

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO BIOLARVICIDA SPINOSAD SOBRE A ATRATIVIDADE
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), VIABILIDADE DOS OVOS E
PERSISTÊNCIA EM ARMADILHAS DE OVIPOSIÇÃO**

Aluna: Cristina Maria de Menezes Torres

Orientadora: Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque

Co-orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Recife, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO BIOLARVICIDA SPINOSAD SOBRE A ATRATIVIDADE
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), VIABILIDADE DOS OVOS E
PERSISTÊNCIA EM ARMADILHAS DE OVIPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como exigência para a obtenção do grau de mestre em Biologia Animal.

Aluna: Cristina Maria de Menezes Torres

Orientadora: Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque

Co-orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Recife, 2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Torres, Cristina Maria de Menezes

Avaliação do biolarvicida spinosad sobre a atratividade de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), viabilidade dos ovos e persistência em armadilhas de oviposição / Cristina Maria de Menezes Torres. – Recife: O Autor, 2014.

60 f.: il.

Orientadora: Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque

Coorientadora: Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. *Aedes aegypti* 2. Sistemas de controle biológico I. Albuquerque, Cleide Maria Ribeiro (orient.) II. Oliveira, Cláudia Maria Fontes de (coorient.) III. Título.

595.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-106

CRISTINA MARIA DE MENEZES TORRES

**AVALIAÇÃO DO BIOLARVICIDA SPINOSAD SOBRE A ATRATIVIDADE
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), VIABILIDADE DOS OVOS E
PERSISTÊNCIA EM ARMADILHAS DE OVIPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como exigência para a obtenção do grau de mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque

Co-orientadora: Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Aprovada em 18/02/2014

Banca Examinadora:

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque (UFPE)

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos (CPqAM/FIOCRUZ-PE)

Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (UFPE)

Dra. Solange Laurentino dos Santos (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

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

À minha orientadora, Cleide Ribeiro, pela oportunidade, confiança e dedicação, por ser um exemplo de profissional. Obrigada pela força que me deu em todos os momentos!

À minha co-orientadora, Cláudia Fontes, pela oportunidade e dedicação durante todo o trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições feitas ao trabalho.

Aos professores do PPGBA, que contribuíram com minha formação durante o mestrado.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Marcos Antônio, Bruno Lima, Diogo Lira, Vinicius Nascimento, Maxwell Nascimento e Jéssica Brayner pela enorme ajuda na realização deste projeto. Em especial a Marcos e Bruno, pela grande amizade, pela paciência em escutar meus desabafos nos momentos de desânimo, e por animarem meus dias no laboratório. A vocês, meu infinito obrigada!

Aos amigos e companheiros da turma de mestrado, pela amizade, companhia e momentos de descontração. Em especial a Aliny Barreto, Ana Paula Valença e Rodrigo Carmo, pela ajuda com a análise de dados.

A Francisco Cipriano, por toda ajuda durante a realização deste trabalho, pelo enorme apoio e por tanto incentivar meu crescimento acadêmico.

Aos meus pais, Agripino Torres e Verônica Torres, por sempre me apoiarem e por me ensinarem a nunca desistir. Obrigada por, mesmo na distância, estarem sempre presentes em minha vida. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Nunca conseguirei retribuir tamanho apoio e amor. Aos meus irmãos, Vitor e Rafael, pela amizade e torcida.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Estou desconfiada de que a gente cresce quando começa a aprender, com o sentimento, muito além da retórica, a não permitir que uma desilusão ou outra nos afaste de nós mesmos e nem dos nossos sonhos mais bonitos. Estou desconfiada de que a gente cresce quando é capaz de entender que estar vivo é perigoso, sim, é trabalhoso, sim, mas também é uma oportunidade rara e imperdível. Que há que se pagar o preço, se a ideia é ser feliz e inteiro”.

(Ana Jácomo)

RESUMO

Estudos de campo foram realizados para avaliar o desempenho do larvicida spinosad (Natular® DT) nas formulações líquida (6,3nL/L e 18,9nL/L) e em pastilha (100mg/L, 50mg/L e 25mg/L), como alternativa para o uso em ovitrampas. Além disso, foram avaliados a influência do spinosad sobre a escolha da armadilha como sítio de oviposição e o potencial de inibição de eclosão de larvas em ovos expostos ao spinosad pastilha. O biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) na concentração de 4mg/L (VectoBacWG®) foi usado como parâmetro para comparação da ação larvicida e a persistência do spinosad. A presença de larvas e pupas foi analisada semanalmente em 210 ovitrampas instaladas no campus da UFPE. A positividade e a densidade de ovos postos nas ovitrampas foram consideradas para avaliar a influência do spinosad sobre a escolha da armadilha como sítio de oviposição. O percentual de ovos intactos e murchos foi considerado na avaliação da taxa de inibição de eclosão. O período de controle total de larvas sofreu influência da concentração e exposição das ovitrampas ao sol, tendo sido mais prolongado (17 semanas) na formulação pastilha em armadilhas sombreadas. O registro de larvas vivas nas ovitrampas contendo a formulação líquida do spinosad ocorreu desde a primeira semana de tratamento. A atividade de controle do Bti em condições similares foi de duas semanas. Não foi observado efeito repelente do spinosad em nenhuma das condições testadas nesse trabalho, com percentual de colonização >90% das ovitrampas. A eclosão das larvas em ovitrampas foi elevada (>70%) mesmo nas altas concentrações testadas da formulação pastilha. Esses dados proveem evidências de que a formulação pastilha apresenta uma elevada atividade larvicida e melhor persistência sob condições adversas de exposição solar, quando comparada com a formulação líquida e com o Bti. Além disso, o produto não influencia na escolha da ovitrapa pelas fêmeas de *Aedes* sp nem na eclosão das larvas.

Palavras-chave: *Saccharopolyspora spinosa*; controle biológico; mosquito.

ABSTRACT

Field studies were conducted to evaluate the performance of the larvicide spinosad (Natular® DT) in liquid (6.3 nL / L and 18.9 nL / L) and tablet (100 mg / L, 50mg / L, 25mg / L) formulations as an alternative for use in ovitraps. Furthermore, the influence of spinosad on the choice of trap as an oviposition site and the potential of inhibition of hatchability in eggs exposed to spinosad were assessed. The biolarvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) at a concentration of 4mg/L (VectoBacWG®) was used as parameter for comparing the larvicidal activity and persistence of spinosad. The presence of larvae and pupae was assessed weekly in 210 ovitraps installed on the *campus* of UFPE. The positivity and density of eggs laid in ovitraps were considered to evaluate the influence of spinosad on the choice of the trap as oviposition site. The percentage of intact and withered eggs was considered to evaluate the inhibition of hatchability. The period of total control of larvae suffered influences of concentration and exposure of ovitraps to the sun, being longer (17 weeks) in the tablet formulation in shaded traps. The registration of live larvae in ovitraps containing the liquid formulation of spinosad occurred since the first week of treatment. The period of total control in Bti treatment under similar conditions was two weeks. No repellent effect of spinosad was observed in any of the conditions tested in this work, with percent colonization of ovitraps > 90%. The egg hatching in ovitraps was high (> 70%) even at high concentrations tested to the tablet formulation. These data provide evidence that the tablet formulation has a high persistence and better larvicidal activity under unfavorable conditions of sunlight exposure when compared to the liquid formulation and Bti. Furthermore, the product does not influence the choice of the ovitrap by *Aedes* sp female or the larvae hatching.

Key words: *Saccharopolyspora spinosa*; biologic control; mosquito.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

- Figura 1** – Estágios de desenvolvimento de *Aedes aegypti* 11
- Figura 2** – Ovos de *Aedes aegypti*. A – ovos claros no momento da postura; B – ovos após adquirirem cor negra. C – microscopia eletrônica mostrando ornamentação típica do ovo de *A. aegypti*. No detalhe, micrópila localizada no polo anterior do ovo.....12
- Figura 3** – Formas imaturas do mosquito *Aedes aegypti*. A – larva. B e C – vista frontal das escovas orais do 1º e 4º ínstars larvais, respectivamente. D – pupa.....13
- Figura 4** – Armadilha de oviposição (ovitrampa) elaborada a partir de garrafa PET pintada de preto e devidamente identificada.....16
- Figura 5** – Mecanismo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* 19
- Figura 6 – Desenho esquemático do modo de ação das spinosinas, evidenciando a ligação das toxinas aos receptores de acetilcolina, provocando a abertura de canais de sódio 21

Artigo

- Figura 1. Média (\pm EP) de ovos de *Aedes* sp. coletados em ovitrampas tratadas com 0,87, 0,43 e 0,21g/L de spinosad (Natular® DT). 52
- Figura 2. Média (\pm EP) de ovos de *Aedes* sp. por ovitrampa coletados durante o experimento, em ovitrampas contendo 0,43g/L da pastilha de spinosad e somente água. 53
- Figura 3. Atividade residual de diferentes concentrações da pastilha de spinosad em armadilhas de oviposição contra *Aedes* sp. instaladas em jardins (A) e corredores (B) 54
- Figura 4. Média (\pm EP) de ovos de *Aedes* sp. em armadilhas de oviposição contendo 6,3nL/L e 18,9nL/L de spinosad líquido 55

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1. Períodos (semanas) de controle de 100% e $\geq 80\%$ de larvas de *Aedes* sp. em ovitrampas contendo 0,87g/L, 0,43g/L e 0,21g/L do larvicida spinosad na formulação pastilha instaladas em áreas sombreadas e ensolaradas 56

Tabela 2. Larvas de *Aedes* sp. registradas em ovitrampas tratadas com os larvicidas spinosad e *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) 57

Tabela 3. Mortalidade de larvas de *Aedes* sp. pelo efeito residual do spinosad impregnado em ovos coletados em ovitrampas tratadas com diferentes concentrações da formulação pastilha 58

Tabela 4. Percentual médio de larvas de *Aedes aegypti* originadas de ovos com diferentes idades submetidos a diferentes tempos de exposição e concentrações do larvicida spinosad..... 59

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
1 REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Aedes aegypti</i>	11
1.2 ARMADILHA DE OVIPOSIÇÃO (OVITRAMPA): IMPORTÂNCIA NO MONITORAMENTO E CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i>	15
1.3 <i>Bacillus thuringiensis israelenses</i> (Bti) E SPINOSAD: BIOLARVICIDAS PARA O CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i> :	17
1.3.1 <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti).....	18
1.3.2 Spinosad	20
1.3.2.1 Ação do spinosad sobre a eclosão de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	22
REFERÊNCIAS	24
2 HIPÓTESES E OBJETIVOS	32
Manuscrito.....	34
Resumo	35
Abstract.....	37
Introdução	38
Metodologia.....	39
Resultados.....	42
Discussão	44
Conclusão	46
Resultados não descritos no artigo científico	46
Referências	48
3 CONCLUSÕES	60
ANEXO A	61

APRESENTAÇÃO

O uso intensivo de larvicidas químicos como medida predominante nos programas de controle do mosquito *Aedes aegypti* (L.), vetor de arbovírus causadores da dengue e febre amarela, tem levado à ocorrência de resistência em populações desse inseto. Um método alternativo de controle que tem se destacado é o uso de larvicidas de origem biológica, particularmente por apresentarem baixa toxicidade para o ambiente e animais.

Nesse contexto, o presente trabalho avaliou o desempenho do biolarvicida spinosad contra *A. aegypti* em um ponto estratégico de criação desse mosquito em Recife, visando indicar a possibilidade de uso de mais um produto de natureza biológica nos programas de controle. O interesse pelo spinosad ocorreu devido ao sucesso obtido em testes de laboratório e alguns trabalhos de campo realizados no México contra essa espécie de mosquito, usando a formulação líquida do produto.

Em nosso trabalho, seu uso foi analisado em armadilhas de oviposição (ovitrampa) empregando-se as formulações líquida e em pastilha), sob diferentes concentrações, tendo em vista obter dados que permitam indicar condições mais favoráveis para uso nos programas de controle. Além disso, a ação do spinosad foi comparada com *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti), um biolarvicida eficiente que faz parte do programa de controle de *Aedes aegypti* em alguns municípios do estado de Pernambuco – Brasil. Pela primeira vez, avaliou-se em laboratório, uma possível atividade do spinosad na formulação pastilha sobre a eclosão das larvas.

A dissertação está apresentada na forma de seções que seguem as normas da ABNT para realização de trabalho científico, exceto a última seção, que apresenta os resultados obtidos nos testes com a formulação pastilha do larvicida spinosad e se encontra na forma de um artigo científico, seguindo-se as regras do periódico ao qual será submetido (*Parasites & Vectors*). Em seguida, encontram-se os resultados dos experimentos com a formulação líquida do spinosad. As normas de submissão de artigos científicos à revista *Parasites & Vectors* estão em anexo.

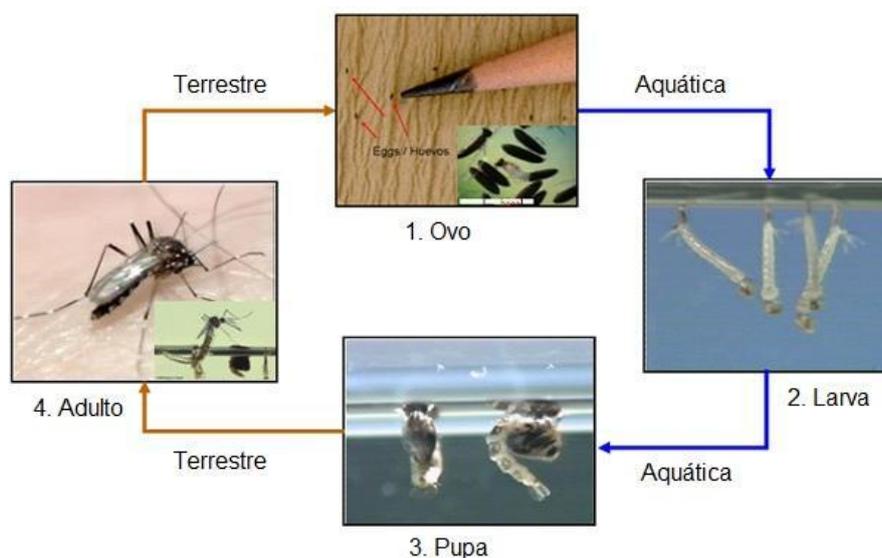
1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DE *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linneaus (1762) pertence à ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Culicini (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). É um mosquito oriundo do velho mundo, provavelmente da região etiópica (nordeste da África), tendo sido descrito originalmente no Egito (PESSÔA; MARTINS, 1982) e introduzido nas Américas, possivelmente durante o período colonial, com o tráfico de escravos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FONSECA, 1999). A espécie predomina em áreas tropicais e subtropicais do mundo, entre os paralelos de latitudes 45°N e 35°S, sendo geralmente encontrada em baixas altitudes de até 1.000 metros (LOZOVEI, 2011).

A. aegypti é um inseto holometábolo, apresentando, assim, em seu ciclo de vida, as fases de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (Figura 1) (FORATTINI, 1965).

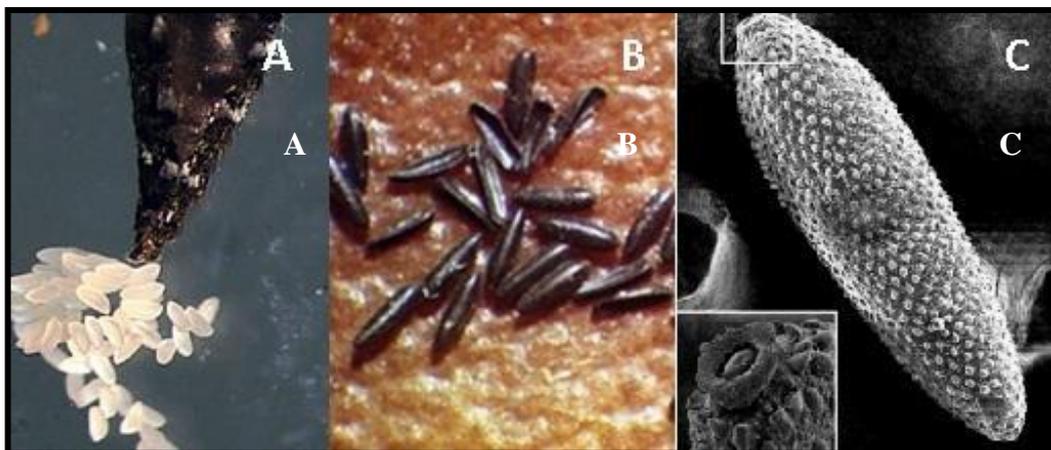
Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de *Aedes aegypti*.



Fonte: Centers for disease control and prevention.

Os ovos medem aproximadamente 1mm de comprimento e são geralmente depositados em recipientes escuros e úmidos, aderidos nas paredes dos criadouros, próximos à lâmina d'água (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FAY; PERRY, 1965). No momento da postura os ovos são brancos, mas após algumas horas adquirem cor negra (Figura 2 A e B) (FORATTINI, 1965).

Figura 2 – Ovos de *Aedes aegypti*. A – ovos no momento da postura; B – ovos após adquirirem cor negra. C – microscopia eletrônica mostrando ornamentação típica do ovo de *A. aegypti*. No detalhe, micrópila localizada no polo anterior do ovo.



Fonte: Figuras 2A e 2B – Fiocruz; Figura 2C - PEREIRA *et al.*, 2006.

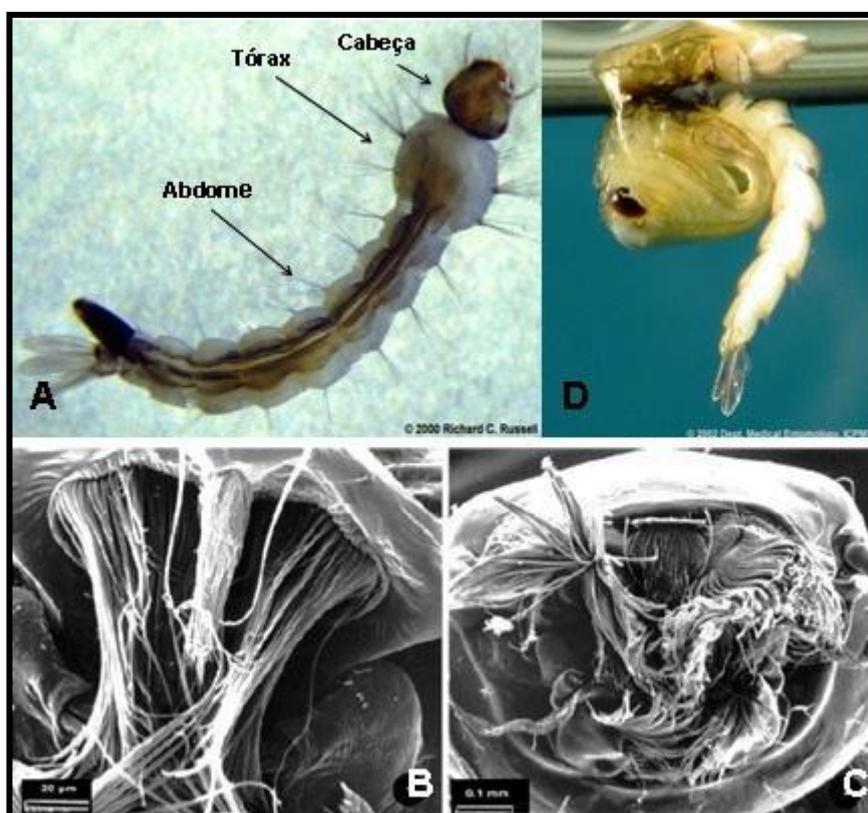
Uma casca composta de três camadas envolve o ovo: o exocório, um envoltório externo, fino e transparente; o endocório, localizado logo abaixo, constituído por quitina, resistente à tensão e insolúvel em água, e internamente, a membrana vitelina que envolve o núcleo, citoplasma e vitelo (PEREIRA *et al.*, 2006). O exocório apresenta ornamentações de aparência reticular, compostas por células pentagonais, denominadas de corpos coriônicos. Na extremidade anterior do ovo há um orifício, a micrópila, pelo qual o espermatozoide penetra para fecundar o óvulo (Figura 2C) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; PEREIRA *et al.*, 2006). Hidrocarbonos e enzimas presentes na superfície dos ovos, como a elongaseacil-coA, influenciam na capacidade dos ovos de *A. aegypti* de permanecerem viáveis por longos períodos em ausência de água (URBANSKI *et al.*, 2010). Durante esse período de quiescência, os ovos podem ser transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, sendo esse o principal meio de dispersão do inseto. A quiescência é interrompida após o contato dos ovos com a água (EDGERLY; MARVIER, 1992; LIVDAHL *et al.*, 1984).

As larvas, que são aquáticas filtradoras não seletivas, passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de matéria orgânica acumulada nas paredes e fundo dos criadouros. Apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e longo abdome (Figura 3A). Ao longo do desenvolvimento ocorre uma grande mudança no tamanho da larva, com os indivíduos recém eclodidos medindo cerca de 1mm, e atingindo cerca de 8 mm no final da fase larval (L4) (CLARK- GIL; DARSIE,1983). As principais mudanças do 1º para o 4º estágio larval podem ser vistas nas escovas orais, que apresentam um aumento no número de filamentos: nas larvas de 1º e 2º instares as escovas possuem poucos filamentos, enquanto nas

larvas de 3º e 4º instares os filamentos são mais numerosos, aparecendo como um emaranhado de longas estruturas (Figura 3 – B e C) (SCHAPER; HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA, 2006).

A duração desta fase depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro, porém, em condições ótimas, o período do primeiro ao quarto estágio larval pode não exceder cinco dias (BRASIL, 2001).

Figura 3 – Formas imaturas do mosquito *Aedes aegypti*. A – larva. B e C – vista frontal das escovas orais do 1º e 4º instares larvais, respectivamente. D – pupa.



Fonte: Figura 3A – Russel, 2000; Figura 3B e 3C – Schaper; Hernández-Chavarría, 2006; Figura 3D – Dept. Medical Entomology, ICPMR.

É no estágio de pupa (Figura 3D), que dura entre dois e três dias, em que ocorre a metamorfose da larva para o adulto. A pupa não se alimenta, mas é bastante móvel (BRASIL, 2001; FORATTINI, 1965).

Os adultos de *A. aegypti*, apresentam tórax enegrecido, frequentemente ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateadas. A principal característica da espécie é uma nítida faixa curva, branco-prateada de cada lado do

tórax (mesonoto) e duas mais finas, retas, longitudinais e centrais, as quais formam a figura de uma lira (CONSOLI; DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1965).

Tem hábitos preferencialmente diurnos e predileção de se alimentar do sangue humano (GADELHA; TODA, 1985). Tanto machos como fêmeas necessitam de carboidratos como fonte de energia, alimentando-se principalmente de néctar de plantas. No entanto, as fêmeas desta espécie necessitam das proteínas presentes no sangue do hospedeiro para que ocorra a maturação dos ovos (CLEMENTS, 1999). Estes são depositados geralmente em recipientes artificiais preenchidos com água localizados dentro ou ao redor das casas (GADELHA; TODA, 1985).

Estímulos visuais e olfatórios, que envolvem semioquímicos como feromônios e apneumônios, atuam como atrativos na seleção dos sítios de oviposição (EIRAS, 2001). Bactérias ou fungos saprobióticos e seus metabólitos voláteis presentes em águas poluídas ou infusões à base de gramíneas, têm papel importante como estímulos atraentes para fêmeas de mosquitos, no momento da oviposição (GEETHA *et al.*, 2003; NAVARRO *et al.*, 2003; SIVAGNANAME *et al.*, 2001; TAKKEN; KNOLS, 1999).

Sinais químicos também são utilizados pelas fêmeas em busca de hospedeiros para sua alimentação sanguínea. Ao se alimentar em humanos, a fêmea pode transmitir patógenos, como o vírus da dengue. A dengue é transmitida para humanos através da picada de uma fêmea do mosquito infectada, que, em sua maioria, adquire o vírus ao se alimentar do sangue de outra pessoa nesta situação. O vírus infecta o intestino do mosquito e se espalha para as glândulas salivares em um período de 8 a 12 dias, após o que a fêmea está apta para infectar outras pessoas (FORATTINI, 1962; HALSTEAD, 2008).

O arbovírus causador da dengue pertence à família Flaviviridae, e possui reconhecidamente, quatro sorotipos virais: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (ARAÚJO; CARELS, 2007). Recentemente, foi apresentada na Terceira Conferência Internacional de Dengue e Dengue Hemorrágica a descoberta de um quinto sorotipo do vírus. Este foi encontrado em amostras de sangue e soro coletadas durante uma epidemia de dengue ocorrida em 2007 na Malásia. Segundo Normile (2013), pesquisadores suspeitam que este sorotipo circula entre macacos, na Indonésia. Após o sequenciamento genético do vírus, descobriu-se que este era filogeneticamente distinto dos quatro sorotipos já conhecidos. Experimentos mostraram que anticorpos de macacos produzidos contra o novo sorotipo eram diferentes daqueles produzidos contra os demais (NORMILE, 2013). Essa descoberta pode dificultar os esforços realizados para o controle da doença, especialmente aqueles relacionados com o desenvolvimento de uma vacina que proteja contra todos os sorotipos simultaneamente.

1.2 ARMADILHA DE OVIPOSIÇÃO (OVITRAMPA): IMPORTÂNCIA NO MONITORAMENTO E CONTROLE DE *Aedes aegypti*

No Brasil, foi implantado em 1996 o Programa de Erradicação de *Aedes aegypti* (PEAa), que, mesmo não atingindo seus objetivos, resultou em um fortalecimento das ações de combate ao mosquito. No entanto, diante da tendência de aumento da incidência de casos de dengue e a introdução de um novo sorotipo (DEN 3), o Ministério da Saúde, com a parceria da Organização Pan-Americana de Saúde, realizou um Seminário Internacional, em junho de 2001, para avaliar as diversas experiências e elaborar um Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD). Em 2002, a fim de intensificar o conjunto de ações que vinham sendo realizadas e implantar novas ações, foi implantado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (BRASIL, 2002).

A vigilância entomológica utiliza dos índices de infestação por *Aedes aegypti* para monitorar a presença, distribuição e abundância do vetor, podendo, assim, subsidiar ações de controle do mosquito (GOMES, 1998; LOK, 1985). Seguindo as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana da Saúde (Opas), a Secretaria de Vigilância em Saúde/MS tem utilizado vários métodos para os levantamentos entomológicos, que auxiliam na vigilância de *A. aegypti* no país, incluindo a detecção de ovos, larvas e adultos através de armadilhas (BRASIL, 2013).

Dentre as armadilhas, as ovitrampas, destinadas à coleta de ovos, têm se mostrado ferramenta sensível e econômica para detecção da presença de *A. aegypti* em uma área, particularmente quando a densidade populacional desse mosquito é baixa e os resultados da coleta de larvas e adultos são insatisfatórios. Braga *et al.* (2000), por exemplo, demonstraram que este método de vigilância é mais sensível do que a pesquisa larvária, e permite detectar diferenças de infestação entre vários locais. A ovitampa também apresenta desempenho superior à pesquisa larvária em relação ao tamanho da amostra capturada (MARQUES *et al.*, 1993).

Descrita na literatura inicialmente por Fay e Perry (1965) para vigilância de populações de *A. aegypti* nos Estados Unidos, a ovitampa foi logo depois modificada por Fay e Eliason (1966). No entanto, a ideia da utilização desse tipo de armadilha parece datar de períodos mais antigos. LIMA (1989), citando CRUZ (1909), afirma que a motivação para usar armadilhas foi detectar a presença de *A. aegypti* em uma determinada área por ocasião das campanhas realizadas por Oswaldo Cruz, em torno de 1903, quando os resultados das pesquisas larvárias em uma área se mostravam negativos. Nesses locais eram, então,

distribuídos vasilhames com água para postura de ovos de *A. aegypti*, indicando sua presença na área e seus possíveis focos.

A armadilha de oviposição é constituída, basicamente, de um recipiente de cor preta e fosca, com tamanho variável, contendo em seu interior água e um substrato de postura, para facilitar a oviposição (Figura 4).

Por sua simplicidade, a ovitrampa pode ser adaptada facilmente a partir desse modelo padrão. Podem ser utilizados diferentes tipos de recipientes, como vasos plásticos (SANTOS *et al.*, 2003) ou garrafas PET pintadas de preto (NUNES; TRINDADE; SOUTO, 2011). Da mesma forma, diferentes materiais podem ser utilizados como substrato de postura, como, por exemplo, palhetas de madeira (SANTOS *et al.*, 2003) ou papel filtro (BAAK-BAAK *et al.*, 2013). Várias alterações relacionadas com a substituição da água por outras substâncias que sirvam de atrativo para as fêmeas do mosquito são descritas na literatura, como, por exemplo, infusão de plantas (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2012; NUNES; TRINDADE; SOUTO, 2011; REITER *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 2010). A eficiência da ovitrampa pode, ainda, ser aperfeiçoada com o uso de compostos com atividade larvicida, aumentando seu período de permanência em campo, impedindo que se torne um criadouro, como por exemplo, a utilização de biolarvicida à base de bactérias entomopatogênicas, como o *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) (JAHAN; SARWAR, 2013; MELO-SANTOS *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2003).

Figura 4 – Armadilha de oviposição (ovitrampa) elaborada a partir de garrafa PET pintada de preto e devidamente identificada.



Fonte: autoria própria.

Esse tipo de armadilha tem sido empregado em diversos programas de monitoramento de *A. aegypti* como um método para avaliar a presença do vetor da dengue, sendo notadamente útil para avaliar o impacto de medidas de controle (REITER *et al.*, 1991). Essa armadilha foi usada pela primeira vez como método complementar de controle da população de *A. aegypti* por Chan *et al* (1973) na Singapura. Trabalhos posteriores têm confirmado a ovitrampa como mais uma ferramenta potencial e eficiente no controle do mosquito (JAHAN; SARWAR, 2013; PERICH *et al.*, 2003; RÉGIS *et al.*, 2013). Em Pernambuco, por exemplo, Regis *et al.*, (2013) obtiveram uma redução de 90% e 77% na densidade de ovos nas cidades de Santa Cruz do Capibaribe e Ipojuca, respectivamente, após dois anos de intervenções que consistiram na utilização de ovitrampas, além de coleta de mosquitos adultos e introdução de peixes em cisternas de residências.

Além disso, quando existe uma demanda de um grande número de mosquitos de populações de campo para experimentos em laboratório, as ovitrampas são uma maneira simples e rápida de obtê-los a partir de ovos que podem ser coletados em grande quantidade.

A instalação de ovitrampas em campo permite a obtenção de dois índices: IPO (índice de positividade de ovitrampas), que indica o percentual de armadilhas positivas, e IDO (índice de densidade de ovos/ovitrampa), que mostra o número médio de ovos por ovitrampa. Esses índices auxiliam na detecção precoce de novas infestações e no monitoramento de populações vetoriais em áreas com baixa densidade do mosquito (GOMES, 1998).

1.3 *Bacillus thuringiensis israelensis* E SPINOSAD: BIOLARVICIDAS BACTERIANOS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*

Atualmente, existem vários larvicidas de origem biológica sendo avaliados para uso no controle do mosquito *A. aegypti*. Dentre eles se destacam os produzidos a partir de bactérias (NARESHKUMAR *et al.*, 2012; REVATHI *et al.*, 2013); partes de plantas (AGRA-NETO *et al.*, 2014; KOVENDAN *et al.*, 2012), algas marinhas (RAVIKUMAR; ALI ; BEULA, 2011) e fungos (DARBRO *et al.*, 2011).

Dentre os bacterianos, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) tem sido o inseticida biológico mais utilizado no controle de *A. aegypti*, devido à sua especificidade e eficiência. Uma proposta mais recente e promissora, para uso alternativo é o biolarvicida spinosad, baseado na bactéria *Sacharopolyspora spinosa*.

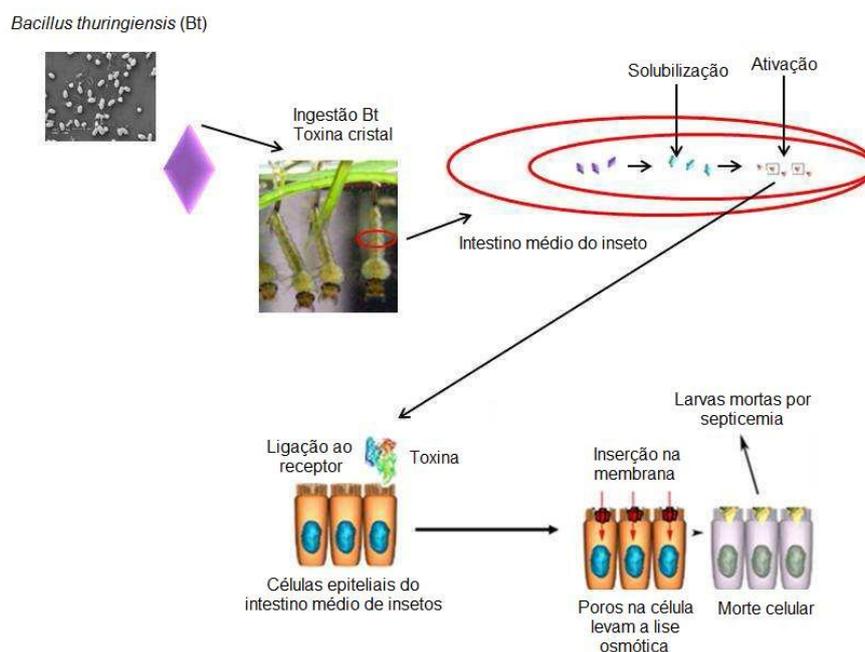
1.3.1 *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria aeróbia, gram-positiva, da família Bacillaceae, que produz, no momento da esporulação, inclusões cristalinas compostas de proteínas (δ -endotoxinas) que são tóxicas para várias ordens de insetos (FEITELSON *et al.*, 1992). No entanto, a ação larvicida do Bt para dípteros só foi conhecida a partir da descoberta de *Bacillus thuringiensis* sor. *israelenses* (Bti) (DE BARJAC, 1978). Essa cepa foi isolada em 1977 a partir do intestino de larvas de *Culex* (DE BARJAC, 1978). Posteriormente, descobriu-se que a atividade larvicida do Bti estendia-se para diferentes espécies das famílias Culicidae e Simuliidae (DELÉCLUSE; JUÁREZ-PÉREZ ; BERRY, 2000).

Dois grupos de toxinas multigênicas, Cry e Cyt, são formados após a esporulação (DE MAAGD *et al.*, 2001). Bti possui três diferentes toxinas Cry e uma Cyt, que agem de forma sinérgica (BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007; CRICKMORE *et al.*, 1995; GILL *et al.*, 1992; HUGHES *et al.*, 2005), características que reduzem a probabilidade de desenvolvimento de resistência (BECKER, 2000; RÉGIS *et al.*, 2001). Proteínas Cry possuem toxicidade específica para diferentes ordens de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera. Ao contrário, proteínas Cyt são tóxicas principalmente para Diptera (FEDERICI; BAUER, 1998; GUERCHICOFF; DELÉCLUSE; RUBINSTEIN, 2001). Essas toxinas não apresentam toxicidade para humanos, outros vertebrados e plantas, além de serem completamente biodegradáveis (BRAVO; SOBERÓN; GILL, 2010).

Um esquema do mecanismo de ação do Bti em larvas de mosquito está apresentado na Figura 5. Após a ingestão, os cristais são dissolvidos em meio alcalino do intestino médio das larvas, e as protoxinas são liberadas, porém ainda não exibem atividade biológica e a ativação proteolítica necessária. As proteases do intestino desdobram as protoxinas e produzem proteínas ativadas de menor tamanho. As toxinas ativas ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades da membrana de células epiteliais do intestino médio do inseto. Após isso, as toxinas criam poros que interferem no sistema de transporte de íons pela membrana do tecido. Este processo causa lise do epitélio do intestino médio, baixando o pH do lúmen, favorecendo a germinação dos esporos, que leva à septicemia e morte do inseto. (GILL; COWLES; PIETRANTONIO, 1992; MONNERAT; BRAVO, 2000).

Figura 5 – Mecanismo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Lara, 2013.

Bti foi introduzido no Brasil pela primeira vez em 1983 para o controle de simuliídeos (popularmente conhecidos como borrachudos) no Rio Grande do Sul (MARDINI *et al.*, 2000), porém sua utilização foi estendida ao controle de *A. aegypti* em municípios onde eram detectadas populações do mosquito resistentes ao organofosforado temephos (BRAGA; VALLE, 2007). Programas realizados em vários países têm demonstrado a sua eficácia para controle de culicídeos em condições de campo (BECKER, 1997; GUIDI *et al.*, 2011; RÉGIS *et al.*, 2013). Em Pernambuco, Bti foi utilizado com sucesso em ovitrampas em programa de controle integrado de *A. aegypti*, citado anteriormente (RÉGIS *et al.*, 2013). Sabe-se que este larvicida não atua como repelente para as fêmeas de *A. aegypti*, podendo, assim, ser utilizado em armadilhas de oviposição sem prejudicar a eficiência das mesmas (SANTOS *et al.*, 2003; STOOPS, 2005).

Alguns trabalhos têm alertado para um possível surgimento de resistência às toxinas isoladas do Bti em mosquitos como consequência de seu uso intensivo. Boyer, Tilquin e Ravel (2007) descrevem populações de campo do culicídeo *Ochlerotatus cataphylla* com reduzida sensibilidade ao Bti. Paris *et al* (2010) detectaram populações de campo de *A. rusticus* que apresentavam mudanças na estrutura genética as quais, segundo os autores, poderiam representar o primeiro passo para o desenvolvimento de resistência ao Bti. Paris *et al* (2011) demonstraram que uma população de laboratório de *A. aegypti* suscetível ao Bti

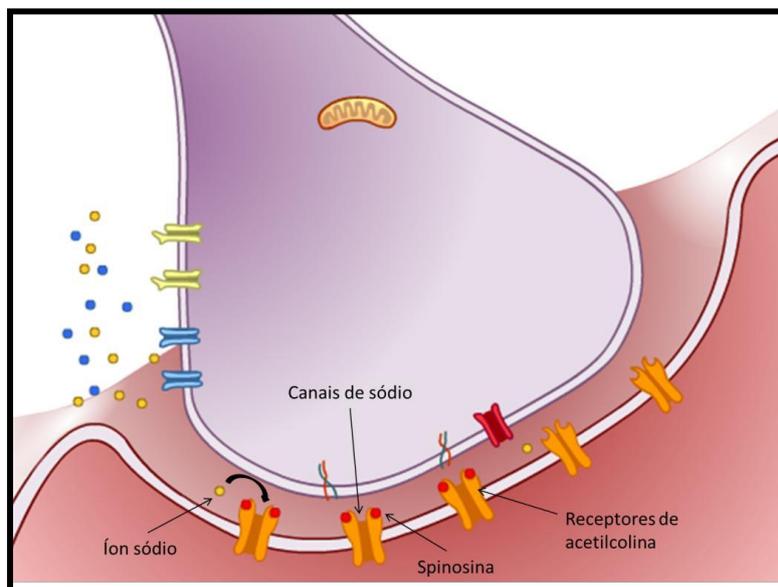
pode adquirir resistência às toxinas isoladas do larvicida após algumas gerações de pressão seletiva, no entanto, a resistência às três toxinas simultaneamente permaneceu baixa nas populações utilizadas nos experimentos.

1.3.2 Spinosad

Na década de oitenta, um extrato de microrganismos cultivados a partir de amostras de solo coletadas em uma ilha do Caribe apresentou efeito letal em larvas de mosquitos, porém só tornou-se de real interesse quando esse efeito foi confirmado, no ano seguinte, em larvas de *Spodoptera eridania*, uma espécie da ordem Lepidoptera considerada praga na agricultura (THOMPSON, 2000). Estudos posteriores indicaram que a atividade larvicida havia sido provocada por substâncias produzidas durante a fermentação aeróbia de um actinomiceto de solo, *Sacharopolyspora spinosa* (MERTS; YAO, 1990), que foram denominadas de spinosinas. No total, são produzidas nove spinosinas neste processo (A-H e J), porém as que possuem maior atividade inseticida são as spinosinas A e D, sendo estas também as produzidas em maior quantidade (SALGADO; SPARKS, 2010). Com base nesse conhecimento, foi produzido o spinosad, um biolarvicida obtido a partir do extrato resultante da fermentação da bactéria e que contém essas duas spinosinas (A – 85%; D – 15%).

Spinosad penetra no corpo dos insetos principalmente por ingestão, podendo ocorrer em menor proporção passagem através da cutícula (THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000). Este inseticida atua primariamente nos receptores nicotínicos de acetilcolina e, secundariamente, nos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA) (Figura 6). As toxinas ligam-se ao receptor nicotinérgico de acetilcolina, provocando uma mudança na conformação do receptor e, conseqüentemente, causando a abertura de canais de íon sódio e a condução do estímulo nervoso. No entanto, as spinosinas não são degradadas pela enzima acetilcolinesterase, o que aconteceria normalmente com a acetilcolina. O resultado é a ativação prolongada dos receptores de acetilcolina, ocasionando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos, o que causa tremores, paralisia e morte do inseto (ORR *et al.*, 2009; SALGADO, 1998; THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000;).

Figura 6 – Desenho esquemático do modo de ação das spinosinas, evidenciando a ligação das toxinas aos receptores de acetilcolina, provocando a abertura de canais de sódio.



Fonte: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (adaptado).

Apesar de outros inseticidas atuarem nos receptores GABA e de acetilcolina (imidaclopride e avermectina, por exemplo), spinosad interage nesses receptores com sítios de ligação diferentes dos já descritos para outros inseticidas e ainda desconhecidos (ORR *et al.*, 2009). Por conta deste modo de ação diferenciado, o “Insecticide Resistance Action Committee” (IRAC) classificou as spinosinas como um novo grupo de inseticidas, conhecido como “ativadores alostéricos dos receptores de acetilcolina” (IRAC, 2008). Spinosad não apresenta resistência cruzada com outros inseticidas (DARRIET; DUCHON; HOUGARD, 2005), além de apresentar baixa toxicidade para humanos e outros organismos não alvo, incluindo insetos que são benéficos ao ambiente (WILLIAMS *et al.*, 2003; MARINA *et al.*, 2010).

Este larvicida é utilizado na agricultura contra diversas espécies de insetos-praga, principalmente das ordens Diptera, Lepidoptera, Thysanoptera e Coleoptera (ALLAL-BENFEKIH *et al.*, 2013; EL-AW *et al.*, 2008; SUBRAMANYAM *et al.*, 2007). Porém, apenas recentemente, sua eficácia para uso contra culicídeos vem sendo avaliada, mostrando alta toxicidade do spinosad para larvas de *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (DARRIET *et al.*, 2005; MARINA *et al.*, 2012; PÉREZ *et al.*, 2007; ROMI *et al.*, 2006).

Em estudo recente, Marina *et al.* (2011) utilizaram a formulação líquida (1mg/L e 5mg/L) do spinosad em armadilhas de oviposição para avaliar sua eficácia contra larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, tendo se mostrado altamente tóxico para estes animais. Em testes

realizados em Martinica, no Caribe, spinosad apresentou atividade tóxica contra larvas de *A. aegypti* na concentração de 0,1mg/L (formulação granulada), bem como quando utilizado em uma mistura junto com piriproxifeno (0,02mg /L de piriproxifeno + 0,1mg/L de spinosad) (DARRIET *et al.*, 2010). Além disso, demonstrou-se que esse larvicida não apresenta efeito repelente para fêmeas grávidas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (MARINA *et al.*, 2010; PÉREZ *et al.*, 2007). Os resultados promissores obtidos com o uso do spinosad como biolarvicida no combate a *A. aegypti* estimulam novos estudos que comprovem seu potencial no controle destes insetos em diferentes populações, bem como em diferentes condições climáticas, como a do Nordeste brasileiro, que é altamente adversa para a utilização de larvicidas no controle de culicídeos.

1.3.2.1 Ação do spinosad sobre a eclosão de larvas de *Aedes aegypti*

Diversos produtos naturais têm sido avaliados quanto à atividade inibitória para eclosão das larvas de *A. aegypti*, como, por exemplo, substâncias extraídas de plantas (GOVINDARAJAN, 2011; GOVINDARAJAN; KARUPPANNAN, 2011; SANTOS *et al.*, 2012) e fungos (ALBERNAZ; TAI; LUZ, 2009; LUZ *et al.*, 2008). Testes de laboratório utilizando preparações contendo uma lectina solúvel em água extraída de sementes da planta *Moringa oleifera* têm sugerido a existência de efeito ovicida (SANTOS *et al.*, 2012).

A perspectiva de um produto capaz de inibir a eclosão de larvas é importante sob diversos aspectos, particularmente aqueles inerentes à biologia do mosquito e que dificultam as medidas de controle. Dentre esses aspectos, evidencia-se a capacidade dos ovos de *A. aegypti* de resistir à dessecação, podendo sobreviver em condições adversas e eclodirem longo período após a postura (REZENDE *et al.*, 2008; SILVA; SILVA, 1999), repovoando áreas tratadas e consideradas sob controle. Outro aspecto importante no conhecimento de substâncias com potencial para inibir ou retardar a eclosão de larvas, refere-se à possibilidade de seu uso em armadilhas de oviposição. O maior problema dessa armadilha é a possibilidade de desenvolvimento de imaturos a partir dos ovos postos, necessitando a presença de um produto que dificulte o desenvolvimento de ovos/larvas. Desse modo, um produto com atividade sobre a eclosão das larvas potencializaria o tempo de permanência da armadilha em campo, além de torná-la uma excelente ferramenta de controle do mosquito.

Alguns estudos têm sugerido uma possível ação inibitória da eclosão de larvas de mosquitos no spinosad, no entanto, os resultados são pouco conclusivos. Argueta, Valle e Marina (2011) observaram um baixo efeito ovicida em ovos expostos a 10mg/L de spinosad

por períodos de 12, 24, 48 e 96 horas (em média 91,8% de taxa de eclosão, enquanto no controle esse percentual foi de 97,5%). Pérez *et al* (2007) registraram uma taxa de eclosão de 37,7% em ovos de *A. aegypti* expostos a 5mg/L de spinosad, que não diferiu significativamente do observado no controle (48,7%). Em trabalho realizado no México, Marina *et al.*, (2010) registraram uma taxa de eclosão variando de aproximadamente 20-30% de ovos de *Aedes* spp. obtidos de armadilhas de oviposição contendo spinosad (1 e 5mg/L) instaladas em campo.

Embora existam poucos estudos sobre o efeito do spinosad na eclosão de larvas, os resultados obtidos até o momento indicam que essa atividade parece depender da concentração do ingrediente ativo. No entanto, devido à importância do assunto, são necessários estudos mais aprofundados sobre a capacidade do spinosad de inibir a eclosão de larvas.

REFERÊNCIAS

- AGRA-NETO, A. C. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research**, v. 113, p. 175-184, 2014.
- ALLAL-BENFEKIH, L. *et al.* Comparative evaluation of the toxicity of lambda cyhalothrin and spinosad on the insect pests and auxiliary fauna in an orange orchard of the central Mitidja (Blidean Atlas, Algeria). **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 7, p. 21-26, 2013.
- ALBERNAZ, D. A. S.; TAI, M. H. H.; LUZ, C. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, p. 141-147, 2009.
- ARAÚJO, R. F. S. D.; CARELS, N. Investigação de polimorfismos no genoma do vírus da Dengue. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde**, v. 1, p. 317-321, 2007.
- ARGUETA, A. L., VALLE, J., MARINA, C. F. Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, p. 269-272, 2011.
- BAAK-BAAK, C. M. *et al.* Development and Laboratory Evaluation of Chemically-Based Baited Ovitrap for the Monitoring of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology**, v 38, p 175-181, 2013.
- BECKER, N. Microbial control of mosquitoes: Management of the upper rhine mosquito population as a model programme. **Parasitology Today**, v. 13, p. 485-487, 1997.
- BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J.-F., Delecluse, A., Nielsen-LeRoux, C. (Eds.), **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 383-396, 2000.
- BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, p. 163-169, 2007.
- BOYER, S.; TILQUIN, M.; RAVANEL, P. Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 157-162, 2007.
- BRAGA, I. A. *et al.* Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 347-353, 2000.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, p. 279-293, 2007.

BRASIL. **Dengue - Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. **Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypti* (LIRAA) para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2013.

BRASIL. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GILL, S. S. *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use. In: **Insect Control: biological and synthetic agentes**. 1.ed. Elsevier, 2010.

CHAN, K. L. The eradication of *Aedes aegypti* at the Singapore Paya Lebar International Airport. *Vector Control in Southeast Asia* (ed. by Y.-C. Chan, K.-L. Chan and B.-C. Ho), pp. 85-88. Ministry of Health, Singapore. 1973.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html>. Acesso em 28/11/2013.

CLARK-GIL, S.; DARSIE, R. F. The Mosquitoes of Guatemala, their identification and binomics. **Mosquito Systematics**, v. 15, p. 151-284, 1983.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes: development, nutrition and reproduction**. London: Chapman e Hall, 1999.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CRICKMORE, N. *et al.* Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 249–254, 1995.

DARBRO, J. M. *et al.* Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, p. 1027-1047, 2011.

DARRIET, F.; DUCHON, S.; HOUGARD, J. M. Spinosad: a new larvicide against insecticide-resistant mosquito larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, p. 495-496, 2005.

DARRIET, F. *et al.* Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 88-95, 2010.

DE BARJAC, H. Un nouveau candidat a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Entomophaga**, v. 23, p. 309-319, 1978.

DELÉCLUSE, A.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: J. F. CHARLES, A. DELÉCLUSE, AND C. NIELSEN-LEROUX. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000. 524 p.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 193-199, 2001.

Department of Medical Entomology. University of Sydney and Westmead Hospital, Australia. Disponível em: <<http://medent.usyd.edu.au/photos>>. Acesso em 15/11/2013.

EDGERLY, J. S.; MARVIER, M. A. To hatch or not to hatch? Egg hatch response to larval density and to larval contact in a treehole mosquito. **Ecological Entomology**, v. 17, p. 28-32, 1992.

EIRAS, A. E. 2001. **Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos vetores de doenças médico-veterinárias**, cap 12. p. 99-122. In E.F. Vilela & M.T.D. Lúcia (eds) Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Editora Holos, 206p.

EL-AW, M. A. M. *et al.* Mortality comparison among spinosad, actara, malathion, and methomyl containing baits against peach fruit fly, *Bactrocera zonata* Saunders (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 4, p. 216-223, 2008.

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Disponível em: <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano_0708/g19_beladona/mec.html>. Acesso em 08/12/2013.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 26, p. 531-535, 1966.

FAY, R. W.; PERRY, A. S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v. 25, p. 276-81, 1965.

FEDERICI, B. A.; BAUER, L. S. Cyt1Aa Protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4368-4371, 1998.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. **Bio/Technology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

FIOCRUZ. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=32&sid=12>>. Acesso em 15/11/2013.

FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Febre Amarela. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 251-257.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962.

_____. Culicini: *Culex*, *Aedes* e *Psorophora*. In: **Entomologia médica**. Volume II. São Paulo: Editora da USP/Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1965.

GADELHA; D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GEETHA, I. *et al.* Oviposition response of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* to the secondary metabolite(s) of the fungus, *Trichoderma viride*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 223-226, 2003.

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The Mode of Action of *Bacillus Thuringiensis* Endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 615-634, 1992.

GOMES, A. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. **Iesus**, v. 7, p. 49-57, 1998.

GOMES, A. S.; SCIAVICO, C. J. S.; EIRAS, A. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 327-332, 2006.

GOPALAKRISHNAN, R. *et al.* Studies on the ovitraps baited with hay and leaf infusions for the surveillance of dengue vector, *Aedes albopictus* in northeastern India. **Tropical Biomedicine**, v. 29, p. 598-604, 2012.

GOVINDARAJAN, M. Evaluation of *Andrographis paniculata* Burm.f. (Family: Acanthaceae) extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say.) and *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 176-181, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; KARUPPANNAN, P. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 24-28, 2011.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 480-496, 1998.

GUERCHICOFF, A.; DELÉCLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1090-1096, 2001.

GUIDI, V. *et al.* Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a swiss wetland reserve after 22 years of mosquito control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3663-3668, 2011.

HALSTEAD, S. B. Dengue Virus – Mosquito interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 273-291, 2008.

HUGHES, P. A. *et al.* Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 34-39, 2005.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. **The IRAC e-classification: an interactive mode of action (MoA) tool.** Disponível em: <<http://www.irac-online.org/eclassification/>>. Acesso em: 23 dez. 2013.

JAHAN, N.; SARWAR, M. S. Field evaluation of lethal ovitraps for the control of dengue vectors in Lahore, Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, p. 305-315, 2013.

KOVENDAN, K. *et al.* Bioefficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Carica papaya* (Caricaceae) leaf extract and bacterial insecticide, spinosad, against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 10, p. 669-678, 2012.

LARA, A. P. S. S. **Expressão heteróloga da toxina Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1919) var. *israelensis* em *Escherichia coli* (Escherich, 1885), visando o controle biológico.** 51 f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

LIMA, M. M.; AMARAL, R. S.; ARAGÃO, M. B. Estudo comparativo da eficácia de armadilhas para *Aedes aegypti*. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 5, p. 143-150, 1989.

LIVDAHL, T. *et al.* S. The Complex repose of *Aedes* eggs to larval density. **Ecological Entomology**, London, v. 9, p. 437-442, 1984.

LOK, C. K. Singapore's dengue haemorrhagic fever control programme: a case study on the successful control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using mainly environmental measures as a part of integrated vector control, 1985.

LOZOVEI, A. L. Culicidae (Mosquitos). In: MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária.** São Paulo: Atheneu; 2011. p. 107-174.

LUZ, C. *et al.* Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 214-215, 2008.

MARINA, C. F. *et al.* Spinosad as an effective larvicide for control of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, vectors of dengue in southern Mexico. **Pest Management Science**, v. 67, p. 114–121, 2011.

MARQUES, C. C. A. *et al.* Estudo comparativo de eficácia de larvitrapas e ovitrapas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 237-241, 1993.

MELO-SANTOS, M. A. V. *et al.* Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, 2001.

MERTZ, P. P.; YAO, R. C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar rum still. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 34-39, 1990.

NARESHKUMAR, A. *et al.* Larvicidal potentiality, longevity and fecundity inhibitory activities of *Bacillus sphaericus* (Bs G3-IV) on vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 44, p. 79-84, 2012.

NAVARRO, D. M. A. F. *et al.* The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 46–50, 2003.

NORMILE, D. Surprising new Dengue Virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, 2013.

NUNES, L. S.; TRINDADE, R. B. R.; SOUTO, R. N. P. Avaliação da atratividade de ovitrampas a *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linneus (Diptera: Culicidae) no bairro Hospitalidade, Santana, Amapá. **Biota Amazônia**, v. 1, p. 26-31, 2011.

ORR, N. *et al.* Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 1-5, 2009.

PARIS, M. *et al.* Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. **Pest Management Science**, v. 67, p. 122-128, 2011.

PARIS, M. *et al.* Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 325-337, 2010.

PEREIRA, S. T. *et al.* Role of egg buster in hatching of *Aedes aegypti*: scanning electron microscopy study. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, p. 68-72, 2006.

PÉREZ, C. M. *et al.* Spinosad, a naturally derived insecticide, for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): efficacy, persistence, and elicited oviposition response. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 631-638, 2007.

PERICH, M. J. *et al.* Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vectors in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 205-210, 2003.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

RAVIKUMAR, S.; ALI, M. S.; BEULA, J. M. Mosquito larvicidal efficacy of seaweed extracts against dengue vector of *Aedes aegypti*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 143–146, 2011.

RÉGIS, L. N. *et al.* Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 377-380, 2001.

RÉGIS, L. N. *et al.* Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian cities. **Plosone**, v. 8, p. 1-12, 2013.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; COLON, N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Journal of American Mosquito Control Association**, v.7, p.52-55, 1991.

REVATHI, K. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 369-376, 2013.

REZENDE, G. L. *et al.* Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Developmental Biology**, v. 8, p. 82-95, 2008.

ROMI, R. *et al.* Laboratory evaluation of the bioinsecticide spinosad for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 93-96, 2006.

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

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

SANTOS, E. *et al.* Oviposition activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in response to different organic infusions. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 299-302, 2010.

SANTOS, N. D. L. *et al.* Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **Plosone**, v. 7, p. 1-8, 2012.

SANTOS, S. R. A. *et al.* Field evaluation of ovitraps consociated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to determine oviposition rates of *Aedes aegypti*. **Dengue Bulletin**, v. 27, p. 156-162, 2003.

SCHAPER, S.; HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA, F. Scanning electron microscopy of the four larval instars of the Dengue fever vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 54, p. 847-852, 2006.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 349-355, 1999.

SIVAGNANAME, N. *et al.* Oviposition attractancy of an infusion from a wood inhabiting fungus for vector mosquitoes. **International Journal of Medical Research**, v. 114, p. 18-24, 2001.

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

SUBRAMANYAM, B. *et al.* Evaluation of spinosad as a grain protectant on three Kansas farms. **Crop Protection**, v. 26, p. 1021-1030, 2007.

TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 131-157, 1999.

THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science**, v. 56, p. 696-702, 2000.

URBANSKI, J. M. *et al.* The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 277, p. 2683–2692, 2010.

WILLIAMS, T.; VALLE, J.; VIÑUELA, E. Is the naturally-derived insecticide Spinosad compatible with insect natural enemies? **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, p. 459–475, 2003.

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o efeito de diferentes formulações e concentrações do larvicida spinosad sobre a atratividade, persistência e viabilidade dos ovos de *A. aegypti* em ovitrampas, comparando-o com o larvicida Bti.

Objetivos específicos:

1- Avaliar a seleção de ovitrampas contendo diferentes concentrações e formulações de spinosad como sítio de oviposição por fêmeas de *A. aegypti* em situação de campo.

Hipótese: Considerando a possibilidade de que fêmeas de mosquitos podem escolher habitats larvais que não apresentem perigo para a espécie, espera-se maior taxa de positividade e postura em ovitrampas com concentrações mais baixas do larvicida.

2 - Avaliar a eficácia e a persistência do larvicida spinosad nas formulações líquida e sólida na população de *A. aegypti* em Recife.

Hipótese: Considerando-se que a pastilha apresenta maior concentração e liberação lenta do ingrediente ativo, além de possuir maior estabilidade, espera-se que o efeito larvicida e residual sejam mais intenso e prolongado na formulação pastilha do que na formulação líquida.

3 - Avaliar o potencial do spinosad como possível alternativa ao Bti, comparando-se a preferência de ovitrampas como sítio de oviposição e a capacidade larvicida.

Hipótese: Dados da literatura têm indicado que, em populações de outras regiões do mundo, os dois larvicidas atuam de modo similar sobre *A. aegypti*. Desse modo, espera-se que o mesmo aconteça à população de Recife, de modo que o spinosad possa ser indicado como mais uma alternativa nos métodos de controle do inseto.

4 – Avaliar o efeito da formulação com maior atividade larvicida sobre a viabilidade dos ovos.

Hipótese: Espera-se que a formulação com maior atividade larvicida possua potencial mais elevado para inviabilizar o desenvolvimento embrionário.

Os dados referentes ao efeito larvicida e de inibição da eclosão da formulação pastilha do spinosad estão apresentados no manuscrito a seguir com previsão de submissão à revista *Parasites & Vectors*, após as revisões sugeridas pela banca. A apresentação segue os padrões de formatação e organização solicitados pela mesma. A seguir são descritos a metodologia e os resultados obtidos nos experimentos com a formulação líquida do spinosad.

**Elevada efetividade de spinosad em pastilha para monitoramento de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) em armadilhas de oviposição**

Cristina Maria de Menezes Torres^{1,3*} (crismmt@msn.com), Maria Alice Varjal de Melo Santos² (mavarjal@cpqam.fiocruz.br), Cláudia Maria Fontes de Oliveira² (claudia@cpqam.fiocruz.br), Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque³ (Cleide.ufpe@gmail.com)

¹Mestrado em Biologia Animal, Departamento de Zoologia/UFPE. Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Recife PE, Brazil.

²Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife PE, Brazil.

³Laboratório de Invertebrados Terrestres, Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife PE, Brazil.

*Autor para correspondência

RESUMO

Introdução

Na ausência de fármacos ou vacina específicos, o controle do mosquito *Aedes aegypti* é o principal meio de prevenir a transmissão da dengue e impedir a ocorrência de epidemias. O uso de inseticidas químicos tem levado ao aparecimento de populações resistentes, sendo recomendado o uso de inseticidas biológicos a base de bactérias entomopatogênicas para o controle desta espécie, visto que, além de efetivos, apresentam elevada seletividade e baixa toxicidade para organismos não-alvo. Nesse trabalho, avaliou-se em campo o desempenho do larvicida spinosad em pastilha, como alternativa para o monitoramento deste mosquito usando-se ovitrampas. Além disso, foram avaliados a influência do spinosad sobre a escolha da armadilha como sítio de oviposição e o potencial de inibição de eclosão de larvas.

Metodologia

A ação larvicida e a persistência da pastilha de spinosad (Natular® DT) em três diferentes concentrações (0,87 g/L, 0,43g/L e 0,21g/L) foram avaliadas tendo como parâmetro o biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) na concentração de 4mg/L (VectoBac®WG). Em campo, 150 ovitrampas foram instaladas e vistoriadas semanalmente para registro da presença de larvas e pupas. A positividade e a densidade de ovos postos nas ovitrampas foram consideradas para avaliar a influência do spinosad sobre a escolha da armadilha como sítio de oviposição. O percentual de ovos intactos e murchos foi considerado na avaliação da taxa de inibição de eclosão.

Resultados

O spinosad pastilha apresentou um período de controle total de larvas que variou de 8 a 17 semanas em função da condição de exposição das ovitrampas ao sol. A atividade de controle do Bti em condições similares foi de duas semanas. Um elevado percentual de colonização (>90%) das armadilhas e de densidade de ovos foi registrado, indicando a inexistência de efeito repelente para as concentrações do spinosad avaliadas neste estudo. Não foi observado efeito do larvicida sobre a eclosão das larvas em ovitrampas, mesmo nas altas concentrações testadas.

Conclusões

Esses dados proveem evidências de que o spinosad não interfere na escolha da ovitrampa pelas fêmeas de *Aedes* sp. e apresenta uma elevada atividade larvicida e prolongada persistência, mesmo sob condições adversas de exposição solar. Além disso, o produto não influencia na eclosão das larvas quando utilizado em ovitrampas.

Palavras-chave: *Saccharopolyspora spinosa*; controle biológico; mosquito.

ABSTRACT

Background

In the absence of specific drugs or vaccine, control of the mosquito *Aedes aegypti* is the primary way of restraining dengue transmission and preventing epidemics. However, the intensive use of chemical insecticides has resulted in the emergence of resistant mosquito populations, leading to the recommendation of using bioinsecticides based on entomopathogenic bacteria for this species control. Besides being effective, bioinsecticides have high selectivity and low toxicity to non-target organisms. In this study, we evaluated the field performance of the tablet formulation of the biolarvicidaspinosad as an alternative for monitoring these mosquitoes using ovitraps. In addition, the effect of spinosad on the ovitrap selection as the oviposition site and the inhibition of hatchability in eggs were also investigated.

Methods

The larvicidal activity and persistence of spinosad tablet (Natular[®] DT) were assessed at three different concentrations (0,87 g/L, 0,43g/L e 0,21g/L) using the biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (VectoBac[®]WG) at 4mg/L concentration as a comparative parameter. In the field, 150 ovitraps were installed and surveyed weekly for pupae and larvae records. The influence of spinosad on trap selection as oviposition site was measured by presence and density of the eggs. The percentage of intact and withered eggs were considered in the hatchability evaluation.

Results

Spinosad tablet provided 8 to 17 weeks of complete control of *A. aegypti* larvae, depending on the level of ovitraps exposure to sunlight. In similar conditions, Bti provided two weeks of complete control. A high percentage of ovitraps colonization (> 90%) and egg density was recorded, indicating no repellent effect of the spinosad tablet. No effect of spinosad on hatchability was observed in ovitraps, even at high concentrations.

Conclusions

These data provides evidence that spinosad does not interfere in the ovitrap selection as an oviposition site by the *Aedes* sp. females and shows a high larvicidal activity and prolonged persistence even under adverse conditions of sunlight exposure. The product does not influence the larvae hatchability when applied in ovitraps.

Key words: *Saccharopolyspora spinosa*; biological control; mosquito.

Introdução

Aedes aegypti é o principal vetor do vírus da dengue, estando também envolvido no ciclo de transmissão urbana da febre amarela na África e na América do Sul [1,2]. A dengue é um grave problema de saúde pública que ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde vivem cerca de 2,5 bilhões de pessoas [3,4]. Estima-se que ocorram aproximadamente 50 a 100 milhões de casos de dengue e mais de 20.000 mortes por dengue hemorrágica no mundo [5].

Na ausência de fármacos ou vacina específicos, o controle do mosquito é o principal meio de prevenir a transmissão da doença e impedir a ocorrência de epidemias [4].

No Brasil, a utilização de inseticidas químicos, além do manejo ambiental, permanece como a principal ação para controle de *A. aegypti* no âmbito do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), iniciado em 1996 [6,7]. O organofosforado temephos foi amplamente utilizado como larvicida no período de 1996 a 2011, levando ao aparecimento de populações de *A. aegypti* com diferentes níveis de resistência a esse composto [6,8,9]. Biolarvicidas baseados em bactérias entomopatogênicas como *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (Bti) têm sido utilizados com sucesso para o controle de espécies de *Aedes* em diversos países e para o manejo de resistência ao temephos em populações brasileiras de *A. aegypti* [7,10-13]. Alguns estudos referem à possibilidade de desenvolvimento de resistência às toxinas isoladas do Bti em condições de laboratório [14-16]. Entretanto, até o momento, nenhum registro de resistência ao conjunto de toxinas nativas desta bactéria foi referido em campo, mesmo em áreas onde seu uso se estende por mais de 10 anos [7,17]. Além disso, nenhuma formulação comercial do produto apresenta toxinas isoladas do Bti.

Entre as alternativas para o controle de espécies de mosquitos, inclusive *A. aegypti*, está o larvicida biológico spinosad, um metabólito secundário da fermentação aeróbica da bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa*, composto por duas neurotoxinas tetracíclicas (Spinosinas A e D) [18-21]. Os alvos deste composto são os receptores GABA e de acetilcolina, cujo mecanismo de ação leva à excitação do sistema nervoso, seguido de paralisia e morte das larvas [22-25]. Esse biolarvicida, que atua por ingestão ou contato, tem sido amplamente utilizado na agricultura para o controle de diversas espécies de pragas das ordens Diptera, Lepidoptera, Thysanoptera e Coleoptera [26-28]. A baixa toxicidade para humanos e outros organismos não alvo [21,29], além da ausência de resistência cruzada com outros inseticidas [19], tem favorecido o uso do spinosad naquele contexto e mais recentemente para o controle de mosquitos [21,30-32].

Embora o biolarvicida spinosad seja encontrado em formulações líquida (emulsão concentrada) e sólidas (pó, grânulo e pastilha) [33], a maioria dos estudos que avaliou seu efeito larvicida para *A. aegypti* utilizou a formulação líquida [21,32,34]. Entre os aspectos que desfavorecem este tipo de formulação de biolarvicidas, como o Bti e o spinosad, estão a baixa estabilidade no ambiente e a rápida degradação de seus componentes tóxicos pela exposição à radiação solar [35-37]. Formulações sólidas de um modo geral são mais estáveis, e algumas delas apresentam, ainda, a característica de liberar lentamente o princípio ativo, aspecto que tende a prolongar o efeito larvicida residual no ambiente, favorecendo o maior contato do organismo-alvo com as partículas tóxicas do produto [38].

O tempo de exposição ao produto em elevadas concentrações tem sido considerado determinante para o efeito larvicida prolongado e especulado, por alguns autores, como uma variável que também pode influenciar o efeito sobre a eclosão das larvas de *A. aegypti* pelo spinosad [20,21,37,39]. A possibilidade de empregar um produto com dupla atividade, larvicida e ovicida, se reveste de grande importância para o controle de algumas espécies de *Aedes* que apresentam a quiescência como características de sobrevivência e dispersão passiva, consideradas elementos que dificultam a efetividade das medidas de controle.

Assim, para avaliar o desempenho do spinosad em armadilhas de oviposição para *A. aegypti*, o presente trabalho se propôs a responder as seguintes questões: (1) O uso de elevadas concentrações do spinosad afeta a escolha do sítio de oviposição por fêmeas de *A. aegypti*? (2) Qual a melhor relação entre a concentração do spinosad e a persistência de sua atividade larvicida? (3) O spinosad atua regulando a eclosão de larvas de *A. aegypti*?

Metodologia

Local e período de estudo

Os testes de campo ocorreram entre os meses de janeiro e outubro de 2013, na cidade de Recife, Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Os experimentos foram realizados no *Campus* da Universidade Federal de Pernambuco - 8° 3' 7" S e 34° 56' 59" W, com 411.971 m². Esta área é considerada um ponto estratégico no âmbito do PNCD, devido ao elevado índice de infestação por *Aedes* sp. e o grande número de pessoas (cerca de 35.000) que circulam diariamente pelo *Campus*, aspectos que podem favorecer a transmissão do vírus Dengue. O índice de infestação medido através do número de armadilhas positivas para ovos de *A. aegypti* nesta área foi estimado em 97,5% em dezembro/2012, no início dos

experimentos, utilizando-se armadilhas contendo somente água ou o larvicida spinosad na formulação líquida.

Modelo de armadilha e larvicidas biológicos

Armadilhas de oviposição do tipo ovitrampas (Ovt) foram construídas a partir de garrafas pet (2L), cortadas e pintadas de preto, adaptadas a partir do modelo descrito em Santos *et al.* [40]. Em seu interior uma palheta de Eucatex (5x12cm), fixada verticalmente, serviu como substrato de postura para *Aedes* sp. Estas armadilhas continham 1,5 L de água potável tratado com o spinosad em pastilha, Natular[®] DT, contendo 7,48% de spinosinas, nas seguintes concentrações: 0,87 g/L (1 pastilha), 0,43g/L (1/2 pastilha) ou 0,21g/L (1/4 pastilha), gentilmente cedido pela Clarke Mosquito Control Products. Aproximadamente 4,0 mg/L de VectoBac[®]WG, granulado contendo 37,4% de Bti, foi utilizado neste estudo como controle positivo nas ovitrampas.

Desenho Experimental

150 armadilhas foram instaladas em locais completamente protegidos do sol e da chuva (corredores e escadas) ou em jardins, em locais parcialmente expostos às intempéries ambientais. A partir desse ponto essas áreas serão referidas como ensolaradas e sombreadas. Grupos de 30 armadilhas para cada condição experimental, cada uma representando uma única réplica, foram utilizados nos testes com os diferentes produtos e concentrações.

Efeito de diferentes concentrações do spinosad pastilha sobre a seleção do sítio de oviposição

A positividade e a densidade de ovos nas ovitrampas foram os parâmetros usados para avaliar a influência das diferentes concentrações do spinosad sobre a escolha da armadilha como sítio de oviposição. Para análise foram considerados os ovos recolhidos nos primeiros 15 dias após a aplicação dos produtos. Os resultados foram comparados com os obtidos nas armadilhas controle, contendo apenas água, cujas larvas foram retiradas das ovitrampas semanalmente.

Persistência de controle

A atividade larvicida residual relativa dos produtos foi acompanhada até quando o mesmo promoveu mais de 80% de inibição da emergência (%IE) dos indivíduos expostos [31]. As ovitrampas foram monitoradas em intervalos semanais, considerando o processo de colonização natural da área. A partir da detecção das primeiras L3 a vistoria das armadilhas passou a ser feita a cada dois dias para a contagem e o recolhimento dos sobreviventes nas fases de L4 e pupa, envio para laboratório, acompanhamento até a emergência dos mosquitos e estimativa do percentual acumulado de mortalidade. O volume perdido por evaporação foi repostado semanalmente.

Durante o período do experimento, a temperatura média e o índice pluviométrico registrados na área de estudo variaram de $28,4^{\circ} \text{C} \pm 2,6^{\circ} \text{C}$ e $245,8 \pm 53,4 \text{ mm}$, respectivamente.

Efeito do spinosad sobre a eclosão dos ovos

Os ovos presentes nas palhetas foram analisados em estereomicroscópio quanto à sua apresentação e classificados como: íntegros (fechados com aspecto normal); abertos (com opérculo aberto) ou murchos (enrugados e/ou desidratados). A inibição da eclosão das larvas foi calculada a partir do percentual de ovos íntegros e murchos e classificada como: baixa, moderada ou alta quando a quantidade de ovos nestas condições foi, respectivamente, 30%, 50% e 80% acima do registrado no grupo controle.

Para avaliar se os ovos aparentemente íntegros permaneciam com potencial de eclosão após o período de permanência em campo, 1500 unidades para cada grupo exposto ao spinosad e o controle foram analisadas em laboratório. Esses ovos foram cuidadosamente removidos das palhetas e colocados em contato com a água, por sete dias consecutivos. As larvas que eclodiram foram observadas por 48 horas para a determinação da taxa de sobrevivência após eclosão.

Além disso, foram conduzidos também em laboratório experimentos para verificar se os efeitos do spinosad ocorreriam no início do desenvolvimento do embrião ou após a sua formação. Grupos de 50 ovos com um dia e 7 a 15 dias originados da geração F1 da população de campo foram expostos às diferentes concentrações do larvicida por 24h, 48h e 72h. Após cada período, os ovos foram mergulhados em água declorificada por um período de sete dias e a taxa de eclosão registrada.

Análises Estatísticas

Comparações do número de ovos/tratamento visando determinar a influência das diferentes concentrações do spinosad sobre a escolha da armadilha como sítio de oviposição foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) após transformação dos dados em \sqrt{x} . A persistência do larvicida foi estimada a partir do cálculo da inibição de emergência de adultos, baseado em Darriet *et al.* [31], seguindo-se a fórmula:

$$\% \text{ IE} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Onde C representa a percentagem de sobrevivência média de L4 velhas e pupas no grupo controle, em um determinado momento, e T a percentagem média nos recipientes tratados no mesmo período.

Resultados

Seleção de ovitrampas contendo diferentes concentrações do spinosad pastilha como sítio de postura

Mais de 90% das ovitrampas contendo spinosad 0,87g/L, 0,43g/L ou 0,21g/L estavam positivas para presença de ovos, após 15 dias em campo. No mesmo período, a densidade de ovos não foi significativamente diferente entre as condições avaliadas, indicando que não houve efeito repelente associado ao spinosad em nenhuma das concentrações avaliadas nesse trabalho ($p > 0,05$) (Figura 1). De um modo geral, as ovitrampas contendo spinosad registraram 19% mais ovos quando comparadas ao controle, entretanto esta diferença não foi significativa.

A figura 2 apresenta a média de ovos nas ovitrampas contendo somente água e 0,43g/L da pastilha de spinosad, mostrando que houve uma pressão de colonização das armadilhas durante todo o período do experimento.

Efeito larvicida residual do spinosad

Spinosad na formulação pastilha, nas três concentrações avaliadas, apresentou efeito larvicida residual $\geq 80\%$ por 17 a 31 semanas, dependendo do local de instalação das

ovitrampas (áreas ensolaradas ou sombreadas) (Figura 3). As concentrações de 0,21g/L, 0,43g/L e 0,87g/L em armadilhas em ambientes sombreados proveram 9, 15 e 17 semanas de controle total, respectivamente. Em áreas ensolaradas, a persistência do produto foi menor, sendo a maior diferença de tempo de cobertura observada para 0,43g/L (Tabela 1).

Das armadilhas que ficaram positivas para larvas vivas até a 21ª semana (n=32), cerca de 90% delas estavam em áreas ensolaradas, enquanto para o total de armadilhas positivas para larvas vivas (n=66), apenas 28,8% delas estavam em áreas sombreadas, independente da concentração testada. O número médio de larvas/pupas registradas, por ovitrampa, nas armadilhas tratadas com spinosad foi de 43,0±4,2 para 0,87g/L; 76,1±4,7 para 0,43g/L; e na concentração de 0,21g/L a sobrevivência foi de 63,7±4,4 por ovitrampa (Tabela 2) ao final do experimento.

O Bti permaneceu eliminando 100% das larvas durante as duas primeiras semanas. A partir desse período, registrou-se um percentual de IE de 95%, 89% e 83% por mais três semanas consecutivas. Durante as cinco semanas de persistência do VectoBacWG® a pressão de colonização das 30 armadilhas foi, em média, de 140,30±84,29 ovos/ovitrampa, tendo sido registradas 119,8±9,6 larvas + pupas/ovitrampa (Tabela 1).

Efeito do spinosad em pastilha sobre a eclosão de larvas

Em campo, o percentual de eclosão das larvas registrado no grupo controle foi de 39,4% e no grupo tratado em média 15%, independente da concentração. Em laboratório os ovos íntegros e sem sinais de alteração morfológica resultaram na eclosão de 54,6%, 64,6% e 64,0% de larvas, para 0,21g/L, 0,43g/L e 0,87g/L, respectivamente. No grupo controle, este percentual foi de 70,6%. Dessa forma, não houve influência do spinosad na taxa de eclosão das larvas. No entanto, as larvas que eclodiram destes ovos apresentaram taxa de mortalidade de cerca de 30%, após 48 h de observação (Tabela 3).

Em laboratório, para os ovos colocados em contato direto com o spinosad, o percentual de eclosão nos grupos tratados foi aproximadamente 25% menor do que no grupo controle, confirmando a ausência de efeito ovicida (Tabela 4). Neste experimento, nem a idade do ovo (1 dia ou 7-14 dias) nem o tempo de exposição (24h, 48,72 horas) ao produto nas diferentes concentrações influenciaram a taxa de inibição de eclosão.

Discussão

O presente trabalho relata a longa persistência da ação larvicida do produto Natular® DT contra *Aedes aegypti* em armadilhas de oviposição, para monitoramento populacional em áreas urbanas. A utilização de concentrações do spinosad muito superiores às aquelas recomendadas para tratamento de reservatórios de água potável (0,1mg/L) [31] não influenciou negativamente a atratividade das armadilhas como sítio de oviposição para esse mosquito. Além disso, todas as concentrações se mostraram altamente eficazes na prevenção do desenvolvimento de larvas.

A atividade larvicida residual do produto garantiu a permanência da ovitrampa em campo com ausência completa de larvas vivas por oito a 17 semanas, após um único tratamento, dependendo da concentração do produto e do local de instalação da armadilha.

Quando instaladas em ambientes sombreados, a concentração de 0,43g/L da formulação pastilha do spinosad resultou no controle de 100% das larvas por 15 semanas, tempo similar à da maior concentração avaliada (0,87g/L), 17 semanas. Assim, em locais sombreados, a utilização dessa concentração da pastilha seria a mais adequada. Nas situações em que não seja possível a instalação das ovitrampas em áreas sombreadas, a concentração mais indicada seria a de 0,87g/L, uma vez que em locais ensolarados essa concentração apresentou uma persistência mais prolongada (14 semanas) comparada às demais (oito semanas). O efeito da exposição à luminosidade foi evidente também no que se relaciona à persistência do produto, que apresentou eficácia mínima ($IE \geq 80\%$) de até 18 semanas quando as armadilhas foram instaladas em jardins, e até 31 semanas quando deixadas em ambientes sombreados.

A radiação solar tem sido referida como um fator adverso à persistência do spinosad sob a formulação líquida [21,35,37]. No México, usando uma emulsão concentrada de 10mg/L de spinosad em ovitrampas instaladas em cemitério, Pérez *et al.* [37] relataram perda de 99,7% da toxicidade do spinosad quando exposto diretamente à luz solar por 20 dias, enquanto recipientes que permaneceram em local sombreado apresentaram perda de 92% da toxicidade após 90 dias. Esses dados são reforçados pelas observações de Cleveland *et al.* [35], que registraram rápida fotodegradação das spinosinas em ambiente aquático, com meia-vida de <1 até 2 dias. Segundo esses últimos autores, a fotólise seria a principal via de degradação das spinosinas em sistemas aquáticos. Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram essas observações, entretanto, este efeito foi minimizado possivelmente em função da maior estabilidade da formulação sólida, em pastilha e sua característica de

liberação mais lenta das spinosinas. Esta situação é confirmada quando estes resultados são comparados aos observados à sombra, uma vez que a formulação em pastilha apresenta um menor percentual de ingrediente ativo comparada às formulações líquidas a base de spinosinas [33]. Assim, o uso da pastilha em ovitrampas implicaria na redução do esforço ligado à aplicação e transporte do produto em campo, bem como na diminuição da frequência de vistoria das armadilhas pelos agentes de saúde, aspectos que poderão gerar ganhos operacionais.

Em nosso estudo, o Bti em grânulos persistiu eliminando mais de 80% das larvas por um período superior a 30 dias. Este intervalo é preconizado para um novo tratamento com Bti nas ovitrampas utilizadas para o monitoramento de *A. aegypti*, em pontos estratégicos no Recife/PE, Brasil [41]. O efeito larvicida residual do spinosad para 100% dos indivíduos expostos foi de no mínimo dois meses na menor concentração, mesmo sob condições adversas, revelando seu elevado potencial para uso em ovitrampas. No México, durante a estação seca, Marina *et al.* [21], avaliando o desempenho do spinosad e do Bti (VectoBac 12AS[®]; Valent Biosciences Corp.), ambos sob formulação líquida, também em armadilhas de oviposição, verificaram persistências que variaram de cinco a 13 semanas para concentrações de 1 mg/L e 5mg/L do spinosad e de apenas uma semana para o Bti, testado na concentração de 13µl/L. Naquele estudo as dosagens de spinosad foram cerca de 80 a 400 vezes maiores do que a do Bti, sendo a concentração de spinosinas 17 vezes maior do que as de toxinas do Bti. Em nosso estudo, as dosagens do spinosad variaram de aproximadamente 50 a 200 vezes, embora a formulação em grânulos do Bti (VectoBac[®]WG) apresente cinco vezes mais princípio ativo do que a pastilha do spinosad. Estes dados sugerem que as formulações sólidas tendem a melhorar o desempenho destes agentes bacterianos de controle em campo.

Mesmo utilizando concentrações elevadas de spinosinas nas armadilhas, os resultados obtidos em nosso estudo não confirmaram a existência de atividade ovicida para o produto, visto que a taxa de eclosão nos grupos tratados foi similar ao do grupo controle. Estes resultados corroboram com os encontrados por Pérez *et al.* [37] para o spinosad líquido, também utilizado em elevadas concentrações (5 e 20 mg/L). Argueta *et al.* [39] referem uma baixa atividade ovicida para a formulação líquida (Tracer 480SC) cujo percentual médio de inibição da eclosão em ovos de *A. aegypti* variou de 6,8% com 1 mg/L a 8,2% com 10 mg/L do produto.

Em nosso estudo, mesmo quando os ovos de *A. aegypti*, em diferentes fases do desenvolvimento embrionário, permaneceram totalmente mergulhados em água contendo o produto, não foi confirmado o efeito ovicida. Apesar disso, cerca de 30% de mortalidade foi

observada para as larvas que eclodiram dos ovos expostos ao spinosad nas ovitrampas, sugerindo a presença de resíduos do larvicida impregnados na superfície dos ovos, em quantidade capaz de promover mortalidade adicional. Esta característica não havia sido referida para o spinosad até o momento.

Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que o spinosad não apresenta atividade repelente em armadilhas de oviposição para *Aedes aegypti*, mesmo em altas concentrações, tendo a vantagem de ampliar a ação larvicida residual do produto, particularmente em armadilhas instaladas em ambientes sombreados. Nessa condição, o controle total de larvas pode atingir até 17 semanas. Sugere-se que o spinosad pastilha, particularmente na concentração de 0,43 g/L, pode ser adotado por programas de controle de vetores para uso em ovitrampas, visto que possui elevado potencial larvicida e vantagens operacionais relativas à facilidade de aplicação e prolongada persistência. O Spinosad apesar de não apresentar efeito ovicida, em concentrações muito elevadas pode ser capaz de impregnar-se à superfície de ovos, causando um efeito larvicida adicional. Outras vantagens atribuídas ao spinosad, como a baixa toxicidade para organismos não-alvo [29] e o mecanismo de ação diferente dos larvicidas químicos, fazem deste um produto ambientalmente mais seguro, com elevado potencial para uso no controle populacional de espécies de culicídeos e um candidato ao manejo de populações resistentes a inseticidas químicos.

RESULTADOS NÃO DESCRITOS NO ARTIGO CIENTÍFICO

Metodologia

Os experimentos com a formulação líquida do spinosad seguiram metodologia similar à descrita para a formulação pastilha. Foram avaliadas duas concentrações desta formulação: 6,3nL/L e 18,9nL/L (Natular® EC; 20,62% de spinosinas).

Resultados e Discussão

Taxa de oviposição de *Aedes sp.* em ovitrampas contendo spinosad líquido

Assim como em ovitrampas contendo spinosad pastilha, não foi verificado efeito repelente decorrente da presença de spinosad líquido nas ovitrampas avaliadas nesse estudo. A maioria das armadilhas (> 90%) contendo o biolarvicida apresentava ovos de *Aedes sp.*, com densidade similar para as duas concentrações avaliadas 6,3nL/L e 18,9nL/L. As médias registradas foram de $149,0 \pm 17,9$ e $180,4 \pm 18,4$ ovos/armadilha para as concentrações de 6,3nL/L e 18,9nL/L, respectivamente (Figura 4).

Outros estudos têm registrado ausência de efeito repelente para a formulação líquida do spinosad. Perez *et al.* (2007) verificaram taxas de oviposição similares em recipientes contendo água ou spinosad líquido em concentrações de 5 e 20 mg/L, muito superiores às utilizadas em nosso estudo. Resultados similares foram encontrados no México usando-se concentrações de 1 e 5mg/L em ovitrampas (Marina et al., 2011) ou pneus (Marina et al., 2012). O conhecimento da influência da presença de um larvicida em ovitrampas, sobre a escolha da armadilha como sítio de oviposição pela fêmea é fundamental antes de adotar seu uso em programas de controle.

Efeito larvicida residual do spinosad líquido

O spinosad líquido apresentou efeito residual $\geq 80\%$ por duas semanas, independente da concentração. Foram observadas larvas vivas nas armadilhas desde a primeira semana do experimento. Durante as duas semanas de persistência do spinosad, a média de larvas por ovitrampa foi de $27,0 \pm 8,4$ e $23,1 \pm 7,9$ para as concentrações de 6,3nL/L e 18,9nL/L, respectivamente. Não foi observado efeito do local de instalação (jardins ou corredores) no período de persistência do spinosad nesta formulação.

Outros estudos utilizando a formulação líquida relatam períodos mais prolongados de controle do que o observado em nosso trabalho. Em três estudos utilizando spinosad nas concentrações de 1 e 5mg/L, foram registrados períodos de controle total variando de cinco a 13 semanas (PÉREZ et al., 2007; MARINA et al., 2011, 2012). No entanto, as concentrações utilizadas foram maiores do que as usadas em nosso estudo.

Referências

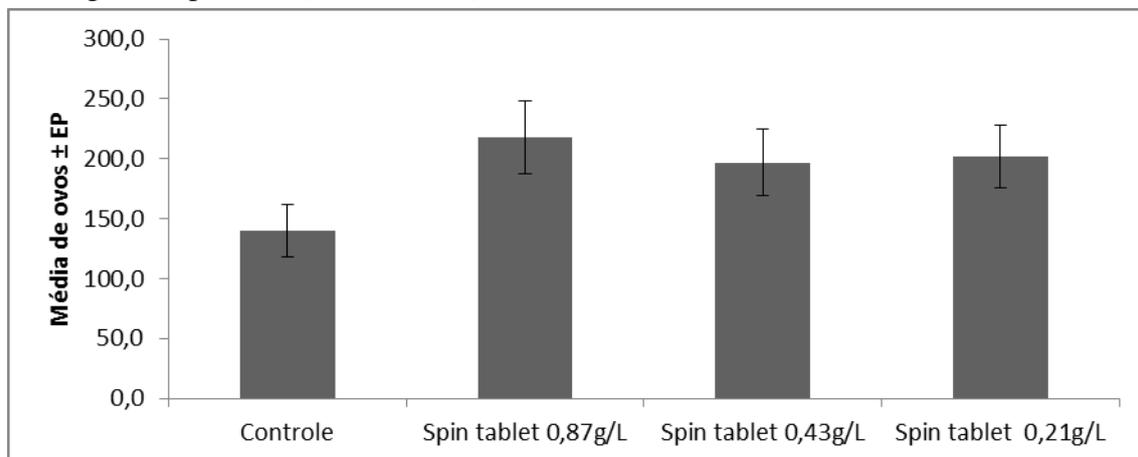
1. Forattini OP: **Culicini: Culex, Aedes e Psorophora**. In: *Entomologia médica*. Volume 2. 1st edition. São Paulo: USP/Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1965.
2. Foster WA, Walker ED: **Mosquitoes (Culicidae)**. In: *Medical and Veterinary Entomology*. 2nd edition. Edited by Mullen GR, Durden LA. London: Academic Press, 2009.
3. Gubler DJ: **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. *Clin. Microbiol. Rev* 1998, **11**: 480-496.
4. WHO: *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
5. Dengue and severe dengue [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>]
6. Braga, IA, Valle D. **Aedes aegypti: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil**. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2007, **16**: 295-302.
7. Araújo AP, Diniz DFA, Helvécio E, Barros R A, Oliveira CMF, Ayres CFJ, Melo-Santos MAV, Regis, L, Silva-Filha MH: **The susceptibility of Aedes aegypti populations displaying temephos resistance to Bacillus thuringiensis israelensis: a basis for management**. *Parasit Vectors* 2013, **6**: 297.
8. Lima JBP, Da Cunha MP, Silva Jr RC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D: **Resistance of Aedes aegypti to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil**. *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**: 329-333.
9. Braga IA, Lima, JBP, Soares SS, Valle D: **Aedes aegypti resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**: 199-203.
10. Lacey LA: **Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control**. *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**:133-163.
11. Mulla MS, Darwazeh HÁ: **Efficacy of formulations of Bacillus thuringiensis H-14 against mosquito larvae**. *Bull Soc Vect Ecol* 1985, **10**:14-19.
12. Benjamim S, Rath A, Fook CY, Lim LH. **Efficacy of a Bacillus thuringiensis israelensis tablet formulation, vectobac DT, for control of dengue mosquito vectors in potable water containers**. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005, **36**: 879-892.

13. Regis LN, Acioli RV, Silveira Jr. JC, Melo-Santos MAV, Souza WV, Ribeiro CMN, Silva JCS, Monteiro AMV, Oliveira CMF, Barbosa RMR, Braga C, Rodrigues MAB, Silva NGNM, Ribeiro Jr. PJ, Bonat WH, Medeiros LCC, Carvalho MS, Furtado AF: **Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities.** *PLoS One* 2013, **8**:7.
14. Federici BA, Park, HW, Bideshi DK: **Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control.** *Open Toxinology Journal* 2010, **3**: 83-100.
15. Paris M, Boyer S, Bonin A, Collado A, David JP, Despres L. **Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment.** *Molecular Ecology* 2010, **19**: 325–337.
16. Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David JP. **Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes.** *Pest Manag Sci* 2011; **67**: 122-128.
17. Becker N, Ludwig M. **Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*.** *J Am Mosq Control Assoc* 1993, **9**: 221-4.
18. Cetin H, Yanikoglu A, Cilek JE. **Evaluation of the naturally-derived insecticide spinosad against *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) larvae in septic tank water in Antalya, Turkey.** *Journal of Vector Ecology* 2005, **30**: 151-154.
19. Darriet, F, Duchon S, Hougard JM: **Spinosad: a new larvicide against insecticide-resistant mosquito larvae.** *J Am Mosq Control Assoc* 2005, **21**: 495-496.
20. Romi R, Proietti S, Di Luca M, Cristofaro M: **Laboratory evaluation of the bioinsecticide spinosad for mosquito control.** *J Am Mosq Control Assoc* 2006, **22**: 93-96.
21. Marina CF, Bond JG, Casas M, Muñoz J, Orozco A, Valle J, Williams T: **Spinosad as an effective larvicide for control of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, vectors of dengue in southern Mexico.** *Pest Man Sci* 2011, **67**: 114-121.
22. Salgado VL: **Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates.** *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1998, **60**: 91-102.
23. Thompson GD, Dutton R, Sparks TC. **Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme.** *Pest Manag Sci* 2000, **56**: 696-702.

24. Watson GB. **Actions of Insecticidal Spinosyns on g-Aminobutyric Acid Responses from Small-Diameter Cockroach Neurons.** *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2001, **71**: 20-28.
25. Orr N, Shaffner AJ, Richey K, Crouse GD: **Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites.** *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2009, **95**: 1-5.
26. Subramanyam B, Toews MD, Ileleji KE, Maier DE, Thompson GD, Pitts TJ. **Evaluation of spinosad as a grain protectant on three Kansas farms.** *Crop Protection* 2007, **26**: 1021-1030.
27. El-Aw MAM, Draz KAA, Hashem AG, El-Gendy IR. **Mortality comparison among spinosad-, actara-, malathion-, and methomyl-containing baits against peach fruit fly, *Bactrocera zonata saunders* (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions.** *Journal of Applied Sciences Research* 2008, **4**: 216-223.
28. Allal-Benfekih L, Aoudia B, Mostefaoui H, Belguendouz R. **Comparative evaluation of the toxicity of lambda cyhalothrin and spinosad on the insect pests and auxiliary fauna in an orange orchard of the central Mitidja (Blidean Atlas, Algeria).** *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 2013, **7**: 21-26.
29. Williams T, Valle J, Viñuela E: **Is the naturally-derived insecticide Spinosad1 compatible with insect natural enemies?** *Biocontrol Science and Technology* 2003, **13**: 459-475.
30. Thavara U, Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Mulla MS: **Field evaluation in Thailand of spinosad, a larvicide derived from *Saccharopolyspora spinosa* (Actinomycetales) against *Aedes aegypti* (L.) larvae.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009, **40**: 235-242.
31. Darriet F, Marcombe S, Etienne M, Yébakima A, Agnew P, Yp-Tcha MM, Corbel V: **Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies).** *Parasit Vectors* 2010, **3**: 88-95.
32. Marina CF, Bond JG, Muñoz J, Valle J, Chirino N, Williams T: **Spinosad: a biorational mosquito larvicide for use in car tires in southern Mexico.** *Parasit Vectors* 2012, **5**: 95-104.
33. Natular[®]: Naturally derived active ingredient
[<http://www.clarke.com/images/pdf/brochures/natular%20resource%20guide%202012.pdf>
]

34. Bond JG, Marina CF, Williams T. **The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae.** *Medical and Veterinary Entomology* 2004, **18**: 50-56.
35. Cleveland CB, Bormett GA, Saunders DG, Powers FL, Mcgibbon AS, Reeves GL, Rutherford L, Balcer JL: **Environmental Fate of Spinosad. 1. Dissipation and degradation in aqueous systems.** *J Agric Food Chem* 2002, **50**: 3244-3256.
36. Araújo AP, Melo-santos MAV, Carlos SO, Rios EMMM, Régis L. **Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae).** *Biological Control* 2007, **41**: 339-347.
37. Pérez, CM, Marina CF, Bond JG, Rojas JC, Valle J, Williams T: **Spinosad, a Naturally Derived Insecticide, for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Efficacy, Persistence, and Elicited Oviposition Response.** *Journal of Medical Entomology* 2007, **44**: 631-638.
38. Couch TL: **Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria.** In *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. 1st edition. Edited by Charles JF, Delécluse A, Nielsen-LeRoux C. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000: 297-314.
39. Argueta AL, Valle J, Marina CF: **Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** *Revista Colombiana de Entomología* 2011, **37**: 269-272.
40. Santos EM, Melo-Santos MAV, Oliveira CMF, Correia J, Albuquerque, CMR: **Evaluation of a sticky trap (*Aedes*TraP), made from disposable plastic bottles, as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations.** *Parasit Vectors* 2012, **5**: 195.
41. Nunes: comunicação pessoal 2013.

Figura 1. Média (\pm EP) de ovos de *Aedes* sp. coletados em ovitrampas tratadas com 0,87, 0,43 e 0,21g/L de spinosad (Natular[®] DT).



Spin=Spinosad

Figura 2. Média (\pm EP) de ovos de *Aedes* sp. por ovitampa coletados durante o experimento, em ovitampas contendo 0,43g/L da pastilha de spinosad e somente água.

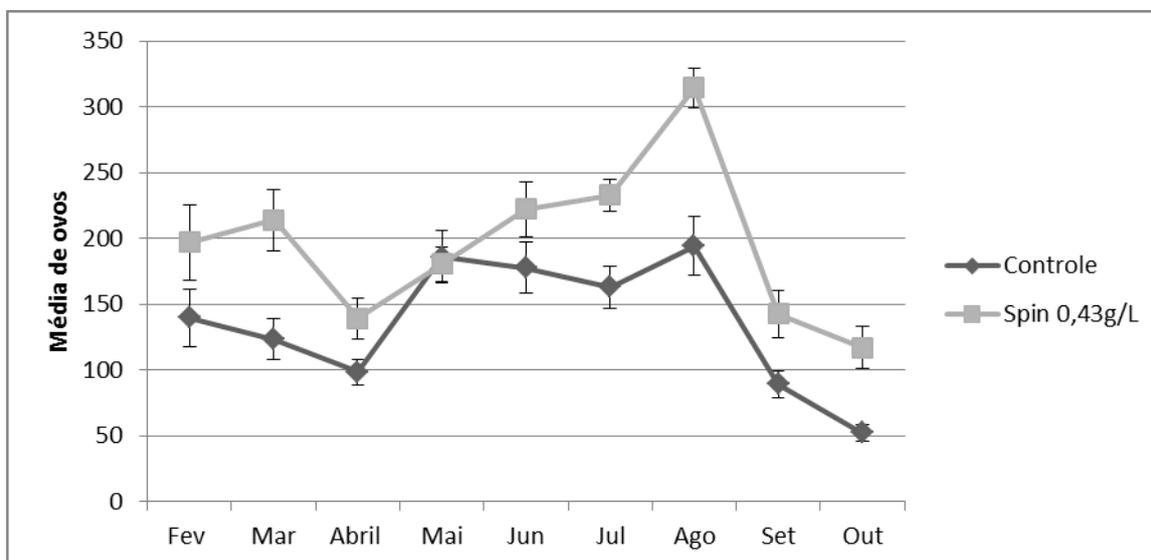


Figura 3. Atividade residual de diferentes concentrações da pastilha de spinosad em armadilhas de oviposição contra *Aedes* sp. instaladas em jardins (A) e corredores (B).

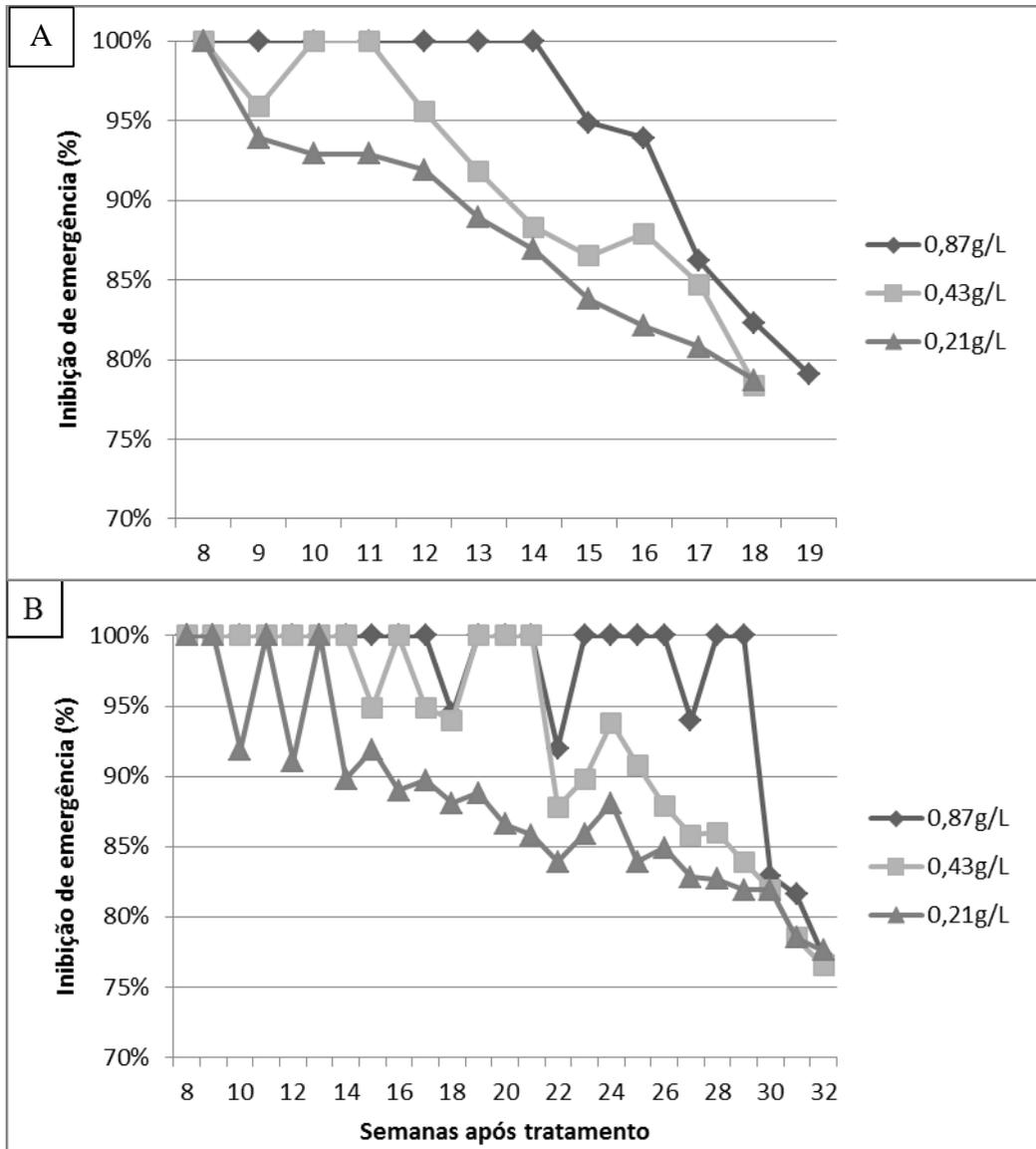


Figura 4. Média (\pm EP) de ovos de *Aedes* sp. em armadilhas de oviposição contendo 6,3nL/L e 18,9nL/L de spinosad líquido.

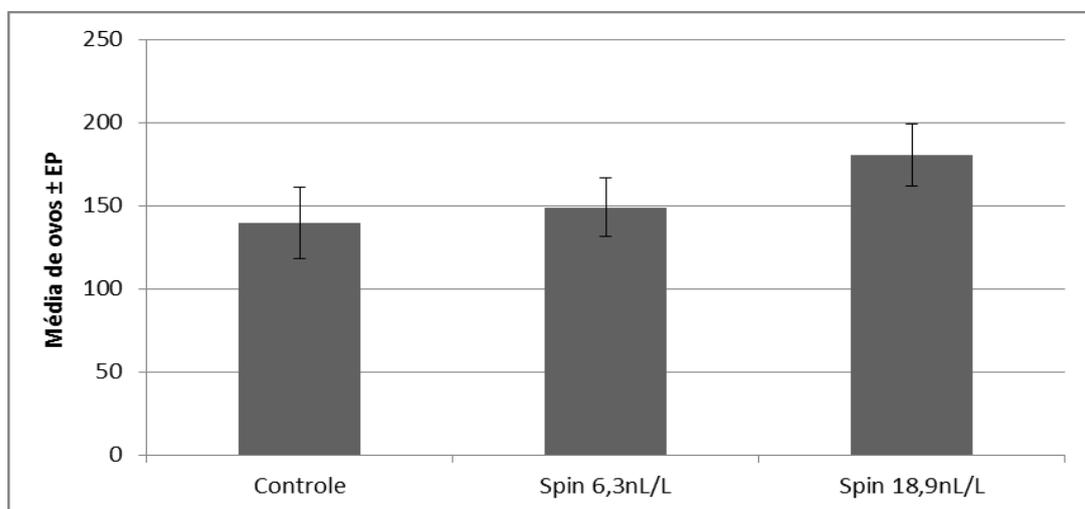


Tabela 1. Períodos (semanas) de controle de 100% e $\geq 80\%$ de larvas de *Aedes* sp. em ovitrampas contendo 0,87g/L, 0,43g/L e 0,21g/L do larvicida spinosad na formulação pastilha instaladas em áreas sombreadas e ensolaradas.

	0,87g/L		0,43g/L		0,21g/L	
	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra
100% de controle	14	17	8	15	8	9
Controle $\geq 80\%$	18	31	17	30	17	30

Tabela 2. Larvas de *Aedes* sp. registradas em ovitrampas tratadas com os larvicidas spinosad e *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti).

Grupo experimental	Controle		Spin pastilha		Bti
Persistência (semanas)	31		31		05
Concentração	NA	0,87g/L	0,43g/L	0,21g/L	4mg/L
Nº total de L4+Pupas	21505	859	1675	1592	3.595
Nº médio de L4+pupas/ovt positiva ±DP	716,8±23,6	43,0±4,2	76,1±4,7	63,7±4,4	119,8±9,6

NA= Não se aplica.

Tabela 3. Mortalidade de larvas de *Aedes* sp. pelo efeito residual do spinosad impregnado em ovos coletados em ovitrampas tratadas com diferentes concentrações da formulação em pastilha.

	Controle	Spinosad		
	NA	0,87g/L	0,43g/L	0,21g/L
% eclosão	70,6%	64,0%	64,6%	54,6%
% mortalidade após 48h	0%	39,6%	24,7%	24,4%

Tabela 4. Percentual médio de larvas de *Aedes aegypti* originadas de ovos com diferentes idades submetidos a diferentes tempos de exposição e concentrações do larvicida spinosad.

		24h	48h	72h	Média
	Controle	74	62	77,4	71,2
Ovos 7-15 dias	0,87g/L	48	34	52	44,6
	0,43g/L	44	38	40,6	40,8
	0,21g/L	35,4	46	43,4	41,6
	Controle	69,4	70	69,6	69,6
Ovos 1 dia	0,87g/L	50,6	48,6	49,6	49,6
	0,43g/L	58,6	45,4	52	52
	0,21g/L	50,6	48,6	36,6	45,3

3 CONCLUSÕES

- Spinosad, nas formulações líquida e pastilha, não apresenta atividade repelente para *Aedes aegypti* em armadilhas de oviposição;
- As formulações líquida e pastilha apresentaram atividade larvicida em ovitrampas, embora a pastilha tenha apresentado maior eficácia e persistência.
- Spinosad na formulação pastilha pode ser adotado por programas de controle de *Aedes aegypti* para uso em ovitrampas, como alternativa à utilização do Bti;
- A concentração de 0,43g/L de spinosad é a mais indicada para uso em ovitrampas instaladas em ambientes sombreados, enquanto 0,87g/L é mais eficaz em ambientes ensolarados.
- Spinosad não apresenta efeito sobre a eclosão de larvas de *A. aegypti* quando utilizado em armadilhas de oviposição, porém, em concentrações muito elevadas, pode ser capaz de impregnar-se à superfície de ovos, causando um efeito larvicida adicional.

ANEXO A

Instructions for authors

Submission Process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *Parasites & Vectors* levies an article-processing charge on all accepted Research; if the submitting author's institution is a BioMed Central member the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see About page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Parasites & Vectors* prefers online submission.

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of word processor and graphics file formats that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as movies, animations, or original data files, can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the 'About *Parasites & Vectors*' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from BioMed Central customer support team.

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our Useful Tools page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- Device Independent format (DVI)

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

Overview of manuscript sections for Research

Manuscripts for Research submitted to *Parasites & Vectors* should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Background
- Methods
- Results and discussion
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions
- Preparing additional files

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Systematic review registration**, if your reports the results of a controlled health care intervention, please list your registry, along with the unique identifying number (e.g. **Systematic review registration**: PROSPERO CRD0123456789). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your registration number.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug

names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see 'About this journal'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in 'About this journal'.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to ICMJE guidelines, An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- BibTeX
- EndNote style file
- Reference Manager
- Zotero

Examples of the *Parasites & Vectors* reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *Parasites & Vectors* reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.* Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2.* 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.* Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells.* New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells and Tissues.* Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report.* London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs.** *PhD thesis.* Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Corpas M: **The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values** [<http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/>]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*)**. *GigaScience*.<http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Clinical trial registration record with persistent identifier

Mendelow, AD (2006): **Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage**. Current Controlled Trials. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our figure preparation guidelines for detailed instructions on maximising the quality of your figures.

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is

sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Parasites & Vectors* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files will be published along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to chris.arme@gmail.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Parasites & Vectors* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Style and language

General

Currently, *Parasites & Vectors* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

Parasites & Vectors will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All lines and pages should be numbered. Authors are asked to ensure that line numbering is included in the main text file of their manuscript at the time of submission to facilitate peer-review. Once a manuscript has been accepted, line numbering should be removed from the manuscript before publication. For authors submitting their manuscript in Microsoft Word please do not insert page breaks in your manuscript to ensure page numbering is consistent between your text file and the PDF generated from your submission and used in the review process.
- Use the *Parasites & Vectors* reference format.
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).