than infested deposits with *Bti* (10.9%; $p < 0.001$). In containers where the fish died or disappeared, infestation was 27.8% higher than in deposits with *Bti* ($p < 0.010$). In deposits where the fish remained, efficacy was 85% better than *Bti*. The permanence of fish was higher in concrete tanks (48.5%), located outside the house (47.5%) and at ground level (53.3%). We conclude that *B. splendens* may be suitable for biological control of *Ae. aegypti* larvae in large domestic water containers.

Key-words: Dengue. *Aedes aegypti*. Biological control. Larvivorous fish. Chlorine. Oviposition. *Betta splendens. Poecilia reticulata*.

LISTA DE TABELAS

1. Número de ovos postos no experimento preliminar com as cinco espécies de peixes, durante três semanas..... 68

2. Índice de Atividade de Oviposição (IAO) de cinco espécies de peixe. 69

3. Tamanho e peso das cinco espécies de peixes larvófagos x IAO..... 69

4. Número de ovos postos durante as sete semanas de experimento, por depósito..... 71

5. Índice de Atividade de Oviposição* em depósitos com *Betta splendens* e *Poecilia reticulata*..... 72

6. Número de ovos depositados por fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em criadouros com e sem o peixe *Betta splendens*..... 73

7. Número de ovos depositados por fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em criadouros com e sem o peixe *Poecilia reticulata*..... 74

8. Proporção de sobrevivência dos peixes *Betta splendens* e *Poecilia reticulata* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de cloro..... 76

9. Concentração de cloro inicial e 24 horas após exposição, em um experimento para estimar a resistência do peixe *Betta splendens* a diferentes concentrações..... 77

10. Concentração de cloro inicial e 24 após exposição, em um experimento para estimar a resistência do peixe *Poecilia reticulata* a diferentes concentrações de cloro..... 77

11. Permanência do peixe *Betta splendens* em depósitos domiciliares com água (N=537), segundo o tempo de observação..... 78

12. Densidade de Incidência da infestação por *Aedes aegypti* em depósitos domiciliares com água, segundo o grupo (*Betta splendens* ou *Bti*), não ajustado e ajustado para potenciais confundidores..... 80

13. Densidade de Incidência da presença do peixe *Betta splendens* em depósitos domiciliares com água (N=537), segundo característica dos depósitos..... 81

14. Densidade de Incidência da infestação por *Aedes aegypti* em depósitos domiciliares com água (N=974), segundo características dos depósitos..... 82

LISTA DE FIGURAS

1. Casos notificados de dengue no Brasil, 1986-2008..... 21

2. Proporção de casos notificados de dengue no Brasil, por região, 2001-2008..... 22

3. Número de casos e incidência de dengue no Ceará, 1986 a 2009*..... 24

4. Número de casos confirmados de FHD e letalidade no Ceará, 1994-2008..... 25

5. Proporção de casos de FHD em indivíduos com 12 anos ou menos. Ceará, 2001-2008..... 26

6. Gaiola..... 60

7. Esquema de distribuição dos aquários dentro da gaiola de testes..... 61

8. Palheta de eucatex..... 61

9. Disposição dos aquários durante os sete ensaios consecutivos para cada espécie de peixe..... 62

10. Tambores utilizados para os testes de resistência ao cloro..... 64

11. Conector utilizado nas saídas de água das caixas d'água..... 66

12(a). Número de ovos depositados por fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em criadouros com e sem o peixe *Betta splendens*..... 75

12(b). Número de ovos depositados por fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* em criadouros com e sem o peixe *Poecilia reticulata*..... 75

LISTA DE QUADROS

1. Inquéritos de soro-prevalência realizados em cidades Brasileiras, por ano da coleta das amostras..... 30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 16

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 19

2.1 A palavra “dengue”..... 19

2.2 Mecanismos de transmissão e epidemiologia..... 20

2.3 Dengue no Ceará..... 23

2.4 Formas clínicas e apresentação da doença..... 26

2.5 O Vírus..... 27

2.6 Inquéritos soro-epidemiológicos..... 28

2.7 Estratégias para o desenvolvimento de vacinas..... 31

2.8 Importância para Saúde Pública..... 32

2.9 Biologia e ecologia do *Aedes aegypti*..... 33

2.10 Erradicação versus Controle..... 35

2.11 Controle do *Aedes aegpyti*..... 36

2.11.1 Inseticidas químicos..... 37

2.11.2 Controle biológico..... 39

2.11.2.1 Extrato vegetal..... 40

2.11.2.2 Bactérias e fungos..... 42

2.11.2.3 Copépodes..... 44

2.11.2.4 Peixes larvófagos..... 45

2.11.2.5 Outras alternativas..... 57

3 OBJETIVOS..... 58

3.1 Geral..... 58

3.2 Específicos..... 58

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 59

4.1 Aspectos Gerais..... 59

4.2 Aspectos Éticos..... 59

4.3 Padrão de oviposição em depósitos com peixes..... 59

4.4 Sobrevivência do *Betta splendens* e *Poecilia reticulata* ao cloro..... 63

4.5 Utilização do peixe *Betta splendens* em condições de campo..... 65

5 RESULTADOS..... 68

6 DISCUSSÃO..... 83

7 CONCLUSÕES..... 97

REFERÊNCIAS..... 98

ANEXOS..... 118

1 INTRODUÇÃO

O dengue é uma doença viral febril aguda, transmitida por mosquitos hematófagos, podendo ser de curso benigno ou grave (BRASIL, 2002). É a enfermidade viral mais importante transmitida por artrópodes em todo o mundo (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005). Na Grécia, em 1927/1928, por meio de diagnóstico retrospectivo, identificou-se a ocorrência de uma grave epidemia de dengue hemorrágico de incidência alarmante e alta letalidade. A investigação de soros de sobreviventes indicou a circulação dos vírus DENV-1 e DENV-2 (OPS, 1928; HALSTEAD; PAPAVANGELOU, 1980).

Atualmente o dengue encontra-se disseminado de forma autóctone em mais de 100 países de todos os continentes, com exceção da Europa (DELGADO *et al.*, 2008). É uma ameaça para a saúde de mais de 2,5 bilhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais, onde se estima que cerca de 80 milhões de pessoas se infectem anualmente (WHO, 2009; KOURI, 2006). Possui ainda um elevado custo para os serviços de saúde e para população (SUAYA *et al.*, 2009).

Há grandes evidências de que as condições atuais e as perspectivas futuras das Américas, e particularmente do Brasil, favorecem a expansão e o agravamento dos eventos relacionados com o dengue. Isto é resultado de uma situação de hiperendemicidade, associada à circulação de vários sorotipos, aumentando a probabilidade de imunoamplificação (WHO, 2002).

No continente americano, o vetor principal do dengue é o mosquito culicídeo *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), cujos hábitos o têm levado a um comportamento domiciliar, adaptando-se rapidamente ao ambiente urbano (CALADO; SILVA, 2002). Sua ampla distribuição geográfica no Brasil constitui-se também uma ameaça constante à reurbanização da febre amarela (SILVA; SILVA, 1999).

Até o momento, o único elo vulnerável da cadeia de transmissão do dengue é o vetor. Portanto, todas as formas de combate à doença estão direcionadas ao controle do mosquito, principalmente via redução dos potenciais criadouros das formas larvárias e do controle químico do mosquito adulto (VERONESI, 1985; OPS, 1994; TAUIL, 2002).

O uso de inseticidas químicos tem sido o principal método de controle do *A. aegypti*, porém o meio ambiente vem sofrendo conseqüências nocivas com essa utilização descontrolada que poderão se manifestar nas próximas décadas (OPS, 1984). Existe ainda o

risco de toxidade para o homem e animais. Além disso, o controle químico além de conduzir a uma resistência por seleção, pode causar a destruição de controladores naturais dos vetores e a contaminação do meio em volta, provocando um desequilíbrio do ecossistema (OPS, 1984).

Nesse contexto, o controle biológico é uma alternativa aos adulticidas e larvicidas químicos para controlar a proliferação dos mosquitos. O controle biológico do vetor do dengue é bastante difundido no mundo. O uso de peixes larvófagos é citado desde o século passado e várias espécies de peixe colocadas em recipientes infestados têm sido utilizadas. Entretanto, um dos pontos mais críticos é o seu uso em depósitos domiciliares e com água potável (CHADEE, 1992).

Os primeiros estudos no Estado do Ceará sobre o uso do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico para larvas de *A. aegypti* iniciaram no final de 1999, a partir da observação de um experiente entomologista da FUNASA/Ce. Ele observou que, em tanques de alvenaria no bairro da Messejana, onde um jovem criava peixes, não havia a presença de larvas. Enquanto isso, outros tanques no mesmo domicílio em que não havia peixes estavam infestados por larvas de *A. aegypti*. A percepção de que os machos dessa espécie mostravam-se bastante agressivos motivou o início de um projeto financiado pela Fundação Giacometti, FUNCAP e CNPq; com o objetivo de avaliar a capacidade larvófaga de machos do peixe *Betta splendens* em condições de laboratório.

No ano de 2000 houve um grande aumento no número de casos de dengue em Fortaleza. Pela necessidade de soluções alternativas para o seu controle e por uma pressão da própria comunidade, a Secretaria de Saúde do Estado do Ceará incorporou o peixe *Betta splendens* no controle do dengue em Fortaleza e em outros municípios do interior do Estado (DN, 2000; PAMPLONA, 2001).

A pressão da população pela sua adoção como mais uma alternativa para deter a epidemia fez com que sua utilização se expandisse rapidamente, chegando em 2002 a mais de 200.000 depósitos “peixados” em Fortaleza (OLIVEIRA-LIMA *et al.,* 2003). Trabalho realizado em 2001 e 2002, no município de Canindé, sugeriu um bom potencial da utilização do peixe *Betta splendens* em tanques de cimento (PAMPLONA *et al.*, 2004).

Essa grande popularidade fez com que vários municípios do interior do Estado também buscassem adotar essa alternativa de controle, gerando uma grande procura pelo peixe. Até dezembro de 2004 existiam mais de 710.000 depósitos “peixados” em 121 municípios do Ceará (CAVALCANTI, 2006). As cinco espécies utilizadas no Ceará são:

Poecilia reticulata, Poecilia sphenops, Trichogaster thricopteros, Betta splendens e Astyanax fasciatus. A capacidade larvófaga desses peixes já foi demonstrada em condições de laboratório (CAVALCANTI *et al.,* 2007). Entretanto, não existem dados fidedignos sobre a sobrevivência de algumas dessas espécies em reservatórios domiciliares e a possibilidade de seu uso como biocontroladores em larga escala.

Nesse sentido, mostra-se importante que sejam conhecidos os mecanismos que regulam as interações bióticas e abióticas. Aqui propusemos avaliar o uso de alguns peixes larvófagos como alternativa viável de controle biológico de larvas de *A. aegypti* em depósitos domiciliares e sua inserção de forma sustentável no programa de controle do dengue.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A palavra dengue

A febre do dengue é entidade clínica conhecida desde o século XVIII e, possivelmente, em séculos anteriores, pois, segundo descrição de Gubler (1998), o termo Water Poison, cunhado na China em 992, reportava-se a epidemias de dengue (GUBLER, 1998).

As duas primeiras descrições da doença na literatura médica se devem a David Bylon, que descreveu uma epidemia de dengue ocorrida no ano de 1780, em Java, e a Benjamin Rush, que descreveu o surto epidêmico ocorrido na Filadélfia em 1780 (MORTON, 1983). A partir desse período, a nomenclatura médica foi acrescida de novos nomes para a doença, tais como "febre epidêmica", "febre reumatismal", "febre epidêmica eruptiva" "febre articular exantemática", "febre reumática eruptiva", "escarlatina reumatismal", "artrodinia" e outras (CHERNOVIZ, 1890).

Por motivos desconhecidos, o nome dengue sobrepôs-se aos demais e passou a ser utilizado universalmente, sendo, em 1839, o nome escolhido por Dickson para o seu livro sobre a história, a patologia e o tratamento da doença (DICKSON, 1855). Em 1869, foi adotado pelo Colégio Real de Medicina de Londres (GARNIER; DELAMARE, 1984).

A partir de então a doença, de caráter epidêmico, recebeu no mundo os mais variados nomes populares. Dentre esses, destacamos "febre da China" na Ásia, "bouhou" na Oceania, "febre quebra-ossos" nos Estados Unidos, "colorado" em colônias espanholas, "dandy fever" em colônias inglesas, "dengue" nas Antilhas, "polca" no Rio de Janeiro e “patuléia" na Bahia (CHERNOVIZ, 1890; SÃO PAULO, 1970).

2.2 Mecanismo de transmissão e epidemiologia do dengue

O mecanismo de transmissão do dengue foi descrito, em 1906, por Bancroft, quando identificou o mosquito *A. aegypti* como o vetor da doença (RODHAIN; ROSEN, 1997). Em 1916, confirmou-se a importância desse vetor através de estudos realizados na Austrália, por Cleland. Entretanto, só após os trabalhos de Siler, em 1926, e Simmons, em 1931, é que alguns pontos importantes na transmissão do dengue puderam ser elucidados. Estes autores identificaram um segundo vetor, o *Aedes albopictus*, e outras duas espécies: *A. scutellaris* e *A.*

polynesiensis, encontradas na Indonésia e Ilhas do Pacífico Sul, respectivamente (HALSTEAD**,** 1974).

A etiologia do dengue foi determinada por Ausburn e Craig, em 1906, com o achado de um agente infeccioso filtrável no sangue humano (GUBLER, 1998).

Ao longo dos três últimos séculos, tem-se registrado a ocorrência do dengue em várias partes do mundo, com epidemias isoladas atingindo as Américas, África, Ásia, Europa e Austrália. Depois da segunda guerra mundial, ocorreram várias epidemias de dengue e dengue hemorrágico em diversos países do mundo, destacando-se o Sudeste asiático. Foram registradas epidemias nas Filipinas, em 1956, Tailândia, em 1958, Vietnã, em 1960, Cingapura, em 1962 e Birmânia, em 1970 (TORRES, 2005). Durante o período de 2000 a 2006, uma média de 545 mil casos foram reportados, anualmente, em 44 países (GÓMEZ-DANTÉS; WILLOQUET, 2009).

Assim como o mosquito que o transmite, o dengue encontra-se disseminado, principalmente, nas regiões tropicais do mundo. Em 2004, a doença foi notificada em mais de 100 países, onde vivem cerca de 2 bilhões de pessoas em risco. Por ano, existem milhões de infecções e ocasionalmente dezenas de milhares de mortes. Atualmente o dengue é a mais importante virose transmitida por mosquitos. Afeta da mesma forma jovens e idosos, ricos e pobres, especialmente pessoas vivendo em áreas urbanas densamente habitadas na zona tropical (TORRES, 2005). Um complexo relacionamento entre variáveis climáticas, abundância de mosquitos, densidade populacional susceptível e sorotipos circulantes definem as condições para transmissão do dengue (GÓMEZ-DANTÉS; WILLOQUET, 2009; LAMBRECHTS; SCOTT, 2009).

Nas Américas, existem relatos de casos de dengue há mais de 200 anos. Em 1963, já havia circulação comprovada dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 em vários países e, em 1977, o sorotipo DENV-1 foi introduzido, inicialmente pela Jamaica. A partir de 1980, foram notificadas epidemias em vários países, aumentando consideravelmente a magnitude do problema. Vale salientar as seguintes epidemias: Cuba (1977/1981), Bolívia (1987), Paraguai (1988), Equador (1988) e Peru (1990) (BRASIL, 2002). Destaca-se ainda a presença do sorotipo DENV-4 no Perú (FORSHEY *et al.*, 2009).

No Brasil, existem referências de epidemias em São Paulo, em 1916 e no ano de 1923 em Niterói, porém, sem confirmação laboratorial (BRASIL, 2002). O primeiro achado laboratorial de positividade para dengue foi em Boa Vista, em pacientes com quadro clínico

sugestivo de rubéola, em 1981 (OSANAI, 1984). Esse foi o primeiro registro de uma epidemia documentada com a circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4. Já naquele momento foi alertado para o risco de epidemias de dengue no Brasil, em regiões com elevadas infestações por *A. aegypti* (OSANAI, 1984).

Após o episódio de Roraima, em 1981/82, o País viveu um período de silêncio epidemiológico até meados de 1986/87, quando o sorotipo DENV-1 invadiu o Sudeste e o Nordeste do País. Em virtude da extraordinária capacidade de adaptação do *A. aegypti* ao ambiente intradomiciliar, o dengue se espalhou para todos os estados em poucos anos (CÂMARA *et al.*, 2007).

A partir de 1986, os casos passaram a ser notificados ininterruptamente (figura 1). Nesse ano destacou-se a epidemia ocorrida no Estado do Ceará em virtude da introdução do sorotipo DENV-1 e as elevadas infestações vetoriais. A partir de 1990, com a introdução do DENV-2 e circulação simultânea de dois sorotipos virais, começam a surgir os casos de febre hemorrágica, com destaque para as epidemias ocorridas no Estado do Rio de Janeiro (MEDRONHO, 2006). Já em 2000, com a introdução do sorotipo DENV-3, tiveram início às grandes epidemias de dengue acompanhadas de um grande número de casos hemorrágicos.

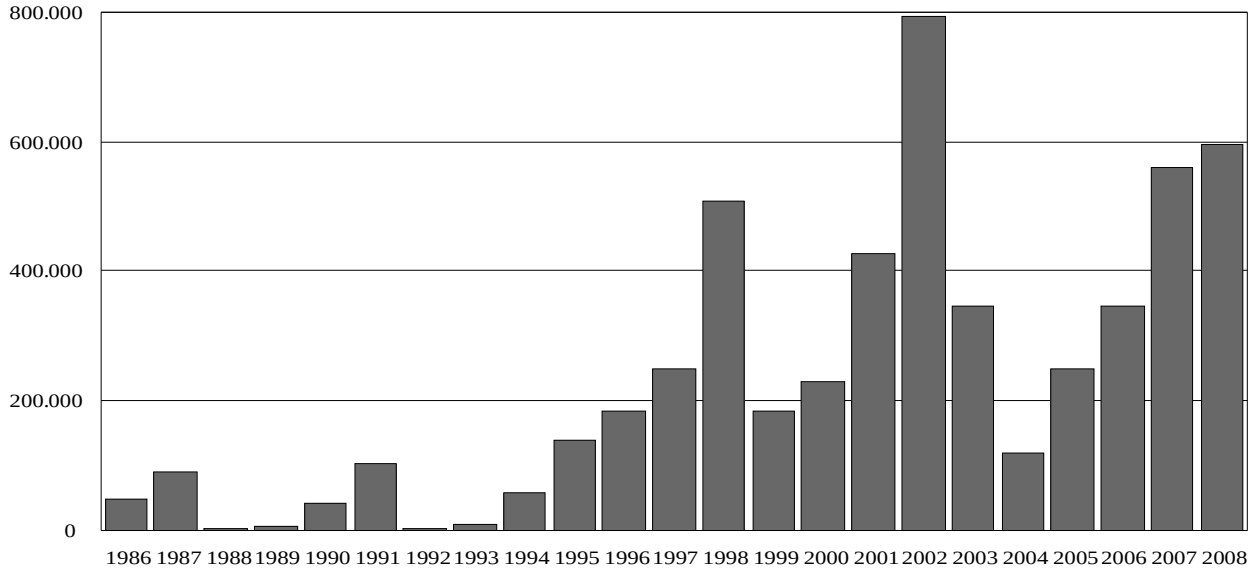

Figura 1. Casos notificados de dengue no Brasil, 1986-2008*.

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, MS.

* Dados até junho de 2009, sujeitos à revisão.

As epidemias ocorreram em períodos cíclicos, de aproximadamente quatro anos. Isso ocorre em virtude da disseminação dos novos sorotipos virais e da interiorização da doença.

A partir de 1986, foram notificados diversos casos clínicos e várias epidemias em vários estados. Destas, a mais importante ocorreu no Rio de Janeiro onde, por inquérito sorológico realizado, estimou-se pelo menos 1 milhão de pessoas afetadas pelo sorotipo DEN 1, nos anos de 1986/1987. Outros estados (Ceará, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Tocantins, São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) notificaram surtos no período de 1986/1993. A introdução do sorotipo 2 foi detectada em 1990, no estado do Rio de Janeiro, onde foi detectado também pela primeira vez o sorotipo 3, posteriormente, identificado em Tocantins, Alagoas e Ceará (BRASIL, 2002).

O Brasil apresenta um padrão sazonal de transmissão com maior incidência de casos nos primeiros meses do ano, provavelmente influenciado por fatores como temperatura, umidade e pluviometria, típicos de regiões tropicais.

A maior proporção de casos é notificada nas regiões sudeste e nordeste, chegando a 89% em 2002. Teixeira *et al* (2009) mostra que 38,4% dos casos de dengue ocorridos entre os anos de 1990 a 2007 foram na região nordeste. A região Centro-Oeste vem apresentando um aumento na proporção dos casos notificados nos últimos anos (figura 2).

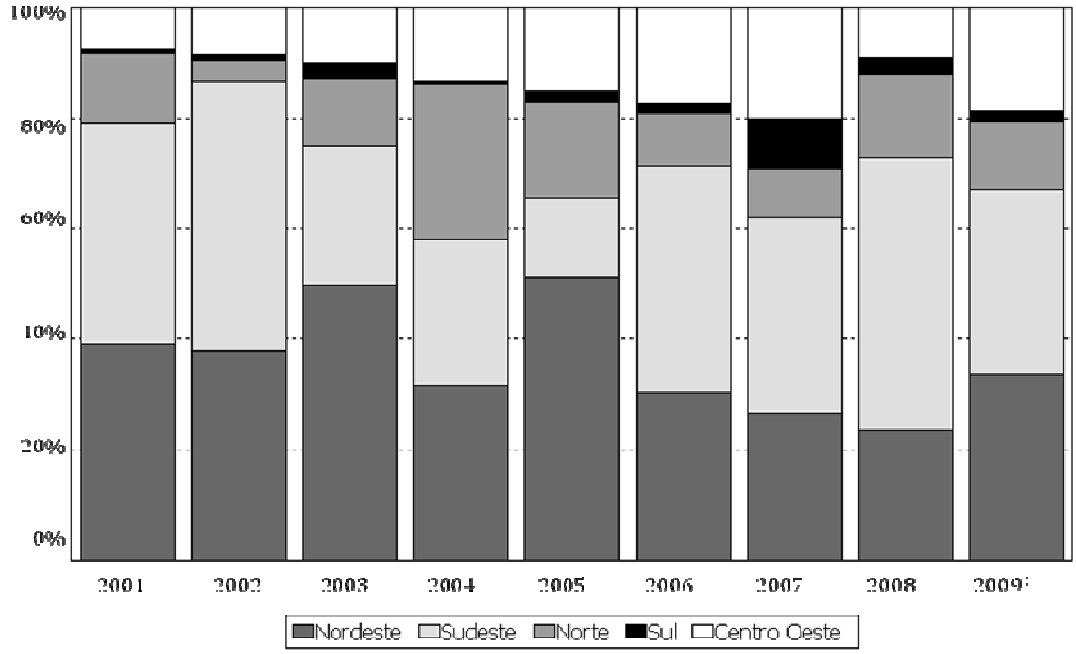

Figura 2. Proporção de casos notificados de dengue no Brasil, por região, 2001-2009*.

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, MS.

* Dados até dezembro de 2008, sujeitos à revisão.

2.3 Dengue no Ceará

Os primeiros registros do *A. aegypti* no Ceará demonstram sua presença no ano de 1851, devido a uma grande epidemia de febre amarela urbana onde foram relatados cerca de 28.500 casos dessa patologia, atingindo mais da metade da população da época (FRANCO, 1976). Em 1932 a Fundação Rockefeller realizou no Estado os primeiros levantamentos de índices em alguns municípios. No período de 1931 a 1949 o *A. aegypti* foi encontrado em todos os municípios do Estado (FRANCO, 1976). Os focos do *Aedes* foram totalmente erradicados do Ceará até o ano de 1950, em virtude de um amplo programa de erradicação do dengue nas Américas e, até 1983, a literatura dos órgãos oficiais não relata nenhum foco do mosquito. No ano de 1984 foi detectado novamente foco no município de Aquiráz e, desde este período não foi mais possível erradicá-lo do território cearense (FRANCO, 1976). Com isso, o Ceará figura como um dos mais importantes quanto ao número de casos reportados de dengue (CUNHA *et al.,* 1988). Apesar do crescimento dos esforços de controle do vetor no estado, o dengue continua se manifestando de forma endêmica com frequentes surtos epidêmicos (CAPRARA *et al.*, 2009).

Sua primeira epidemia teve início em agosto de 1986, estendendo-se até novembro de 1987. Nesse período foram notificados cerca de 27.000 casos, com o pico de transmissão em abril de 1987 (LIMA; PAMPLONA; NOGUEIRA, 2003). Febre, cefaléia, artralgia e mialgia foram os sintomas mais frequentes (VASCONCELOS *et al.*, 1995).

Desde 1986 nenhum ano se passou sem a confirmação de casos de dengue tendo, em 1994, a maior epidemia registrada nesse estado. A série histórica de dengue no Ceará apresenta alguns picos epidêmicos e, mesmo com todas as ações de controle desenvolvidas nos últimos anos, 2008 se apresentou como o segundo ano com o maior número de casos confirmados e o primeiro em número de casos hemorrágicos (figura 3).

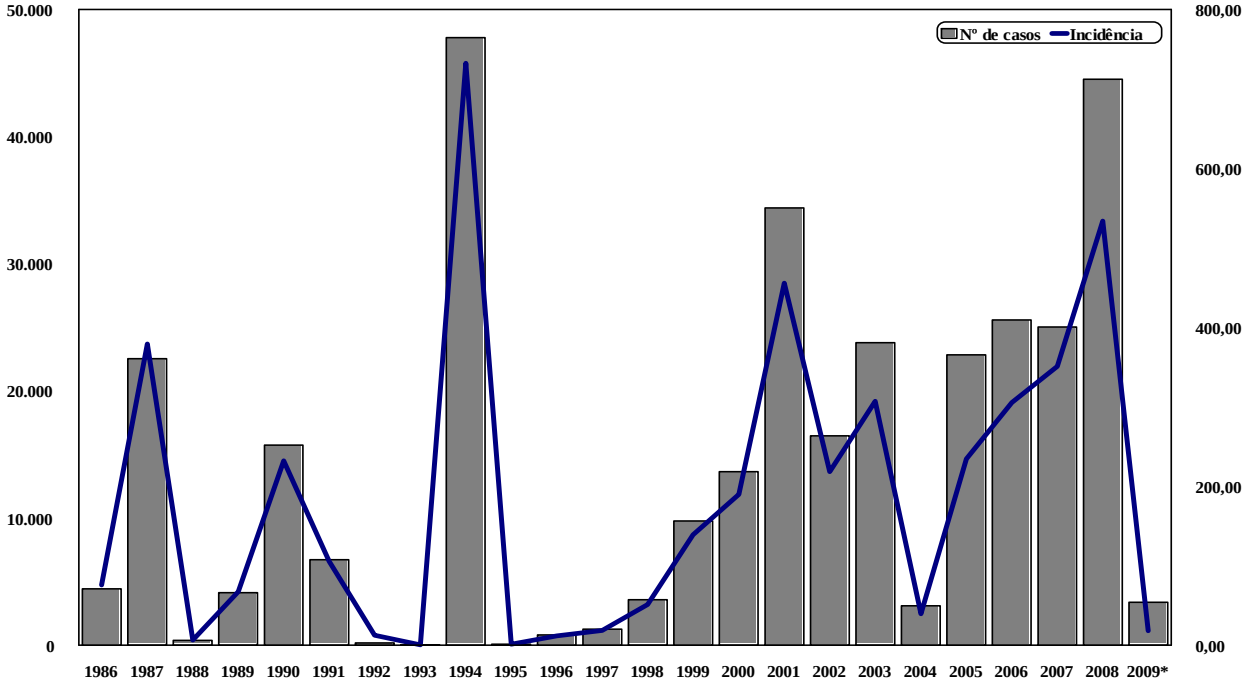

Figura 3. Número de casos confirmados e incidência de dengue no Ceará, 1986 a 2009*.

Fonte: Secretaria da Saúde do Ceará.
* Atualizados em 08/08/09. Dados sujeitos à revisão.

Os primeiros casos de dengue hemorrágico (FHD) foram notificados no Ceará em 1994, quando foi detectada a introdução do sorotipo DENV-2. A partir de 1998, todos os anos apresentaram casos hemorrágicos destacando-se o ano de 2000, com uma letalidade de 75%, sendo considerada a maior do Brasil (VILAR, 2008). A partir de 2001, com a introdução do sorotipo DENV-3 e a circulação simultânea de três sorotipos, aumentou o risco de evolução para casos hemorrágicos (figura 4).

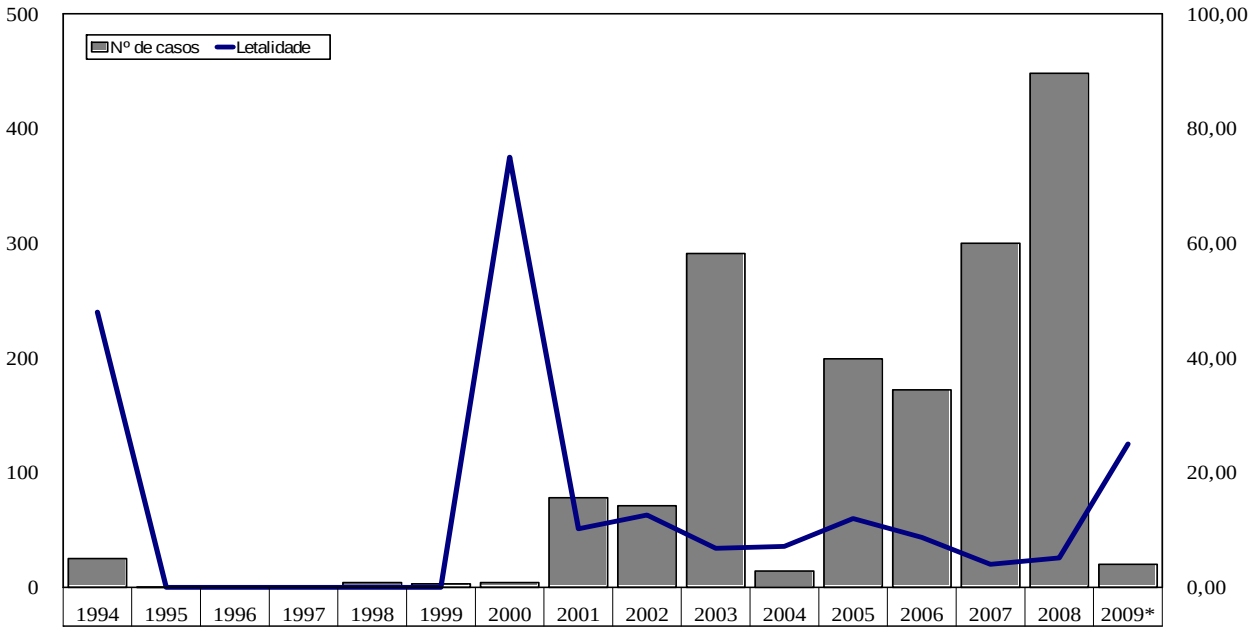

Figura 4. Número de casos confirmados de FHD e letalidade no Ceará, 1994-2009*.

Fonte: Secretaria da Saúde do Ceará.

Dados sujeitos à revisão.

Outro aspecto que tem chamando a atenção é que nos últimos anos vem reduzindo a idade média dos pacientes que evoluem para formas graves no Ceará. Em 2001, a média de idade dos pacientes com FHD foi de 36,8 anos e, em 2003, declinou para 30 anos (PAMPLONA *et al.*, 2005). Esse aspecto também foi relatado por Teixeira *et al.* (2009) em outros estados brasileiros, com destaque para o Rio de Janeiro. Vilar (2008) demonstra um aumento do número de casos de FHD e uma redução significativa da faixa etária dos pacientes, provavelmente ocasinado pela circulação simultânea de três sorotipos virais por mais de duas décadas e a re-emergência do DENV-2 após alguns anos sem circulação no Ceará (figura 5).

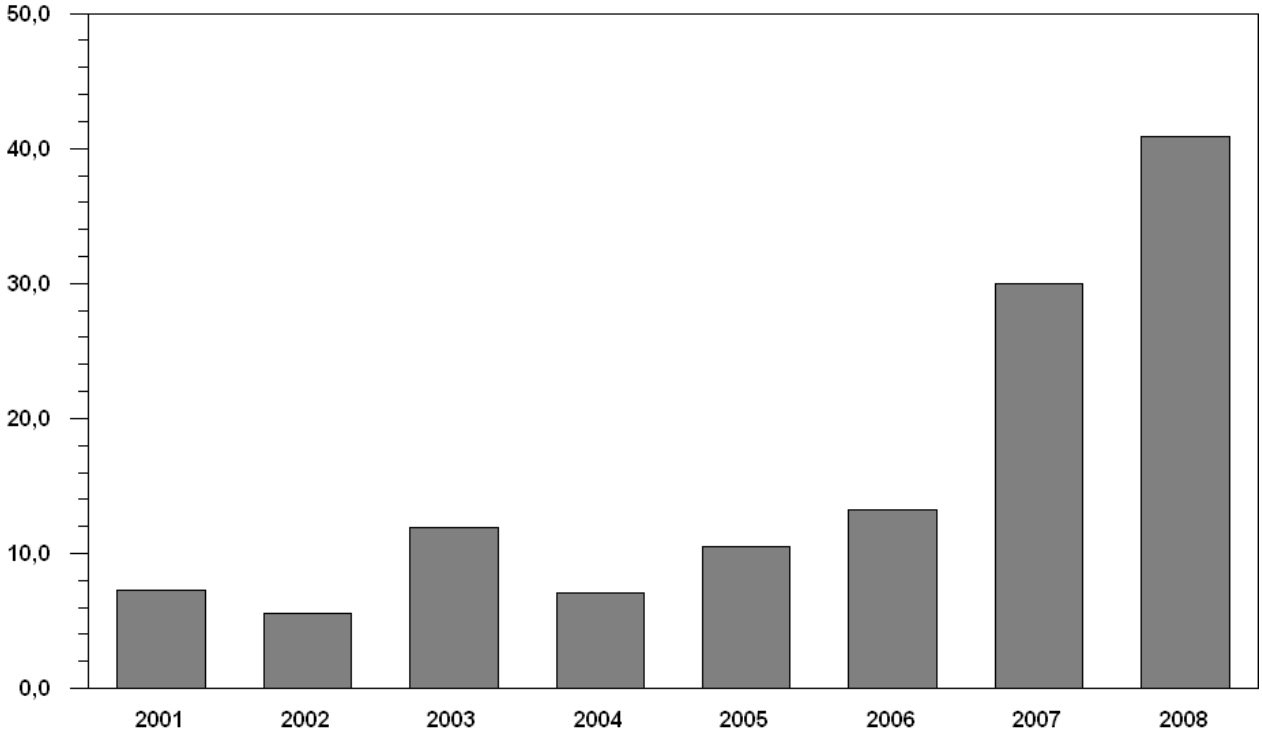

Figura 5. Proporção de casos de FHD em indivíduos com 12 anos ou menos. Ceará, 2001-2008.

Fonte: dados ainda não publicados.

2.4 Formas clínicas e apresentação da doença

Dengue é uma doença febril aguda que pode se apresentar como infecção inaparente, Dengue Clássico (DC), Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) ou Síndrome do Choque da Dengue (SCD). Seu agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivírus*, pertencente à família Flaviviridae. São sorologicamente relacionados, mas antigenicamente distintos, sendo conhecidos 4 sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BRASIL, 2002).

As formas graves do dengue e em particular a febre hemorrágica são a expressão de um mecanismo patogenético complexo no qual interagem o vírus e o hospedeiro e, principalmente, ressalta-se a resposta imunológica deste. A maior parte dos autores, atualmente, concorda com a teoria de que a infecção secundária seja o principal fator de risco para desenvolver a FHD, porém, segundo Torres, outros fatores são também importantes (TORRES, 2005).

Em virtude das diversas formas de classificar os casos hemorrágicos (FHD), o Ministério da Saúde do Brasil adotou um critério de classificação das formas de FHD em quatro categorias, de acordo com a gravidade:

- GRAU 1: febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva.

- GRAU 2: além das manifestações constantes do grau 1, somam-se hemorragias espontâneas leves (sangramentos de pele, epistaxe, gengivorragia e outros).

- GRAU 3: colapso circulatório, com pulso fraco e rápido, e pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação.

- GRAU 4: choque profundo, com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível (Síndrome do Choque da Dengue) (BRASIL, 2002).

2.5 Vírus

Pertencentes à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivírus* (GUBLER, 1998), o qual inclui 68 espécies em 8 grupos sorologicamente relacionados (quatro transmitidos por mosquitos, dois por carrapatos e dois ainda sem vetores conhecidos) (SCHATZMAYR *et al.*, 2000).

Os vírus do dengue apresentam-se como quatro sorotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), porém sorologicamente relacionados. A infecção por um determinado sorotipo do dengue não provê imunidade por toda a vida contra os demais sorotipos (GUBLER; MELTZER, 2003).

Esses vírus são envelopados, esféricos, com projeções nas superfícies, medem aproximadamente 60nm. Possuem genoma de aproximadamente 11.000 nucleotídeos que codificam 10 genes contidos em uma molécula de RNA com fita simples, a qual se comporta como RNA mensageiro de cadeia simples e polaridade positiva (RICE; STRAUSS; STRAUSS, 1986).

A reinfestação do Brasil pelo *A. aegypti* na década de 1970 e a elevada circulação dos vírus dengue nas Américas propiciaram um cenário ideal para a reintrodução da dengue no Brasil (PINHEIRO; CORBER, 1997). Em 1981, amostras dos sorotipos DENV-1 e DENV-4

foram isoladas durante um surto da doença na cidade de Boa Vista, no estado de Roraima (OSANAI *et al.,* 1983). Entretanto, apenas a partir de 1986 a dengue ganhou destaque no contexto nacional da saúde pública, com a introdução do sorotipo DENV-1 no estado do Rio de Janeiro, disseminando-se, em seguida, para outras unidades da Federação (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; ROSA, 1986; FIGUEIREDO, 1996).

Amplamente difundidos pelo país e criando um perfil hiperendêmico nas cinco regiões brasileiras, os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foram responsáveis, nos últimos 20 anos, por mais de quatro milhões e quinhetos mil casos de dengue (BRASIL, 2009). Análises por seqüenciamento do genoma isolados dos vírus revelaram que os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 pertenciam a genótipos provenientes das Américas, do sudeste asiático e do subcontinente indiano. O terceiro sorotipo foi associado a graves epidemias de DH/SCD registradas no Sri Lanka e Índia, bem como a casos de morte nos países da América Central (RICO-HESSE, 1990).

Em 2008 foi reportada a circulação do sorotipo DENV-4 no Estado do Amazonas. Há mais de 25 anos esse vírus não circulava no país. O vírus foi isolado de três pacientes por testes moleculares e um dos pacientes estava co-infectado pelos vírus DENV-3 e DENV-4. Nenhum dos casos havia se deslocado 15 dias antes do início dos sintomas, o que foi caracterizado como transmissão autóctone (FIGUEIREDO *et al.,* 2008). Entretanto, independente da polêmica estabelecida em torno desse achado, não se pode fechar os olhos para o fato de que o DENV-4 chegará ao Brasil, embora não se possa prever quando (MEDRONHO, 2008).

2.6 Inquéritos soro-epidemiológicos

Vários inquéritos sorológicos foram realizados no Brasil para avaliar o potencial de disseminação da doença e circulação viral em cidades de pequeno, médio e grande porte populacional.

Foi realizado inquérito após duas epidemias de dengue clássica na Bahia, sendo a primeira em 1987 causada pelo sorotipo DENV-1 em Ipupiara e a segunda em 1995 causada pelo sorotipo DENV-2 na cidade de Prado. Em ambos os trabalhos foram utilizados o teste de inibição de hemaglutinação (IH). A soro-positividade foi de 11,9% e 17,5%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre idade e gênero (VASCONCELOS *et al.*, 2000).

Trabalho realizado em 1993 no município de Paraíso, São Paulo, mostrou uma positividade de 3,7%. Esse estudo sugeriu uma subnotificação de 1:12 casos e não relatou diferenças significativas entre sexo, idade e nível sócio-econômico. Destaca ainda que 33% dos indivíduos positivos não apresentaram sintomatologia (SCANDAR *et al.*, 2003). Já em inquérito realizado no município de Santa Bárbara D`Oeste, cinco meses após o período epidêmico, mostrou uma incidência várias vezes superior a incidência confirmada laboratorialmente durante a epidemia. Além disso, foi notificado ainda um grande número de casos que não foram confirmados laboratorialmente como dengue, sugerindo um valor preditivo muito baixo (15,6%) (LIMA *et al.*,1999).

Outro inquérito foi realizado com uma amostra de escolares em 1994 no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro. A técnica utilizada também foi o teste de Inibição da Hemaglutinação com 39,2% de positividade. Essa positividade não apresentou diferença significante entre sexo e apresentou uma elevação com o aumento da idade e co-circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (CUNHA *et al.*, 1997).

No município de Fortaleza foi realizado inquérito após a epidemia de 1994, causada pelo sorotipo DENV-2. Através dos testes de inibição de hemaglutinação e aplicação de questionários semi-estruturados foi possível detectar 44% de positividade, sendo a maior parte de resposta secundária. A prevalência geral variou entre 21% e 71%. Não houve diferença significativa entre sexo, idade e escolaridade, ao contrário de condição sócio-econômica (VASCONCELOS *et al.*, 1995).

Após epidemia ocorrida no período 1995/96 em São Luís provocada pelo sorotipo DENV-1 foi realizado inquérito com o objetivo de avaliar o impacto na população. A positividade chegou a 55,4% em uma das áreas avaliadas. Não foi observada diferença significativa entre sexo, o mesmo não ocorrendo com renda que evidenciou maior prevalência na população de melhor nível sócio econômico ($p<0,003$). Foi possível estimar mais de 400 mil infecções (VASCONCELOS *et al.*, 1999).

Inquérito realizado em 1998 na cidade de Campinas, São Paulo, foi utilizada a técnica de papel de filtro, sendo as amostras testadas pelo teste imunoenzimático em culturas celulares infectadas (EIA-ICC). Foi observada uma prevalência de 14,8%, sendo considerada bem superior aos casos confirmados (LIMA, 2007).

Inquérito nas cidades de Brasiléia e Epitaciolândia após a epidemia ocorrida em 2000 mostrou a circulação simultânea dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 com uma prevalência de

60,3% de IgM e 67,2% de IgG. A soropositividade foi mais frequente no sexo masculino e em faixas etárias mais elevadas. A estimativa de subnotificação da infecção foi de 65% em Brasiléia, e 69,9% em Epitaciolândia (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Diante desses inquéritos foi possível observar que em cidades com populações de menor porte populacional a dinâmica da infecção pelo vírus do dengue parece ser diferente. No Brasil, os inquéritos sorológicos têm assinalado taxa de infecção com uma grande variação, em virtude provavelmente do tamanho da população exposta e ao momento epidemiológico vivenciado no momento da realização do inquérito (quadro 1).

Cidade	Ano da coleta	Técnica utilizada	Soro-positividade	Autores
Bipupiana, BA	1987	IH	11,9%	Vasconcelos *et al.*,
Paraíso, SP	1993	-	3,7%	Scandar *et al.*,
Santa Bárbara, SP	-	-	15,6%	Lima *et al.*,
Paracambi, RJ	1994	IH	39,2%	Cunha *et al.*,
Fortaleza, CE	1995	IH + questionário	44%	Vasconcelos *et al.*,
Prado, BA	1995	IH	17,5%	Vasconcelos *et al.*,
São Luis, MA	1995/96	-	55,4%	Vasconcelos *et al.*,
Campinas, SP	1998	Papel filtro	14,79%	Lima *et al.*,
Brasiléia, DF	2000	-	60,3%	Guimarães *et al.*,

Quadro 1 - Inquéritos realizados em cidades Brasileiras, por ano da coleta das amostras.

2.7 Estratégias para o desenvolvimento de vacinas

Considerando as dificuldades encontradas para o controle de seu principal vetor, o *A. aegypti*; além dos bons resultados obtidos com vacinas para outros arbovírus como a febre amarela e encefalite japonesa, a produção de uma vacina para dengue poderia ser uma solução. Entretanto, após 60 anos de descoberta de seu agente etiológico isso ainda não foi possível (FIGUEIREDO, 1999; TAUIL, 2002; GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2006).

Destacam-se como fatores limitantes para essa produção a ausência de um modelo experimental que permita uma adequada compreensão dos processos envolvidos tanto na expressão da doença quanto na resposta pós-vacinal; o conhecimento parcial dos processos envolvidos nas infecções secundárias heterólogas que podem determinar uma maior gravidade na expressão clinica da doença; a co-circulação dos quatro tipos de vírus determinando a necessidade de uma vacina tetravalente; o pouco conhecimento da genética de virulência dos vírus e desinteresse por parte de grupos comerciais produtores de vacinas (FIGUEIREDO, 1999; GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2006; FARRAR; FOKS; GUBLER, 2007).

Segundo alguns autores uma vacina ideal para dengue deveria cumprir pelo menos quatro características: promover a imunização para os quatro sorotipos sem desencadear os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela dengue hemorrágica; apresentar baixo custo; baixa toxicidade (principalmente neuro e hepatotóxica) e manter títulos virais sob refrigeração ou à temperatura ambiente por pelo menos três dias (FIGUEIREDO, 1999; GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2006; FARRAR; FOKS; GUBLER, 2007).

De acordo com Guzmán, Garcia e Kouri (2006) e Hombach (2006) no atual estágio de desenvolvimento de vacinas apresentam-se como promissoras as produzidas a partir de vírus vivo atenuado, cuja técnica de formulação é clássica. Outra técnica é a que utiliza vírus recobinante com basicamente três estratégias: a introdução de uma mutação selecionada no vírus da dengue; a inserção de um gene estrutural prM/E na cadeia genética de um vírus classicamente atenuado e a inserção do gene prM/E na matriz genética da cepa vacinal YF 17D, que serve como vetor (GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2006; HOMBACH, 2006).

Existe ainda a possibilidade de produção de uma vacina baseada em um vírus quimérico (GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2006; HOMBACH, 2006; SILVA; RICHTMANN, 2006). Desta forma, percebe-se o esforço nos últimos anos em pesquisas abordando a possibilidade de uma vacina, entretanto segundo Guzmán, Garcia e Kouri (2006) e Hombach (2006) ainda são necessários pelo menos mais cinco anos para concretização de algum desses trabalhos. Após essa fase concluída teríamos ainda dificuldades técnicas em virtude de novos desafios a serem superados. Segundo alguns trabalhos poderia haver divergências ainda quanto ao calendário vacinal, definição de qual população seria considerada de maior risco, quais faixas etárias e qual o comportamento da vacina quando aplicada em larga escala em uma população já sensibilizada (TAUIL, 2002; OOI; GOH; GUBLER, 2006; HOMBACH, 2006).

2.8 Importância para a Saúde Pública

Epidemias de dengue e dengue hemorrágico trazem importantes impactos econômicos e representam um encargo significativo para as comunidades afetadas (MELTZER; RIGAN-PÉREZ; CLARK, 1998). Este impacto pode variar e incluir perda de vidas, despesas médicas com hospitalização dos pacientes, perda de produtividade da força de trabalho afetada, sobrecarga dos serviços de atenção a saúde devido à demanda alta e repentina durante as epidemias; gastos consideráveis com as ações emergenciais de controle de vetores a e perda de receita de turismo como resultado de publicidade negativa (MELTZER; RIGAN-PÉREZ; CLARK, 1998; SUAYA; SHEPARD; SIQUEIRA, 2009). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil são gastos mais de um milhão de reais por dia só com as ações de prevenção e controle do dengue (BRASIL, 2009).

Kouri *et al.* (1989) estimaram que o custo da epidemia ocorrida em Cuba no período de 1979/81 foi de US$ 103 milhões, sendo 84 milhões com custos diretos e outros 19 milhões para custos indiretos.

Em Porto Rico a epidemia ocorrida no ano de 1977 teve um custo estimado entre US$ 6 e US$ 16 milhões. Os custos diretos com atenção médica e medidas de controle entre 2,4 e 4,7 milhões de dólares e custos indiretos com dias de trabalho perdidos pelos trabalhadores doentes e pais de crianças doentes entre 3,7 e 11 milhões (VON ALLMEN; LOPEZ-CORREA; WOODALL, 1979).

A despeito de todas as ações de controle desenvolvidas, há grandes evidências de que as condições atuais e as perspectivas futuras do Brasil, e particularmente no Ceará, favorecem a expansão e o agravamento dos eventos relacionados com o dengue. Isto devido ao estabelecimento de uma situação de hiperendemicidade, grande dispersão de seu vetor, associados à circulação de vários sorotipos virais (WHO, 2002; BRASIL, 2002).

2.9 Biologia e ecologia do *A. aegypti*

O principal vetor do dengue nas Américas é o *A. aegypti*, cujos hábitos o tem levado a um comportamento domiciliar, adaptando-se rapidamente ao ambiente do homem (CALADO; SILVA, 2002). Além disso, deve-se ressaltar que sua ampla distribuição geográfica no Brasil constitui-se uma ameaça constante à reurbanização da febre amarela (TAUIL, 2002). Vários

surtos dessa patologia, em sua forma silvestre, têm ocorrido nos últimos anos no Brasil, em áreas infestadas por *A. aegypti* (SILVA; SILVA, 1999).

Depois um repasto sangüíneo realizado em um indivíduo infectado, o mosquito torna-se apto a transmitir o vírus, após um período de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. Este período de incubação varia de 3 a 15 dias, sendo em média de 5 a 6 dias (BRASIL, 2002). Tanto a fonte de infecção, como seu reservatório vertebrado é o ser humano; sendo descrito na Ásia e África um ciclo selvagem envolvendo macacos (BRASIL, 2002).

Thoisy *et al.* (2009) mostram pela primeira vez que os mamíferos selvagens neotropicais podem ser infectados com o vírus dengue. Entretanto, a questão a ser esclarecida é a possibilidade de se manter o ciclo do vírus enzoótico nesses mamíferos e determinar qual seu papel na reermergencia da doença em populações humanas. Além disto, existe transmissão transovariana ou vertical, significando que as novas gerações poderão já nascer infectadas (CALADO; SILVA, 2002).

Esse inseto tem hábitos preferencialmente diurno e crepuscular vespertino. Após a cópula, sua fêmea tem a capacidade de acumular espermatozóides por toda a vida em espermatecas, produzindo ovos muito resistentes à dessecação. A primeira postura atinge cerca de 80 a 100 ovos. Nas posturas seguintes reduz para 25 a 30 ovos. Em condições propícias o número de oviposições pode atingir entre 12 a 15 ao longo da vida (GADELHA; TODA, 1985). Depois da oviposição e após o desenvolvimento embrionário inicial; que se passa em ambiente ainda úmido, estes ovos podem permanecer mais de 490 dias em local seco (CALADO; SILVA, 2002). Este é um dos fatores mais importantes da biologia deste vetor, que o torna de difícil erradicação.

Em condições normais, os ovos maduros eclodem após alguns minutos quando submersos em meio líquido (GADELHA; TODA, 1985). As larvas emergem facilmente da rotura do ovo, após o contato dos mesmos com a água. Estas larvas passam por quatro sub-fases de crescimento: L1, L2, L3 e L4 e só então atingem o estágio de pupa, que dura cerca de 24 a 48 horas (CALADO; SILVA, 2002). A passagem de um estágio larval para o próximo é feita pelo processo de muda durante o qual ocorre o desprendimento do exoesqueleto (GADELHA; TODA, 1985). Um fluido é secretado para possibilitar a separação do exoesqueleto da nova cobertura desenvolvida sob o corpo (GADELHA; TODA, 1985). O tempo necessário para a evolução do ovo até o mosquito adulto varia de acordo com a temperatura e com a alimentação da larva. Em condições favoráveis este período não excede 10 dias (GADELHA; TODA, 1985).

Após a eclosão, o *A. aegypti* apresenta grande capacidade de colonizar os mais variados tipos de criadouros e, com certeza, existe correlação entre os depósitos preferenciais para sua oviposição e os hábitos de armazenagem de água da população estudada (GADELHA; TODA, 1985; O'GOWER, 1957). A atividade humana, seus hábitos, costumes e tradições somadas a outros fatores, tais como topografia regional, temperatura, umidade e altitude exercem marcada influência nessa distribuição do vetor (GADELHA; TODA, 1985).

Um dos grandes desafios no conhecimento dos hábitos desse vetor encontra-se na determinação dos depósitos preferenciais para sua oviposição. Os depósitos artificiais preferidos para postura dos ovos são aqueles que apresentam superfície de água livre, parede porosa e baixa reflectividade (O'GOWER, 1957).

Em relação à qualidade da água, mostrou-se preferência por meios pouco poluídos; contudo desde que as condições gerais fossem viáveis, tal seletividade se tornava duvidosa (GADELHA; TODA, 1985; O'GOWER, 1957).

Segundo Bezerra, em estudo realizado em Fortaleza, o *A. aegypti* mostrou preferência por depósitos com grande volume de água e maior altura em relação ao solo (BEZERRA, 1999). Os criadouros mais importantes no Vietnã foram caixas d´água de concreto e tinas e, essa importância não diferia durante as estações chuvosas e secas, sendo denominados de depósitos-chave. Estes depósitos-chave foram consistentemente positivos para grande número de larvas durante todo o ano, com um aumento significativo durante a estação chuvosa - 2,23 vezes mais larvas (NAM, 2003).

Trabalho ralizado em Cuba sugere a importância de caixas d´água, tanques de cimento, poços e tinas de concreto (CRUZ; MESA; SAN MARTIN, 2001). Em duas cidades cubanas com condições socioeconômicas diferentes foram descritos 10 tipos de criadouros com focos de *A. aegypti* e uma média de 12 a 13 depósitos com água por cada imóvel e, nas duas situações os tanques estavam entre os depósitos mais infestados (MARQUETTI *et al.*, 1996).

Nas Antilhas Britânicas os depósitos mais usados pelos *A. aegypti* em áreas urbanas foram tanques e cisternas de grande volume utilizadas para armazenamento de água (NATHAN; GIGLIOLI, 1973).

Segundo Chadee, Ward e Novak (1998) buracos de árvores chegaram a representar 19% dos criadouros no Caribe. Já na Índia os depósitos preferenciais foram potes de barro e

vasos de planta (RAY; TANDON, 1999). Na Tailândia estudos realizados por Kittayapong e Strickman (1993) mostraram que dos doze tipos de criadouros identificados com larvas de *A. aegypti*, mais de 56% deles foram representados por potes de barro. Na Argentina os vasos de plantas, potes de barro e bebedouros de animais foram os mais infestados em cerca de 40% dos domicílios visitados (LIBÓRIO *et al.*, 2004). No Rio de Janeiro, mais de 50% dos depósitos infestados foram vasos de planta e vasilhames de plástico (SOUZA-SANTOS, 1999).

Vários trabalhos na literatura mostram que os depósitos predominantes variam de região para região e, principalmente de acordo com as condições de fornecimento de água (BOND *et al.*, 1969; LIMA; ARAGÃO; AMARAL, 1998; PINHEIRO; TADEI, 2002; PEREIRA, 1996).

2.10 Erradicação *versus* Controle

Durante algumas décadas o Brasil acreditou ser possivel a erradicação do *A. aegypti*, em virtude principalmente do sucesso com a erradicação da febre amarela urbana (FRANCO, 1976). Isso ocorreu não apenas no Brasil, mas na América Latina (SOPER, 1965). Essa mudança na postura de erradicação para controle provocou no continente americano uma gradual reinfestação pelo *A. aegypti*.

Discussões calorosas ocorreram acerca de qual a mais adequada política nacional deveria ser adotada, se erradicação ou controle, mas sem haver consenso. Os partidários da erradicação, argumentaram que o sucesso obtido anteriormente credenciava o País na adoção da mesma política e lembraram que no passado com menos tecnologia se logrou êxito.

Entretanto, o intrínseco relacionamento dos problemas de gerenciamento de programas, interrupções e limitações operacionais e técnico-científicas inviabilizam a erradicação. Segundo a 31ª Reunião do Conselho Diretivo da Organização Panamericana da Saúde, em 1985, ocorreu uma importante mudança na política da OPS contrariando a estratégia de erradicação e reconhecendo pela primeira vez a possibilidade de implementação de programas de controle (OPS, 1994).

2.11 Controle do *A. aegypti*

Até o momento, o único elo vulnerável da cadeia de transmissão do dengue é o *A. aegypti*. Portanto, todas as formas de combate à doença estão direcionadas ao controle do vetor, principalmente redução dos potenciais criadouros das formas larvárias e do controle químico. A redução de criadouros é obtida através de um conjunto diversificado de atividades, que entre outras inclui o destino adequado de materiais que possam acumular água e a vedação de depósitos domiciliares (VERONESI, 1985; OPS, 1994; TAUIL, 2001; BRASIL, 2009).

Os tradicionais programas de erradicação baseados na centralização, verticalização e paternalismo que ainda existem em alguns países da América do Sul são ineficazes, principalmente pelos seus altos custos e, na maioria das vezes, não são financiados, nem manejáveis. (WHO, 2002).

Assim existiriam vários motivos para se incentivar o desenvolvimento de outras alternativas de controle, principalmente que associem baixo custo que fossem sustentáveis (SERVICE, 1995; NAM, 2003). Outro aspecto importante que deve ser considerado é o fato de não se levar em conta apenas a ecologia do *A. aegypti*, mas principalmente o significado social dos recipientes para as pessoas e para as residências (NATHAN; KNUDSEN, 1991).

Um dos principais problemas que se enfrentam atualmente na luta contra este vetor é que tradicionalmente, o controle químico tem sido o principal método de controle. Porém o meio ambiente vem sofrendo conseqüências nocivas com a utilização descontrolada de inseticidas que poderão se manifestar nas próximas décadas (OPS, 1984). Existe ainda embora pequeno, um risco de toxidade para o homem e outros animais. Além disso, leva à resistência por seleção, causa à destruição de controladores naturais dos vetores e a contaminação do meio em volta, podendo provocar um desequilíbrio do ecossistema (OPS, 1984).

Um outro aspecto importante que permite a manutenção da infestação vetorial é a dificuldade para o desenvolvimento das intervenções sobre a população de mosquitos que também decorrem de distintos hábitos de vida (DONALÍSIO, 1999). Como exemplos marcantes e antagônicos observam-se que em muitas residências de bairros nobres, por questão de segurança, não se consegue a permissão dos moradores ou síndicos para a atuação intra e peridomiciliar dos agentes de endemias (DONALÍSIO, 1999).

Ainda segundo Donalísio (1999) em algumas áreas de favelas com registros maiores de violências os agentes têm receio de trabalhar ou são impedidos de fazê-lo. Desta forma, as taxas de recusas nessas áreas são muito elevadas, constituindo-se verdadeiras ilhas de difícil intervenção que, não só permanecem infestadas como prejudicam a eliminação do vetor (DONALÍSIO, 1999).

Alternativas de controle legal tem sido pouco implementadas no Brasil, mesmo após ampla revisão do assunto pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Desta forma, o conrole larvário pode estar comprometido em algumas áreas urbanas em virtude das grandes densidades populacionais e produção de inúmeros criadouros para mosquitos vetores de doenças (CHANDRA *et al.*, 2008).

2.11.1 Controle com inseticidas químicos

Agentes químicos têm sido utilizados para o controle do *Aedes* desde a virada do século (OPS, 1984). Durante a primeira campanha contra a febre amarela em Cuba e no Panamá, os criadouros eram tratados com óleo queimado (diesel) e as casas borrifadas com piretrinas (OPS, 1984). Quando as propriedades inseticidas do DDT (dicloro-difeniltricloroetano) foram descobertas nos anos quarenta do século XX, o seu uso tornou-se rapidamente o principal método empregado nas campanhas mundiais de erradicação do *A. aegypti* (OPS, 1991).

Segundo alguns relatos da época a eficiência deste inseticida levou a um otimismo exagerado. Acreditava-se que as doenças transmitidas por insetos, particularmente por mosquitos, poderiam ser erradicadas em poucos anos (OPS, 1994; CHAVARRÍA, 2000). Entretanto, a resistência ao DDT começou a ser detectada no início dos anos 60. Isso levou a pesquisa de vários inseticidas; dentre eles, os organofosforados. Foram desenvolvidos vários outros tendo o Fenthion, o Malathion, o Fenitrothion e o Temephós caído em uso corrente para o controle do *A. aegypti* (OPS, 1984).

Um dos principais problemas que se enfrentam atualmente na luta contra este vetor é que tradicionalmente, o controle químico tem sido o principal método de controle; porém o meio ambiente vem sofrendo conseqüências nocivas com a utilização descontrolada de inseticidas, que poderão se manifestar nas próximas décadas (OPS, 1984).

Entre os fatores negativos associados ao controle químico das populações de *Aedes* temos a falta de especificidade; podendo eliminar além do *Aedes* uma grande variedade de

outros organismos, como seus inimigos naturais, microcrustáceos de água doce, larvas de libélulas e de *toxorhynchites* (DIAS, 1992).

Várias pesquisas são desenvolvidas na área dos inseticidas químicos sintéticos devido a ação rápida e eficiente no controle de larvas de insetos. Entretanto, Arruda, Oliveira e Silva (2003) sugerem que estes larvicidas apresentam alta toxicidade para mamíferos e o meio ambiente.

O tratamento focal consiste na aplicação de um produto larvicida em depósitos com água, para as formas imaturas do mosquito. Atualmente são utilizados pelo Programa Nacional de Controle do Dengue (PNCD) os larvicidas químicos: temefós e outro organfosforado, o difrubenzuron e um outro biológico, com menor poder residual, o *Bacillus thuringiensis israelensis* (BRASIL, 2009). No caso da aplicação espacial de inseticidas para combate ao vetor alado é utilizado o inseticida químico à base de piretróide. Entretanto, a perspectiva de uma longa convivência com o *A. aegypti* deverá levar a racionalização do emprego desses inseticidas.

O controle de vetores em uma concepção atualizada procura contemplar idéias de integração de métodos e estratégias. Entende-se dentro desse princípio que se deve trabalhar racionalmente diversos métodos dentro de um enfoque ecológico. A crescente demanda pela proteção ambiental tem incentivado a busca e adoção de métodos alternativos de controle. Assim, a utilização do controle biológico tem-se mostrado promissora, tanto pela segurança quanto pela eficiência que oferece e, principalmente, por ser alternativa viável economicamente e socialmente desejável.

2.11.2 Controle biológico

O rápido aumento da resistência do *A. aegypti* a vários inseticidas químicos e os possíveis danos causados por eles ao meio ambiente têm resultado na busca de novas alternativas de controle (FREDERICI, 1995).

Tem-se descritos vários mecanismos de atuação de antagonistas para controlar a espécie alvo; destacando-se a competição por alimento e espaço, o microparasitismo, a predação, indução de resistência, dentre outras. A competição mais comum é por nutrientes e espaço. O parasitismo se refere à situação em que um microorganismo parasita o outro e consiste na utilização de patógenos como alimento pelo microorganismo.

Dessa forma então, o controle biológico é baseado no uso de organismos vivos ou seus produtos capazes de predar, competir, eliminar ou parasitar as larvas ou formas aladas do vetor (FREDERICI, 1995). Vários organismos foram testados como potenciais para uso em programas de controle de vetores como nematódeos, fungos, bactérias e protozoários (RAJAGOPALAN, 1981).

O Departamento de Saúde Pública da Universidade da Luisiana, nos Estados Unidos estudou na década de 50 várias possibilidades acerca do uso do controle biológico de mosquitos vetores de doenças. Concluíram à época que poucos pesquisadores poderiam questionar o papel de agentes biológicos ocorrendo naturalmente e regulando populações de mosquitos em seu ambiente natural (CHAPMAN, 1985).

Há uma perspectiva de restringir o uso de agentes químicos no controle do *A. aegypti* em depósitos de água que não podem ser eliminados ou não podem ser manejados (OPS, 1989). A luta contra os mosquitos vetores de doenças está crescendo de forma que se buscam, a cada dia, novas alternativas de controle, principalmente aqueles que empregam agentes biológicos (BORDA; REA; HUERTA, 2001; KUMAR; HWAG, 2006).

2.11.2.1 Extrato Vegetal

Existem estudos buscando alternativas econômicas, eficientes e ecologicamente compatíveis como à utilização de substâncias de origem vegetal; já que parte da literatura sugere um bom potencial para o controle de insetos (DIAS, 1992).

Várias pesquisas são desenvolvidas na área dos inseticidas químicos sintéticos devido a sua ação rápida e eficiente no controle de larvas de insetos; entretanto estes apresentam desvantagens como alta toxicidade para mamíferos e o meio ambiente (ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003).

Plantas brasileiras ricas em óleos essenciais contendo sesquiterpenos abundantes como nerolidol e farnesol, monoterpenos como α e β-pineno, carvona e geraniol e fenilpropanóides como safrol, eugenol e aldeído cinâmico são alternativas interessantes para o controle de larvas de *A. aegypti* (SIMAS *et al.*, 2004).

Cerca de 80 extratos etanólicos de plantas pertencentes a várias famílias foram submetidos a testes biológicos para verificação da atividade sobre larvas de *A. aegypti* (OMENA, 2001). Destes extratos testados foram considerados ativos para larvas de *A. aegypti*, os da: *Annona crassiflora* (casca da raiz, madeira da raiz e caule). *A. glabra*

(semente), *A. muricta* (raiz), *A. squamosa* (folha, raiz e semente), *Derris sp* (raiz), *Erithrina mulungu* (casca do caule) e *Pterodon polygalaeflorus* (semente). O extrato etanólico das sementes do *P. polygalaeflorus* apresentou atividade elevada com uma DL90 de 62,38 ppm (OMENA, 2001).

Trabalho avaliou 30 plantas do cerrado através de prospecção de substâncias larvicidas. Das 30 plantas estudadas a *Magonia pubescens*, o *Paepalanthus speciosa* e a *Copaifera langsdorffii* apresentaram potencial larvicida, contudo o óleo da *Copaifera langsdorffii* foi o larvicida botânico mais promissor para uso no combate ao *A. aegypti*, dentre as espécies de plantas avaliadas (SILVA *et al.*, 2001).

Fernandes *et al.* (2001) realizaram experimento com o objetivo de avaliar, em condições de laboratório e de campo, o efeito inseticida do extrato aquoso de pimento-do-reino. Tanto nos experimentos de laboratório, quanto em campo, o extrato só obteve 100% de letalidade na concentração de 1.000 mg/l. Nos testes de campo, concluiu-se também que quanto maior a concentração do extrato utilizado, menor foi a postura de ovos nas ovitrampas.

Os primeiros estudos fitoquímicos realizados para isolar frações larvicidas da *Magonia pubescens* foram realizados por Silva *et al.* (2004), onde foram realizados 5 bioensaios para determinar CL_{50} de CL_{90} em condições de laboratório. Foi identificado 3,1 e 36,6 ppm, respectivamente (SILVA *et al.*, 2004). Arruda, Oliveira e Silva (2003) realizaram trabalho com o objetivo de confirmar seu potencial e elucidar esse aspecto através de estudos histológicos e histoquímicos. Trabalhou com o extrato bruto da casca do caule da planta *Magonia pubescens* no tubo digestivo das larvas de 3º estágio. As alterações tóxicas foram observadas principalmente a nível do mesêntero e a partir de 4 horas de exposição. Quanto maior o tempo de exposição ao extrato maior foi o efeito nas estruturas internas das larvas confirmando o potencial deste extrato e evidenciando seu mecanismo de ação.

Trabalho de Simas *et al.* (2004) mostra a importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade larvicida em *A. aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas. Também foi observada a menor atividade de fenilpropanóides contendo núcleos benzênicos que possuem substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxola.

Trabalho de Furtado *et al.* (2005) mostraram que o óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker induziu a maior atividade larvicida, com CL50 de 15,9 mg/ml e CL90 de 28,5 mg/ml., enquanto o de *O. gratissimum L*. apresentou a menor atividade com CL50 de 95,80

mg/ml e CL90 de 102,86 mg/ml. Com isso, os resultados indicam que dentre os óleos essenciais avaliados, o de *V. arborea*, são compostos por substâncias com efeito larvicida contra *A. aegypti* (FURTADO *et al.*, 2005).

Trevisan *et al.* (2006) descrevem os resultados experimentais das atividades anticolinesterásica e larvicida de extratos de três espécies do gênero *Kalanchoe* e de flavonóides glicosilados isolados do extrato acetato de etila (AcOEt) de *K. brasiliensis*. Das três espécies testadas, a *K. brasiliensis* apresentou os resultados mais satisfatórios, o que justificou a seleção do extrato AcOEt para o fracionamento bio-guiado. O estudo do extrato AcOEt, que inibiu a enzima em 100%, apresentando resultado positivo em CCD e potencial larvicida com DL50< 250 ppm, levou ao isolamento da mistura dos flavonóides ativos: 3,7-di-*O*-α-Lraminopiranosíl 8-metoxiquercetina (9) e 3,7-di-*O*-raminosil 8-metoxikanferol. Apesar de inibir a enzima acetilcolinesterase, a mistura destes flavonóides não apresentou atividade larvicida na concentração de 50 ppm (TREVISAN *et al.*, 2006).

A atividade inseticida de *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) em insetos de importância agrícola tem sido extensivamente avaliada. Contudo, a possibilidade de uso desta planta no controle de insetos de importância médica é pouco estudada. O extrato de frutos maduros de *Melia azedarach* é mais eficiente do que frutos verdes, para o controle de larvas de *A. aegypti*. (PROPHIRO *et al.*, 2008).

Embora existam muitos relatos na literatura mostrando a atividade inseticida de óleos essenciais, poucos discutem a relação estrutura x atividade biológica de seus constituintes. Do ponto de vista comercial esta informação é importante, pois a viabilidade econômica para a obtenção de um extrato é muito maior quando comparada a uma substância pura. Além disso, grande parte dos trabalhos apresenta limitações para utilização em larga escala, em depósitos domiciliares, em virtude das altas concentrações necessárias.

2.11.2.2 Bactérias e fungos

Dentre os agentes de controle biológico em utilização em todo o mundo, os bacilos entomopatogênicos apresentam especial importância. A primeira menção à doenças em insetos causadas por este tipo de bactéria entomopatogênica data de 1902, quando Ishiwata, no Japão, descreveu uma bactéria esporulante que causava mortalidade em bicho da seda (*Bombix mori*).

Em 1911 na Alemanha Berliner descreveu o mesmo tipo de bactéria atuando sobre as traças da farinha (*Anagasta kuhniella*) e, em 1915 a denominou de *Bacillus thuringiensis*. Em 1977 e em 1983 ocorreram descobertas marcantes, que ampliaram o espectro de utilização dos bacilos entomopatogênicos. No primeiro caso, Golbert e Margalit (1977) trabalhando com solos de Israel, encontraram uma estirpe de *B. thuringiensis,* efetiva contra dípteros (culicídeos e simulídeos) que logo chamou a atenção por sua elevada potência larvicida e que foi batizada como *Bacillus thuringiensis subesp.israelensis* (DIAS, 1992).

Produtos a base de *Bacillus thuringiensis* são comercializados há mais de 50 anos, com um mercado estimado em mais de 80 milhões de dólares ao ano (OPS, 1984). Previa-se que esta utilização poderia aumentar, seguindo à tendência mundial de diminuição do uso de inseticidas químicos; na medida em que legislações de proteção ambiental mais rigorosas fossem adotadas e produtos mais eficientes e baratos fossem sendo lançados e aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OPS, 1984).

Vários trabalhos já foram escritos no Brasil sugerindo a efetividade dos produtos a base de *Bacillus thuringiensis* para controle de larvas de culicídios nos mais variados habitats e nas mais varias formulações (LAGO, 1986; SUAREZ, 1987; ANDRADE, 1991; MELO-SANTOS, 2001).

Segundo Luz (2001) existem diferenças significativas na duração do efeito residual quando comparadas formulações aquosas e granuladas e principalmente de marcas comerciais diferentes. Além disso, a ação da luz interfere significativamente para reduzir este efeito larvicida (LUZ, 2001; REGAZZI, 2005).

Polanczyk, Garcia e Alves (2003) acredita que o *Bti* pode ser uma alternativa efetiva de controle devido a vantagens como segurança humana e baixo potencial de seleção de resistência.

Pontes *el al.* (2005) mostraram a maior eficácia de duas apresentações de temefós sobre outras apresentações comerciais do *Bacillus thuringiensis israelensis,* mesmo em uma situação epidemiológica de longa exposição ao produto e com renovação de água dos recipientes (PONTES *et al.*, 2005).

Trabalho realizado no Ceará em 2006 mostrou que todas as populações de mosquitos experimentados apresentaram resistência ao temefós, com razões de resistência variando entre 8 e 16. Esses achados reforçam as evidências anteriores sobre a disseminação de resistência

ao temefós em diferentes localidades do Estado submetidas a grande pressão de controle nas últimas décadas (LIMA *et al.,* 2006).

No entanto, segundo Dias (1992) existiriam, pelo menos, três causas que poderiam ser imediatamente apontadas como fortes limitantes para a utilização dos inseticidas bacterianos em grande escala. A primeira diz respeito aos custos, ainda elevados de produção, que se refletem em custos de utilização. Outra causa aparente para a baixa utilização é a sua especificidade, o que para a preservação do ambiente é uma grande vantagem. E um terceiro aspecto, também importante, é a baixa persistência do efeito larvicida dos produtos quando usados em campo, devido a influências ambientais, tais como temperatura, exposição ao sol, excessiva renovação de água, dentre outras (DIAS, 1992).

2.11.2.3 *Copépodes*

Nos últimos anos foram realizados vários estudos sobre o uso de copépodos (*Copepoda: Cyclopoidae*) como predadores de larvas de *A. aegypti* indicando que estes animais teriam um potencial grande para o controle de mosquitos em várias regiões do mundo (DIAS, 1992; SCHAPER; HÉRNANDEZ; SOTO, 1998).

No ano de 1989 estudo experimental em 26 províncias do Vietnam foi descrita a capacidade de predação do *Mesocyclops (copepoda) micronecta (corixidae)* em beckers de 500 ml (NAM *et al.,* 2000).

Estudo realizado em condições de laboratório no Ceará demonstrou que quatro diferentes espécies de *Mesocyclops* apresentavam potencial para serem utilizados como alternativa de controle biológico em alguns reservatórios domésticos (KAY *et al.,* 1992).

Foi realizado um levantamento das espécies de Copépodes no Estado de São Paulo com o objetivo de descrever as espécies existentes e os que apresentavam potencial como predador de larvas de *A. aegypti* e *albopictus*. Coletaram-se amostras de 11 reservatórios naturais onde foi possível identificar as seguintes espécies de ciclopídeos: *Metacyclops mendocinus, Tropocyclops prasinus, Eucyclps sp, Eucyclops serrulatus, Eucyclops solitarius, Eucyclops ensifer, Macrocyclops albidus var. albidus e Mesocyclops longisetus var. longisetus*. Todas estas espécies tiveram seu potencial larvófago avaliado e esta capacidade variou de zero a 97,3%, em condições de laboratório. A espécie que apresentou maior capacidade foi o *Mesocyclops longisetus var. longisetus* e em segundo lugar o *Macrocyclops albidus var. albidus.* A partir destes resultados o estudo sugeriu ainda que os copépodes

poderiam ser utilizados como controladores de mosquitos em larvitrampas (SANTOS; ANDRADE, 1997).

Schaper, Hérnandez e Soto (1998) realizaram inquéritos para identificar o gênero de Copépode mais comumente encontrado em rios e lagoas da Costa Rica e avaliar sua capacidade predatória para larvas de *A. aegypti*. A espécie mais encontrada foi o *Mesocyclops thermocyclopoides* que se mostrou capaz de predar sete larvas por dia. Além disso, foi possível identificar que os copépodes lesionavam as larvas nos seus segmentos abdominais e sifão respiratório (SCHAPER; HÉRNANDEZ; SOTO, 1998).

Martinez-Ibara *et al*. (2002), entretanto, relata que no México a população apresentou uma certa rejeição por essa alternativa de controle em virtude dos organismos utilizados não serem tão atrativos e lembrarem “baratas”.

2.11.2.4 Peixes larvófagos

No controle de insetos vetores de doenças, tais como malária, febre amarela e dengue, os peixes larvófagos vêm sendo utilizados no mundo há muito tempo, principalmente nos criadouros naturais destes insetos (OPS, 1984; ROJAS *et al.*, 2004). Segundo Gerberich *et al.* (1985), mais de 250 espécies de peixes já foram testados em laboratório como alternativa de controle de insetos no mundo.

Esta técnica teria sido introduzida pelos chineses durante no ano de 1905 e foi utilizada por tribos indígenas da América Central que observaram que nos depósitos que tinham peixes não existiam larvas. Essa talvez tenha sido a primeira descrição do uso de peixes larvófagos em larga escala para controle de larvas de mosquitos em depósitos para acúmulo de água (MOLLOY, 1924).

Alguns ictiologistas têm visto com preocupação a utilização de peixes em habitats naturais, onde eles não são nativos, em virtude do possível dano potencial para estes ecossistemas. Quando se iniciou o uso de peixes para controle de mosquitos alguns especialistas chegaram a desincentivar, pois além do risco para o ecossistema ele também poderia esgotar os inimigos naturais dos mosquitos (RUPP, 1996).

Para a Organização Mundial da Saúde (2003) existem algumas características para uma espécie de peixe ser considerada como potencial para controle biológico. Destaca-se preferência por predar larvas de mosquitos, ser de tamanho reduzido, ter o corpo alongado, ter

agilidade, alta fecundidade, resistir bem ao transporte e armazenamento e não ser utilizada comercialmente como alternativa para alimentação humana (OPS, 1994).

Há ainda como pré-requisitos de um bom peixe larvófago a preferência alimentar por larvas, ser de pequeno porte, ter agilidade, ser resistente ao confinamento, tolerante a altas temperaturas e variados níveis de pH, ser encontrado facilmente e apresentar grande capacidade de locomoção (VARGAS, 2003).

Além da capacidade larvófagaé importante também o custo de aquisição, a disponibilidade durante todo o ano, facilidade de reprodução em cativeiro, resistência às condições ambientais, capacidade de esconder-se de humanos e predadores, resistência a fungos e bactérias e acentuado dimorfismo sexual (VALERO *et al.,* 2006).

Características como agressividade, grande cobertura da área alagada, tamanho reduzido, olhos grandes e boca virada para cima foram consideradas características para peixes larvófagos (SHARMA, 1994).

Para se utilizar com êxito peixes larvófagos como alternativa de controle biológico de mosquitos deve-se conhecer, além dos fatores citados anteriormente, sua biologia (KOLDENKOVA; ÁVILA, 1991, HERNANDEZ CONTRERAS *et al.,* 2005). Segundo Chandra *et al* (2008) para que se alcance um controle eficiente e aceitável é preciso além dos fatores acima relacionados, conhecimentos sobre o peixe a ser Utilizado e sua interação com outros organismos locais para evitar efeitos indesejáveis.

O fato de serem utilizadas espécies locais ou exóticas está diretamente relacionado às condições de cada país. Acredita-se ainda que as espécies nativas apresentam mais vantagens devido adaptação as condições locais. De certa forma, isto sugere que caso as espécies exóticas se adaptem bem as condições locais não haveria problemas para sua utilização, desde que não fossem introduzidos em reservatórios naturais (NENG *et al.,* 1985; OPS, 1994).

O controle de mosquitos utilizando peixes larvófagos se encontra entre os métodos biológicos que menos causam danos ao ecossistema, desde que utilizados de forma adequada e respeitando o ambiente e a diversidade biológica local (HERNANDEZ CONTRERAS *et al.,* 2005).

Capacidade larvófaga é a medida do número de larvas consumidas por determinada espécie de peixe no intervalo de 24 horas; enquanto o potencial larvófago nada mais é do que a propriedade que alguns peixes possuem de incluir na sua dieta estágios imaturos de

mosquitos (HERNANDEZ CONTRERAS *et al.*, 2005). Ainda segundo esse mesmo autor, bons peixes larvófagos avançam sob as larvas logo que são percebidas nos reservatório e geralmente a capacidade larvófaga está diretamente ligada ao tamanho e sexo desses peixes.

Dentre os peixes larvófagos utilizados no mundo, nas últimas décadas, destacam-se algumas espécies de aquário tais como o peixe mosquito (*Gambusia affinis*) e o Gulpe (*Poecilia reticulata*).

Em 1908 e 1928 o *Poecilia reticulata* e o *Gambusia affinis (Guppie)*, respectivamente foram introduzidos para o controle de vetores em algumas regiões da Índia. Devido o seu sucesso foi realizado estudo para identificar peixes locais com potencial larvófago (HAQ *et al.*, 1993). Esse mesmo tipo de experimento foi repetido em vários outros países (JAYASREE; PANICKER, 1992; FLETCHER *et al.*, 1993; GENE *et al.*, 1999; BORDA; REA; HUERTA, 2001).

Segundo Garcia *et al*, em algumas cidades Cubanas foram introduzidos *Poecilias* em lagoas para controle de *Culex quinquefasciatus* e após 2,5 meses não havia mais a presença de mosquitos e os peixes haviam se reproduzido suficientemente para que fossem removidos para outros lugares.

Elias (1995) através de estudo em laboratório, utilizando larvas de *Culex* de 3º estágio, determina que o *Poecilia reticulata* tem capacidade de predar 41 larvas por dia, variando entre 54,9 para fêmeas e 27,0 para os machos. Esse mesmo autor relata ainda que quanto mais elevada a temperatura da água, maior foi a capacidade larvófaga da espécie (ELIAS *et al.*, 1995).

Dua *et al.* (2007) observaram diferença significativa entre a predação do *Poecilia reticulata* em água potável e poluída; podendo ser confirmado através da identificação de plâncton no conteúdo estomacal dos espécimens.

Seng *et al.* (2008) em um experimento de campo realizado no Cambodgia mostraram que o *Poecilia reticulata* foi capaz de reduzir a infestação de *A. aegypti* em tanques e que o uso dessa espécie foi bem aceito pela comunidade local, considerando assim a estratégia efetiva, eficiente e bastante promissora em virtude da não utilização de larvicidas químicos.

O *Poecilia reticulata* também foi avaliado em Cuba para uso em 458 tanques que acumulavam água da chuva demonstrando bons resultados (HERNANDEZ HERNANDEZ; MARQUES PINA, 2006).

Estudo realizado por Koldenkova *et al.* (1989) em Cuba demonstraram que mesmo alevinos bastante jovens de *Poecilia reticulata* foram capazes de atuar como biorreguladores de larvas de mosquitos em ambientes naturais. Outro trabalho realizado em campo no município de Taguasco, Cuba demonstrou que essa espécie poderia ser utilizada em tanques que acumulavam água de chuva, sendo inclusive muito bem recebido pela comunidade local (HERNANDEZ HERNANDEZ; MARQUES PINA, 2006).

Lardeux *et al.* (2002) realizaram experimento em duas cidades da Polinésia para avaliar a possibilidade de controle de larvas de mosquitos por um período de 6 meses sem intervenções adicionais. A utilização do *Poecilia reticulata* foi considerada satisfatória em grande parte dos reservatórios (lagoas e grandes poços), onde ele se adaptou rapidamente e proliferava sistematicamente eliminando as larvas (LARDEUX *et al.*, 2002).

Os inseticidas utilizados comumente pelos programas de controle de vetores são letais para os *Poecilias* e este mesmo autor sugere o uso integrado do *Poecilia reticulata* com bioinseticidas como o *Bacillus thuringiensis israelensis* H-14, por apresentarem uma toxicidade muito baixa DL_{50}>100mg/litro (MITTAL; ADAK; SHARMA, 1994).

O potencial larvófago de algumas espécies de peixes pode ser diminuída na presença de outras prezas. Esse autor avaliou a capacidade de predação de larvas de *Culex quinquefasciatus* pelo peixe *Poecilia reticulata* na presença de larvas de *Chironomidae* (*Insecta: Diptera*) e *tubicicid worms* (*Tubificidae, Oligochaeta*). Utilizou aquários contendo 25 litros de água e para cada lote de testes foi repetido 20 vezes. O consumo de larvas (65-84) variou de forma significativa ($p<0,001$) entre os peixes de tamanhos diferentes e principalmente naqueles depósitos com a presença das outras prezas ($p<0,05$). Esse mesmo autor concluiu que mesmo apresentando potencial larvófago, o *Poecilia reticulata* manifesta baixa preferência alimentar por larvas de *Culex quinquefasciatus*. Isso reduz sua capacidade quando utilizado em reservatórios com a presença de outras alternativas alimentares (MANNA; ADITYA; BANERJEE, 2008).

Outra espécie que tem se destacado é o peixe mosquito (*Gambusia affinis*). O *G. affinis* tem sido utilizado como alternativa de controle biológico para mosquitos vetores da malária em áreas urbanas da Índia há muito tempo. No entanto, até 1997 havia poucos trabalhos que relatassem à verdadeira operacionalização do uso do *Gambusia* em depósitos domiciliares.

Em 1997, Sharma se propôs a determinar a capacidade e a eficácia do *Gambusia* como controle de vetores em vários tipos de depósito que acumulassem água. Sua utilização não mostrou-se tão eficiente em reservatórios como: covas, barris, tambores e drenos. No entanto, foi observado que em tanques e poços reduziu em 100% a densidade larvária de *Anofelíneos* e *Culicídeos*, após a terceira semana da sua implantação (SHARMA *et al.*, 1997).

Dixit, Sachdeva e Varma (1981) experimentaram o uso do *Gambusia affinis* em tanques construídos com diferentes materiais, tamanhos e proporção de peixes distintas chegando a conclusão de que essa espécie poderia ser utilizada de forma efetiva nesses depósitos. Nesse mesmo trabalho ele identificou nesses tanques a presença de diatomáceas, euglenas, paramécios e acinárias; em um pH variando entre 6 a 8.

Trabalho realizado por Bheema *et al.* (1982) comprovaram a capacidade do *Gambusia affinis* em grandes covas na Casuarina, principalmente em situações com a presença de poucas algas e incidência direta de luz solar. Sugere ainda nesse mesmo trabalho que o custo dessa implementação seria desprezível se a comunidade local adotasse essa alternativa, dispensando a visita mensal do agente sanitário.

Mathur, Rahman e Wattal (1981) realizaram um experimento para comparar a eficácia da utilização do *Gambusia affinis* isoladamente e em consórcio com o larvicida Temefós. Isoladamente os peixes mantiveram a redução larvária por 4 semanas. Essa reduzida eficiência foi atribuída a grande quantidade de plantas aquáticas, zoo-plâncton, e a poluição da água. O experimento mostrou ainda que quando utilizado em combinação com o larvicida apresentava maior eficiência. Entretanto, sugeria a aplicação semanal de larvicida, devido a grande poluição das águas.

O *Gambusia affinis*, que é nativo nos Estados Unidos tem sido introduzido na América do Norte e em regiões sub-tropicais como alternativa para uso em controle de larvas de insetos. Em algumas cidades dos Estados Unidos ele vinha sendo utilizado a despeito da existência de outras espécies nativas de peixes. Desta forma, Nelson e Keenan (1992) realizou estudo buscando comparar o potencial de uso do peixe do gênero *Fundulus* (família: *Cyprinodontidae*) que se encontrava disperso nas lagoas da região com o *Gambusia affinis*, que havia sido introduzido há vários anos em algumas lagoas. Ambas as espécies apresentaram capacidade de controlar larvas de mosquitos não mostrando diferenças estatísticas significantes (NELSON; KEENAN, 1992).

Outra espécie de *Gambusia* com potencial larvófago é o *Gambusia holbrooki.* Essa espécie foi utilizada no início do século tanto no Hawai como nas Filipinas, sendo considerada uma boa alternativa em consórcio com piretróides. Na época foram utilizados cerca 50 peixes/m^2 (RODOLFO *et al.*, 1997).

A dificuldade de estocagem do *Gambusia affinis* na Califórnia, devido à baixa temperatura da água e a limitação dessa espécie a esse fator ambiental tem favorecido a utilização da espécie *Orthodon microlepidotus* na proporção de 5 a 16 peixes/m^3 (CECH Jr; LINDEN, 1987).

Na Nicarágua, além das espécies *Gambusia affinis* e o *Heterandia formosa*, ambas encontradas largamente em lagos e lagoas da região, foi utilizada a espécie *Poecilia sphenops* (conhecida localmente como Olomina), que se mostrava bastante resistente ao transporte entre regiões. Essa espécie apresentou uma grande voracidade chegando a comer em torno de 200 larvas, reproduzindo-se com grande facilidade em reservatórios naturais. Molloy destacou ainda o fato de os técnicos locais colocarem os peixes em aquários para demonstração, fato esse que aumentou significativamente a aceitação da população (MOLLOY, 1924).

No início da década de 70, Legner e Medved (1974) testaram algumas espécies do gênero *Cyprinodon* para que fossem utilizadas em substituição ao *Gambusia* em algumas regiões, sugerindo a utilização de quatro fêmeas para cada macho.

O *Aplocheilichthys normani* apresenta preferência por se alimentar, em ordem decrescente, de larvas *Aedes*, *Anopheles* e de *Culex*, tendo sido considerado com bom potencial para controle de larvas de A. aegypti em países da África Ocidental (ROMAND, 1985).

Foi esclarecido que o uso de espécies nativas como o *Clarias fuscus* na Costa da China em depósitos para acúmulo de água foi capaz de reduzir a infestação pelo *A. aegypti*, apresentando-se uma estratégia custo-efetiva. Esse trabalho sugere ainda que o uso de espécies nativas pode apresentar melhores resultados em virtude da melhor adaptação dos peixes ao clima e condições da região (OPS, 1994).

Posteriormente, esse mesmo autor desenvolveu um estudo experimental de campo em oito cidades da Costa para avaliar seu potencial de utilização em larga escala. O estudo foi feito entre os anos de 1981 e 1982 e foram colocados peixes em 1324 depósitos, com 1408 servindo como controle. Não foi encontrada nenhuma larva nos depósitos com peixes,

enquanto nos depósitos controle foram encontrados 43 com larvas de mosquitos, gerando um índice de infestação de 3,5%. Neng *et al.* (1987) sugeriram ainda que o uso de peixes apresentava um custo 15 vezes inferior a utilização de controle químico tradicional.

Neng *et al.* (1987) desenvolveram um estudo no sentido de determinar a capacidade predatória da espécie *Clarias fuscus* (Chinese cat fish) e seu potencial para utilização em larga escala, já que esta espécie encontrava-se amplamente distribuída na região e mostrava-se bastante resistente a concentrações de cloro de até 4 mg/l. Um espécimen pesando entre 4 e 6 gramas foi capaz de predar 227 larvas de 4º estágio em 24 horas.

Foi realizado um estudo na região de Kerala, na Índia, onde foram coletados 34 espécies para serem testadas quanto ao seu potencial larvófago. Destas espécies apenas 10 (*Macropodus cupanus, Ophiocephalus striatus, Tilapia mossanbica, Anabas testudineus, Etroplus maculatus, Etroplus suratensis, Trichogaster tricopteros, Amblypharyngodon microlepis, Aplocheilus lineatus e Osphronemus goramy)* apresentaram potencial larvófago significativo. Os peixes foram coletados de ambientes naturais (lagos e canais) e acondicionados separadamente em laboratório para aclimatação por um período de 24 horas. Em cada balde foi colocada 1.000 larvas de 4º estágio, 5 plantas para servir de esconderijo para larvas e um espécime do peixe a ser testado. Após 24 horas as larvas eram retiradas e contadas. A espécie com maior capacidade predatória foi o *Tilapia mossambica* com 512 larvas de *mansonia* e o menor foi o *Amblypharyngodon microlepis* com 118 larvas. Entretanto quando foi dividido a capacidade predatória pelo peso e tamanho o maior consumo foi do *Ophiocephalus striatus* com 354 larvas/grama de peixe/dia e em segundo o *Macropodus cupanus* com 231 larvas/grama de peixe/dia. O *Trichogaster trichopteros* apresentou capacidade de predar 139 larvas de *Culex*. Jayasree e Panicker (1992) sugeriram que a espécie *Macropodus cupanus* foi a mais indicada como agente biocontrolador de larvas de *Mansonia* nesta região da Índia.

Outra espécie de peixe o *Aphanius dispar (Cyprinodontidae)* é encontrado na África, Arábia e Golfo Pérsico. Tolera elevadas temperaturas, salinidade e poluição e é onívoro, com destacada preferência alimentar por larvas de insetos. Quando adulto apresenta tamanho variando entre 3,2cm e 5,2cm e pesa 0,6g a 1,5g. Trabalhos de Fletcher, Teklehaimanot e Yemane (1992) mostraram que essa espécie é capaz de predar cerca de 207 larvas de *Anopheles* por dia. Este mesmo autor comprovou a efetividade de seu uso em poços e cisternas, reduzindo a infestação de 3,8% para 0,5%. Entretanto, foram utilizados aproximadamente 20 peixes por depósito, sendo necessária uma reposição mensal de 30% dos

peixes (FLETCHER; TEKLEHAIMANOT; YEMANE, 1992). Frenkel e Goren (1997) mostrou ainda que essa espécie sobrevive a variações de temperatura da água entre 18º e 37ºC, com uma pequena diminuição da reprodução nos extremos de temperatura (FRENKEL; GOREN, 1997).

Em virtude desse sucesso do uso de algumas espécies de peixes larvófagos Haq *et al.* (1993) realizaram um levantamento dos peixes existentes em outra região da Índia que apresentavam potencial para uso em controle de vetores. A captura ocorreu nos anos de 1986 e 87 em todos os rios e lagoas da região. Foram coletadas 35 espécies. Embora 24 das 35 espécies capturadas se alimentassem de larvas, muitas não foram recomendadas devido ao tamanho e capacidade de adaptação aos depósitos domiciliares. As espécies que apresentaram maior potencial larvófago foram o *Chela bacaila, o Puntios stigma, Rasbora daniconius, Colisa fasciatus e o Danio sp;* todos variando entre 2,5 a 6 centímetros de comprimento. Todas as espécies diminuíram a capacidade de predação quando foi introduzido plâncton nos depósitos e algumas apresentaram predileção por algum estágio larvar. No período invernoso a predação decresceu para todas as espécies, devido à baixa temperatura das águas e nenhum deles apresentava características de canibalismo o que favorecia seu armazenamento (HAQ *et al.*, 1993).

Foi realizado por Fletcher *et al.* (1993) na Etiópia estudo entre os anos de 1985 e 1990 com os mesmos objetivos de Haq. Todos os reservatórios naturais, tanto permanentes como temporários foram investigados. Foram identificadas 11 espécies larvófagas, das quais 5 já haviam sido reportadas anteriormente. As espécies foram *Alestes affinis, Aplocheilichtys antinorii, Alestes macrolepidotus, Aphanius dispar, Aplocheilichtys loati, Epiplatys spilargyreius, Micralestes sp., Nannaethiops unitaeniatus, Nothobranchius sp., Oreochromis niloticus, Oreochromis spilurus spilurus*. Todos foram eficientes predadores de larvas de 4º estágio de *Anopheles* em condições de laboratório. A média de larvas predadas foi calculada em 4 dias consecutivos. Embora todos tenham se mostrado eficientes predadores, situações como a presença de plantas aquáticas diminuiríam essa capacidade em condições naturais.

Segundo experimento realizado por Sharma, nos anos de 1978 a 1980, foram estudadas 28 espécies de peixes encontrados na cidade de Haryana, que poderiam apresentar potencial larvófago. Eles foram agrupados de acordo com o comportamento e a área que ocupavam dentro da água; além de algumas características como; tamanho, olhos bem desenvolvidos e posição da boca. Foram classificados como predadores de superfície, próximos à superfície, toda a área e predadores de fundo. Dos 28 peixes estudados, 8 foram

classificadas como predadores moderados de larvas e outras 16 espécies apresentaram baixa ou nenhuma voracidade à larvas de mosquitos. As 4 espécies que apresentaram alto potencial para serem predadores de larvas de mosquitos foram o *Puntios ticto, Colisa fasciata, Aplocheilus panchax* e *Rasbora daniconius* (SHARMA, 1994).

Takagi *et al*. (1995) testaram na Costa da Indonésia as espécies *Tilápias sp* e *Ophiocephalus sp* em tanques de psicultura. O melhor resultado foi observado com as Tilápias sendo capazes de reduzir 95% da infestação de larvas de mosquitos. Esse autor sugeriu ainda que fosse monitorada a sobrevivência dos peixes mensalmente e destacou também o baixo custo dessa alternativa.

Kumar *et al.* (1998) estudou a possibilidade de uso em consórcio do *Bacillus thuringiensis israelensis* e da espécie de peixe *Aplocheilus blocki* na Índia. Foram utilizados mais de 60.000 peixes em 2.556 poços, 173 tanques de grande volume e em 7 fontes e piscinas; com uma proporção média de 5 peixes/m^2 de área. A infestação no período estudado entre 1994 e 1995 decresceu significativamente e o uso do *Bti* em consórcio com o peixe *Aplocheilus blocki* contribuiu para uma redução mais acentuada da infestação.

A partir de um convênio do Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri com o Centro Nacional de Parasitologia e Enfermidades Tropicais da Argentina, no ano de 1998 foi possível identificar três espécies de peixes autóctones na Argentina que apresentaram elevada capacidade predatória em condições de laboratório. As espécies testadas foram o *Astyanax bimaculatus* (25 a 65mm), o *Pyrrhulina australis* (62mm) e o *Gymnogeophagus australis* (28 a 59mm). Estas espécies foram capazes de predar uma média de 655, 184 e 285 larvas, respectivamente (GENE *et al.*, 1999).

Russel demonstrou em condições de laboratório na cidade de Queensland que o *Craterocephalus stercusmuscarum* não apresenta bom potencial para ser utilizado como alternativa de controle biológico devido principalmente a pouca capacidade de sobrevivência ao transporte entre duas áreas distintas. Os que sobrevivem a esse transporte não ultrapassam 17 dias no laboratório, impondo limitações operacionais a utilização desta espécie. Já o *Melanotaenia s. splendida* apresentou bom potencial predatório demonstrando ser um promissor agente de controle biológico de larvas em poços (RUSSEL, 2001).

Na cidade de Corrientes, também na Argentina, foi realizado experimento com o mesmo objetivo, de identificar peixes autóctones capazes de predar larvas de mosquitos (*Gymnogeophagus brasiliensis* e o *Cheirodon piaba*). A cada dia de experimento se

aumentava o número de larvas concluindo no final dos testes que a espécie *G. brasiliensis*, que media aproximadamente 118 milímetros foi capaz de predar uma média de 630 larvas; enquanto a espécie *C. piaba* (20 mm) predou apenas 27 larvas de *Culex* por dia (BORDA; REA; HUERTA, 2001).

Em algumas cidades Mexicanas, em virtude da intermitência no fornecimento de água é necessário seu acúmulo em tanques de cimento. Desta forma, Martinez-Ibara *et al.* (2002) desenvolveram um estudo no sentido de testar o potencial larvófago de peixes nativos nesses reservatórios. Foram testadas 5 espécies de peixes, encontrados facilmente na região: *Lepisosteus tropicus (Lepisosteiformes: Lepisosteidae); Astyanax fasciatus (Cypriniformes: Characinidae); Brycon guatemalensis (Cypriniformes: characinidae); Ictalurus meridionalis (Cypriniformes: ictaluridae) e Poecilia sphenops (Cyprinodontiformes: Poecilidae*). Foram utilizados 1 *L. tropicus,* 10 *A. fasciatus*, 10 *B. guatemalensis*, 10 *P. sphenops*; e 2 *I. meridionalis* para cada tanque, sendo repostos quando morriam. Em nenhum tanque com peixe foi detectado a presença de larvas, com uma infestação média nos tanques controle de 80% (MARTINEZ-IBARA *et al.*, 2002).

Na Somália, três espécies de peixes larvófagos foram descritas, entretanto o mais comum é da família das Tilápias o *Oreochromis spilurus spilurus*. Foi realizado um trabalho para determinar a resistência dessa espécie ao cloro e sua capacidade larvófaga em condições de laboratório e em campo. Após um período de 30 minutos de exposição ao cloro com concentração de 1,5 e 2,0mg/L os peixes mostraram-se bastante “irritados” e após 2 horas a letalidade foi de 100% na concentração de 2,0mg/L. Em 3 horas a concentração de 1,5mg/L também foi 100% letal. Nos testes de predação, em condições de laboratório, a média de predação foi de 90%, variando entre 83% e 99%. Na parte de campo foram introduzidos peixes em 25 tanques e a maior redução foi de 78,6% do número de larvas e a menor foi de 16,5% com uma média de 52,8%. Os peixes testados pesavam entre 24 e 34,1 gramas. Quando esse mesmo autor avaliou a receptividade da comunidade local ao uso de peixes como alternativa de controle para mosquitos observou uma aceitação de 83% (MOHAMED, 2003).

No Brasil, segundo o artigo 13 da portaria nº 1.469 de 29 de dezembro de 2002 e portaria nº 518, de 25 de março de 2004, os depósitos que acumulam água devem conter, após uma desinfecção, um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5mg/Litro, sendo obrigatória a manutenção de no mínimo 0,2mg/Litro. O teor máximo de cloro residual livre deve ser de 2,0mg/Litro. A Companhia de Água e Esgoto de Fortaleza realiza anualmente coleta de água

em vários pontos da rede de abastecimento para avaliação do cloro residual. Dados de 2007 revelam que em 8.000 amostras analisadas a variação do cloro foi de 0,55 a 1,83mg/L (CAGECE, 2007).

Na região Oriental do Mediterrâneo, em aproximadamente 20 países, foram identificadas espécies nativas com potencial para serem utilizadas como alternativa de controle biológico de larvas de mosquitos destacando-se o *Aphanius dispar, Aplocheilus panchax, Aplocheilus blockii, Aplocheilus lineatus, Nothobranchius patrizii, Nothobranchius cyaneus, Nothobranchius guentery, Nothobranchius microlepis, Oreochromis spilurus spilurus, Oreochromis niloticus, Oreochromis zillii, Puntios ticto, Puntios sophore, Rasbora daniconius*. Além destas espécies, alguns peixes exóticos foram introduzidos como o *Gambusia affinis, Gambusia holbrooki* e o *Poecilia reticulata*.

Segundo Vargas (2003), na Costa Rica alguns peixes da família *Poecilidae, Cyprinidae, Cyprinodontidae e Cichilidae* têm sido utilizados. Os gêneros mais comuns são *Gambusia, Tilapia, Poecilia, Fundulus, Gasterosteus, Lucania, Aphanius e Panchax*. Em plantações de arroz o *Gambusia* tem sido a espécie mais utilizada devido à facilidade de adaptação em uma grande variedade de habitats com água salobra, temperaturas variando de muito baixas até 35ºC, pouco teor de oxigênio e procriar com facilidade. A partir de capturas nos lagos da região observou-se outra espécie, o *Priapichthys annectens (Poecilidae)* que demonstrou capacidade larvófaga de predar entre 40 e 85 larvas num período de 1.3 a 2.4 minutos. O *Poecilia gilli (Poecilidae*) é uma das espécies de peixes mais comuns na Costa Rica e a partir de testes de laboratório determinou-se que esta espécie seria capaz de predar até 75 larvas em menos de 15 minutos (VARGAS, 2003).

Trabalho com o mesmo objetivo foi realizado no Sri Lanka por Kusumawathie *et al.* (2006) onde foram identificadas 25 espécies de peixes em cinco grandes rios. Após avaliação da capacidade larvófaga apenas 12 espécies (*Aplocheilus dayi, Danio malabaricus, Esomus thernoicos, Carra ceylonensis, Oreochromis niloticus, Oreochromis mossambicus, Poecilia reticulata, Puntius bimaculatus, Puntius fialmentosus, Puntius vittatus e Rasbora daniconius*) se mostraram predadoras de larvas de Anofelineos. O autor sugeriu ainda que mesmo apresentando capacidade de predar larvas seriam necessários a realização de ouros trabalhos para avaliar o potencial prático de utilização dessas espécies no controle de larvas de mosquitos em rios (KUSUMAWATHIE *et al.,* 2006).

Trabalho realizado no Ceará (2006) com mais de 369.000 larvas, em condições de laboratório, mostrou que as espécies de peixe *Betta splendens, Trichogaster trichopteros,*

Astyanax fasciatus, *Poecilias reticulata* e *Poecilia sphenops* apresentaram bom potencial larvófago com destaque para o *Betta splendens* e *Trichogaster trichopteros* (CAVALCANTI, 2006).

Estudo realizado na Austrália mostra que o uso de peixes é bastante eficiente, entretanto quando esses peixes foram utilizados em consórcio com o larvicida Vectolex WG (Bacillus sphaericus) os resultados foram melhores, pois não permitiram a recolonizaão de insetos nos reservatórios (HURST *et al.*, 2006).

Howard, Zhou e Omlin (2007) testou, em condiçoes de campo, a espécie *Oreochromis niloticus (Perciformes: Cichlidae) (formely Tilapia nilotica).* Os peixes foram introduzidos em tanques abandonados a 1.880m de altitude e depois de seis meses foi avaliado o número de larvas presentes nesses tanques e em outros utilizados como controle. Após 15 semanas os peixes foram capazes de reduzir em 94% de larvas de *Anopheles gambie* e *Anopheles funestus* e, mais de 75% de *Culicideos*. Esse mesmo trabalho relata uma grande aceitação dessa técnica pelas comunidades rurais do Kenya, em virtude de ser essa, uma espécie comum na região (HOWARD; ZHOU; OMLIN, 2007).

Quatro espécies de peixes apresentam bom potencial larvófago, com destaque para o *Betta splendes* e *Poecilia reticulata* (RAISAH; RAMLI, 2007).

O *Ochthera chalybescens* como predador natural de larvas e pupas de mosquitos em condições naturais, não sendo capaz de predar apenas os ovos (MINAKAWA *et al.*, 2007).

Na Califórnia foi descrita a espécie nativa *Arroyo chub,* com potencial viável para utilização em programas integrados de controle de vetores em áreas alagadas nos Estados Unidos (VAN DAM; WALTON, 2007).

Trabalho de Kusumawathie *et al.* (2008) realizado no Sri Lanka comparando o custo-efetividade do uso do peixe *Poecilia reticulata* e o larvicida Temefós para controle de anofelíneos em barragens de rios mostrou que além da redução significativa da densidade larvária o uso dos peixes foi 2,67 vezes mais barato que o do larvicida. Esse mesmo autor conclui ainda que caso a população local se envolva com as ações de controle utilizando peixes larvófagos esse custo poderia ser bastante reduzido (KUSUMAWATHIE *et al.*, 2008).

A maior parte dos trabalhos realizados em condições de campo foram registrados para uso no controle da malária, evidenciando não ser uma estratégia nova, porém um pouco esquecida. Desta forma, Ghosh *et al* sugerem que o uso de peixes seja feito de forma

associada a outros métodos, tornando-o mais efetivo. Além disso, sugere ainda que em ambientes naturais sejam utilizadas técnicas de georreferenciamento para facilitar a supervisão onde foram inseridos os peixes (GHOSH; DASH, 2007).

2.11.2.5 Outras alternativas

Vários organismos foram testados como potenciais para uso em programas de controle de vetores na Índia, tendo sido identificados Nematódeos: *Romanomermis culicivorax, Romanomermis muspratti, Romanomermis iyengari*; fungos: *Coelomomyces, Lagenidium giganteum, Metarrhizium anisopliae, Entomophthora destruens, Culicinomyces clavosporus* e Protozoários: *Nosema algerae, Pleistophora culicis, Stempellia milleri* (RAJAGOPALAN, 1981).

Consoli *et al.* (1984) avaliaram a capacidade predatória do *Helobdella triserialis lineata* (Hirudínea: *Glossiphonidae*) sobre ovos, larvas e pupas de *Aedes fluviatis* e *Culex quinquefasciatus* em condições de laboratório. Determinou a influência da presença desses hirudíneos sobre o comportamento de oviposição das fêmeas das duas espécies de mosquitos. Foi observada predação de larvas e pupas das duas espécies de dípteros e foi estatisticamente significante a diminuição das desovas em depósitos com a presença destes organismos, no caso do *Culex* (CONSOLI *et al.*, 1984).

Existe susceptibilidade do *Aedes* ao parasito *Romanomermis culicivorax*, principalmente nos estágios larvários mais novos. Em experimentos realizados tanto de laboratório quanto de campo, sugerem que este parasita poderia constituir um bom candidato para ser utilizado no controle biológico do *Aedes* (SANTAMARINA MIJARES; PÉREZ PACHECO; MARTÍNEZ, 2000).

O uso de sapos e girinos para conroles de larvas de mosquitos mostra-se ainda pouco explorado no mundo. Esses animais são parte importante de ecossistemas aquáticos naturais e como predadores e/ou competidores de vários outros organismos aquáticos (RAGHAVENDRA; SHARMA; DASH, 2008).

No México foi avaliada a utilização de alternativas de controle biológico, entretanto os organismos utilizados como os odonatas, copépodos e hemípteras não foram bem aceitos pela comunidade por não serem considerados familiares. Já os peixes pareciam ser aceitos sem restrição e foram utilizados por iniciativa da própria população (MARTINEZ-IBARA *et al.*, 2002).

Por outro lado parece promissor o uso de armadilhas mais modernas que possam gerar informações mais precisas. Destaca-se o MI-Dengue que consiste em uma armadilha para captura de fêmeas grávidas de *A. aegypti* associada a sistemas informatizados de coleta, transmissão e acesso das informações de campo, e mapas georreferenciados em tempo real (EIRAS; RESENDE, 2009).

Considerando os padrões epidemiológicos do dengue no mundo e particularmente no Brasil, aponta-se para necessidade de avançar no desenvolvimento de novas ferramentas e estratégias de prevenção e controle da doença (TEIXEIRA *et al.,* 2009). Considerando ainda que um controle efetivo de vetores não pode depender de um só método, mas sim, dispor de várias alternativas adequadas à realidade local (OPS, 1995; BRAGA; VALLE, 2007). Desta forma e, em virtude da necessidade de busca de alternativas de controle buscou-se avaliar a possibilidade do uso de algumas espécies de peixes larvófagos em depósitos domiciliares para controle de larvas de *A. aegypti*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a eficácia do uso de peixes larvófagos em depósitos domiciliares como alternativa de controle biológico de larvas de *A. aegypti*.

3.2 Específicos

- Avaliar o padrão de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* em depósitos domiciliares com a presença de peixes larvófagos.

- Identificar a sobrevivência de espécimes dos peixes *Betta splendens* e *Poecilia reticulata* a três diferentes concentrações de cloro na água.

- Descrever a efetividade do peixe *Betta splendens* para o controle de *A. aegypti* em reservatórios domiciliares do município de Fortaleza.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos gerais

Esse trabalho foi desenvolvido em três etapas. As duas primeiras foram realizadas no Laboratório de Entomologia do Departamento de Saúde Comunitária da UFC e a terceira etapa, em condições de campo, acompanhando as ações desenvolvidas pelo Programa Municipal de Controle do Dengue em Fortaleza.

No Laboratório de Entomologia, a temperatura média foi de 28 ± 3^{o}C, umidade 80 ± 5% e fotoperíodo de 12h. Os peixes utilizados, assim como todas as larvas de *A. aegypti*, foram mantidas nesse laboratório no período de realização dos testes. Durante os experimentos, os mosquitos foram alimentados diariamente, utilizando-se codornas (*Nothura maculosa),* como fonte sanguínea, e água com açúcar. Foram respeitados as normas de segurança para o laboratório de entomologia.

4.2 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para experimentos com animais da Universidade Estadual do Ceará sob parecer n° 05267606-4 (ANEXO 1).

4.3 Padrão de oviposição em depósitos com peixes larvófagos

Material/instrumentos

Utilizou-se uma balança digital da marca GEHAKA, modelo BG 200VP com capacidade máxima de 200 g, mínima de 0,025 g e d=0,001 g. Para medir os peixes foi utilizado um paquímetro. Para esses testes foi utilizada uma gaiola telada com 6 m^3 de área, tentando simular condições de campo (figura 6).

Figura 6 - Gaiola

Peixes utilizados

Foram utilizados peixes adultos coletados em criadouros naturais e, posteriormente, submetidos à uma quarentena de 15 dias em aquários, onde foram alimentados com ração adequada.

As espécies avaliadas foram *Betta splendens* (Regan, 1910), *Trichogaster trichopteros* (Pallas, 1770), *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), *Poecilia sphenops* (Cuvier, 1846) e *Poecilia reticulata* (Peters, 1860); todas utilizadas em municípios cearenses como alternativa de controle biológico para larvas de *A. aegypti* (*Linnaeus*, 1762) (CAVALCANTI, 2006).

Desenho

Realizou-se um teste preliminar para identificar a existência de diferença na postura dos mosquitos na presença dos peixes larvófagos. Nessa primeira etapa, foram utilizados 50 mosquitos e seis aquários. Os mosquitos foram transferidos para essa gaiola utilizando capturador de sucção (MARCONDES *et al.*, 2007).

Para cada ensaio, foram utilizados os seis aquários, sendo três como testes (com peixe) e outros três como controles (sem peixes), cada um deles com 15 litros de água desclorada e uma palheta de eucatex para postura dos ovos. Esse procedimento foi repetido três vezes, em semanas consecutivas, para cada uma das cinco espécies de peixe (figura 7).

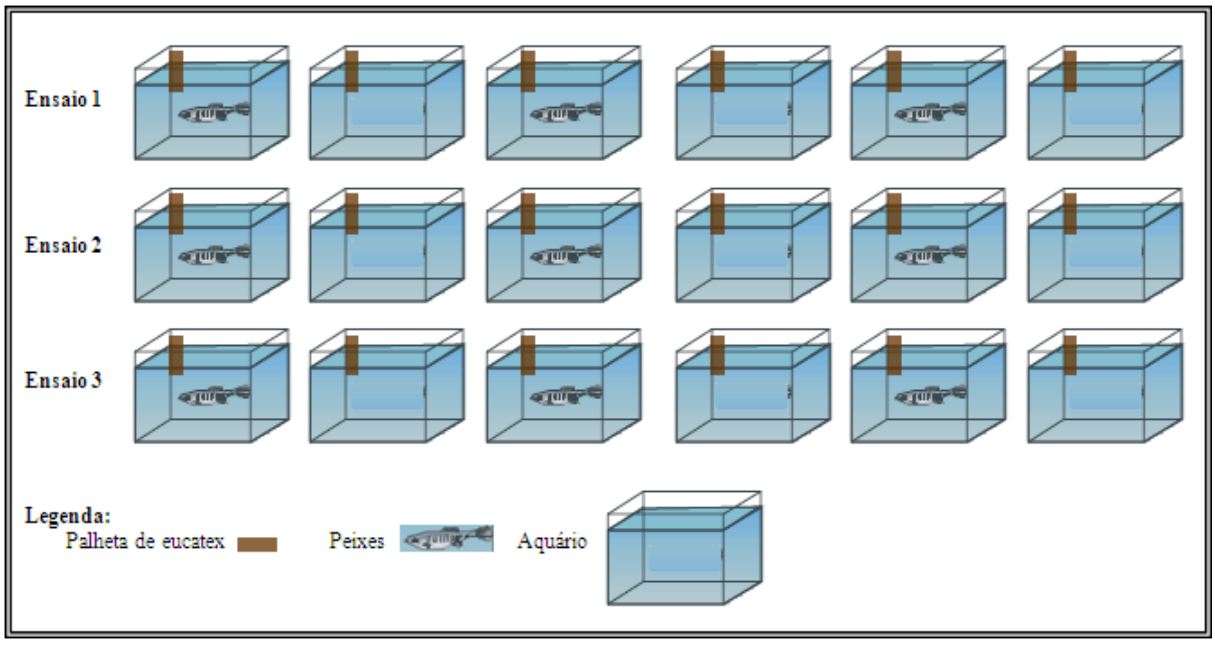

Figura 7 - Esquema de distribuição dos aquários da gaiola de testes

Ao final de cada semana, as palhetas foram retiradas e substituídas por outras novas (figura 8).

Figura 8. Palheta de eucatex

Posteriormente, foram selecionadas, dentre as cinco espécies, as que apresentaram maior e menor potencial de repelir fêmeas grávidas de *A. aegypti* e seguido o protocolo abaixo:

- 100 mosquitos e oito aquários com palhetas de eucatex, quatro deles com peixes (teste) e quatro sem peixes (controles). Esses aquários, com e sem peixes, foram ordenados semanalmente de forma alternada (PAMPLONA, método não publicado).

- Para cada uma das espécies de peixe foram realizados sete ensaios separadamente (figura 9).

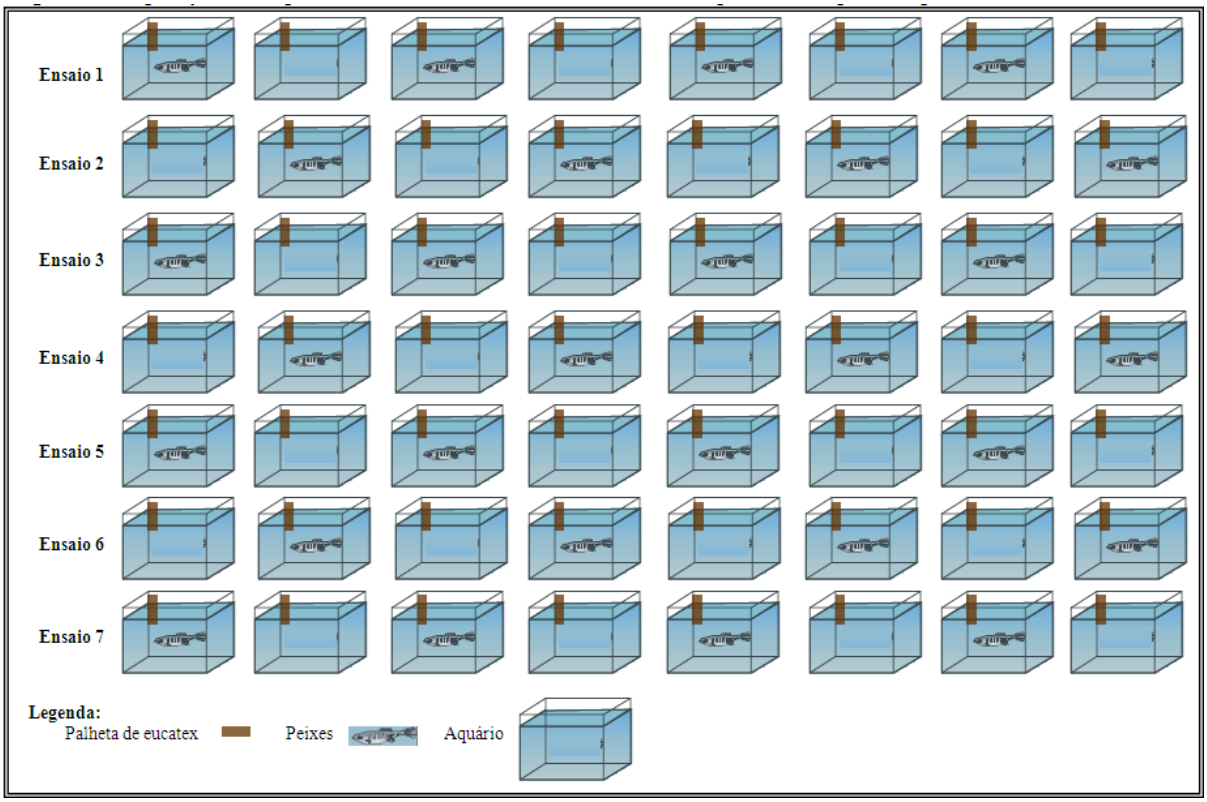

Figura 9 – Disposição dos aquários durante os sete ensaios consecutivos para cada espécie de peixe.

Ao final de cada semana, os depósitos foram retirados e foi feita a contagem de ovos nas palhetas, com auxílio de um microscópio entomológico, além da contagem das larvas que porventura existissem.

Análise dos dados

A técnica utilizada para avaliar a diferença de postura da primeira fase foi o Índice de Atividade de Oviposição (IAO), que, segundo Kramer e Mulla (1979) é uma medida para conhecer se as fêmeas de mosquitos grávidas são ou não influenciadas pelo tratamento (presença de peixes). Segundo o IAO valores iguais a zero indicam que não há diferença entre teste e controle, enquanto valores maiores que zero indicam que não há repelência por parte dos mosquitos. Essa técnica foi validada por Van Dam e Walton (2007).

Na segunda fase, foi repetido o IAO e foram comparadas medianas, amplitude e quartis do número de ovos. Foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparar os dois grupos. A mediana do número de ovos foi comparada ao longo das semanas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o software STATA, versão 9.2 (Stata Corporation, College Station, USA).

4.4 Sobrevivência dos peixes *Betta splendens e Poecilia reticulata* ao cloro

Material/instrumentos

Foram utilizados tambores com capacidade para 70 litros de água, contendo 35 litros. Os mesmos permaneceram tampados durante os experimentos (figura 10).

Figura 10 – Tambores utilizados para os testes de resistência ao cloro

Desenho

Os peixes foram submetidos a três diferentes concentrações de cloro (1,00 mg/L, 1,50 mg/L e 2,00 mg/L) e submetidos às concentrações de cloro por meio de exposição direta (MEDEIROS; VASCONCELOS; CALAZANS, 2007).

Para a primeira concentração foram realizados três lotes de experimentos com 30 testes (com cloro) e cinco controles (sem cloro) em cada um. Na concentração de 1,50 mg/L, foram utilizados quatro lotes com 30 testes e cinco controles e, para 2,00 mg/L, cinco lotes com 30 testes e cinco controles (QUINTANS, 2008 *apud* PAMPLONA, 2008).

Em cada tambor tinha apenas um espécime de peixe e os experimentos foram realizados, separadamente, para cada espécie avaliada (anexo B).

Descrição dos procedimentos

As concentrações de cloro foram obtidas adicionando-se hipoclorito de cálcio comercial 65% a estoques de água destilada. Para se chegar à concentração desejada, foi utilizada a seguinte fórmula: **X** = 35L x [ ] x 100,0%/ 65, onde **X** é a quantidade de cloro que deve ser pesada, em mg, para ser dissolvido em 35 litros de água destilada. Após adição do cloro foi agitado o depósito garantir uma concentração uniforme da mistura, conforme descrito por MEYER (1994).

Análise dos dados

Para avaliar a sobrevivência dos peixes nas diferentes concentrações de cloro, foi estimado o intervalo de confiança (IC) para cada concentração. Essa diferença de sobrevivência foi medida por análise de variância.

4.5 Utilização do peixe *Betta splendens* em condições de campo

Local de estudo:

Cidade de Fortaleza com população de 2,5 milhões de habitantes e clima tropical. O bairro onde ocorreram os experimentos, “Serviluz”, apresentava temperatura média variando entre 26ºC e 27ºC e umidade relativa do ar de 81% ± 7%. Esse bairro foi escolhido por apresentar descontinuidade no fornecimento de água gerando a necessidade da população de possuir vários reservatórios para armazenamento de água e porque existia uma grande proporção de depósitos nos quais havia sido utilizados espécimes do peixe *B. splendens* para controle das formas imaturas do *A. aegypti*.

Desenho do estudo, coleta de dados e o Programa Municipal de Controle do Dengue (PMCD) em Fortaleza

Na época do estudo o Programa Municipal de Controle da Dengue (PMCD), em Fortaleza, utilizava o larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* G (0,02g/L) em todos os tipos de depósitos domiciliares com água. O Programa Nacional de Controle do Dengue (PNCD) recomendava que as visitas domiciliares e o tratamento dos depósitos, que não pudessem ser eliminados, fossem a cada 60 dias, com seis ciclos anuais (BRASIL, 2009), mas na prática em Fortaleza esses ciclos ocorriam em intervalos que variavam de 60 a 90 dias. Em depósitos com volume superior a 200 litros, principalmente, tanques e caixa d´água eram

utilizados espécimes do *B. splendens*, quando o responsável pelo domicilio permitia. O agente de endemias explicava que o programa estava colocando, em depósitos de grande volume, um peixe que comia larvas do mosquito *A. aegypti* e perguntava ao responsável se ele aceitava que este peixe fosse colocado em depósitos de sua residência. Nas caixas d'água era utilizado um conector para que o peixe não passase pelo cano.

Figura 11 – Conector utilizado nas saídas de água das caixas d'água.

Foi realizado um estudo com base nos dados secundários produzidos pelo PMCD a partir das atividades de campo realizadas no período de outubro de 2002 a abril de 2003. Na visita inicial os depósitos foram tratados com peixe *B. splendens* ou com o *Bti*, constituindo-se os dois grupos do estudo, o grupo Peixe e o grupo *Bti*. Posteriormente foram realizadas mais 2 visitas, a primeira no decorrer do 3º e 4º mês, e a segunda entre o 5º e 6º mês de observação. Nestas visitas foi avaliada a permanência do peixe e condição de infestação dos depósitos pelas formas imaturas do *A. aegypti*. Aqueles que se encontravam infestados foram tratados novamente (*Bti* ou *B. splendens*) e censurados. Os depósitos que receberam o peixe foram também censurados quando os mesmos eram encontrados sem a presença do peixe. Foram registradas a data da visita inicial e a data das duas visitas de acompanhamento. Os dados foram coletados por cinco agentes de endemias do Programa de Controle do Dengue, da Secretaria de Saúde do Município de Fortaleza. Foi avaliada a eficácia do peixe *B. splendens* e a efetividade do uso desses peixes larvófagos pelo PMCD.

Características dos depósitos

Na primeira visita foram registradas informações acerca dos depósitos tratados referentes ao tipo do depósito (tanque ou caixa d´água); de material (alvenaria, concreto, amianto, plástico, metal ou fibra de vidro); localização (dentro ou fora do domicílio); volume

(calculado a partir das dimensões do depósito); altura em relação ao solo e a presença ou ausência de coberta.

Determinação da infestação

A infestação nos depósitos foi determinada através do encontro das formas imaturas do vetor. Os depósitos foram inspecionados com o auxílio de uma lanterna e todas as formas imaturas presentes nos depósitos foram retiradas com um pesca larva, colocados em tubitos de vidro contendo álcool a 75% e levadas para o laboratório, onde as formas imaturas do *A. aegypti* foram identificadas.

Análise dos dados

Para os cálculos de infestação, o tempo de observação foi o tempo decorrido entre a data da primeira visita e a data no qual foi observada a presença de formas imaturas de *A. aegypti*, ou data da última visita, para aqueles depósitos que nunca foram observados infestados. Para os cálculos de permanência do peixe nos depósitos o tempo de observação foi o tempo decorrido entre a data da primeira visita e a data no qual foi observado que o peixe não estava presente no depósito. Ou ainda, a data da última visita para aqueles depósitos nos quais o peixe esteve presente em todas as visitas anteriores.

A probabilidade da permanência do *B. splendens* nos depósitos com o decorrer do tempo foi estimada através do método de tábua de vida. A densidade de incidência de infestação de depósitos foi estimada dividindo-se o número de depósitos infestados pela soma dos tempos de observação dos depósitos. De forma semelhante, a densidade de incidência da presença do peixe foi estimada dividindo-se o número de depósitos com o peixe presente pela soma dos tempos de observação dos depósitos. A razão de densidade de incidência não ajustada e seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram estimados através de regressão de Poisson simples, e esta razão foi considerada significativa quando seu IC 95% não incluía o valor 1. A razão de densidade de incidência de infestação ajustada para potenciais confundidores foi estimada através de regressão de Poisson múltipla. Esses potenciais confundidores (material do depósito, volume, altura e presença de coberta) foram variáveis que, em um modelo de regressão de Poisson simples, estavam associadas à infestação com um valor-p $\leq$ 0,250 (HOSMER; LEMESHOW, 2000).

5 RESULTADOS

5.1 Padrão de oviposição em depósitos com peixes larvófagos

Nos testes preliminares com as cinco espécies de peixe, foram utilizados três espécimes de cada espécie, por semana. Ao final dessa etapa, foram utilizados 54 peixes. Foram postos 23.063 ovos em todos os experimentos. Destes, 9.543, nos depósitos com peixes, e 13.520, nos depósitos utilizados como controle.

A média de ovos nos depósitos com peixes foi de 1.909, variando de 1.137 a 3.019, nos depósitos com o *B. splendens* e *P. sphenops*; respectivamente. Nos depósitos controle, o número médio de ovos postos foi de 2.704, variando entre 2.090, nos testes com o *T. trichopteros,* e 3.529, com o *P. sphenops* (tabela 1).

Tabela 1. Número de ovos postos nos testes preliminares com as cinco espécies de peixes, durante três semanas.

Experimentos	***B. splendens***	***T. trichopteros***	***P. sphenops***	***P. reticulata***	***A. fasciatus***	**Total**
Teste 1	245	288	921	781	497	2.732
Teste 2	693	1.022	1.102	1.087	42	3.946
Teste 3	199	442	996	782	446	2.865
Total (teste)	**1.137**	**1.752**	**3.019**	**2.650**	**985**	**9.543**
Comtrole 1	572	459	867	1.796	307	4.001
Controle 2	1.601	645	1.973	471	1.276	5.966
Controle 2	462	986	689	371	1.045	3.553
Total (controle)	**2.635**	**2.090**	**3.529**	**2.638**	**2.628**	**13.520**
N° Total de ovos	**3.772**	**3.842**	**6.548**	**5.288**	**3.613**	**23.063**

Segundo o Índice de Atividade de Oviposição (IAO), a única espécie a não apresentar diferença significativa entre a postura nos depósitos com e sem peixe foi o *Poecilia reticulata,* com um índice igual a zero. Os testes com os *T. trichopteros* e *P. sphenops* apresentaram quase os mesmos resultados, sugerindo uma discreta alteração no padrão de postura por parte

dos mosquitos nos depósitos com essas espécies. A repelência mais significativa ocorreu nos testes com o *B. splendens*, com índice de -0,40 (tabela 2). Esse resultado sugere que existe diferença significativa no padrão de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* nos depósitos com peixe *Betta splendens* e aqueles utilizados como controle.

Tabela 2. Índice de Atividade de Oviposição* (IAO) em depósitos com cinco espécies de peixe.

Nº de Ovos	***B. splendens***	***T. trichopteros***	***P. sphenops***	***P. reticulata***	***A. fasciatus***
Com peixe	1.137	1.752	3.019	2.650	1.879
Sem peixe	2.635	2.090	3.529	2.638	2.628
IAO	**-0,40**	**-0,09**	**-0,08**	**0,00**	**-0,17**

* Kramer e Mulla (1979).

O tamanho médio do *P. sphenops* (3,68 cm) e *B. splendens* (3,75 cm) foi muito próximo, entretanto, o IAO foi 500 vezes menor nos depósitos com a presença do *B. splendens*. O peso médio entre as espécies *P. sphenops* (0,964 g) e *A. fasciatus* (0,983 g) foi similar. Por outro lado, o IAO nos depósitos com o *A fasciatus* foi duas vezes menor (tabela 3).

Tabela 3. Tamanho e peso das cinco espécies de peixes larvófagos x IAO.

Espécies	**Tamanho (cm)**		**Peso (g)**		**IAO***
	médio	**∆T**	**médio**	**∆T**	
Poecilia reticulata	2,70	2,20 – 4,20	0,311	0,172 – 0,938	0,00
Poecilia sphenops	3,68	3,90 – 4,60	0,964	0,879 – 1,659	-0,08
Trichogaster trichopteros	6,28	6,00 – 7,20	3,234	2,747 – 4,300	-0,09
Astyanax fasciatus	4,45	3,80 – 5,10	0,983	0,615 – 1,782	-0,17
Betta splendens	3,75	3,50 – 4,20	0,699	0,468 – 1,232	-0,40

*Índice de Atividade de Oviposição.

Após os resultados preliminares, as espécies selecionadas com maior e menor IAO foram *B. splendens* e *P. reticulata.*

Nessa nova etapa, com as duas espécies acima descritas e oito depósitos por semana (quatro testes + quatro controles), foram postos um total de 21.775 ovos. Destes, 8.689 nos criadouros com peixes (teste) e 13.086, nos criadouros utilizados como controle. A maior e a menor posturas ocorreram nos criadouros com o *P. reticulata* (958) e *B. splendens* (0), respectivamente. Nos experimentos com *B. splendens,* foram colocados 6.892 ovos e, nos testes com o *P. reticulata,* 14.883 (tabela 4).

Tabela 4. Número de ovos postos durante as sete semanas de experimento, por depósito.

Ensaios	*Betta splendens*										*Poecilia reticulata*									
	Teste					Controle					Teste					Controle				
	1º	2º	3º	4º	Total	5º	6º	7º	8º	Total	1º	2º	3º	4º	Total	5º	6º	7º	8º	Total
Semana 1	98	9	17	0	124	103	212	161	211	687	669	435	84	72	1260	571	282	80	194	1127
Semana 2	27	38	14	8	87	269	187	138	241	835	294	203	198	8	703	265	167	136	203	771
Semana 3	68	38	56	54	216	210	102	102	87	501	638	148	82	380	1248	581	391	121	145	1238
Semana 4	180	49	26	18	273	346	128	221	216	911	387	96	132	398	1013	287	301	143	263	994
Semana 5	87	18	0	42	147	117	71	61	16	265	493	112	219	297	1121	513	185	158	302	1158
Semana 6	115	0	4	0	119	574	353	382	488	1797	958	209	141	112	1420	798	306	97	318	1519
Semana 7	67	181	48	25	321	254	142	27	186	609	476	98	33	30	637	345	112	96	121	674
Total	**642**	**333**	**165**	**147**	**1.287**	**1.873**	**1.195**	**1.092**	**1.445**	**5.605**	**3.915**	**1.301**	**889**	**1.297**	**7.402**	**3.360**	**1.744**	**831**	**1.546**	**7.481**

O Índice de Atividade de Oviposição (IAO) para o peixe *P. reticulata* não apresentou diferença considerável entre os depósitos com e sem peixe (-0,005). Por outro lado, os depósitos com o *B. splendens* apresentaram uma significativa diferença entre o número de ovos (-0,627). O IAO sugere que fêmeas grávidas de *A. aegypti* preferem não colocar seus ovos nos depósitos com o peixe *B. splendens*. O mesmo não ocorreu nos depósitos com o *P. reticulata* (tabela 5).

Tabela 5. Índice de Atividade de Oviposição* em depósitos com *B. splendens* e *P. reticulata*.

IAO	**Semanas**							**Total**
	1ª	**2ª**	**3ª**	**4ª**	**5ª**	**6ª**	**7ª**	
B. splendens	-0,694	-0,811	-0,397	-0,539	-0,286	-0,876	-0,310	**-0,627**
P. reticulata	0,056	-0,046	0,004	0,009	-0,016	-0,034	-0,028	**-0,005**

* Kramer e Mulla (1979).

Considerando os oito depósitos, por semana, foram comparadas as distribuições do número de ovos colocados por fêmeas de *A. aegypti* em criadouros com e sem o peixe *B. splendens* (figura 12(a) e tabela 6). Em cinco das sete semanas, a mediana da distribuição do número de ovos foi significativamente menor nos criadouros com o peixe *B. splendens*. Quando os dados das sete semanas foram agrupados a mediana da distribuição do número de ovos colocados nos criadouros com o peixe *B. splendens* (32,5/semana) foi significativamente menor ($p < 0,001$) que nos criadouros sem peixe (186,5/semana), onde a mediana da distribuição do número de ovos depositados variou de forma significativa durante as sete semanas ($p = 0,005$). O mesmo não ocorreu nos criadouros com peixe *B. splendens* ($p = 0,285$).

Tabela 6. Número de ovos depositados por fêmeas grávidas de *A. aegypti* em criadouros com e sem o peixe *B. splendens*.

Semanas	**Distribuição do número de ovos**					**Valor p**
Tipo de criadouro	**Mediana**	**Min**	**Max**	**P 25**	**P 75**	
Semana 1:						
Com peixe	13	0	98	4,5	57,5	
Sem peixe	186	103	212	132	221,5	0,021
Semana 2:						
Com peixe	20,5	8	38	11	32,5	
Sem peixe	214	138	269	162,5	255	0,021
Semana 3:						
Com peixe	55	38	68	46	62	
Sem peixe	102	87	210	94,5	156	0,020
Semana 4:						
Com peixe	37,5	18	180	22	114,5	
Sem peixe	218,5	128	346	172	283,5	0,043
Semana 5:						
Com peixe	30	0	87	9	64,5	
Sem peixe	66	16	117	38,5	94	0,387
Semana 6:						
Com peixe	2	0	115	0	59,5	
Sem peixe	435	353	574	67,5	531	0,020
Semana 7:						
Com peixe	57,5	25	181	36,5	124	
Sem peixe	164	27	254	84,5	220	0,248
Semana 1 a 7[¥]:						
Com peixe	32,5	0	181	11,5	61,5	
Sem peixe	186,5	16	574	102,5	247,5	<0,001

[¥]Teste de Kruskal-Wallis para comparar a distribuição dos ovos nas sete semanas. Nos criadouros sem peixe: valor-p=0,005. Nos criadouros com peixe: valor-p=0,285. Em ambos os criadouros: valor=0,676.

Também foram comparadas a distribuição dos ovos colocados em criadouros com e sem o peixe *Poecilia reticulata* (figura 12(b) e tabela 7). Em cada uma das sete semanas, a distribuição do número de ovos foi semelhante nos criadouros com e sem peixe. Mesmo após

agregar os resultados das sete semanas, a distribuição do número de ovos permaneceu semelhante nos dois tipos de criadouros (p = 0,491).

Tabela 7. Número de ovos depositados por fêmeas grávidas de *A. aegypti* em criadouros com e sem o peixe *P. reticulata*.

Semanas	**Distribuição do número de ovos**					**Valor-p**
Tipo de criadouro	**Mediana**	**Min**	**Max**	**P 25**	**P 75**	
Semana 1:						
Com peixe	259,5	72	669	78	552	
Sem peixe	238	80	571	137	426,5	1,000
Semana 2:						
Com peixe	200,5	8	294	103	248,5	
Sem peixe	185	136	265	151,5	234	0,884
Semana 3:						
Com peixe	264	82	638	115	509	
Sem peixe	268	121	581	133	486	1,000
Semana 4:						
Com peixe	259,5	96	398	114	392,5	
Sem peixe	275	143	301	203	294	1,000
Semana 5:						
Com peixe	258	112	493	165,5	395	
Sem peixe	243,5	158	513	171,5	407,5	0,773
Semana 6:						
Com peixe	175	112	958	126,5	583,5	
Sem peixe	312	97	798	201,5	558	0,772
Semana 7:						
Com peixe	65,5	30	476	31,5	287	
Sem peixe	116,5	96	345	104	233	0,387
Semana 1 a 7[¥]:						
Com peixe	200,5	8	958	97	392,5	
Sem peixe	233	80	798	139,5	312	0,491

[¥]Teste de Kruskal-Wallis para comparar a distribuição dos ovos das sete semanas. Nos criadouros sem peixe: valor-p=0,692. Nos criadouros com peixe: valor-p=0,813. Em ambos os criadouros: valor=0,460.

As figuras 12a e 12b mostram a mediana, os números mínimos e os máximos de ovos que foram postos pelas fêmeas de *A. aegypti* durante as sete semanas do experimento. Percebe-se que há uma maior semelhança entre o número médio de ovos dos testes realizados

com a presença do peixe *P. reticulata* e os respectivos controles (Figura 12b). O mesmo não ocorreu nos testes com o *B. splendens* (figura 12a).

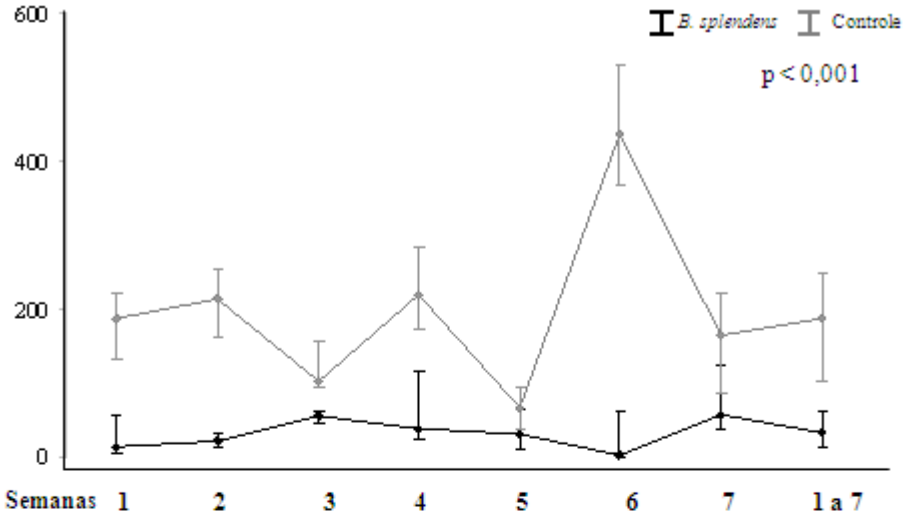

Figura 12(a): Número médio de ovos de *Aedes aegypti* por semana em depósitos com o peixe *Betta splendens* e controles sem peixes. Barras verticais indicam quartis.

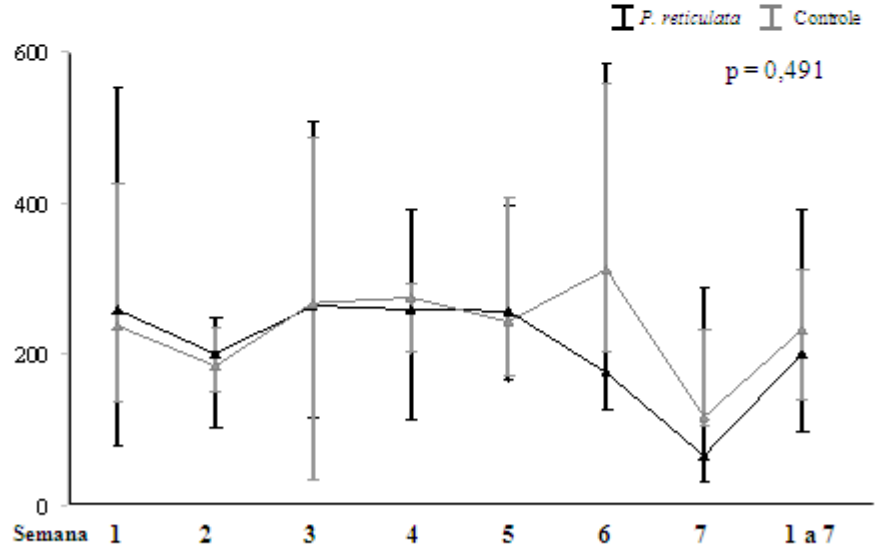

Figura 12(b): Número médio de ovos de *Aedes aegypti* por semana em depósitos com o peixe *Poecilia reticulata* e controles sem peixes. Barras verticais indicam quartis.

5.2 Sobrevivência do *B. splendens* e *P. reticulata* ao Cloro

O *B. splendens* apresentou sobrevivência de 100%, quando exposto a uma concentração inicial de cloro de 1,0 mg/L. Para a concentração de 1,5 mg/L, o índice foi de 72,5% (64,4 - 80,6). Em 2,00 mg/L, 39,3% (31,4 – 47,2) resistiram (tabela 8).

Sobreviveram todos os 75 espécimes de peixes utilizados como controle durante os experimentos. Suas proporções são apresentadas na tabela 8.

O *P. reticulata* apresentou uma menor resistência ao cloro apresentando um percentual de sobrevivência de 4,4% (0,1 – 8,7) já na primeira concentração de cloro. Dessa forma, respeitando os aspectos éticos, não foram realizados testes nas outras concentrações com essa espécie de peixe (tabela 8).

Tabela 8. Proporção de sobrevivência dos peixes *B. splendens* e *P. reticulata* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de cloro.

Conc. Inicial de cloro	**Nº de peixes expostos (*B. splendens*)**	***B. splendens* vivos**			**Nº de peixes expostos (*P. reticulata*)**	***P. reticulata* vivos**		
		N	**%**	**I.C. 95%**		**N**	**%**	**I.C. 95%**
0,00 mg/L	60	60	100,0	94,0 – 100,0	15	15	100,0	78,0 – 100,0
1,00 mg/L	90	90	100,0	96,0 -100,0	90	4	4,4	0,1 – 8,7
1,50 mg/L	120	87	72,5	64,4 – 80,6	-	-	-	-
2,00 mg/L	150	59	39,3	31,4 – 47,2	-	-	-	-

A variação do cloro na água foi significativa para todas as concentrações utilizadas. A concentração residual máxima de cloro após 24 horas nas três concentrações testadas para o *Betta splendens* foi de 0,12; 0,92 e 0,87; respectivamente (tabela 9). A mediana para concentração inicial de 2,0 mg/L foi de 0,58 mg/L, revelando uma redução de 71% da concentração inicial. A temperatura da água apresentou uma mediana de 26,2ºC, variando entre 24,3ºC e 27,4ºC.

Tabela 9. Concentração de cloro inicial e 24 horas após[¥] exposição, num experimento para estimar a resistência do peixe *B. splendens* a diferentes concentrações.

Concentração Inicial	**Concentração (mg/L) após 24 horas de exposição**		
	Mínimo	**Mediana**	**Máximo**
1,00 mg/L	0,00	0,03	0,12
1,50 mg/L	0,17	0,40	0,92
2,00 mg/L	0,20	0,58	0,87

[¥]Temperatura da água medida na 24ª hora de cada um dos experimentos.

Nos testes com o *P. reticulata,* o cloro residual máximo foi inferior aos apresentados nos testes com o *B. splendens*. Após 24 horas, a mediana das concentrações foi de 0,02 mg/L e o valor máximo foi de 0,06 mg/L. A mediana da temperatura da água foi de 26,2ºC, variando entre 26,1ºC e 27,3ºC (tabela 10).

Tabela 10. Concentração inicial de cloro e 24 após exposição[¥], num experimento para estimar a resistência do peixe *P. reticulata* a diferentes concentrações de cloro.

Concentração Inicial	**Concentração (mg/L) após 24 horas de exposição**		
	Mínimo	**Mediana**	**Máximo**
1,00 mg/L	0,00	0,02	0,06

[¥]Temperatura da água medida na 24ª hora de cada um dos experimentos.

5.3 Sobrevivência e eficácia do peixe *B. splendens* para controle do *A. aegypti* em depósitos domiciliares com água

Foram inspecionados 1.001 imóveis e identificados 974 depósitos de grande volume (> 200 litros). Destes, 588 (60,4%) foram caixas d´água e outros 386 (39,6%) tanques. Em 537 (55,1%) a intervenção foi com o peixe *B. splendens* e nos outros 437 (44,9%) foi utilizado o larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis*.

Em um dos depósitos monitorados o peixe permaneceu por pelo menos 183 dias. 97,6% (95,83 – 98,57) dos peixes utilizados permaneceram nos depósitos por até 60 dias após a intervenção. No intervalo de 61 a 89 dias 62,7% (58,10 – 66,85) dos peixes permaneceram nos depósitos e 13,5% (10,02 – 17,51) permaneceram entre 90 e 183 dias nesses depósitos domiciliares (tabela 11).

Tabela 11. Permanência do peixe *B. splendens* em depósitos domiciliares com água (N=537), segundo o tempo de observação.

Tempo de Observação	Depósitos com peixe	Depósitos sem peixe	Proporção de depósitos com peixe presente	
			%	IC 95%
45 a 60 dias	537	13	97,56	95,83 – 98,57
61 a 89 dias	514	163	62,65	58,10 – 66,85
90 a 183 dias	234	151	13,51	10,02 – 17,51

A infestação nos depósitos com a presença do peixe *B. splendens* foi de 1,6% e naqueles depósitos tratados com o larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* foi de 10,9%. Desta forma, nos depósitos onde o peixe permaneceu ele foi 85% mais eficaz, com uma infestação por *A. aegypti* significativamente menor que naqueles onde foi utilizado o larvicida ($p = 0,001$). Nos depósitos onde o peixe foi colocado, mas não estava presente no momento da inspeção a infestação foi de 27,8%, sendo significativamente maior que nos depósitos com larvicida ($p < 0,001$) (tabela 12). Assim, nas condições em que foi utilizado em Fortaleza não apresentou efetividade para redução da infestação.

Quando a densidade de incidência (DI) da infestação foi ajustada para potenciais confundidores (material do depósito, volume, altura e presença de coberta) a razão dessa DI foi de 19,7 (5,88 – 65,99), mostrando que nos depósitos onde os peixes permanecem a infestação é significativamente menor que nos depósitos tratados com larvicida. Quando comparamos essa DI ajustada não houve diferença significativa entre utilizar o peixe ou larvicida para redução da infestação por *A. aegypti* (p = 0,967). Entretanto, quando os peixes não permanecem nos depósitos, mesmo com os dados ajustados, houve uma maior infestação nesses depósitos com razão de DI de 0,65 (0,43 – 0,98) mostrando que nas condições em que foram utilizados a técnica não foi efetiva para redução da infestação (tabela 12).

Tabela 12. Densidade de Incidência da infestação por *A. aegypti* em depósitos domiciliares com água, segundo o grupo (*B. splendens* ou *Bti*), não ajustado e ajustado para potenciais confundidores.

Tipo de análise: Grupo	**Nº**	**Densidade de incidência (DI)**			**Razão de DI (IC 95%)**	**P**
		Tempo	**Numero de Infestações**	**DI x 10.000**		
Não ajustada:						
-Peixe presente[£]	210	18.405	3	1,63	1	
-*Bti*	437	39.283	43	10,94	6,72[¶] (2,08 – 21,64)	0,001
Não ajustada:						
-Peixe ausente[€]	327	29.460	82	27,83	1	
-*Bti*	437	39.283	43	10,94	0,39[¶] (0,27 – 0,57)	<0,001
Não ajustada:						
-Peixe[§]	537	47.865	85	17,75	1	
-*Bti*	437	39.283	43	10,94	0,62[¶] (0,43 – 0,89)	0,010
Ajustada:						
-Peixe presente[£]	-	-	-	-	1	
-*Bti*	-	-	-	-	19,69[¥] (5,88 – 65,99)	<0,001
Ajustada:						
-Peixe ausente[€]	-	-	-	-	1	
-*Bti*	-	-	-	-	0,65[¥] (0,43 – 0,98)	0,041
Ajustada:						
-Peixe[§]	-	-	-	-		
-*Bti*	-	-	-	-	1,01[¥] (0,67 – 1,53)	0,967

[§]Todos os depósitos do grupo "peixe" que o peixe estivesse presente ou não nos momentos de determinação da condição de infestação.
[€]Apenas os depósitos nos quais o peixe estava ausente nos momentos de determinação da condição de infestação.
[£]Apenas os depósitos nos quais o peixe estava presente nos momentos de determinação da condição de infestação.
[¶]Razão de densidade de Incidência não ajustada.
[¥]Razão de densidade de Incidência ajustada para material do depósito, volume, altura e coberta.

Segundo a densidade de incidência a permanência dos peixes foi maior em tanques (p < 0,001), depósitos de alvenaria (p = 0,018), localizados no peridomicílio (p = 0,038) e ao nível do solo (p = 0,002). Aspectos como volume do depósito e presença de coberta não apresentaram diferença significativa para a permanência dos peixes (tabela 13).

Tabela 13. Densidade de Incidência da presença do peixe *B. splendens* em depósitos domiciliares com água (N=537), segundo característica dos depósitos.

Características dos depósitos	**Nº**	**Densidade de Incidência (DI)**			**Razão de DI (IC 95%)**	**P**
		Tempo	**Nº de presença**	**DI**		
Tipo de depósito						
Caixa	200	17.849	52	29,13	1,81	
Tanque	337	30.016	158	52,64	(1,32 – 2,47)	<0,001
Material						
Outros	154	13.821	45	32,56	1,49	
Alvenaria/Concreto	383	34.044	165	48,47	(1,07 – 2,07)	0,018
Localização						
Intradomicílio	131	11.864	39	32,87	1,44	
Peridomicílio	406	36.001	171	47,49	(1,02 – 2,05)	0,038
Volume em litros						
200 a 2.000	464	41.358	177	42,79	1,19	
2.001 a 10.000	73	6.507	33	50,71	(0,82 – 1,72)	0,371
Altura em metros						
< 1	269	24.011	128	53,31	0,65	
1,1 a 9	268	23.854	82	34,38	(0,49 – 0,85)	0,002
Presença de coberta						
Não	199	17.655	80	45,31	0,95	
Sim	338	30.210	130	43,03	(0,72 – 1,25)	0,716

No tocante a infestação por *A. aegypti*, independente do tipo de intervenção (peixe ou *Bti*), os tanques apresentaram uma densidade de incidência (DI) 3,37 vezes maior que nas caixas d´água e os depósitos de alvenaria também apresentaram DI significativa (p = 0,008). Os depósitos ao nível do chão, abertos e com até 2.000 litros apresentaram maior densidade de incidência para infestação por *A. aegypti*, por outro lado a localização dos depósitos não interferiu para infestação (tabela 14).

Tabela 14. Densidade de Incidência da infestação por *A. aegypti* em depósitos domiciliares com água (N=974), segundo características dos depósitos.

Características dos depósitos	**Nº**	**Densidade de Incidência (DI)**			**Razão de DI (IC 95%)**	**P**
		Tempo	**Nº de presenças**	**DI**		
Tipo de depósito						
Caixa	588	52.734	40	7,59	3,37	
Tanque	386	34.414	88	25,57	(2,32 – 4,89)	<0,001
Material						
Outros	326	29.471	29	9,84	1,74	
Alvenaria/Concreto	648	57.677	99	17,16	(1,05 – 2,64)	0,008
Localização						
Intradomicílio	222	19.378	26	13,41	1,12	
Peridomicílio	752	67.770	102	15,05	(0,73 – 1,73)	0,601
Volume em litros						
200 a 2.000	802	71.420	116	16,24	0,47	
2.001 a 10.000	172	15.728	12	7,63	(0,26 – 0,85)	0,013
Altura em metros						
< 1	308	27.523	68	24,71	0,41	
1,1 a 9	666	59.625	60	10,06	(0,29 – 0,58)	<0,001
Presença de coberta						
Não	292	25.914	60	23,15	0,48	
Sim	682	61.234	68	11,10	(0,34 – 0,68)	<0,001

6 DISCUSSÃO

O estudo presente mostra que fêmeas grávidas de *A. aegypti* preferem não colocar seus ovos nos depósitos com a presença do peixe *B. splendens*. O mesmo não ocorreu nos depósitos com o peixe *P. reticulata*. Além disso, o *B. splendens* apresentou 100% de sobrevivência quando expostos a cloro em alta concentração. Por outro lado, o mesmo não ocorreu com os espécimes do *P. reticulata,* que apresentaram baixa sobrevivência. Em condições de campo, nos tanques onde o peixe *Betta splendens* permaneceu a infestação foi significativamente menor que naqueles tratados com o *Bti*.

Peixes larvófagos podem ser um importante componente de programas integrados de controle de vetores (GHOSH; DASH, 2007). Existem algumas características para que uma espécie de peixe seja considerada potencial para controle biológico de insetos vetores de doenças, dentre as quais o conhecimento adequado de sua biologia (KOLDENKOVA; ÁVILA, 1991; HERNANDEZ CONTRERAS *et al.*, 2005). Destaca-se ainda a preferência por predar larvas de mosquitos, ter o corpo alongado, ter agilidade, alta fecundidade, resistir bem ao transporte e armazenamento e não ser utilizada comercialmente como alternativa para alimentação humana (OPS, 1994). Há ainda como pré-requisitos de uso de um peixe larvófago a preferência alimentar por larvas, ser de pequeno porte, ter agilidade, ser resistente ao confinamento, tolerante a altas temperaturas e variados níveis de pH, ser encontrado facilmente e apresentar grande capacidade de locomoção (VARGAS, 2003; VALERO *et al.*, 2006). Características como agressividade, grande cobertura da área alagada, olhos grandes e boca virada para cima foram consideradas características importantes para peixes larvófagos (SHARMA, 1994). Outros estudos consideram ainda a aceitação por parte das comunidades locais (HAQ *et al.*, 1993; RUSSEL *et al.*, 2001).

Para que se alcance um controle efetivo é preciso além dos fatores acima relacionados, conhecimentos sobre o peixe a ser utilizado e sua interação com outros organismos locais para evitar efeitos indesejáveis (CHANDRA *et al.*, 2008). O peixe *Betta splendens* apresenta grande parte das características citadas acima, com destaque para amplo o conhecimento sobre sua biologia (MAESTRE-SERRANO; PACHÓN-MUÑOZ, 2006), grande capacidade larvófaga (CAVALCANTI *et al.*, 2007), ser pequeno e ágil (BRONSTEIN, 1994), apresentar alta fecundidade (DAMAZIO, 1992), ser tolerante a altas temperaturas e variados níveis de pH (MULLICA; KRISANADEJ, 2001; ZUANON *et al.*, 2007), grande agressividade (HERMOSO, 1992), e ter sua boca virada para cima (MARINO-NETO; SABBATINI, 1988). A espécie *Poecilia reticulata* apresenta algumas dessas características: amplo conhecimento

sobre sua biologia (ENDLER, 1987), ser pequeno (KRAMER; MEHEGAN, 1981; RODD; SOKOLOWSKI, 1995), tolerante a variados níveis de pH (MAYA PEÑA; MARAÑÓN-HERRERA, 1998) e ser facilmente encontrado (ARAÚJO *et al.*, 2009). Desta forma, o peixe *Betta splendens* atende a maior parte dos pré-requsitos básicos, citados por vários autores como importantes para peixes que podem ser utilizados como alternativa de controle biológico. A união dessas características faz com que essa espécie seja uma boa opção para uso em programas integrados de controle de vetores. Por outro lado, a espécie *Poecilia reticulata* atende a apenas alguns desses pré-requisitos, por isso tem sido utilizada principalmente em reservatórios naturais e em grandes concentrações.

O tamanho e o peso dos peixes utilizados nesse experimento parece não ter interferido no padrão de postura das fêmeas de mosquitos. Durante muito tempo os peixes foram considerados inadequados para uso como alternativa de controle biológico de vetores em virtude do seu tamanho e dos reservatórios que se apresentavam como potenciais para proliferação dos mosquitos como pneus, latas e garrafas (ANDRADE; SANTOS, 2004). Entretanto, ainda segundo esses autores, levando-se em consideração os aspectos entomológicos na região nordeste do Brasil onde os grandes reservatórios são os mais infestados e essa estratégia poderia ser utilizada com peixes de tamanho reduzido (ANDRADE; SANTOS, 2004). O tamanho médio do *Poecilia reticulata* utilizado nesse trabalho foi de 2,7 cm (2,2 cm – 4,2 cm). O *Betta splendens* apresentou tamanho médio de 3,75 cm (3,50 cm – 4,20 cm) e peso médio de 0,699 g (0,468g – 1,232g). Na Argentina, as espécies de peixe *Gymnogeophagus brasiliensis* e o *Cheirodon piaba* foram considerados com potencial larvófago. Os espécimes avaliados mediam 118 e 20 milímetros, respectivamente (BORDA; REA; HUERTA, 2001). Haq *et al.* (1993) trabalharam com as espécies larvófagas *Chela bacaila, Puntios stigma, Rasbora daniconius, Colisa fasciatus e Danio sp;* todas variando entre 2,5 a 6 centímetros. Outro trabalho realizado na Etiópia estudou outras espécies de peixes larvófagos, com destaque para o *Aplocheilichtys loati* e o *Oreochromis niloticus*, com peso máximo de 0,28g e 1,8g, respectivamente (FLETCHER *et al.*, 1993). Hernandez Contreras *et al.* (2005) sugeriram que tanto o tamanho como o sexo dos peixes interferiam na capacidade larvófaga (HERNANDEZ CONTRERAS *et al.*, 2005). Para ser utilizado como alternativa de controle biológico é importante que os peixes sejam de pequeno porte e não sejam utilizados para fins de alimentação humana. Isso poderia acarretar uma menor permanência dos mesmos nos depósitos e afetaria uma possível redução de infestação de mosquitos. Desta forma, quanto menor o espécime utilizado, desde que com

bom potencial larvófago, mais indicado para esse fim, fatores esses que que são atendidos tanto pelo *Poecilia reticulata* como pelo *Betta splendens*.

Ensaios realizados em reservatórios naturais com presença de peixes demonstram que, em grandes concentrações, eles podem servir como repelentes para oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes thaeniorhynchus* (RITCHIE, 1994). O tamanho dos depósitos utilizados no experimento pode ter interferido nessa percepção por parte das fêmeas grávidas de *A. aegypti*, como ocorrido para outras espécies de mosquitos. Rodriguez *et al*. (2007) mostrou que não houve diferença significativa entre a oviposição das fêmeas de *A. aegypti* em depósitos com *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) e *copépodes*. Nesse caso, o Índice de Atividade de Oviposição (IAO) foi 0,16 e 0,15, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados para *Aedes albopictus* sob condições de campo (STOOPS, 2005). Em outra situação o *Mesocyclops longisetus*, em reservatórios de água, serviu como um atrativo para oviposição (TORRES-ESTRADA *et al.*, 2001).

Zahiri e Rau (1998) mostraram que fêmeas grávidas de *A. aegypti* selecionam, no momento da oviposição, criadouros com menor densidade larvária e que não albergam larvas mal alimentadas e/ou infectadas por certos patógenos. Alguns dejetos bacterianos e metabólitos presentes em cultivos de *Bacillus thuringiensis israelensis* foram sugeridos como atrativos para fêmeas grávidas de *A. aegypti* (IKESHOJI, 1979). Poonam (2002) confirmou essa hipótese quando demonstrou que a decomposição bacteriana de matéria orgânica, presente na água, libera certos compostos voláteis que estimulam às fêmeas de mosquitos grávidas à oviposição (POONAM, 2002). Com isso, pode haver liberação na água de algum metabólito ou excremento, por parte dos peixes, que venham a interferir na seleção dos depósitos no momento da postura do *A. aegypti*. É necessário esclarecer se o *Betta splendens* libera alguma substância na água que possa atuar como repelente à postura de ovos por fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Além de o *Betta splendens* ser um grande predador de larvas (CAVALCANTI, 2006), sugere-se que ele é efetivo como repelente para oviposição de mosquitos em depósitos de pequeno volume.

A capacidade dos reservatórios utilizados nesse experimento (15 litros) pode ter facilitado a percepção da presença dos peixes através do contato visual, como sugerido por Petranka e Fakhoury (1991). Isso contribuiria para repelência das fêmeas de mosquitos como ocorrido com o *Aedes thaeniorhynchus* (RITCHIE, 1994). Seria necessário outro desenho de estudo para confirmar o potencial de repelência visual das fêmeas de *A. aegypti* grávidas em depósitos de grande volume com exemplares do *Betta splendens*. Estudos futuros

determinarão se o volume dos depósitos interferiu na repelência das fêmeas grávidas de mosquitos no momento da sua oviposição, ou ainda, se os peixes foram capazes de predar os ovos postos no substrato acima do nível da água.

O rápido crescimento e urbanização das populações nas áreas tropicais, sem infra-estrutura básica de saneamento ampliou a faixa de ocorrência do dengue em razão da difusão do *A. aegypti* para áreas antes livres da doença (PEREIRA, 1996). Funcionando como fator de repelência, o uso de algumas espécies de peixes larvófagos em reservatórios domiciliares poderia favorecer a dispersão do vetor em busca de outros depósitos para oviposicão. Segundo Angelon *et al.* (2002) a eficácia do uso de peixes larvófagos no controle de mosquitos poderia ser comprometida caso os mosquitos adultos fossem repelidos pela presença desses peixes nos depósitos, o que contribuiria para uma maior dispersão desses vetores. Entretanto, no nordeste do Brasil, os grandes reservatórios domésticos de água são importantes focos com o potencial de gerar um grande número de larvas (BRASIL, 2009). Dessa forma, talvez seja melhor para o controle que as fêmeas grávidas deixem de por seus ovos nesses grandes reservatórios e passem a ovipor em pequenos recipientes que podem ser manejados e eliminados mecanicamente, sem a necessidade de uma intervenção com produtos químicos pelo Serviço de Saúde. Essa situação, provavelmente, traria menores problemas para as ações de controle preconizadas pelo Programa Nacional de Controle do Dengue.

O cloro é o desinfetante mais utilizado nas estações de tratamento de água, por apresentar efetividade na inativação de microrganismos patogênicos, além de estar disponível a preço razoável e apresentar facilidade de manuseio, armazenamento, transporte e aplicação (FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Seu uso em larga escala somente começou a partir de 1902, na Bélgica, com o chamado refinamento da cloração, isto é, determinação das formas de cloro combinado e livre e a cloração baseada em controles bacteriológicos (MEYER, 1994; LAUBUSCH, 1971). No Brasil, segundo a portaria nº 518, de 25 de março de 2004, os depósitos que acumulam água devem conter, após uma desinfecção, um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/Litro, sendo obrigatória a manutenção de no mínimo 0,2 mg/Litro. Caso seja encontrado nos depósitos domiciliares essa concentração mínima de cloro residual todos os espécimes do peixe *Betta splendens* sobreviveriam, o que tornaria essa espécie indicada para esses depósitos de grande volume. Entretanto, em 8.000 amostras de água avaliadas pela Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE, 2007) no município de Fortaleza a concentração de cloro apresentou mediana de 0,98 mg/L (0,55 mg/L e 1,83 mg/L). Trabalho realizado em Vitória/ES mostrou que 9,2% e 3,1% das amostras de água coletadas do sistema de abastecimento público estavam abaixo e acima, respectivamente dos parâmetros

da Portaria 518/2004 (SILVA; ARREBOLA; JESUS, 2007). Em 1996, em Cuba foi inspecionada a concentração de cloro livre em 480 amostras de água nas casas onde foi encontrado um percentual de 5,2 a 94,1% de amostras com concentração superior 0,3 mg/L (GARCIA BALUJA; Del PUERTO RODRÍGUEZ; CAÑAZ PÉREZ, 2002). No atual estudo, o *Poecilia reticulata* apresentou uma baixa tolerância às concentrações de cloro na água, semelhante ao encontrado por Elas *et al.* (2004), onde duas espécies de *Poecilia* foram avaliados e apresentaram 100% de mortalidade quando expostos a uma concentração de 0,50 mg/L (ELAS *et al.*, 2004). Desta forma, o uso do *Betta splendens* em reservatórios domiciliares poderia também ser um indicador para avaliar altas concentrações de cloro na água, o que poderia trazer problemas para saúde da comunidade local. Ridgway e Olson (1982) chamaram atenção para a possibilidade de que altas concentrações de cloro na água poderia favorecer a seleção de microorganismos tolerantes a esse cloro. É importante que os peixes sejam utilizados em áreas onde a concentração de cloro na água seja conhecida com antecedência para que o uso de peixes tenha o impacto desejado na infestação pelo mosquito *A. aegypti*.

A espécie *Oreochromis spilurus spilurus* após um período de 30 minutos de exposição a concentração de 1,5 e 2,0 mg/L mostrou-se bastante “irritada” e após 2 horas a letalidade foi de 100% na concentração de 2,0 mg/L. Em 3 horas de exposição à concentração de 1,5 mg/L também foi 100% letal. Entretanto, esses espécimens avaliados apresentavam até 34 grams de peso (MOHAMED, 2003), sendo bem mais pesados que o *Betta splendens* e o *Poecilia reticulata*. A espécie *Clarias fuscus* tolerou aproximadamente 4,0 mg/L (NENG *et al.*, 1987). Várias outras espécies de peixes já foram testadas como alternativa para controle biológico, entretanto não levaram em consideração a presença de cloro na água (GERBERICH; LAIRD, 1985).

Segundo Silva, Arrebola e Jesus (2007) a distribuição de água para consumo humano requer condições apropriadas, obtidas através de tratamentos físicos e químicos, onde a desinfecção significa uma etapa essencial para obtenção de água potável. Por outro lado, essa desinfecção é inluenciada por fatores como temperatura e pH da água em virtude da alteração da solubilidade, estabilidade e dissociação do produto utilizado para cloração. Destaca-se ainda que falhas no processo de tratamento da água podem expor a comunidade a riscos de doenças intestinais e a outras doenças infecciosas (SILVA; ARREBOLA; JESUS, 2007). Segundo Meyer (1994) a ocorrência da epidemia de cólera no Brasil, a partir de 1991, provavelmente resultou num aumento nas dosagens de cloro utilizadas em muitos sistemas de abastecimento de água. A avaliação dos riscos de uma elevação da concentração de cloro e a

necessidade de existir uma barreira sanitária para se evitar a propagação da doença se constitui questões delicadas, que devem ser estudadas para cada manancial usado como fonte de abastecimento, já que as características da água desempenham um papel importante na formação dos trihalometanos. Além disso, outras limitações foram encontradas no desenho desse estudo, como a falta de informação do cloro residual dos depósitos domiciliares e não nas estações de tratamento, como verificado na maior parte dos trabalhos de campo. Além disso, como há a possibilidade de variação na concentração de cloro nas torneiras, é importante que outros estudos, em condições de campo, sejam realizados para avaliar a sobrevivência desses peixes.

O *Poecilia reticulata* e o *Betta splendens* sobrevivem melhor em pH entre 6 e 8 (BHEEMA *et al.*, 1982; CASTRO; CASATTI, 1997; MULLICA; KRISANADEJ, 2001). Essa variação está no limite aceitável para água de consumo humano no Brasil (BRASIL, 2004). Nessas circunstâncias, o pH não seria um fator limitador do uso dessas espécies de peixe em depósitos domiciliares.

A maior parte da literatura sobre o uso de peixes larvófagos relata experiências em reservatórios naturais, prinicipalmente com uso das espécies *Poecilia reticulata* e *Gambusia affinis* em lagos, pequenas lagoas e plantações de arroz. Esses trabalhos normalmente descrevem o uso de peixes para controle da malária na Índia, Cuba, Polinésia Francesa e Sri Lanka. (MATHUR; RAHMAN; WATTAL, 1981; BHEEMA *et al.*, 1982; GARCIA *et al.*, 1991; LARDEUX *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2006; KUSUMAWATHIE *et al.*, 2008).

Em algumas cidades Cubanas foram introduzidos *Poecilias* em lagoas para controle de *Culex quinquefasciatus* e após 2,5 meses não havia mais a presença de mosquitos e os peixes haviam se reproduzido suficientemente para que fossem removidos para outros lugares (GARCIA *et al.*, 1991). Entretanto, existem poucos trabalhos avaliando o potencial do uso de peixes larvófagos para controle de vetores em depósitos domiciliares. O primeiro registro do uso de peixes em larga escala, como alternativa de controle de vetores em depósitos domiciliares, foi em 1905, por indígenas da América Central (MOLLOY, 1924).

Em nosso estudo, 97,6% dos peixes permaneceram nos depósitos nos primeiros 60 dias de observação e 62,7% até 90 dias após a intervenção. De acordo com o PNCD é sugerido que as visitas domiciliares, realizadas pelos agentes de endemias, ocorram com uma freqüência de dois meses, perfazendo seis ciclos de visitas domiciliares anuais em cada imóvel (BRASIL, 2009). Nessas condições seria possível atestar a permanência dos peixes e fazer a substituição ou reposição dos mesmos, caso apresentassem algum aspecto que

comprometesse sua permanência. Caso os ciclos de visitas domiciliares fossem regulares, de acordo com o sugerido pelo PNCD, aumentaria a chance de monitorar melhor a permanência dos peixes e contribuiria para melhores resultados com o uso dessa alternativa, tornando-a efetiva, já que o uso do peixe é eficaz. Trabalho de Bheema *et al.* (1982), utilizando 50 espécimes do *Gambusia affinis* por reservatório, sugeriu que o uso dos peixes não foi efetivo em virtude da grande necessidade de reposição destes (BHEEMA *et al.*, 1982). Na Etiópia, cerca de 30% dos peixes utilizados em poços, cisternas e tambores precisaram ser repostos mensalmente (FLETCHER; TEKLEHAIMANOT; YEMANE, 1992); achados semelhantes aos do Ceará. Neng *et al.* (1987) relataram que, caso os peixes não fossem encontrados nos tanques, a solicitação de reposição partia da própria população aos agentes de saúde (NENG *et al.*, 1987). No México foram utilizados 1 *L. tropicus,* 10 *A. fasciatus*, 10 *B. guatemalensis*, 10 *P. sphenops*; e 2 *I. meridionalis* por cada tanque, sendo repostos quando morriam. Em nenhum tanque com peixe foi detectado a presença de larvas (MARTINEZ-IBARA *et al.*, 2002). Takagi *et al.* (1995) testaram na Costa da Indonésia as espécies *Tilápias sp* e *Ophiocephalus sp* em tanques de piscicultura. O melhor resultado foi observado com as tilápias reduzindo 95% da infestação de larvas de mosquitos. Esse autor sugeriu ainda que fosse monitorada a sobrevivência dos peixes mensalmente e destacou também o baixo custo dessa alternativa (TAKAGI *et al.*, 1995). No Ceará, observamos que o maior percentual de peixes permaneceu nos tanques localizados ao nível do solo ($p = 0,002$). Outros experimentos são necessários para esclarecer os motivos pelos quais a maior parte dos peixes não permaneceu nos depósitos por maior intervalo de tempo e talvez o uso de mais de um espécime por depósito aumente a probabilidade de permanência nos mesmos. Destacamos ainda que o desenho de estudo utilizado para avaliar essa eficácia não foi o mais adequado o que pode ter comprometido a avaliação da efetividade do uso de peixes após seis meses. Entretanto, caso as visitas domiciliares fossem realizadas com maior frequência traria um maior custo para as atividades de campo, o que poderia inviabilizar o uso dessa estratégia. Para que isso não ocorra é importante que os peixes sejam utilizados em grandes depósitos em que a população possa acompanhar a permanência ou não dos mesmos e solicitar ou fazer essa reposição quando necessário. Assim, o uso do peixe *Betta* em depósitos como tanques de alvenaria, que ficam ao nível do solo e localizados no peridomicílio, pode ser mais efetivo para redução da infestação por larvas de *A. aegypti* em um programa de controle integrado.

Caso essa estratégia de controle seja adotada pela comunidade local haveria uma redução considerável dos custos (BHEEMA *et al.*, 1982). Neng *et al.* (1987) sugeriram ainda que o uso de peixes apresenta um custo 15 vezes inferior a utilização de controle químico

tradicional. Experiências como essas ocorreram na Nicarágua, Costa Rica, México e Somália (MOLLOY, 1924; CONEJO *et al.,* 2000; MARTINEZ-IBARA *et al.,* 2002; MOHAMED, 2003). No Brasil, já existe relato de boa receptividade do uso do *Betta splendens* em um pequeno município no sertão central do Ceará (FRUTUOSO, 2006). Outros estudos com esse propósito devem ser realizados em diferentes municípios para que se possa perceber os motivos pelos quais determinadas comunidades tem preferência ou não, pelo uso do peixes larvófagos em substituição aos larvicidas químicos.

Sharma *et al.* (1997) se propuseram a determinar a capacidade e a eficácia do *Gambusia* como controle de vetores em vários tipos de depósitos que acumulassem água. Sua utilização não se mostrou tão eficaz em reservatórios como covas, barris, tambores e drenos. No entanto, foi observado que em tanques e poços reduziu em 100% a densidade larvária de *Anofelíneos* e *Culicídeos*, após a terceira semana da sua implantação. No trabalho de Fortaleza essa avaliação foi feita de acordo com as visitas domiciliares realizadas pelos agentes do Programa Municipal de Controle do Dengue, que variaram entre 60 e 90 dias.

Lardeux *et al.* (2002) realizaram experimento em duas cidades da Polinésia para avaliar a possibilidade de controle de larvas de mosquitos por um período de 6 meses sem intervenções adicionais. A utilização do *Poecilia reticulata* foi considerada satisfatória em grande parte dos reservatórios (lagoas e grandes poços) onde os peixes se adaptaram rapidamente e proliferaram sistematicamente eliminando as larvas. Nesse trabalho de Fortaleza foi acompanhada a sistemática de visitas domiciliares do Programa de Controle e sem intervenção dos pesquisadores, o que não acarretou custos extras com um maior número de visitas domiciliares.

Em outro estudo o peixe *Oreochromis niloticus (Perciformes: Cichlidae) (Tilapia nilotica)* foi introduzido em tanques abandonados a 1.880 m de altitude no Kenya e depois de seis meses foi avaliado o número de larvas presentes nesses tanques. Os peixes foram capazes de reduzir em 94% de larvas de *Anopheles gambie* e *Anopheles funestus* e, mais de 75% de *Culicideos*. Esse mesmo trabalho relata uma grande aceitação dessa técnica pelas comunidades rurais, em virtude de ser uma espécie comum na região (HOWARD; ZHOU; OMLIN, 2007). A mesma receptividade já foi avaliada em outro município cearense (FRUTUOSO, 2006) e é percebida em Fortaleza em virtude da grande difusão que foi feita sobre o uso do *Betta splendens*. Entretanto, percebe-se que grandes variações na concentração de cloro residual dos depósitos, o uso de apenas um espécimen de peixe por depósito, o

desconhecimento de alguns aspectos que limitariam a permanência dos peixes nesses depósitos contribuem para que a efetividade dessa ação não tenha sido tão satisfatória.

Seng *et al.* (2008) mostraram, no Cambodgia, que o *P. reticulata* foi capaz de reduzir a infestação de *A. aegypti* em tanques e que o uso dessa espécie foi bem aceito pela comunidade local, considerando assim a estratégia bastante promissora em virtude da não utilização de larvicidas químicos. Posteriormente, esse mesmo autor desenvolveu um estudo experimental de campo em oito cidades da Costa para avaliar seu potencial de utilização em larga escala. Não foi encontrada nenhuma larva nos depósitos com peixes, enquanto nos depósitos controle o índice de infestação de 3,5%. No trabalho de Fortaleza foram encontrados três depósitos onde o peixe estava presente e foram encontradas larvas. Esse fato provavelmente se deve ao grande volume dos reservatórios (>3.000 litros) e ao fato da água não estar limpa, o que favoreceu com que as larvas se escondessem. Esse fato já foi citado por Mathur, Rahman e Wattal (1981).

No Ceará, 50,1% dos tanques onde foi inserido o peixe *Betta splendens* apresentavam-se no nível do chão e 37,1% estavam completamente abertos; achados próximos aos de Cuba onde 72,9% encontravam-se ao nível do chão e 32% abertos (HERNANDEZ HERNANDEZ; MARQUES PINA, 2006). Essa situação pode ser encontrada em outras regiões, o que contribuiria para esse tipo de intervenção. No nordeste do Brasil, principalmente em áreas onde o abastecimento de água não é realizado de forma intermitente a população necessita de grandes reservatórios domiciliares para acumular água. Esses têm sido, em grande parte do Ceará, os principais depósitos infestados pelo *A. aegypti*, além de consumir grandes quantidades de inseticidas químicos por ano (BRASIL, 2009). Na Tailândia, pelo SUM-Method, que avalia o tamanho, utilização da água e material do depósito, 59% dos depósitos infestados com pupas de *A. aegypti* foram potes de barro e tanques de cimento, ambos utilizados para acumular água. Nos tanques com volume de água superior a 200 litros o risco de infestação foi duas vezes maior que naqueles com menores volumes de água (KOENRAADT *et al.*, 2007). Em 2003 e 2004, na Colômbia, foi demonstrado que os tanques não eram os reservatórios encontrados em maior número em virtude da razoável regularidade no abastecimento de água. Entretanto, independente da estação do ano esse reservatório foi responsável por até 95,8% das pupas coletadas. Por outro lado, pequenos vasilhames como garrafas foram os depósitos mais predominantes reprensentando apenas 0,1% das pupas encontradas (ROMERO-VIVAS *et al.*, 2006). Esses trabalhos reafirmam a importância dos tanques utilizados para armazenar água, em várias partes do mundo, como os principais reservatórios para produção de larvas e pupas de mosquitos. A Superintendência do Controle

de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN) recomenda o uso do peixe *Betta splendens* como alternativa para controle de larvas de *A. aegypti* em grandes recipientes de água, fossos de elevadores de construções abandonadas, piscinas desativadas e ainda grandes tanques utilizados para armazenar água, desde que não sejam utilizados com a finalidade de beber (SÃO PAULO, 2007). Essas situações corroboram com nossos achados onde a permanência do peixe foi maior em tanques de alvenaria e o uso dessa espécie de peixe apresenta grande potencial para ser utilizado nesses depósitos no nordeste brasileiro.

Outro aspecto interessante é que em Fortaleza a maior parte dos peixes sobreviveu nos depósitos localizados no peridomicílio, onde provavelmente a temperatura da água pode ser um pouco mais elevada, aumentando sua capacidade larvófaga e consequentemente sua sobrevivência. Essa hipótese é levantada por Elias *et al.* (1995) quando relataram que quanto mais elevada a temperatura da água, maior foi a capacidade larvófaga e a sobrevivência do *P. reticulata*. Por outro lado, trabalho de Harrington *et al.* (2008) sugere que não houve diferença significativa na presença de larvas de *A. aegypti* em depósitos localizados no intra ou Peri-domicílio.

No Ceará foi utilizado apenas um espécime do *Betta splendens* por depósito. Fletcher, Teklehaimanot e Yemane (1992) relataram a espécie *Aphanius dispar* sendo utilizada em poços na Etiópia, na proporção de 20 peixes por depósito. Vários espécimens das espécies *Tilápias sp* e *Ophiocephalus sp* foram utilizadas em tanques de piscicultura na Indonésia (TAKAGI *et al.,* 1995). Trabalho realizado em Cuba relatou o uso de pelo menos três espécimes do *Poecilia reticulata* em tanques utilizados para acumular água da chuva (HERNANDEZ HERNANDEZ; MARQUES PINA, 2006). Outro trabalho realizado no Cambodgia mostrou que o *Poecilia reticulata*, em grande número, reduziu a infestação de *Aedes aegytpi* em tanques (SENG *et al.,* 2008). Desta forma, o conhecimento de fatores que limitaram a permanência dos peixes nos tanques contribuiria decisivamente para sua maior efetividade, destacando-se a possibilidade do uso de mais de um espécime de peixe por depósito.

Mathur, Rahman e Wattal (1981) realizaram um experimento para comparar a eficácia da utilização do *Gambusia affinis* isoladamente e em consórcio com o larvicida Temefós. Isoladamente os peixes mantiveram a redução larvária por quatro semanas. Essa reduzida efetividade foi atribuída à grande quantidade de plantas aquáticas, zoo-plâncton e à poluição da água. O experimento mostrou ainda que quando utilizado em combinação com o larvicida

apresentava maior efetividade. Entretanto, sugeria a aplicação semanal de larvicida, devido à grande poluição das águas.

Outro trabalho avaliando a possibilidade de uso em consórcio de peixes e larvicidas foi realizado na Índia por Kumar *et al.* (1998) com o *Bacillus thuringiensis israelensis* e o peixe *Aplocheilus blocki*. Foram utilizados mais de 60.000 peixes em 2.556 poços, 173 tanques de grande volume e em 7 fontes e piscinas; com uma proporção média de 5 peixes/m^2 de área. Esse consórcio contribuiu para uma redução mais acentuada da infestação. Trabalho realizado na Austrália mostra que o uso de peixes foi bastante eficaz, entretanto quando esses peixes foram utilizados em consórcio com o larvicida Vectolex WG (*Bacillus sphaericus*) os resultados foram melhores, pois não permitiram a recolonização de insetos nos reservatórios (HURST *et al.,* 2006). Essa possibilidade de uso conjunto de larvicidas biológicos e o peixe *Betta splendens* deverá ser mais explorado em estudos futuros, já que segundo o fabricante esse larvicida não é letal para peixes.

O pré-requisito básico para que qualquer intervenção venha a funcionar em condições de campo é que a comunidade local aceite e colabore com as ações dos agentes de endemias. Vários autores reportam que o uso de peixes larvófagos tem sido aceito pela comunidade como estratégia para programas integrados de controle de vetores (MARTINEZ-IBARA *et al.,* 2002; MOHAMED, 2003; FRUTUOSO, 2006; HOWARD; ZHOU; OMLIN, 2007; SENG *et al.,* 2008). Destaca-se o trabalho de Hernandez Hernandez e Marques Pina (2006) onde registra que além da boa receptividade da população, as crianças tornaram-se aliadas ao programa de controle. Aspectos como esses devem ser incentivados para que os programas de controle de vetores tenham uma maior adesão das comunidades locais. Dessa forma, o fato da população manifestar aceitação e interesse em utilizar peixes larvófagos em substituição aos inseticidas pode agregar valor a essa alternativa de controle.

De qualquer forma o uso de peixes em depósitos domiciliares é considerado, como qualquer alternativa de controle biológico, de difícil execução em larga escala em virtude da descontinuidade das ações, da manuntenção desses peixes em quarentema e pelas estruturas dos programas de controle de vetores que na maior parte das vezes não está preparada para tais ações integradas (GERBERICH; LAIRD, 1985; HAQ *et al.,* 1993; RUSSELL *et al.,* 2001). O monitoramento dos depósitos com peixes e o conhecimento de sua biologia e hábitos poderia minimizar algumas adversidades (KOLDENKOVA; ÁVILA, 1991; TAKAGI *et al.,* 1995). Outros fatores possivelmente complicadores para o uso dessa alternativa são a grande mortalidade que algumas espécies de peixes apresentam após longas viagens e o canibalismo,

que dificultam o armazenamento de um grande número de espécimens em reservatórios (MOLLOY, 1924; HAQ *et al.*, 1993).

O fato de serem utilizadas espécies locais ou exóticas está diretamente relacionado às condições de cada país. As espécies nativas apresentam mais vantagens devido a adaptação às condições locais, como clima (NENG *et al.*, 1985; OPS, 1994). Isto sugere que caso as espécies exóticas se adaptem bem a essas condições locais não haveria problemas para sua utilização, desde que não fossem introduzidos em reservatórios naturais. O peixe *Betta splendens* está disperso por grande parte dos pequenos lagos e lagoas no Ceará (CAVALCANTI, 2006). Essa dispersão no nordeste do Brasil se deu, provavelmente, em virtude de atividades como aquarismo e controle de vetores (RECHI, 2008). Além disso, já foi citado como espécie exótica em grandes rios no Estado de Minas Gerais (MAGALHÃES; JACOBI, 2008).

Entretanto, os impactos dessa presença ainda não foram avaliados em larga escala. Alguns ictiologistas vêem com preocupação a utilização de peixes em habitats naturais, onde eles não são nativos, em virtude do possível dano potencial para estes ecossistemas. Quando se iniciou o uso de peixes para controle de mosquitos alguns especialistas chegaram a desincentivar, pois além do risco para o ecossistema os peixes poderiam esgotar os inimigos naturais dos insetos (RUPP, 1996). O controle de mosquitos utilizando peixes larvófagos se encontra entre os métodos biológicos que menos causam danos ao ecossistema, desde que utilizados de forma adequada e respeitando o ambiente e a diversidade biológica local (HERNANDEZ CONTRERAS *et al.*, 2005). Entretanto, segundo alguns autores, espécies exóticas podem causar redução da fauna nativa e contribuir para o declínio de algumas espécies de anfíbios. Trabalho de Lawler *et al*.(2001), mostrou que a presença do *Gambusia affinis* em lagos naturais contribuiu para redução do número de rãs (*Rana aurora draytonii*). Esses anfíbios foram menos ativos na presença de peixes predadores (LAWLER *et al.*, 2001). Outro trabalho mostra que a presença do *Gambusia affinis* em rios perenes dos Estados Unidos pode afetar negativamente a permanência e crescimento populacional da espécie de anfíbio *Hyla regilla* (GOODSELL *et al.*, 1999). A adaptação trófica é um fenômeno comum aos organismos em geral, com destaque para os peixes. Segundo Quintans (2008) os peixes, mesmo com preferência alimentar por larvas de mosquitos, em situações adversas podem se alimentar perfeitamente de zooplâncton e outros microorganismos existentes. Ressaltamos que no Ceará os peixes vem sendo utilizados em depósitos domiciliares utilizados para armazenar água e não em reservatórios naturais. Entretanto, deve-se chamar atenção para as condições de biossegurança dessa alternativa de controle biológico.

Por outro lado e com muito mais evidências existe também trabalhos abordando os impactos ambientais do uso de larvicidas químicos e inseticidas para controle de mosquitos transmissores de doenças, nesses ambientes naturais. A grande limitação desses estudos se deve principalmente a variação na biomassa e riqueza de espécies sazonais existentes nesses reservatórios naturais. Trabalho realizado na Itália mostrou que o uso de larvicidas a base de permetrina para controle do vetor da filariose cutânea em rios interferiu nas populações de invertebrados e outras espécies não-alvo. Entretanto, o próprio autor considerou que seus achados de efeitos adversos ao ambiente não foram definitivos em função dessa variação biológica sazonal (CROSA *et al.*, 2001). Trabalho de Mohsen e Mulla (1982) mostrou que o uso do larvicida FMC-45497 utilizado para controle de *Simulium* na concentração de 0,01ppm apresentou um impacto acentuado na fauna aquática de organismos não-alvo, com destaque para *Baetis*, *Chironomidae, Hydropsyche* e *Odonata*. Trabalho de Laskowski *et al.* (1999) mostrou que o uso do larvicida Temefós em ambientes naturais para controle de insetos apresentou redução significativa ($p<0,01$) de espécies não-alvo, como larvas de *Chironomidae*. Arshad e Mulla (1978) avaliaram o impacto ambiental provocado pelo uso de larvicidas em lagos recreativos. A utilização do Temefós (0,0092 ppm/ha) afetou a população de *Cyclops sp*. O impacto sobre esses organismos não-alvo foi importante e duradouro. Trabalho de revisão coordenado pela Agência Internacional de desenvolvimento dos Estados Unidos (2006) relatou a preocupação com o uso de inseticidas para controle de insetos, principalmente no tocante a pulverização com Cipermetrina em virtude dos operadores e espécies não-alvo. Destacou a elevada toxicidade da Cipermetrina para peixes, abelhas e outros invertebrados aquáticos sendo a CL50 0,0082mg/L para truta arco-íres, 0,0018mg/L para o peixe-lua. Desta forma, existe muito a ser estudado em relação ao impacto de intervenções para controle de vetores em condições naturais, o que não foi o foco específico nesse estudo.

O uso de peixes como agentes de controle biológico deve ser incentivado, não como uma solução para o problema do dengue, mas utilizado em consórcio com outros métodos de controle. No entanto, o uso dessa tecnologia deverá ser limitada a grandes reservatórios domiciliares de água, que são muito relevantes para proliferação do *A. aegypti* e principalmente para produção de pupas no nordeste brasileiro. Desta forma, o *B. splendens* pode ser utilizado como alternativa de controle biológico em reservatórios domésticos utilizados para acumular água, principalmente os tanques de alvenaria, desde que a concentração de cloro seja previamente conhecida. A estratégia de utilização de apenas um

espécime de peixe deve ser repensada pelos serviços de saúde com o objetivo de viabilizar uma maior permanência dos mesmos nos tanques.

Como limitações desse estudo destacamos o volume dos depósitos utilizados para avaliar o padrão de oviposição de fêmeas de *A. aegypti.* Essa estratégia de utilização de aquários apresenta como principal deficiência o fato de não reproduzir com precisão os depósitos encontrados no ambiente natural ou domiciliar, com a complexidade que envolve esses ambientes, com fatores como diversidade de outros organismos, mobilidade dos peixes, iluminação e a variação diária na temperatura da água. Trabalho de Harrington *et al.* (2008) sugere que quanto maior for o reservatório maior será a probabilidade da existência de predadores naturais e ainda que as fêmeas de *A. aegypti* preferem ovipor em depósitos com maior volume de água, maior diâmetro e maior espelho de água. Achados similares aos encontrados por Bezerra (1999) no Ceará. Além disso, como a temperatura e a umidade foram constantes durante todos os experimentos sobre o comportamento de postura, a variação do número de ovos durante as semanas deveu-se, possivelmente, ao fato de os mosquitos não se encontrarem no mesmo estágio de maturidade e não ter sido garantida a mesma idade para todas as fêmeas de mosquitos utilizadas no laboratório. Em relação ao trabalho de campo teríamos pelo menos duas possibilidades de avaliação: a primeira propondo um estudo experimental onde a intervenção seria feita pelos pesquisadores de campo, em condições controladas e com inspeções mais freqüentes aos reservatórios. Uma segunda possibilidade, que optamos nesse trabalho, avaliou o uso do peixe em condições normais do programa de controle, sem intervenção por parte dos pesquisadores. Essa estratégia apresenta importantes limitações para avaliação dos motivos pelos quais os peixes não permaneceram nos depósitos e pelo tempo entre uma inspeção e outra. Entretanto, apresenta dados fidedignos de como o uso de peixes funcionava em condições reais em uma cidade de grande porte e com os problemas que são comuns a todos os programas de controle, como carência de servidores no campo, absenteísmo, escasso material de campo, falta de transporte, tempo excessivo entre as visitas domiciliares, falta de supervisão, entre outras. Outros trabalhos de campo, em condições mais controladas, devem ser realizados para minimizar as limitações desse trabalho em virtude da opção que fizemos em utilizar dados secundários do Programa Municipal de Controle do Dengue de Fortaleza.

7 CONCLUSÕES

- O peixe *B. splendens* suporta elevadas concentrações de cloro podendo ser utilizado para controle de mosquitos vetores de doenças em grandes reservatórios domiciliares, como alternativa ao uso de inseticidas químicos.

- O peixe *P. reticulata*, apesar de apresentar expressiva capacidade larvófaga, não suporta a concentração de cloro existente nos reservatórios que recebem água da Companhia de Água e Esgoto do Ceará (Cagece). Dessa forma, essa espécie de peixe não deve ser utilizada como alternativa de controle biológico de larvas de mosquitos em depósitos domiciliares que contenham água clorada.

- Depósitos com a presença do peixe *B. splendens* parecem "repelir" a postura de ovos por fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Isso não ocorreu na presença do *P. reticulata*. Assim, o uso do peixe *B. splendens* em reservatórios domiciliares pode contribuir para uma busca por outros reservatórios para oviposição e, consequentemente, uma maior dispersão desse vetor.

- O uso do *B. splendens*, em condições de campo, desde que o mesmo permaneça nos depósitos foi mais eficaz que nos depósitos em que foi adicionado o larvicida biológico *Bti*. Entretanto, nos depósitos em que o peixe não permaneceu, a infestação foi mais elevada. Ou seja, em condições em que não for possível atestar a permanência dos peixes nos depósitos parece mais viável o uso de larvicidas convencionais.

- Se os ciclos de visitas domiciliares forem realizados como preconizado pelo Programa Nacional de Controle do Dengue (PNCD), a cada dois meses, 97,6% dos peixes ainda estariam presentes nos depósitos, podendo ser averiguada suas condições e a necessidade ou não de substituição do mesmo; fato que contribuiria para uma maior efetividade do uso dos peixes.

- Os depósitos que ofereceram as melhores condições para permanência dos peixes foram os tanques de alvenaria, localizados no peridomicílio e ao nível do solo, independente do volume. Desta forma, os Programas Municipais de Controle do Dengue deveram priorizar o uso do peixe *B. splendens* nos depósitos que apresentem essas características para que essa alternativa de controle seja mais efetiva.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. F. S.; SANTOS, L.U. **O uso de predadores no controle biológico de mosquitos, com destaque aos *Aedes***. Campinas: Instituto de Biologia/Unicamp, 2004. Disponível em:< http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/C%20B%20de%20mosquitos%20eu+lu%202004.pdf>. Acesso em:

ANGELON, K. A.; PETRANKA, J. W. Chemicals of predatory mosquitofish (*Gambusia affinis*) influence selection of oviposition site by *Culex* mosquitoes. **J. Chem. Ecol.,** v. 28, p. 797-806, 2002.

ARAÚJO, F. G.; PEIXOTO, M. G.; PINTO, B. C. T.; TEIXEIRA, T. P. Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a pollutedstretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. **Braz. J. Biol.,** v. 69, p. 41-48, 2009.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *A. aegypti***. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 36, p. 17-25, 2003.

ARSHAD, A.; MULLA, M. I. R. S. Effects of *Chironomid* Larvicides and Diflubenzuron on Nontarget Invertebrates in Residential-Recreational Lakes. **Environ. Entomol.,** v. 7, p. 21-27, 1978.

BEZERRA, H. S. S. **Determinantes da infestação domiciliar pelo *A. aegypti* na cidade de Fortaleza**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

BHEEMA, R. U.; KRISHNAMMORTHY, K.; REDDY, C. B.; PANILER, K. N. Feasibility of mosquito larval control in casuarina pits using *Gambusia affinis***. Indian J. Med. Res.,** v. 76, p. 684-688, 1982.

BOND, H. A.; FAY, R.W. Factors influencing *A. aegypti* occurrence in containers. **Mosquito News,** v. 29, p. 113-116, 1969.

BORDA, C. E.; REA, M. J. F.; HUERTA BRUNEL, J. E. **Capacidad predadora de um alevino de *Geophagus brasiliensis* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus***. Corrientes, Argentina: Centro Nacional de Parasitologia y Enfermidades Tropicales, 2001.

BORDA, C. E.; REA, M. J. F.; ROSA, J. R. **Estúdios de la capacidad predadora de peces sobre larvas de *Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)***. Corrientes, Argentina: Comunicaciones científicas y tecnológicas del Centro Nacional de Parasitologia y Enfermidades Tropicales, 2001.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *A. aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde,** v. 16, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica.** 5. ed. Brasília, DF: FUNASA, 2002.

_____. Portaria n.º 518, de 25 e março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266.

_____. **Inf. Epidemiol.,** n. 17, 2009a. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_ate_semana_26.pdf>. Acesso em: 20 set. 2009.

_____. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília, DF, 2009b. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRONSTEIN, P. M. On the predictability, sensibilization, and habituation of aggression in males bettas (*Betta splendens*). **J. Comp. Psychol.,** v. 108, p. 45-57, 1994.

COMPANHIA DE ÁGUA E ESGOTO DO CEARÁ (CAGECE). **Relatório Anual Técnico sobre Qualidade da Água**: Controle de Qualidade de Produtos. Fortaleza, 2007.

CALADO, D. C.; SILVA, M. A. N. Avaliação da influência da temperatura sobre o desenvolvimento de *Aedes albopictus*. **Rev. Saúde Pública,** v. 36, p. 173-179, 2002.

CÂMARA, F.P.; THEOPHILO, R.L.G.; SANTOS, G.T.; PEREIRA, S.R.F.G.; CÂMARA, D.C.P.; MATOS, R.R.C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 40, p. 192-196, 2007.

CAPRARA, A.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; MARINHO, A.C.P.; CALVASINA, P.G.; LANDIM, L.P.; SOMMERFELD, J. Irregular water supply, household usage and dengue: a bio-social study in the Brazilian Northeast. **Cad. Saúde Pública,** v. 25, Supl. 1, p. S125-S136, 2009.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Parana River basin, southeastern Brazil. **Ichthyol. Exp. Freshwaters**, v. 7, n. 3/4, p. 337-352, 1997.

CAVALCANTI, L. P. G. **Potencial de cinco espécies de peixe como alternativa de controle biológico de larvas de *A. aegypti* em condições de laboratório**. 2006. 217 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; PAULA JÚNIOR, F. J.; FRUTUOSO, R. L.; SOUSA, E. P; DANTAS FILHO, F. F.; LIMA, J. W. O. Competência de peixes como predadores de larvas de A. aegypti, em condições de laboratório. **Rev. Saúde Pública,** v. 41, n. 4, p. 638-644, 2007.

CECH Jr, J. J.; LINDEN, A. L. Comparative larvivorous perfomances of mosquito fish, *Gambusia affinis*, and juvenile Sacramento *Blackfish, Orthodon microlepidotus*, in experimental paddies. **J. Am. Mosq. Control Assoc., v.** 3, p. 35-41, 1987.

CHADEE, D. D. Bacterial pathogens isolated from guppies (*Poecilia reticulata*) used to control *A. aegypti* in Trinidad**. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.** 86, p. 693-693, 1992.

CHADEE, D. D.; WARD, R.A.; NOVAK, R. J. Natural habitats of *A. aegypti* in the Caribbean. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 14, p. 5-11, 1998.

CHANDRA, G.; BHATTACHARJEE, I.; CHATTERJEE, S. N.; GHOSH, A. Mosquito control by larvivorous fish. **Indian J. Med. Res.,** v. 127, p. 13-27, 2008.

CHAPMAN, H.C. Biological Control of Mosquitoes. **Am. Mosq. Control Assoc. Bull**., v. 6, p. 1-218, 1985.

CHERNOVIZ, P. L. N. **Dicionário de medicina popular.** 6. ed. Paris: Typografia Laemmert, 1890.

CONSOLI, R. A.; GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, C. P.; SANTOS, B. S. Predatory activity of *Helabdella triserialis lineata (Hirudínea: Glossiphonidae)* on immature forms of *Aedes fluviatis* and *Culex quinquefasciatus* (*Diptera: Culicidae*) in laboratory. **Rev. Saúde Pública,** v. 15, p. 359-366, 1984.

CROSA, G.; YAMÉOGO, L.; CALAMARI, D.; DIOP, M. E.; NABÉ, K.; KONDÉ, F. Analysis of the effects of rotational larviciding on aquatic fauna of two Guinean rivers: the case of permethrin. **Chemosphere,** v. 44, p. 501-510, 2001.

CRUZ, A. M.; MESA, A.; SAN MARTÍN, J. L. La comunidad y el control de *A. aegypti*: percepción y comportamiento respecto al larvicida abate. **Rev. Cubana Med. Trop.,** v. 53, n. 1, p. 44-47, 2001.

CUNHA, R. V.; MIAGOSTOVICH, M. P.; PETROLA, Z.; ARAUJO, E. S. M.; CORTEZ, D. L. F. V.; POMBO, V.; SOUZA, R. V.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Retrospective study on dengue in Fortaleza, state of Ceara, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 93, p. 155-159, 1988.

CUNHA, R. V.; MASPERO, R. C.; MIAGOSTOVICH, M. P.; ARAÚJO, E. S. M.; LUZ, D. C.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue infection in Paracambi, state of Rio de Janeiro, 1990-1995. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 30, p. 379-383, 1997.

DAMAZIO, A. **Criando o *Betta splendens***. 2. ed. Rio de Janeiro: Interevistas, 1992.

DELGADO, M. J. P.; GUTIERREZ, J. M.; RADIC, L. B.; MARETIC, T.; ZEKAN, S.; ZUPANC, T. A.; AYMAR, E. S.; TRILLA, A.; BRUSTENGA, J. G. Imported Dengue Hemorrhagic Fever, Europe. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 14, p. 1329-1330, 2008.

DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos**. Pesq. Agropec. Bras.,** v**.** 27, p. 59-76, 1992.

DICKSON, S. H. **On dengue**: its history, pathology, and treatment. Philadelphia: Haswell, Barrington & Haswell, 1855.

DIXIT, R. S.; SACHDEVA, R. N.; VARMA, B. D. Larvivorous efficiency of *Gambusia affinis* baird and girard. **Indian J. Med. Res.,** v. 73, Suppl., p. 155-159, 1981.

DN. 33 mil tanques já foram "peixados". **Diário do Nordeste**, Fortaleza, 20 jul. 2004. Disponível em:< http://www.diariodonordeste.com.br>. Acesso em: 7 dez. 2009.

DONALÍSIO, M. R. **O dengue no espaço habitado.** São Paulo: Hucitec, 1999.

DUA, V. K.; PANDEY, A. C.; RAI, S.; DASH, A.P. Larvivorous activity of *Poecilia reticulata* against *Culex quinquefasciatus* larvae in a polluted water drain in Hardwar, India. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 23, n. 4, p. 481-483, 2007.

EIRAS, A. E.; RESENDE, M. C. Preliminary evaluation of the "Dengue-MI" technology for *A. aegypti* monitoring and control. **Cad. Saúde Pública,** v. 25, supl. 1, p. S45-S58, 2009.

ELAS, M. E.; ROMERO, A.; GONZALEZ, I. J.; ALVARADO, V.; NAVASCUES, A.; NUNEZ, M.; ZETINO, R.; AYALA, M.; LOBO, M. **Ensaio para evaluar la utilidad del gênero *Poecilia* sp. como biocontrolador de los estádios acuaticos del *A. aegypti***. San

Juan, Opico, El Salvador: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador, 2004.

ELIAS, M.; ISLAM, M. S.; KABI, M. H.; RAHMAN, M. K. Biological control of mosquito larvae by *Guppy fish*. **Bangladesh Med. Res. Council Bull.,** v. 21, n. 2, p. 81-86, 1995.

ENDLER, J. A. Predation, light intensity and courtship behaviour in *Poecilia reticulata* (Pisces: *Poeciliidae*). **Anim. Behav.,** v. 35, p. 1376-1385, 1987.

FARRAR, J.; FOKS, D.; GUBLER, D. Towards a global dengue research agenda. **Trop. Med. Int. Health,** v. 12, p. 695-699, 2007.

FERNANDES, W. D.; FERNANDES, M. F.; NASCIMENTO, J. C.; PERES, M. T. L. P.; GONÇALVES, M. C.; FLOR, G. B.; QUARESMA, F. Efeito do extrato de Pimenta-do-reino sobre larvas de *A. aegypti*. **Inf. Epidemiol. SUS,** v. 10, supl.1, p. 53-55, 2001.

FIGUEIREDO, I. C.; FONSECA, I. R.; TEIXEIRA, E. C. Avaliação da aplicabilidade de modelos cinéticos na previsão da desinfecção de água com cloro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21.; FEIRA INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS DE SANEAMIENTO AMBIENTAL, 4., 2001, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001. I-062, p. 1-7.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil I: History, epidemiology and research. **Virus Rev. Res.,** v. 1, 9-16, 1996.

FIGUEIREDO, L.T.M. Vacinas contra dengue. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 21-25, 1999.

FIGUEIREDO, R. M. P.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; VIANA, S. S.; MOURÃO, M. P. G.; COSTA, C. A.; FARIAS, I. P. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 14, p. 667–669, 2008.

FLETCHER, M. A.; TEKLEHAIMANOT, A.; YEMANE, G. Control of mosquito larvae in the Port City of Assad by an indigenous larvivorous fish, *Aphanius dispar*. **Acta Tropica,** v. 52, p. 155-156, 1992.

FLETCHER, M. A.; TEKLCHAIMANOT, G.; YEMANC, A.; KASSAHUM, G.; KIDANE, Y. Prospects for the use of larvivorous fish for malaria control in Ethiopia: search for indigenous species and evaluation of their feeding capacity for mosquito larvae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 96, p. 12-21, 1993.

FORSHEY, B. M.; MORRISON, A. C.; CRUZ, C.; ROCHA, C.; VILCARROMERO, S.; GUEVARA, C.; CAMACHO, D. E.; AVALA, A.; MADRID, C.; BEINHOLEA, L.; SUARES, V.; COMACH, G.; KOCHEL, T. J. Dengue vírus serotype 4, northeastern Peru, 2008. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, n. 11, p. 1815-1818, 2009.

FRANCO, O. **A história da febre amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1976.

FREDERICI, B. A. The future of microbial insectives as vector control agents. **J. Am. Mosq. Control Assoc**., v. 11, p. 260-268, 1995.

FRENKEL, V.; GOREN, M. Some environmental factors affecting the reproduction of *Aphaniur dispar* (Ruppell, 1828). **Hydrobiologia,** v. 347, p. 197-207, 1997.

FRUTUOSO, R. L. **Utilização de peixes como alternativa para o controle do dengue**: percepção da população do município de Pedra Branca, Ceará, Brasil. Monografia (Graduação) -Universidade Federal do Ceará, 2006.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *A. aegypti* L. (*Diptera: Culicidae*). **Neotrop. Entomol.,** v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *A. aegypti*. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.,** v. 37, p. 29-36, 1985.

GARCIA AVILA, I.; KOLDENKOVA, L.; SANTAMARINA MIJARES, A.; GONZALEZ BROCHE, R. Introducción del pez larvívoro *Poecilia reticulata* (Peters, 1985): agente biorregulador de culicídios en lagunas de oxidación y zanjas contaminadas en la isla de la Juventud. **Rev. Cubana Med. Trop**., v. 43, n. 1, p. 45-49, 1991.

GARCIA BALUJA, R.G.; Del PUERTO RODRÍGUEZ, A.; CAÑAZ PÉREZ, R. Impacto en el ambiente y La salude de lãs medidas de intervención social Del “proyecto Cayo Hueso”. **Rev. Cuba. Hig. Epidemiol**., v. 40, n. 1, p. 31-37, 2002.

GARNIER, M.; DELAMARE, V. **Dicionário de termos técnicos de medicina**. 20. ed. São Paulo: Organização Andrei Ed., 1984.

GENE, C. M.; ROSA, J. R.; REA, M. J. F.; BORDA, C. E. **Control biológico de mosquitos - I Ensayos Preliminares con peces autóctones.** Corrientes, Argentina: Comunicaciones científicas y tecnológicas del Centro Nacional de Parasitologia y Enfermidades Tropicales, 1999.

GERBERICH, J. B.; LAIRD, M. Larvivorous fish in the biocontrol of mosquitoes with a select bibliography of recent literature. In: LAIRD, M.; MILES, J. W. **Integrated mosquito control methodologies**. London: Academic Press, 1985. v. 2.

GHOSH, S. K.; DASH, A. P. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**., v. 101, p. 1063-1064, 2007.

GÓMEZ-DANTÉS, H.; WILLOQUET, J. R. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Cad. Saúde Pública,** v. 25, supl. 1, p. S19-S31, 2009.

GUBLER, D. J. Dengue haemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 11, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; MELTZER, M. In: CHAMBERS, T. J.; MONATH, T. P. (Ed.). **Advances in Virus Research:** Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. [S.l.]: California Academic Press, 2003.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. Review. **Emerg. Themes Epidemiol.,** v. 2, p. 1-10, 2005.

GUIMARÃES, M. H.; VASCONCELOS, P. F. C.; NUNES, M. R. T.; RODRIGUES, S. G.; TANAJURA, D.; TAVARES-NETO, J.; DAMASCENO, E. Inquérito soroepidemiológico de dengue em dois municípios do Estado do Acre, fronteira Brasil – Bolívia. **Rev. Ciênc. Méd. Biol**., Salvador, v. 5, p. 13-20, 2006.

GUZMÁN, M. G.; GARCÍA, G.; KOURÍ, G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridade de investigación. **Rev. Panam. Salud Publica,** v. 19, n. 3, p. 204-215, 2006.

HALSTEAD, S. B. Etiologies of the Experimental Dengues of Siler and Simmons. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 23, p. 974-982, 1974.

HALSTEAD, S. B.; PAPAVANGELOU, G. Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 29, p. 635-637, 1980.

HAQ, S.; PRASAD, H.; PRASAD, R.N.; SHARMA, T. Availability and utility of local fishes of Shahjahanpur for mosquito control. **Indian J. Malariol.,** n. 30, p. 1-8. 1993.

HARRINGTON, L. C.; PONLAWAT, A.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W.; VERMEYLEN, F. Influence of Container Size, Location, and Time of Day on Oviposition Patterns of the Dengue Vector, *A. aegypti*, in Thailand. **Vector-Borne Zoonotic Dis.,** v. 8, p. 415-423, 2008.

HERMOSO, D. E. El *Betta splendens*. **Acuarismo,** v. 1, p. 86-91, 1992.

HERNANDEZ CONTRERAS, N.; FIMIA DUARTE, R.; ROJAS URDANETA, J. E.; GARCIA ÁVILA, G. I. Metodologia para valorar el potencial y la capacidad depredadora de los peces larvívoros mediante observaciones directas en el laboratorio. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 57, n. 2, p. 156-158, 2005.

HERNANDEZ HERNANDEZ, E.; MARQUES PINA, M. Control de larvas de *A. aegypti* con *Poecilia reticulata*: una experiencia comunitaria en el municipio Taguasco, Sancti Spirutus, Cuba. **Rev. Cuba. Med. Trop**., v. 58, n. 2, mayo/ago. 2006.

HOMBACH, J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development. **Rev. Panam. Salud Publica,** v. 21, n. 4, p. 254-260, 2007.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. 2. ed. New York: John Wiley and Sons. Inc., 2000.

HOWARD, A. F. V.; ZHOU, G.; OMLIN, F. X. Malaria mosquito control using *edible* fish in western Kenya: preliminary findings of a controlled study. **BMC Public Health,** v. 7, p. 1-6, 2007.

HURST, T. P.; BROWN, M. D.; KAY, B. H.; RYAN, P. A. Evaluation of *Melanotaenia duboulay* (Atheriniformes: Melanotaeniidae), *Hypseleotris galii* (Peciformes: *Eleotridae*), and larvicide Vectolex WG (*Bacillus sphaericus*) for integrated control of *Culex annulirostris*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 22, p. 418-425, 2006.

JAYASREE, M.; PANICKER, K. N. Larvivorous potential of some indigenous fishes of Sherthallai region with special reference to their efficacy in control of mansonioides**. Indian J. Med. Res.,** v. 95, p. 195-199, 1992.

KAY, B. H.; CARLSON, P. C.; ADRIAN, C. S.; MICHAEL, D. B.; RIBEIRO, Z. M.; VASCONCELOS, W. Laboratory evaluation of Brazilian *Mesocyclops* (*Copepode: Cyclopidae*) for mosquito control. **J. Med. Entomol.**, v. 29, p. 599-602, 1992.

KITTAYAPONG, P.; STRICKMAN, D. Distribuition ofcontainer-inhabiting *A. aegypti* larvae (Diptera: Cilicidae) at a dengue focus in Tailand. **J. Med. Entomol.,** v. 30, p. 601-606, 1993.

KOENRAADT, C. J. M.; JONES, J. W.; SITHIPRASASNA, R.; SCOTT, T. W. Standardizing container classification for immature *A. aegypti* surveillance in Kamphaeng Phet, Thailand. **J. Med. Entomol.,** v. 44, p. 938-944, 2007.

KOLDENKOVA, L.; FAMTHINGOC, D.; ISRAEL, G. A.; ISRAEL, G. G. Alimentacción de los alevinos de pez larvívoro *Poecilia reticulata* (*Cyprinodontiformes: Poecilidae*) em un criadero natural de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823). **Rev. Cuba. Med. Trop.,** v. 41, p. 140-148, 1989.

KOLDENKOVA, L.; ÁVILA, I. G. Estúdio de la fecundidad del pez larvívoro *Rivulus cylindraceus*, Poey, 1860 (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae), agente biorregulador de culicídeos, em condiciones de laboratorio. **Rev. Cuba. Med. Trop.**, v. 43, p. 59-65, 1991.

KOURI, G. P.; GUZMAN, M. G.; BRAVO, J. R.; TRIANA, C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons learned from the Cuba epidemic. **Bull. World Health Org.,** v. 67, p. 375-380, 1989.

KOURI, G.P. 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, M. S. Oviposition Attractants and Repellents of Mosquitoes: Oviposition Responses of *Culex* Mosquitoes to Organic Infusions. **Environ. Entomol.,** v. 8, p. 1111-1117, 1979.

KRAMER, D. L.; MEHEGAN, J. P. Aquatic surface respiration, an adaptive response to hypoxia in the guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces, *Poeciliidae*). **Environ. Biol. Fishes,** v. 6, p. 299-313, 1981.

KUMAR, A.; SHARMA, V. P.; SUMODAN, P. K.; THAVASELVAM, D. Field trials of biolarvicide *Bacillus thuringiensis var. israelensis* strain 164 and the larvivorous fish *Aplocheilus blocki* against *Anopheles stephensi* for malária control in Goa, India**. J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 14, p. 457-462, 1998.

KUMAR, R.; HWAG, J. S. Larvicidal efficiency of aquatic predators: a perspective for mosquito biocontrol. **Zool. Studies,** v. 45, p. 447-466, 2006.

KUSUMAWATHIE, P. H. D.; WICKREMASINGHE, A. R.; KARUNAWEERA, N. D.; WIJEYARATNE, M. J. S. Larvivorous potential of fish species found in river bed pools below the major dams in Sri Lanka. **J. Med. Entomol.,** v. 43, p. 79-82, 2006.

KUSUMAWATHIE, P. H. D.; WICKREMASINGHE, A. R.; KARUNAWEERA, N. D.; WIJEYARATNE, M. J. S. Costs and effectiveness of application of *Poecilia reticulata* (guppy) and temephos in anopheline mosquito control in river basins below the major dams of Sri Lanka. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**., v. 102, p. 705-711, 2008.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W. Mode of transmission and the evolution of arbovírus virulence in mosquito vectors. **Proc. Biol. Sci.,** v. 276, n. 1660, p. 1369-1378, 2009.

LASKOWSKI, H. P.; LARSEN, A. C.; O'SHEA, G. F.; PITTENDRIGH, B. R. Effect of Xanthan Gum and Traditional Mosquito Larvicides on *Chironomid* Larvae. **Wildlife Soc. Bull.,** v. 27, p. 741-745, 1999.

LAUBUSCH, E. J. Chlorination and other disinfection processes. In: AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. **Water quality and treatment**: a handbook of public water supplies New York: McGraw-Hill, 1971. p. 158-224.

LARDEUX, F.; SECHAN, Y.; LONCKE, S.; DEPARIS, X.; CHEFFORT, J.; FAARUIA, M. Integrated control of peridomestic larval habitats of *Aedes* and *Culex* mosquitoes (Diptera: *Culicidade*) in atoll villages of French Polynesia. **J. Med. Entomol.,** v. 39, p. 493-498, 2002.

LAWLER, S. P.; DRITZ, D.; STRANGE, T.; HOLYOAK, M. Effects of Introduced Mosquitofish and Bullfrogs on the Threatened California Red-Legged Frog. **Conserv. Biol.**, v. 13, p. 613-622, 2001.

LEGNER, E. F.; MEDVED, R. A. The native desert pupfish, *Cyprinodon macularius* Baird and Girard, a substitute for *Gambusia* in mosquito control? **Calif. Mosq. Pest. Resist.,** v. 42, p. 58-59, 1974.

LIBÓRIO, M.; TOMISANI, A. M.; MOYANO, C. B.; SALAZAR, R.; BALPARDA, L. R. Estrategias de prevención de dengue-Rosario, Argentina. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, p. 311-327, 2004.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA-FILHO, A. M.; LIMA, J. W. O.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S. Resistência do *A. aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

LIMA, J. W. O.; PAMPLONA, L. G. C.; NOGUEIRA, M. S. F. Avaliação do peixe *Betta splendens* como forma de controle biológico no município de Fortaleza, Ceará**.** In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL EM PREVENÇÃO E CONTROLE DO DENGUE, 2., 2003, Brasília. **Anais.** Brasília, 2003.

LIMA, M. M.; ARAGÃO, M. B.; AMARAL, R. S. Criadouros de *A. aegypti* encontrados em alguns bairros na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Brasil, em 1984 - 85. **Cad. Saúde Pública,** v. 4, p. 293-300, 1998.

LIMA, V. L. C.; FIGUEIREDO, L. T. M.; CORREA, F. H. R.; LEITE, O. F.; RANGEL, O.; VIDO, A. A.; OLIVEIRA, S. S.; OWA, M. A.; CARLUCCI, R. H. Dengue fever**:** a post-epidemic soro-epidemiological survey in an urban setting at a northwestern county of S. Paulo State - Brazil**. Rev. Saúde Pública**, v. 33, p. 566-574, 1999.

MAESTRE-SERRANO, R.; PACHÓN-MUÑOZ, E. Actividad enzimática de isoenzimas de llactato: nad+oxidoreductasa (LDH; EC.1.1.1.27) durante el desarrollo embrionario del pez combatiente siames *Betta splendens* (Regan, 1909). **Rev. Acad. Colombiana Ciências,** v. 30, p. 459-464, 2006.

MAGALHÃES, A. L. B.; JACOBI, C. M. Ornamental exotict fish introduced into Atlantic Forest water bodies, Brazil. **Neotrop. Biol. Conserv.,** v. 3, p. 73-77, 2008.

MANNA, B.; ADITYA, G.; BANERJEE, S. Vulnerability of the mosquito larvae to the guppies (*Poecila reticulata*) in the presence of alternative preys. **J. Vector Borne Dis**., v. 45, p. 200-206, 2008.

MARCONDES, C. B.; ALENCAR, J.; BALBINO, V. Q.; GUIMARÃES, A. E. Description of three practical and inexpensive devices for the collection of mosquitoes and other small insects. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 23, p. 84–86, 2007.

MARINO-NETO, J.; SABBATINI, R. M. E. A stereotaxic atlas for the telencephalon of the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 971-986, 1988.

MARQUETTI, M. C.; CARÚS, F.; AGUILERA, L.; GONZALEZ, D.; NAVARRO, A. Comportamiento del programa de erradicación de *A. aegypti* en 2 municipios de Ciudad de la Habana, 1990-1992. **Rev. Cuba. Med. Trop.,** v. 48, n. 3, p. 174-177, 1996.

MARTINEZ-IBARA, J. A.; GUILLÉN, Y. G.; ARREDONDO-JIMENOS, J. I.; RODRIGUEZ-LOPES, M. H. Indigenous fish species for the control of *A. aegypti* in water storage tanks in Southern Mexico. **Biol. Control**., v. 47, p. 481-486, 2002.

MATHUR, K. K.; RAHMAN, S. J.; WATTAL, B. L. Integration of larvivorous fish and temefos for the control of *Culex tritaeniorhynchus* breeding. **J. Commun. Dis.,** v. 13, n. 1, p. 58-63, 1981.

MAYA PEÑA, E.M.; MARAÑÓN-HERRERA, S. Efecto del pH sobre la proporción de sexos, el crecimiento y la sobrevivencia del guppy *Poecilia reticulata* (Peters, 1859). **Hidrobiológica,** v. 8, n. 2, p. 125-132, 1998.

MEDEIROS, L. V.; VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. N. T. Ocorrência de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* cloro resistentes em águas de diferentes origens. **Acta Scient. Biol. Sci.,** v. 29, n. 3, p. 309-313, 2007.

MEDRONHO, R. A. Dengue fever and the urban environment. **Rev. Bras. Epidemiol.,** v. 9, p. 159-161, 2006.

MEDRONHO, R. A. Challenges for dengue control in Brazil. **Cad. Saúde Pública,** v. 5, p. 948-949, 2008.

MELTZER, M. I.; RIGAN-PÉREZ, J. C.; CLARK, G. G. Using disability-adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico: 1984 - 1994. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 59, p. 265-271, 1998.

MEYER, S. T. O. Uso do cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, p. 99-110, 1994.

MINAKAWA, N.; FUTAMI, K.; SONYE, G.; AKWEYWA, P.; KANEKO, S. Predatory capacity of a shorefly, *Ochthera chalybescens*, on malaria vectors. **Malaria J.,** v. 6, p. 1-5, 2007.

MITTAL, P. K.; ADAK, T.; SHARMA, V. P. Comparative toxicity of certain mosquito-cidal compounds to larvivorous fish, *Poecilia reticulata*. **Indian J. Malariol.,** v. 31, p. 43-47, 1994.

MOHAMED, A. A. Study of larvivorous fish for malaria vector control in Somalia, 2002. **La Revue de Santé de la Méditerranée Orientale,** v. 9, p. 618-626, 2003.

MOHSEN, Z. H.; MULLA, M. I. R. S. Field Evaluation of *Simulium* Larvicides: Effects on Target and Nontarget Insects. **Environ. Entomol.**, v. 11, p. 390-399, 1982.

MOLLOY, D. M. Some personal experiences with fish as antimosquito agencies in the tropics. International Health Board, Managua, Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 4, p. 175-194, 1924.

MORTON, L. T. **A medical bibliography** (**Garrison and Morton**), 4th ed. London: Gower, 1983.

MULLICA, J.; KRISANADEJ, J. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. **J. Fish Biol**., v. 58, p. 1311-1319, 2001.

NAM, V. S.; YEN, N. T.; HOLYNSKA, M.; REID, J. W.; KAY, B. H. National progress in dengue vector control in Vietnam: survey for *mesocyclops (copepoda*), *micronecta (corixidae),* and fish as biological control agents. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 62, p. 5-10, 2000.

NAM, V. S. Key container and key premise indices for *Ae. Aegypti* surveillance and control. In: LLOYD, L. S. (Ed.). **Best practices for dengue prevention and control in the Americas**. Washington, DC: Environmental Health Project/ United States Agency for International Development (USAID), 2003. p. 51–56.

NATHAN, M. B.; GIGLIOLI, M. E. Erradicación de *A. aegypti* en Caimán Brag y pequenõ Caimán, Antilhas Britânicas, con abate (temefos) en 1970-1972. **Bol. Oficina Sanitaria Panam.,** v. 92, p. 18-32, 1973.

NATHAN, M. B.; KNUDSEN, A. B. *A. aegypti* infestation characteristics in several Caribbean countries and implications for integrated community based control. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 7, p. 400-404, 1991.

NELSON, S. M.; KEENAN, L. C. Use of an indigenous fish species, *Fundulus zebrinus*, in a mosquito abatement program: a field comparison with the mosquitofish, *Gambusia affinis*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 8, p. 301-304, 1992.

NENG, W.; WANG, S.; ALIO, A.Y.; ISAQ, A.; DELFINI, L.F. Using fish against mosquito-borne diseases. WHO. **World Health Forum,** v. 6, p. 320-321, 1985.

NENG, W.; SHUSEN, W.; GUANGXIN, H.; RONGMAN, X.; GUARNKUNT, T.; CHEN, Q. Control of *A. aegypti* in household water containers by Chinese cat fish. **Bull. World Health Org.,** v. 65, p. 503-506, 1987.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad. Saúde Pública,** v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.

O'GOWER, A. K. The influence of the surface on oviposition by *A. aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **J. Proc. R. Soc. New South Wales,** v. 82, p. 240-244, 1957.

OLIVEIRA, E. A. Dengue no Brasil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA TROPICAL, 1988, Havana, Cuba. **Anais...**Havana, 1988.

OMENA, M. C. **Alternativas para o controle de vetores de endemias**: extratos e produtos de plantas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2001.

OOI, E.; GOH, K.; GUBLER, D. J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 12, p. 887-893, 2006.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. La reciente epidemia de dengue en Grecia. **Bol. Oficina Sanitaria Panam.,** v. 7, n. 11, p. 1379-1382, 1928.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Resurgimiento del dengue en las Americas. **OPS**. **Boletín Epidemiológico**, v. 18, n. 2, p. 1-7, jul. 1997.

_____. **Dengue y dengue hemorrágico en las Americas**: guías para su prevenicón y control. Washington, DC, 1995.

_____. **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas**: guías para su prevención y control. Washington, DC, 2005.

OSANAI, C. H. **Surto de dengue em Boa Vista, Roraima, Brasil, 1981-1982**. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, 1984.

OSANAI, C. H.; ROSA, A. P.; TANG, A. T.; AMARAL, R. S.; PASSOS, A. D.; TAUIL, P. L. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

PAMPLONA, L. G. C. Histórico da utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico para *A. aegypti* no Estado do Ceará. In: MOSTRA NACIONAL DE EXPERIÊNCIAS BEM-SUCEDIDAS EM EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 1., 2001, Brasília. **Anais**... Brasília, 2001.

PAMPLONA, L. G. C.; LIMA, J. W. O.; CUNHA, J. C. L.; SANTANA, E. W. P. Avaliação do impacto na infestação por *A. aegypti* em tanques de cimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 37, n. 5, p. 400-404, 2004a.

PAMPLONA, L. G. C.; HOLANDA, S. G. S.; VILAR, D. C. F.; ESCÓSSIA, K. F.; PINHEIRO, E. M.; MELO, I. M. A.; VIEIRA, L. C. Aspectos epidemiológicos das endemias transmissíveis por vetores no Ceará. **Rev. Cons. Secretários Municipais Saúde Ceará,** v. 15, p. 7-14, 2004b.

PAMPLONA, L. G. C.; VILAR, D. C. F.; HOLANDA, S. G. S.; ESCÓSSIA, K. F.; BARBOSA, M. M.; LIMA, J. W. O. Mudança no Perfil dos pacientes com Febre Hemorrágica do dengue no Ceará entre 2001 e 2003. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 41., 2005, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2005.

PAN AMÉRICAN HEALTH ORGANIZATION. División of Disease Prevention and Control. Communicable Diseases Program. **Dengue and dengue hemorragic fever in the Americas**: guidelines for prevention and control. Washington, DC, 1994. (PAHO. Scientific Publication, n. 548).

PEREIRA, M. **Recipientes artificiais utilizados como criadouros por *A. aegypti* na região de Araçatuba, estado de São Paulo**. 1996. 63 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saude Publica, Departamento de Epidemiologia, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, 1996.

PETRANKA, J. W.; FAKHOURY, K. Evidence of a chemically-mediated avoidance response of ovipositing insects to blue-gills and green frog tadpoles. **Copeia,** v. 1, p. 234-239, 1991.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas. **Wld. Hlth. Statist. Quart,** n. 50, p. 161-169, 1997.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Frequency, diversity and productivity study on the *A. aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** v. 44, n. 5, p. 245-250, 2002.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis Berliner* no controle de *A. aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, p. 813-816, 2003.

PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; OLIVEIRA-LIMA, J. W.; KERR-PONTES, L. R. S. Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *A. aegypti* em recipientes com renovação de água. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 38, p. 316-321, 2005.

PROPHIRO, J. S.; ROSSI, J. C. N.; KANIS, L. A.; SANTOS, T. G. S.; SILVA, O. S. Comparative Study of the Larvicidal Effect of Ripe and Unripe Fruits Extracts of *Melia azedarach* L. (Sapindales: *Meliaceae*) on *A. aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*). **BioAssay,** v. 3, p. 1-5, 2008.

QUINTANS, F. **Preferência alimentícia de *Cnesterodon decemmaculatus* y su rol como agente de control biológico de mosquitos**. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado) - Universidad de La República del Uruguay, Montevideo, 2008.

RAGHAVENDRA, K.; SHARMA, P.; DASH, A. P. Biological control of mosquito populations through frogs: opportunities e constrains. **Indian J. Med. Res.,** v. 128, p. 22-25, 2008.

RAISAH, A. H.; RAMLI, A. Potential comparison of four fish species as the biological control agent for *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: *culicidae*) mosquitoes. **Malaysian J. Med. Sci.,** v. 14, p. 128-128, 2007.

RAJAGOPALAN, P. K. Prospects for biological control of mosquitoes**. Indian J. Med. Res.,** v. 73, Suppl., v. 163-173, 1981.

RAY, S.; TANDON, N. Breeding habitats and seasonal variation in the larval density of *A. aegypti* (L.) and *Ae. Albopictus* (Skuse) in an urban garden in Calcuta city. **Indian J. Med. Res.,** v. 109, p. 221-224, 1999.

RECHI, E. Espécies invasoras e invasores exóticos aquáticos. **Rev. Eletrônica Aquariofilia,** v. 2, p. 1-3, 2008.

RICE, C. M.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Structure of the flavivirus genome. In: SCHLESINGER, M. ***Togavividae* and *flaviviridae***. New York: Plenum Press, 1986. p. 279-327.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology,** v. 174, p. 479-493, 1990.

RODD, F. H.; SOKOLOWSKI, M. B. Complex origins of variation in the sexual behaviour of male Trinidadian guppies, *Poecilia reticulata*: interactions between social environment, heredity, body size and age. **Anim. Behav.,** v. 49, p. 1139-1159, 1995.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relations ships. In: GUBLER D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997. p. 45-60.

RIDGWAY, H. F.; OLSON, B. H. Chlorine resistence patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 44, p. 972-987, 1982.

RODOLFO, V.; ROMEO, B.; GIORGIO, C.; RUOLO, D. I. *Gambusia holbrooki* nel contenimiento dei culicidi e suo impatto sulle biocenosi acquatiche. **Biologia Ambientale,** v. 3, p. 24-40, 1997.

ROJAS, E. P.; GAMBOA, M. B.; VILALOBOS, S. R.; CRUZADO, F. V. Eficácia del control de larvas de vectores de la malaria com peces larvívoros nativos em san martín, Peru. **Rev. Peruana Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 44-50, 2004.

ROMAND, R. Feeding biology of *Aplocheilichthys normani*, Ahl, a small *Cyprinodontidae* from West Africa. **J. Fish Biol.,** v. 26, p. 399-410, 1985.

ROMERO-VIVAS, C. M. E.; ARANGO-PADILLA, P.; FALCONAR, A. K. I. Pupal-productivity surveys to identify the key container habitats of *A. aegypti* (L.) in Barranquilla, the principal seaport of Colombia. **Ann. Trop. Med. Parasitol.,** v. 100, p. S87–S95, 2006.

RUPP, H. R. Adverse assessments of Gambusia affinis: an alternate view for mosquito control practitioners. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 12, p. 155-166, 1996.

RUSSELL, B. M.; WANG, J.; WILLIAMS, Y.; HEARNDEN, M. N.; KAY, B. H. Laboratory evaluation of two native fishes from tropical North Queensland as biological control agents of subterranean *A. aegypti*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 17, p. 124-126, 2001.

SANTAMARINA MIJARES, A.; PÉREZ PACHECO, R.; MARTÍNEZ, S. H. Susceptibilidad de las larvas de *A. aegypti* al parasitismo por *Romanomermis culicivorax* en condiciones de laboratorio y de campo en Oaxaca, México. **Rev. Panam. Salud Pública,** v. 8, n. 5, p. 299-304, 2000.

SANTOS, L. U.; ANDRADE, C. F. S. Survey of *cyclopids (Crustacea, Copepoda)* in Brazil and preliminary screening of their potential as dengue vector predators. **Rev. Saúde Pública,** v. 31, p. 221-226, 1997.

SÃO PAULO, F. **Linguagem médica popular no Brasil**. Salvador: Itapuã, 1970.

SÃO PAULO. Superintendência de Controle de Endemias. **Controle integrado dos vetores da dengue**. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/downl/vetores_geral/den_contri.pdf>. Acesso em: 15 out. 2009.

SCANDAR, S. A. S.; CARDOSO-JÚNIOR, R. P.; GOLDENBERG, P.; FERREIRA, I. B.; SOUZA, L. T. M. Inquérito sorológico, após epidemia de Dengue. Paraíso - São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** v. 62, p. 83-89, 2003.

SCHAPER, S.; HÉRNANDEZ, F.; SOTO, L. La lucha contra el dengue: control biológico de larvas de *A. aegypti* empleando *Mesocyclops thermocyclopoides (crustacea).* **Rev. Costarric. Cienc. Méd.,** v. 19, n. ½, p. 119-125, 1998.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 81, p. 245-246, 1986.

SENG, C. M.; SETHA, T.; NEALON, J.; SOCHEAT, D.; CHANTHA, N.; NATHAN, M. B. Community-based use of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* to control the dengue vector *A. aegypti* in domestic water storage containers in rural Cambodia. **J. Vector Ecol.,** v. 33, n. 1, p. 139-144, 2008.

SERVICE, M. W. Can we control mosquitoes without pesticides? A summary. **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 11, n. 2, pt. 2, p. 290-293, 1995.

SHARMA, S. N. Larvivorous capacity of some indigenous fish of Haryana state. **J. Commun. Dis.,** v. 26, n. 2, p. 116-119, 1994.

SHARMA, S. N.; KAUL, S. M.; LAL, S. Use of *Gambusia affinis* in different habitats as a mosquito control agent. **J. Commun. Dis.,** v. 29, n. 4, p. 371-373, 1997.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influence of eggs quiescence period on the *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) (*Diptera, Culicidae)* life cycle at laboratory conditions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 32, p. 349-355, 1999.

SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; GUIMARÃES, V. P.; LIMA, C. G.; PEREIRA, A. L.; RODRIGUES FILHO, E.; ROCHA, C. Prospecção da atividade inseticida de plantas do Cerrado, visando ao combate do *A. aegypti***. Inf. Epidemiol. SUS,** v. 10, supl. 1, p. 51-52, 2001.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens St. Hil. (Sapindaceae)* sobre *A. aegypti* (Diptera: Culicidadae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, p. 396-399, 2004.

SILVA, L. M.; ARREBOLA, T. M.; JESUS, G. A. **Monitoramento sistemático de cloro residual livre na rede de abastecimento de água do município de Vitória/ES**: sistema de vigilância para prevenção de danos à saúde. [S.l.]: SENAC, 2007. Disponível em:< http://www1.sp.senac.br/hotsites/sigas/docs/20071016_CAS_MonitSistCRL.pdf>. Acesso em: 8 dez. 2009.

SILVA, L. J.; RICHTMANN, R. Vaccines under development: group B stretococus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. **J. Pediatr**., v. 82, n. 3, suppl., p. S15-24, 2006.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA-FILHO, A. M. Produtos naturais para controle da transmissão da dengue – atividade larvicidas de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) de terpenóides e fenilpropanóides. **Quím. Nova,** v. 27, p. 46-49, 2004.

SINGH, N.; SHUKLA, M. M.; MISHRA, A. K.; SINGH, M. P.; PALIWA, J. C.; DASH, A.P. Malaria control using indoor residual spraying and larvivorous fish: a case study in Betul, central India. **Trop. Med. Int. Health,** v. 11, p. 1512–1520, 2006.

SOPER, F. L**.** The 1964 Status of *A. aegypti* Eradication and Yellow Fever in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 14, p. 887-891, 1965.

SOUZA-SANTOS, R. Fatores associados à ocorrência de formas imaturas de A. aegypti na ilha do Governador, Rio de janeiro, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 32, p. 373-382, 1999.

STOOPS, C. A. Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). **J. Vector Ecol.**, v. 30, p. 41-44, 2005.

SUAYA, J. A.; SHEPARD, D. S.; SIQUEIRA, J. B; *et al*. Costs of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 80, p. 846-855, 2009.

TAKAGI, M.; POHAN, W.; HASIBUAN, H.; PANJAITAN, W.; SUZUKI, T. Evaluation of shading of fish farming ponds as a larval control measure against *Anopheles sundaixus* Rodenwaldt (Diptera: Culicidae). **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health,** v. 26, n. 4, p. 748-753, 1995.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública,** v. 17, supl., p. 99-102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle de dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública,** v. 18, p. 867-871, 2002.

TAUIL, P. L. Dengue: as prováveis causas de sua re-emergência e disseminação. **Inf. Epidemiol. Saúde Coletiva**, v. 24, p. 3-8, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, F.; BARRETO, M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, supl. 1, p. S7-S18, 2009.

THOISY, B.; LACOSTE, V.; GERMAIN, A.; MUÑOZ-JORDÁN, J.; COLÓN, C.; MAUFFREY, G.F.; DELAVA, M.; CATZEFLIS, F.; KAZANJI, M.; MATHEUS, S.; DUSSART, P.; MORVAN, J.; XAVIER, A.A.; LAVERGNE, A. Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals. **Vector-Borne Zoonotic Dis.,** v. 9, p. 157-160, 2009.

TORRES, E. M. **Dengue**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.

TORRES-ESTRADA, J. L.; RODRÍGUEZ, M. H.; CRUZ-LÓPEZ, L.; ARREDONDO-JIMENEZ, J. I. Selective oviposition by *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) in response to *Mesocyclopslongisetus* (Copepoda: Cyclopoidea) under laboratory and field conditions. **J. Med. Entomol.,** v. 38, p. 188-192, 2001.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ-FILHO, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Quím. Nova,** v. 29, p. 415-418, 2006.

UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT (USAID). Bureau for Global Health. **Integrated Vector Management Programs for Malaria Control**: Programmatic Environmental Assessment. 2006. Disponível em: <http://www.ehproject.org/PDF/ehkm/ivm-env_assessment.pdf>. Acesso em: 7 Dec. 2009.

VALERO, N.; MELEAN, E.; MALDONADO, M.; MONTIEL, M.; LARREAL, Y.; ESPINA, L. M. Capacidad larvivora del Gold Fish (*Carassius auratus auratus*) y del Gulppy salvaje (*Poecilia reticulata*) sobre larvas de *A. aegypti* en condiciones de laboratorio. **Rev. Cientifica**, v. 16, p. 414-419, 2006.

VAN DAM, A. R.; WALTON, W. E. Comparison of mosquito control provided by the *Arroyo chub* (*Gila orcutti*) and the *mosquitofish* (*Gambusia affinis*). **J. Am. Mosq. Control Assoc.,** v. 23, p. 430-441, 2007.

VARGAS, V. M. Uso de peces larvivoros como controladores biologicos de larvas de *A. aegypti*: una participation comunitaria. **Rev. Col. Microbiol. Quim. Clin. Costa Rica,** v. 9, p. 1-5, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C.; MENEZES, D. B.; MELO, L. P.; PESSOA, E. T. F. P.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, E. S. T.; TIMBÓ, M. J.; COELHO, I. C. B.; MONTENEGRO, F.; ROSA, J. F. S. T.; ANDRADE, F. M. O.; ROSA, A. P. A. T. A Large epidemic of dengue fever with dengue hemorragic cases in Ceará State, Brazil, 1994. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** v. 37, p. 253-255, 1995.

VASCONCELOS, P. F. C.; LIMA, J. W. O.; RAPOSO, M. L.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, J. F. S. T.; AMORIM, S. M. C.; ROSA, E. S. T.; MOURA, C. M. P.; AMÉLIA, N. F. A. Seroepidemiologic survey in São Luis Island, State of Maranhão, Brazil, during a dengue fever epidemic. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 32, p. 171-179, 1999.

VASCONCELOS, P. F. C.; MOTA, K.; STRAATMANN, A.; SANTOS-TORRES, S.; ROSA, A. P. A. T.; NETO, J. T. Epidemia de dengue em Ipupiara e Prado, Bahia Inquérito soro-epidemiológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 33, p. 61-67, 2000.

VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

VILAR, D. C. L. F. **Aspectos clínicos e epidemiológicos do dengue hemorrágico no Ceará, no período de 1994 a 2006**. 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, 2008.

VON ALLMEN, S, D.; LOPEZ-CORREA, R. H.; WOODALL, J. P. Epidemic dengue in Puerto Rico, 1977: a cost analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, p. 1040-1044, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of Control of Tropical Diseases. **Dengue and dengue hemorragic fever**. 1986. Disponível em:< http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>. 1986. Acesso em: 18 Aug. 2009.

_____. **Dengue and dengue hemorragic fever**. 2002. (Fact Sheet, n. 117). Disponível em:<http:// www.who.int/csr/disease/en/who>. Acesso em: 18 Aug. 2008.

ZAHIRI, N.; RAU, M. E. Oviposition attraction and repellency of *A. aegypti* (*Diptera: Culicidae*) to waters from conspecific larvae subjected to crowding, confinement, starvation, or infection. **J. Med. Entomol.,** v. 35, p. 782-787, 1998.

ZUANON, J. A. S.; HISANO, H.; FALCON, D. D.; SAMPAIO, F. G.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Digestibilidade de alimentos protéicos e energéticos para fêmeas de beta. **Rev. Bras. Zoot**., v. 36, p. 987-991, 2007.

ANEXO A - Parecer

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Comitê de Ética para o Uso de Animais

PARECER

PROCESSO N° 05267606-4

PRINCIPAL PESQUISADOR: Luciano Pamplona de Goes Cavalcanti

O projeto tem como objetivo geral avaliar a capacidade de controlar formas imaturas de Aedes aegypti com espécies de peixes utilizadas na rotina do Programa de controle da dengue no Estado do Ceará e como objetivos específicos descrever a história de utilização de peixes larvófagos como alternativa de controle do *A. aegypti* no Ceará; medir a capacidade predatória de formas imaturas do A. aegypti, das espécies de peixe: *Trichogaster trichop feros, Poecilia reticulata, Poecilia sphenqff, Betta splendens* e *Aslyanix fasciatus*; determinar o número de larvas consumidas por grama e por centímetro de peixe; diferenciar o potencial predatório entre machos e fêmeas de cada espécie; classificar as espécies quanto a predação e avaliar a capacidade das espécies de peixes utilizadas sobreviverem em água clorada.

O projeto está bem escrito e fundamentado em uma extensa revisão de literatura. A metodologia encontra-se bem delineada e suas etapas estão detalhadas de maneira satisfatória. Os peixes utilizados no estudo serão abrigados em ambiente apropriado não serão submetidos a nenhum estresse alimentar e de manejo, haja vista que dos quatro teores de cloro utilizados nos testes de sobrevivência dos peixes, apenas o mais elevado (4,0 mg/L) encontra-se acima do limite de concentração estipulado pelo Artigo 13° da Portaria n° 1468 de 29 de dezembro de 2002 do Ministério de Saúde, segundo o qual o teor máximo de cloro residual livre em água para consumo humano não deve ser maior que 2,0 mg/L. No caso de peixes cultivados, segundo a literatura, algumas espécies de peixes podem sobreviver em água com teores de cloro residual de até 4,0 mg/L.

Assim sendo, s.m.j., como o Processo encontra-se devidamente instruído com toda a documentação exigida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais apensa ao mesmo, somos de parecer favorável à sua aprovação.

Fortaleza, 17 de outubro de 2005

Prof. José Mário Girão Abreu
Presidente CEUA-UECE

ANEXO B - Teste

DOUTORADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
Aluno responspável: Luciano Pamplona de G. Cavalcanti

Teste de resistência do peixe *Betta splendens* a três diferentes concentrações de cloro

Número de peixes vivos após exposição ao cloro na concentração de 1,00 mg/litro, durante um período de 24 horas.

Testes	nº de peixes	Vivos após 24 horas	Concentração de Cloro	
			Inicial	Após 24 horas
Experimento 1	1		1,00	
Experimento 2	1		1,00	
Experimento 3	1		1,00	
Experimento 4	1		1,00	
Experimento 5	1		1,00	
Experimento 6	1		1,00	
Experimento 7	1		1,00	
Experimento 8	1		1,00	
Experimento 9	1		1,00	
Experimento 10	1		1,00	
Experimento 11	1		1,00	
Experimento 12	1		1,00	
Experimento 13	1		1,00	
Experimento 14	1		1,00	
Experimento 15	1		1,00	
Experimento 16	1		1,00	
Experimento 17	1		1,00	
Experimento 18	1		1,00	
Experimento 19	1		1,00	
Experimento 20	1		1,00	
Experimento 21	1		1,00	
Experimento 22	1		1,00	
Experimento 23	1		1,00	
Experimento 24	1		1,00	
Experimento 25	1		1,00	
Experimento 26	1		1,00	
Experimento 27	1		1,00	
Experimento 28	1		1,00	
Experimento 29	1		1,00	
Experimento 30	1		1,00	
Total	30	0	1,00	0,00
Controles	nº de peixes	Vivos após 24 horas	Concentração de Cloro	
			Inicial	Após 24 horas
Controle 1	1		1,00	
Controle 2	1		1,00	
Controle 3	1		1,00	
Controle 4	1		1,00	
Controle 5	1		1,00	
Total	5	0	1,00	0,00

Data da realização dos testes:
Lote de teste: 1( ) 2( ) 3( )
Início dia:_____ as _____ horas
Leitura dia:_____ as _____ horas

ANEXO C – Artigos publicados

VOLUME 14 NO 11 PP 1347–1350 NOVEMBER 2009

Reduced oviposition of *Aedes aegypti* gravid females in domestic containers with predatory fish

Luciano de Góes Cavalcanti Pamplona[1,4], Carlos H Alencar[1], José Wellington O. Lima[2] and Jörg Heukelbach[1,3]

1 *Department of Community Health, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil*
2 *Department of Public Health, University of Ceará State and National Health Foundation (FUNASA), Fortaleza, Brazil*
3 *Anton Breinl Centre for Public Health and Tropical Medicine; School of Public Health, Tropical Medicine and Rehabilitation Sciences, James Cook University, Townsville, Australia*
4 *Post-Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Brazil*

Summary The presence of pathogens or predators in water may alter oviposition behaviour of gravid female *Aedes aegypti* mosquitoes. We evaluated the oviposition behaviour of *A. aegypti* in recipients containing larvivorous fish (*Betta splendens* and *Poecilia reticulata*). In four breeders, fish specimens were placed in 15 l of dechlorined water. Four control breeders only contained dechlorined water. Breeders with eucatex ovitraps and approximately 100 male and female mosquitoes were placed in wire netting cages. During a period of 7 weeks, eggs on the ovitraps were counted weekly. The median number of eggs laid in recipients with *B. splendens* (32.5/week) was lower than in those with *P. reticulata* (200.5/week) and the control group (186.5/week; $P < 0.0001$). The oviposition activity index (OAI) for *P. reticulata* did not show any considerable difference between posture in deposits with and without fish (-0005). Deposits with *B. splendens* showed a lower position than those used as controls (-0627). We conclude that *B. splendens* can be used to effectively prevent gravid *A. aegypti* females from laying eggs in large water containers.

keywords *Aedes aegypti*, larvivorous fish, oviposition, biological control, *Betta splendens*, *Poecilia reticulata*

Introduction

Dengue fever is one of the most prevalent vector-transmitted diseases in the world and poses a heavy economic cost to health systems and societies (Suaya *et al.* 2009). *Aedes aegypti*, the main vector, uses domestic containers or recipients capable of accumulating water as breeding sites. In the last 40 years, dengue fever control has mainly been based on the reduction of breeding sites and chemical control focused on adult stages. The latter has become restricted due to emerging resistance of the mosquito against chemical insecticides (Lima *et al.* 2003) and negative impact of large-scale insecticide use on the environment (Iyaniwura 1991). Clearly, alternative vector control methods are needed.

Despite the strenuous efforts of the Brazilian Ministry of Health, periodical occurrences of dengue epidemics could not be prevented. For example, in 2002 more than 800 000 dengue fever cases were reported in Brazil, with 150 deaths from Dengue Hemorrhagic Fever (Braga & Valle 2007).

Several studies have shown that predators, bacteria, plants, insects, copepods, synthetic organic repellents and amphibians may affect oviposition site selection of mosquitoes (Ikeshoji & Mulla 1970; Osgood & Kempester 1971; Kramer & Mulla 1979; Chesson 1984; Bentley & Day 1989; Isoe *et al.* 1995; Torres-Estrada *et al.* 2001; Mokany & Shine 2003; Zahiri & Mulla 2004; Xue *et al.* 2006; Van Dan & Walton 2008). Mechanisms for predator detection by insects may involve tactile, visual or chemical stimuli (Angelon & Petranka 2002).

In natural reservoirs, fish reduced oviposition by gravid *Aedes taeniorhynchus* females (Ritchie & Laidlaw-Bell 1994), but the effect of larvivorous fish on the choice of oviposition sites by *A. aegypti* female has been rarely investigated. Although studies suggest that egg-laying mosquitoes use chemical signals to detect fish, no controlled laboratory studies have been performed to confirm this assumption (Van Dan & Walton 2008). Larvivorous fish are particularly interesting in this context, as they are also used in large domestic containers as an alternative biological control against *A. aegypti* larvae (Phuanukoonnon *et al.* 2005; Pamplona *et al.* 2007). Here we studied whether the presence of larvivorous fish in domestic containers inhibit female *A. aegypti* from laying eggs.

© 2009 Blackwell Publishing Ltd

Materials and methods

Fish species tested were *Poecilia reticulata* (*Poeciliidae*) and *Betta splendens* (*Anabantidae*). Both species are commonly encountered in lakes, rivers and reservoirs in northeast Brazil and are known to feed on *Aedes* larvae (Lardeux *et al.* 2002; Gosh *et al.* 2004; Pamplona *et al.* 2007).

We used young female fish. The fish were fed with commercial fish diet before the experiments and were not fed during the week of testing. At the end of each week, specimens were replaced. Mean size of *B. splendens* was 3.65 cm (range: 3.47–3.83 cm) and mean weight 0.623 g (range: 0.486–0.776 g). Mean size and weight of *P. reticulata* was 2.88 cm (2.21–3.41 cm) and 0.276 g (0.172–0.292 g), respectively.

In wire meshed cages (6 m^3), we placed a population of approximately 100 mosquitoes (males and females) and eight containers with eucatex strips, facilitating oviposition. In four containers (each with 15 l of dechlorined water), a specimen of *P. reticulata* was placed, additional four containers contained only water and were used as negative controls. The test was repeated under identical conditions with *B. splendens* and a respective control.

At the end of each week, eggs laid on the strips were counted, using a dissecting microscope. In addition, containers were checked for larvae which were counted and removed. Then, strips were replaced. The tests were continued for a period of 7 weeks.

During the experiments, mosquitoes were fed daily with sugared water, and quails (*Nothura maculosa*) were used as a source of blood. Each week, the mosquitoes were replaced. The containers were kept at a temperature of 28 ± 4 °C and 80% ± 5% relative humidity.

Data were entered and analysed using STATA software, version 9.2 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). As the number of eggs encountered in the containers did not follow a normal distribution, medians and interquartile ranges are given. The Wilcoxon's rank sum test was used to compare groups. The median numbers of eggs deposited in one breeder over time were compared with the Kruskal–Wallis test. We calculated the ovipositional activity index (OAI) over time for each fish species. The OAI is a measure to assess the influence of treatment to gravid mosquitoes and is calculated as (NT−NC)/(NT+NC) where NT is the number of eggs laid in test group and NC the number of eggs laid in control group (Kramer & Mulla 1979; Van Dan & Walton 2008). An OAI of zero indicates no difference between test and control, whereas values <0 indicate reduced oviposition.

Results

In total, 34 861 eggs were laid – 6892 and 14 883 in containers with *B. splendens* and *P. reticulata*, respectively, and 13 086 in the control containers. Figures 1 and 2 detail median number of eggs laid by female *A. aegypti* in containers with *B. splendens* and *P. reticulata*, respectively, as compared to the control group.

The median number of eggs laid weekly in the containers with *B. splendens* was significantly lower (median = 32.5) than in the containers without fish (186.5; $P < 0.0001$). *P. reticulata* did not reduce the median number of eggs deposited, as compared to the control (median = 200.5 and 233; $P = 0.5$). In containers without fish, the median distribution of the number of eggs deposited varied significantly from week to week during the observation period ($P = 0.005$), but not in the containers with *B. splendens* ($P = 0.3$) and *P. reticulata* ($P = 0.8$).

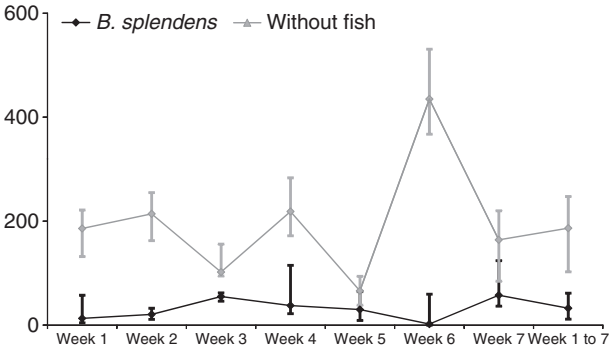

Figure 1 Median number of eggs laid per week by *Aedes aegypti* in containers with the fish *Betta splendens*, as compared to negative control. Vertical bars indicate median and interquartile ranges.

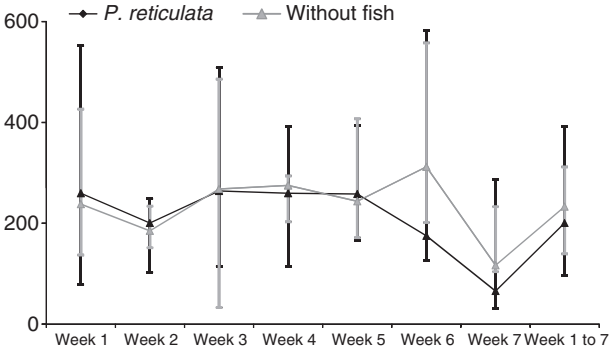

Figure 2 Median number of eggs laid per week by *Aedes aegypti* in containers with the fish *Poecilia reticulata*, as compared to negative control. Vertical bars indicate median and interquartile ranges.

© 2009 Blackwell Publishing Ltd

The OAI for *P. reticulata* revealed no considerable difference between posture in deposits with and without fish (–0.005), whereas deposits with *B. splendens* showed a lower position than those used as controls (–0.627).

Discussion

Our experiments show that the presence of *B. splendens* reduced the number of eggs deposited in domestic containers under laboratory conditions. The OAI indicates that female *A. aegypti* prefer not to place eggs in deposits with *B. splendens*. In contrast, *P. reticulata* did not reveal any effect on oviposition by *A. aegypti*.

There may be several reasons why female *Aedes* mosquitoes do not deposit eggs in containers with natural predators. First, female *A. aegypti* may prefer containers with a lower density of larvae and those not containing larvae are either malnourished, infected by certain pathogens, or both (Zahiri & Rau 1998; Serpa *et al.* 2008). Secondly, gravid mosquitoes may detect the presence of fish in water reservoirs by both visual and chemical means (Petranka & Fakhoury 1991; Phuanukoonnon *et al.* 2005). One study shows that there is no significant difference between the oviposition of gravid females of *A. aegypti* in deposits with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) and copepods. The OAI was 0.16 and 0.15, respectively (Rodríguez *et al.* 2007). Similar results were found for *A. albopictus* under field conditions (Stoops 2005). *Mesocyclops longisetus* in water reservoirs can serve as an attractive for oviposition (Torres-Estrada *et al.* 2001). Bacterial metabolites present in cultivations of Bti have also been suggested to attract *A. aegypti* (Ikeshoji *et al.* 1979). In fact, bacterial decomposition of organic material in water frees certain volatile compounds stimulating oviposition by gravid female mosquitoes (Poonam *et al.* 2002). The presence of *M. longisetus* in water reservoirs also appears to attract gravid *A. aegypti* females (Torres-Estrada *et al.* 2001).

Poecilia reticulata has a strong capacity for eating larvae. In terms of weight and size, *B. splendens* proved capable of eating 523 larvae per gram of weight per day (Gosh *et al.* 2004; Pamplona *et al.* 2007; Raisah & Ramli 2007).

The effectiveness of larvivorous fish in controlling mosquitoes may be compromised if adult mosquitoes respond to predatory fish in water tanks by shifting to nearby breeding sites without fish (Angelon & Petranka 2002). However, in northeast Brazil, large domestic water tanks are the most important breeding sites. Thus, it may be preferable that mosquitoes will place eggs in other smaller deposits that are focus of education campaigns and can be removed mechanically. In addition, the use of fish in water containers reduces the use of chemical larvicides such as temephos which is commonly used in this type of breeding sites.

In natural reservoirs, fish may reduce oviposition by gravid *A. taeniorhynchus* females (Ritchie *et al.* 1994). On the other hand, derived insecticides such as spinosad, temephos granule and the bacterial insecticide VectoBac 12AS did not reduce oviposition by gravid *A. aegypti* at the usual concentrations (Pérez *et al.* 2007).

Perception and acceptance of local communities regarding this alternative of biological control may also influence the impact of large-scale programs and needs to be assessed. Another limiting factor is the high mortality some species present after long journeys, and cannibalism, which makes the storage of large numbers of specimens difficult (Haq *et al.* 1993). Future studies will have to confirm the potential of *B. splendens* against oviposition of female *A. aegypti* under field conditions, and to assess the long-term effect. Other experiments will have to confirm the laboratory-based results under field conditions. We conclude that in addition to its impressive larvivorous activity, *B. splendens* may be used to inhibit *A. aegypti* from oviposition in large domestic containers.

Acknowledgements

We thank the students of biology involved in the activities carried out in the laboratory, and Robert Varela from the National Health Foundation (FUNASA) for collaboration in reading the ovitraps in the pilot test. J.H. is research fellow from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico* – CNPq (Brazil).

References

Angelon KA & Petranka JW (2002) Chemicals of predatory mosquitofish (*Gambusia affinis*) influence selection of oviposition site by *Culex* mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 797–806.

Bentley MD & Day JF (1989) Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Annals Reviews of Entomology* **34**, 401–421.

Braga IA & Valle D (2007) *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* **16**, 113–118.

Chesson J (1984) Effect of notonectids (Hemiptera: Notonectidae) on mosquitoes (Diptera: Culicidae): predation or selective oviposition? *Environmental Entomology* **13**, 531–538.

Gosh A, Bhattacharjee I, Ganguly M, Mondal S & Chandra G (2004) Efficacy of some common aquarium fishes as biocontrol agent of preadult mosquitoes. *Buletin Penelitian Kesehatan* **32**, 144–149.

Haq S, Prasad H, Prasad RN & Sharma T (1993) Availability and utility of local fishes of Shahjahanpur for mosquito control. *Indian Journal of Malariology* **30**, 1–8.

© 2009 Blackwell Publishing Ltd

Ikeshoji T & Mulla MS (1970) Oviposition attractants for four species of mosquitoes in natural breeding waters. *Annals of the Entomological Society of America* **63**, 1322–1327.

Ikeshoji T, Ichomoto I, Konishi J, Naoshima Y & Ueda H (1979) 7,11-dimethyloctadecane: an ovipositional attractant for *Aedes aegypti* by *Pseudomonas aeruginosa* on capric acid substrate. *Journal of Pest Science* **4**, 187–194.

Isoe J, Millar JG & Beehler JW (1995) Bioassays for Culex (Diptera: Culicidae) mosquito oviposition attractants and stimulants. *Journal of Medical Entomology* **32**, 475–483.

Iyaniwura TT (1991) Non-target and environmental hazards of pesticides. *Reviews on Environmental Health* **9**, 161–176.

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

Lardeux F, Sechan Y, Loncke S *et al.* (2002) Integrated control of peridomestic larval habitats of *Aedes* and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in atoll villages of French Polynesia. *Journal of Medical Entomology* **39**, 493–498.

Lima JBP, Cunha MP, Júnior RCS *et al.* (2003) Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brasil. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* **68**, 329–333.

Mokany A & Shine R (2003) Oviposition site selection by mosquitoes is affected by cues from conspecific larvae and anuran tadpoles. *Austral Ecology* **28**, 33–37.

Osgood CE & Kempester RH (1971) An air-flow olfactometer for distinguishing between oviposition attractants and stimulants of mosquitoes. *Journal of Economic Entomology* **64**, 1109–1110.

Pamplona LGC, Pontes RJS, Regazzi ACF, Paula-Júnior FJ, Frutuoso RL & Sousa EP (2007) Predatory competence of fishes for *Aedes aegypti* larvae, under laboratory conditions. *Revista Saude Publica* **41**, 638–644.

Pérez CM, Marina CF, Bond JG *et al.* (2007) Spinosad, a naturally derived insecticide, for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): efficacy, persistence, and elicited oviposition response. *Journal of Medical Entomology* **44**, 631–638.

Petranka JW & Fakhoury K (1991) Evidence of a chemically-mediated avoidance response of ovipositing insects to blue-gills and green frog tadpoles. *Copeia* **1**, 234–239.

Phuanukoonnon S, Mueller I & Bryan JH (2005) Effectiveness of dengue control practices in household water containers in Northeast Thailand. *Tropical Medicine & International Health* **10**, 755–763.

Poonam S, Paily KP & Balaraman K (2002) Oviposition attractancy of bacterial culture filtrates-response of *Culex quinquefasciatus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 359–362.

Raisah AH & Ramli A (2007) Potential comparison of four fish species as the biological control agent for *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: culicidae) mosquitoes. *Malaysian Journal of Medical Science* **14**, 121–304.

Ritchie SA & Laidlaw-Bell C (1994) Do fish repel oviposition by *Aedes thaeniorhynchus*? *Journal of the American Mosquito Control Association* **10**, 380–384.

Rodríguez JR, Díaz ZM, Gracía IG, Pérez MD, Sánchez JE & Armas RG. (2007) Conducta de oviposicion de *Aedes aegypti* (L.) en presencia de *Macrocyclops albidus* (J.) y *Bacillus thuringiensis var. israelensis* en condiciones de laboratorio. *Revista Cubana de Medicina Tropical [online]* **59**. Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100016&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0375–0760.

Serpa LLN, Monteiro SDCB & Voltolini JC (2008) Effect of larval rearing water on *Aedes aegypti* oviposition in the laboratory. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41**, 515–517.

Stoops CA (2005) Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). *Journal of Vector Ecology* **30**, 41–44.

Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB *et al.* (2009) Costs of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**, 846–855.

Torres-Estrada JL, Rodríguez MH, Cruz-López L & Arredondo-Jimenez JI (2001) Selective oviposition by *Aedes aegypti* in response to *Mesocyclops longisetus* under laboratory and field conditions. *Journal of Medical Entomology* **38**, 188–193.

Van Dan AR & Walton WE (2008) The effect of predatory fish exudates on the ovipostional behaviour of three mosquito species: *Culex quinquefasciatus, Aedes aegypti* and *Culex tarsalis*. *Medical and Veterinary Entomology* **22**, 399–404.

Xue RD, Barnard DR & Ali A (2006) Laboratory evaluation of 21 insect repellents as larvicides and as oviposition deterrents of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* **22**, 126–130.

Zahiri NS & Mulla MS (2004) Non-larvicidal effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus spharicus* on oviposition and adult mortality of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology* **30**, 155–162.

Zahiri N & Rau ME (1998) Oviposition attraction and repellency of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to waters from conspecific larvae subjected to crowding, confinement, starvation, or infection. *Journal of Medical Entomology* **35**, 782–787.

Corresponding Author **Luciano de Góes Cavalcanti Pamplona**, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. Tel.: 55 85 99878969; Fax: 55 85 33668044; E-mail: pamplona.luciano@gmail.com

© 2009 Blackwell Publishing Ltd

Survival of Larvivorous Fish Used for Biological Control of *Aedes aegypti* Larvae in Domestic Containers With Different Chlorine Concentrations

LUCIANO PAMPLONA DE GÓES CAVALCANTI,[1,2,3] FRANCISCO JOSÉ DE PAULA JÚNIOR,[4] RICARDO JOSÉ SOARES PONTES,[1] JORG HEUKELBACH,[1,5] AND JOSÉ WELLINGTON DE OLIVEIRA LIMA[6,7]

J. Med. Entomol. 46(4): 841–844 (2009)

ABSTRACT The two fish species *Betta splendens* (Regan) and *Poecilia reticulata* (Peters) are known predators of *Aedes aegypti* (L., 1762) larvae. Both species have been used for biological control in northeastern Brazil. However, the feasibility of these fish for the control of *Ae. aegypti* larvae in domestic containers may be limited by their survival in chlorinated water, as supplied by the public water system. We exposed fish to three different concentrations of chlorine: 1, 1.5, and 2.0 mg/liter. All *B. splendens* survived at 1.0 mg/liter chlorine concentration; 72.5 and 39.3% of *B. splendens* survived chlorine concentrations of 1.5 and 2.0 mg/liter, respectively. In contrast, only 4.4% of *P. reticulata* survived at a chlorine concentration of 1.0 mg/liter. We conclude that *B. splendens* may be an appropriate species for biological control of *Ae. aegypti* in domestic water tanks.

KEY WORDS dengue, *Aedes aegypti*, prevention, biological control, chlorine

In Brazil, the high incidence of dengue fever and the severity of complicated forms have led to its control being one of the main public health priorities. The Brazilian Dengue Control Program is based on health education, community participation, chemical control of adults, and biological or chemical control of immature forms of the vector *Aedes aegypti* (L., 1762) (Braga and Valle 2007). For biological vector control, larvivorous fish have been used successfully in the control of *Anopheline* larvae at natural breeding sites (Sharma et al. 1997), and to a lesser extent in the control of *Ae. aegypti* larvae at domestic breeding sites (Martinez-Ibara et al., 2002). In the northeastern Brazilian state of Ceará, the Dengue Control Program has recently used five species of non-native larvae-eating fish (*Betta splendens*, *Trichogaster trichopteros*, *Astyanax fasciatus*, *Poecilia sphenops*, and *Poecilia reticulata*) to combat *Ae. aegypti* larvae (Pamplona 2006).

Among other factors, the usefulness of larvae-eating fish as a biological control measure against *Ae. aegypti* depends on the survival of fish in the breeding sites, range of temperature, and salinity of water (Mohamed 2003, Vargas 2003, Ghosh and Dash 2007). In case of short survival time, there will be the need for frequent inspections of containers and replacement of specimens, resulting in increased costs. However, there are no data available on resistance of larvae-eating fish to chlorinated water, within the limits of chlorine levels in the water supplied by public systems. Here, we provide data on the survival of *B. splendens* and *P. reticulata*, two species with known high larvivorous activity (Pamplona et al. 2007), to different concentrations of chlorinated water. These species are competent predators, being capable of ingesting 100–400 larvae during a 24-h period (Pamplona et al. 2007).

Materials and Methods

This study was conducted at the Laboratory of Entomology, Department of Community Health, Federal University of Ceará (Fortaleza, Brazil). The study was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Ceará under Process no. 05267606-4.

In Brazil, supplied tap water is treated at a large scale using chlorine gas. In this experiment, chlorinated water was prepared by adding calcium hypochlorite to distilled water. *B. splendens* and *P. reticulata* fish were exposed to three different concentrations of chlorinated water (1, 1.5, and 2 mg/liter). These concentrations were selected to provide the upper range

[1] Department of Community Health, School of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil 60.430-140.
[2] Post-Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Brazil 60.430-140.
[3] Correspondig author, e-mail: pamplona.luciano@gmail.com.
[4] Secretary of Health of Ceará State (SESA), Fortaleza, Brazil 60.060-440.
[5] Anton Breinl Centre, School of Public Health, Tropical Medicine and Rehabilitation Sciences, James Cook University, Townsville, Australia 4811.
[6] National Health Foundation (FUNASA), Fortaleza, Brazil 60.150.160.
[7] Department of Public Health, State University of Ceará (UECE), Fortaleza, Brazil 60.740-903.

0022-2585/09/0841–0844$04.00/0 © 2009 Entomological Society of America

Table 1. Survival of *B. splendens* and *P. reticulata* fish 24 h after exposure to three different concentrations of chlorine

Initial chlorine concn	*B. splendens*			*P. reticulata*		
	Exposed	Survival		Exposed	Survival	
		%	95% CI		%	95% CI
0.0 mg/liter (control)	60	100	94–100	15	100	78,2–100
1.0 mg/liter	90	100	96–100	90	4.4	1,2–10.9
1.5 mg/liter	120	72.5	63.6–80.3			
2.0 mg/liter	150	39.3	31.5–47.6			

of chlorine concentrations found in the Brazilian water supply systems. Brazilian Ministry of Health regulations define minimum and maximum concentrations of 0.2 and 2.0 mg/liter, respectively (Brazilian Ministry of Health 2004). The public water supply system of Fortaleza, the capital city in northeastern Brazil where the studies were carried out, ranges between 0.55 and 1.83 mg/liter (CAGECE 2007).

Fish were exposed in uncovered 70-liter drums. Each drum contained water with the respective chlorine concentration and one specimen of *B. splendens* or *P. reticulata*, respectively. Due to limitation of space, experiments were performed in sets of 30 test drums and five control drums and then repeated twice (concentration of 1 mg/liter), three times (1.5 mg/liter), and four times (2.0 mg/liter), respectively, resulting in 90, 120, and 150 test drums and 15, 20, and 25 control drums for each fish species. We expected that the proportion of surviving fish would decrease with increasing chlorine concentrations; thus, we increased the number according to chlorine concentrations, ensuring more precise estimates. Control drums contained unchlorinated tap water and the respective fish.

Chlorine concentration was measured at the start of the experiment by using a digital TRACER PockeTester Total Chlorine (LaMotte Co., Chestertown, MD). Water temperature was maintained constantly between 26 and 27°C. Chlorine concentration was measured again after 24 h. The live specimens exposed to chlorine were counted 24 h after exposure and monitored in the laboratory for an additional period of 3 wk. We considered alive those fish that survived the entire period without changes in behavior. Tests were done at a temperature of 28 ± 4°C and 80 ± 5% RH.

Proportions of surviving fishes and exact binomial confidence intervals were estimated for each chlorine concentration. Difference of survival at different chlorine concentrations was assessed by analysis of variance.

Results

The proportions of *B. splendens* and *P. reticulata* surviving 24 h under different chlorine concentrations are presented in Table 1. All *B. splendens* survived an initial concentration of 1.0 mg/liter; 72.5 and 39% *B. splendens* survived chlorine concentrations of 1.5 and 2.0 mg/liter, respectively. The proportion of surviving *B. splendens* decreased significantly with increasing chlorine concentrations ($P < 0.001$).

Only a few *P. reticulata* survived a chlorine concentration of 1.0 mg/liter (Table 1). As this proportion was low, higher chlorine concentrations were not further tested for this species.

Table 2 depicts the concentration of residual chlorine after 24 h. With an initial concentration of 1.00 mg/liter, the residual median amount of chlorine was 0.03 mg/liter, and at an initial concentration of 2.00 mg/liter, median concentration was 0.6 mg/liter after 24 h.

Discussion

Larvivorous fish can be an important component in vector control programs (Ghosh and Dash 2007). To be used for biological control of insect larvae in large tanks, a fish species should be small; capable of eating a large number of larvae; have preferences for eating larvae of the target insect; and show resistance to confinement, high temperatures, variation in pH; and high concentrations of chlorine (Vargas 2003). Other studies considered cultural acceptance by local communities as another important factor (Haq et al. 1993, Russell et al. 2001). Approximately 250 fish species have been tested in different countries for the control of insect larvae (Gerberich and Laird 1985). Most of these studies deal with the control of *Culicine* and *Anopheline* mosquitoes in natural breeding sites and do not consider concentrations of residual chlorine in water. In the 1980s, Gerberich and Laird (1985) considered the use of larvae-eating fish in domestic tanks as not feasible, due to the lack of knowledge of the biology of the species (Gerberich and Laird 1985).

The species *P. reticulata* and *B. splendens* survive better at a pH between 6 and 8 (Bheema et al. 1982, Castro and Casatti 1997, Mullica and Krisanadej 2001). This variation in pH falls within the acceptable limits for human consumption of water. In Brazil, public water supply systems are supposed to offer water with a pH between 6 and 9.5 (Ministry of Health of Brazil, Decree no. 518/2004). Under these circumstances, pH

Table 2. Initial and final chlorine concentration after 24 h in test drums with *B. splendens* and *P. reticulata* fish

Initial chlorine concn	Final chlorine concn (mg/liter)							
	B. splendens				*P. reticulata*			
	No. drums	Median	Min.	Max.	No. drums	Median	Min.	Max.
1.0 mg/liter	90	0.03	0	0.12	90	0.02	0	0.06
1.5 mg/liter	120	0.40	0.17	0.92				
2.0 mg/liter	150	0.58	0.20	0.87				

is not expected to be a limiting factor for the use of fish in domestic water tanks.

In our study, *B. splendens,* an impressive predator of *Ae. aegypti* larvae, survived at 1.0 mg/liter chlorine concentration with no apparent discomfort, and ≈75% survived to a chlorine concentration of 1.50 mg/liter. Other fish species have been described to survive these concentrations. Mohamed (2003) showed under laboratory conditions, that *Oreochromis spilurus spilurus* tolerated concentrations up to 1.0 mg/liter. The species *Clarias fuscus* tolerated chlorine concentrations of up to 4.0 mg/liter (Neng et al. 1987).

In the current study, *P. reticulata* had a low survival rate in chlorinated water, similar to previous findings (Elas et al. 2004). In that study, the two species (*P. reticulata* and *P. sphenops*) did not survive at concentrations ≥0.50 mg/liter. Other studies from El Salvador demonstrated that after 4-h exposure, concentrations >0.6 mg/liter were 100% lethal for *Poecilia* sp. Even if the concentration of chlorine decreased over time, the effect of the initial exposure to a concentration of 0.60 mg/liter was irreversible (Elas et al. 2004).

An operational report of the Sewage and Water Company of Ceará, the sole distributor of tap water to the city of Fortaleza, showed that in >8,000 samples chlorine concentrations ranged from 0.55 to 1.83 mg/liter (CAGECE 2007). All Betta fish survived at a concentration of 1 mg/liter, but only 73% of the specimens survived a chlorine concentration 1.50 mg/liter, which would reduce its viability for use in biological control programs. However, it is not known how chlorine concentrations of tap water in Fortaleza oscillate over time and whether fish would survive short-term increases of chlorine. In addition, chlorine concentration varies with release location. More detailed studies are needed assessing survival of *Betta* fish in tap water under field conditions. Our data further show that *P. reticulata* is clearly not an adequate candidate fish species for use in domestic water tanks provided with tap water. A high mortality of these fish would increase the number of inspections and consequently raise the costs of the program.

If the use of larvae-eating fish is accepted by local communities, a considerable reduction of costs of dengue fever control is to be expected (Bheema et al. 1982). In a historical report from Nicaragua, Molloy (1924) mentioned that a local population adapted quickly and even replaced fish when they died. In Somalia, larvae-eating fish used for malaria control in brick tanks showed an acceptance rate of >80% in a local community (Mohamed 2003). The use of biological agents to control insect larvae was also well received in Costa Rica, because it was an alternative that could be applied by children (Conejo et al. 2000). In Mexico, others concluded that fish were well accepted by the community because people feel familiar with fish, unlike copepods and Hemiptera, which have been used as biological control alternatives (Martinez-Ibara et al., 2002). In Brazil, a good cultural acceptance of *B. splendens* fish has been reported from a small municipality in the northeast (Frutuoso 2006).

Clearly, the use of fish as biological control agents should be stimulated alongside other control methods. The use of this alternative in the domestic environment is limited to large tanks, which are very relevant in the proliferation of the *Ae. aegypti* in northeastern Brazil. Biological control should be encouraged due to the reduction in the consumption of chemical insecticides and the possibility of greater involvement of local communities in the integrated program for vector control, and consequently lower cost. In conclusion, our data show that *B. splendens* may be suitable for biological control of *Ae. aegypti* in large domestic water reservoirs, in areas where concentration of chlorine in tap water does not exceed 1.00 mg/liter.

Acknowledgments

We thank the Entomology Laboratory of the Department of Community Health at Federal University of Ceará. This study was supported by the Ceará Foundation for support to research (FUNCAP), project no. FUNCAP/PPSUS/MCT no. 015500104). J.H. is research fellow from the Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) (Brazil).

References Cited

Bheema, R.U.S., K. Krishnamoorthy, C. B. Reddy, and K. N. Paniker. 1982. Feasibility of mosquito larval control in casuarina pits using *Gambusia affinis.* Indian J. Med. Res. 76: 684–688.

Braga, I. A., and D. Valle. 2007. *Aedes aegypti:* vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde 16: 295–302.

[CAGECE] Companhia de Água e Esgoto do Ceará. 2007. Technical annual report of water quality. Control of product quality. Companhia de Água e Esgoto do Ceará, Brazil.

Castro, R.M.C., and L. Casatti. 1997. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River basin, southeastean Brazil. Ichthyol. Explor. Freshwat. 7: 337–352.

Conejo, A.C.C., F. N. Nogueral, G. M. Fonseca, R.A.S. Silva, M.V.C. Rodríguez, L. Soto, L. Angulo, J. D. Garcia, and F. N. Chavarría. 2000. Reseña de uma experiência de promoción de la salud e lucha contra el dengue utilizando el control biológico, em escuelas de Chacarita, Puntarenas, Costa Rica. Revista Costarricense de Salud Publica 9(17).

Elas, M., E. Romero, A. Gonzaléz, I. J. Alvarado, V. Navascues, A. Núñez, M. Zetino, R. Ayala, M. Moreno, and M. Lobo. 2004. Ensaio para evaluar la utilidad del gênero *Poecilia* sp. como biocontrolador de los estádios acuaticos del *Aedes aegypti.* Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de El Salvador, San Juan, Opico, EI Salvador.

Frutuoso, R. L. 2006. Utilização de Peixes como Alternativa para o Controle do Dengue: uma percepção da população do município de Pedra Branca, Ceará, Brasil. M.S. thesis, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.

Gerberich, J. B., and M. Laird. 1985. Larvivorous fish in the biocontrol of mosquitoes with a select bibliography of recent literature, pp. 47–76. *In* Integrated mosquito control methodologies. Volume II. Academic Press, London, United Kingdom.

Ghosh, S. K., and A. P. Dash. 2007. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 101, 1063–1064.

Haq, S., H. Prasad, R. N. Prasad, and T. Sharma. 1993. Availability and utility of local fishes of Shahjahanpur for mosquito control. Indian J. Malariol. 30: 1–8.

Martinez-Ibara, J. A., Y. G. Guillén, J. I. Arredondo-Jimenes, and M. H. Rodriguez-Lopes. 2002. Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tanks in southern Mexico. Biocontrol 47: 481–486.

Mohamed, A. A. 2003. Study of larvivorous fish for malaria vector control in Somalia, 2002. La Rev. de Santé de la Méditerranée Orientale 9: 4.

Molloy, D. M. 1924. Some personal experiences with fish as antimosquito agencies in the tropics. International Health Board, Managua, Nicaragua. Am. J. Trop. Med. Hyg. 4: 175–194.

Mullica, J., and J. Krisanadej. 2001. Bubble nest habitats characteristics of wild Siamese fighting fish. J. Fish Biol. 58: 1311–1319.

Neng, W., W. Shusen, H. Guancxin, X. Rongman, T. Guankun, and Q. Chen. 1987. Control of *Aedes aegypti* in household water containers by Chinese cat fish. Bull. WHO 65: 503–506.

Pamplona, L.G.C. 2006. Potencial de cinco espécies de peixe como método de controle biológico de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório, no Ceará. M.S. thesis, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.

Pamplona, L.G.C., R.J.S. Pontes, A.N.F. Regazzi, F. J. Paula-Junior, R. L. Frutuoso, E. P. Sousa, F.F.D. Dantas-Filho, and J. W. Oliveira-Lima. 2007. Predatory competence of fishes for *Aedes aegypti* larvae, under laboratory conditions. Public Health J. 41: 638–644.

Russell, B. M., J. Wang, Y. Williams, M. N. Hearnden, and B. H. Kay. 2001. Laboratory evaluation of two native fishes from tropical north Queensland as biological control agents of subterranean *Aedes aegypti.* J. Am. Mosq. Control Assoc. 17: 124–126.

Sharma, S. N., S. M. Kaul, and S. Lal. 1997. Use of *Gambusia affinis* in different habitats as a mosquito control agent. J. Commun. Dis. 29: 371–373.

Vargas, V. M. 2003. Uso de peces larvivoros como controladores biologicos de larvas de *Aedes aegypti:* una participation comunitaria. Rev. Col. MQC de Costa Rica 9: 3.

Received 29 January 2009; accepted 11 May 2009.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo