

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo verificar alterações morfológico-estruturais durante o desenvolvimento biológico de larvas e adultos de *C. quinquefasciatus* (Diptera – Culicidae) após exposição à dose sub-letal de diferentes inseticidas. Na sua execução foram utilizadas mais de 5000 larvas de 3^o e 4^o instar do mosquito, que foram obtidas de criação semi-natural. As larvas foram colocadas em recipientes plásticos num período de 60 minutos de exposição à solução dos inseticidas, e a seguir foram lavadas em água desclorada, transferidas para outros recipientes contendo água e alimento para posterior observação do seu desenvolvimento. Algumas larvas submetidas a concentrações sub-letais dos inseticidas, foram utilizadas para o preparo de amostras para estudos em histologia e do pH do intestino médio, enquanto outras foram separadas e colocadas em gaiolas para análise do desenvolvimento até adulto. Para a análise de assimetria flutuante, machos e fêmeas adultas do grupo controle e tratado, sobreviventes das larvas expostas à doses sub-letais de inseticidas, foram selecionados e destes, retiradas suas asas para posterior observação através do microscópio estereoscópico com câmera de vídeo acoplada. Foram realizadas medidas de comprimento das nervuras R₃, R₄₊₅, M₁, M₂, M₃₊₄ e do perímetro das nervuras M₁ e M₂. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os inseticidas em suas doses sub-letais causam alterações morfológicas no corpo gorduroso e mudanças no pH do tubo intestinal médio das larvas, além de demonstrar efeito na assimetria flutuante nas asas dos adultos.

Abstract

The aim of the present study was to verify the morphologic and structural alterations during the biological development of larvae and adults of *C. quinquefasciatus* (Diptera – Culicidae) after the exposition to the sub-lethal dose of different insecticides. It was used more than 5.000 3rd and 4th stager larvae obtained from a semi natural breeding colony. The larvae were transferred to plastic containers containing a insecticide solution for 60 minutes. After the exposition to the solution of the insecticides, the larvae were washed with declorinated water and maintained in other plastic recipients with water. Some larvae submitted to sub-lethal concentrations of the insecticides, used for histological studies and measurement of intestinal pH, others were monitored until adult stage. For fluctuating asymmetry analyses, males and females adults of the control and treated group which survived exposure to sub-lethal doses were selected and from them, the posterior wing was removed for further and observation through stereoscopic microscope with video camera mounting. R₃, R₄₊₅, M₁, M₂, M₃₊₄ nervures and the perimeter of M₁ and M₂ nervures were measured. The results obtained in this work showed that the insecticide in sub-lethal doses cause morphologic alterations in the fat body and changes in the pH of the larval midgut, and demonstred fluctuating asymmetry in adults wings.

Sumário

<i>Resumo</i>	10
<i>Abstract</i>	11
<i>Lista de Figuras</i>	17
<i>Lista de Tabelas</i>	20
<i>Lista de Gráficos</i>	23
<i>1- Introdução</i>	32
<i>2- Metodologia</i>	47
<i>2.1- Obtenção de Espécimes</i>	48
<i>2.2- Inseticidas</i>	48
<i>2.3- Concentrações empregadas</i>	48
<i>2.4- Teste de suscetibilidade</i>	49
<i>2.4.1- Bioensaio</i>	49
<i>2.4.2- Teste de Concentração</i>	49
<i>2.5- Análise do pH intestinal das larvas expostas aos inseticidas</i>	50
<i>2.6- Análise histológica das larvas expostas aos inseticidas</i>	51
<i>2.6.1- Preparação do material para microscopia óptica</i>	51
<i>2.6.2- Preparação do material para microscopia eletrônica de transmissão</i>	52

<i>2.7- Manutenção dos insetos após exposição às drogas para verificar parâmetros biológicos</i>	<i>53</i>
<i>2.8- Teste de efetividade das telas impregnadas com derivados da avermectina sobre as larvas</i>	<i>54</i>
<i>2.9- Bioensaio em gaiolas teladas com derivados da avermectina</i>	<i>55</i>
<i>2.10- Assimetria flutuante</i>	<i>56</i>
<i>2.11- Análise estatística</i>	<i>57</i>
<i>3- Resultados</i>	<i>59</i>
<i>3.1- Suscetibilidade das larvas de Culex quinquefasciatus</i>	<i>60</i>
<i>3.2- Análise do pH intestinal das larvas expostas aos inseticidas</i>	<i>68</i>
<i>3.3- Análise histoquímica e morfológica</i>	<i>70</i>
<i>3.3.1- Análise histoquímica</i>	<i>70</i>
<i>3.3.2- Análise morfológica das larvas em microscopia óptica</i>	<i>70</i>
<i>3.3.2.1- Larvas do grupo controle</i>	<i>70</i>
<i>3.3.2.2- Larvas do grupo exposto aos inseticidas</i>	<i>74</i>
<i>3.3.2.2.1- Larvas expostas à concentração de 20ppb de Cipermetrina por 1 hora</i>	<i>74</i>
<i>3.3.2.2.2- Larvas expostas à concentração de 30ppb de Deltametrina por 1 hora</i>	<i>77</i>

3.3.2.2.3- Larvas expostas à concentração de 50ppb de Temefós por 1 hora	78
3.3.2.2.4- Larvas expostas à concentração de 1,5ppb de Ivermectina por 1 hora	81
3.3.2.2.5- Larvas expostas à concentração de 1,5ppb de Abamectina por 1 hora	83
3.3.3- Análise morfológica das larvas em microscopia eletrônica de transmissão	85
3.3.3.1- Larvas expostas à concentração de 20ppb de Cipermetrina por 1 hora	86
3.3.3.2- Larvas expostas à concentração de 30ppb de Deltametrina por 1 hora	88
3.3.3.3- Larvas expostas à concentração de 50ppb de Temefós por 1 hora	90
3.3.3.4- Larvas expostas à concentração de 1,5ppb de Ivermectina por 1 hora	91
3.3.3.5- Larvas expostas à concentração de 54ppb de Abamectina por 1 hora	92
3.4- Parâmetros biológicos dos insetos após exposição das larvas aos inseticidas	94
3.5- Análise da efetividade das telas impregnadas com derivados da avermectina sobre larvas	98
3.6- Análise da exposição dos adultos à tela impregnada com derivados da avermectina	99
3.7- Assimetria flutuante	100
3.7.1- Análise da assimetria flutuante das asas de larvas expostas aos inseticidas	100
3.7.1.1- Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante	105

3.7.1.2- Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante	107
3.7.1.3- Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante	107
3.7.2- Análise da assimetria flutuante das asas de larvas expostas à Cipermetrina	108
3.7.2.1- Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante	113
3.7.2.2- Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante	113
3.7.2.3- Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante	114
3.7.3- Análise da assimetria flutuante das asas de larvas expostas à Deltametrina	115
3.7.3.1- Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante	120
3.7.3.2- Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante	121
3.7.3.3- Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante	122
3.7.4- Análise da assimetria flutuante das asas de larvas expostas ao Temefós	123
3.7.3.1- Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante	127
3.7.3.2- Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante	128

3.7.3.3- <i>Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante</i>	129
3.7.5- <i>Análise da assimetria flutuante das asas de larvas expostas à Abamectina</i>	131
3.7.5.1- <i>Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante</i>	136
3.7.5.2- <i>Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante</i>	137
3.7.5.3- <i>Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante</i>	139
4- <i>Discussão</i>	140
5- <i>Conclusão</i>	163
6- <i>Bibliografia</i>	165

Lista de Figuras

Metodologia

Figura 1: Asa de *C. quinquefasciatus* utilizadas para análise da assimetria flutuante dos mosquitos emergentes das larvas expostas à concentração de 1,5ppb de Ivermectina. As letras indicam os pontos marcados para a realização das medidas, enquanto os números correspondem às nervuras. 1 – R₃, ponto a – b; 2 – R₄₊₅, ponto c – d; 3 – M₁, ponto e – f; 4 – M₂, ponto e – g; 5 – perímetro da M₁ e M₂, pontos e – f – g – e; 6 – M₃₊₄, ponto h – i 57

Análise do pH intestinal das larvas expostas aos inseticidas

Figura 2: Tubo intestinal de larva de *C. quinquefasciatus* após exposição a água desclorada por 1 h e posterior exposição ao indicador de pH azul de Bromotimol por 1 h. Notar as glândulas cecais (CG), intestino médio anterior (IA) e intestino médio posterior (EP) 69

Figura 3: Tubo intestinal de larva de *C. quinquefasciatus* após exposição à concentração de 20ppb de Cipermetrina por 1 h e posterior exposição ao indicador de pH azul de timol por 1 h. Notar as glândulas cecais (CG), intestino médio anterior (IA) e intestino médio posterior (EP) 69

Análise histoquímica e morfológica

Figura 4: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo controle 73

- Figura 5: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 20ppb de Cipermetrina durante 60 minutos **76**
- Figura 6: Fotomicrografias da região mediana do intestino médio de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 30ppb de Deltametrina durante 60 minutos e corada por HE **78**
- Figura 7: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 50ppb de Temefós durante 60 minutos **80**
- Figura 8: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 1,5ppb de Ivermectina durante 60 minutos **82**
- Figura 9: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 54ppb de Abamectina durante 60 minutos **84**
- Figura 10: Eletromicrografia da membrana peritrófica do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* exposta à concentração de 30ppb de Deltametrina durante 60 minutos. Notar a integridade da membrana (seta). 4900X **85**
- Figura 11: Eletromicrografia de trofócito no corpo gorduroso de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 20ppb de Cipermetrina durante 60 minutos **86**
- Figura 12: Eletromicrografia do ápice de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo controle **86**
- Figura 13: Eletromicrografia de célula do epitélio do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 20ppb de Cipermetrina durante 60 minutos **87**

- Figura 14: Eletromicrografia do ápice de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 20ppb de Cipermetrina durante 60 minutos **88**
- Figura 15: Eletromicrografia de célula epitelial do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 30ppb de Deltametrina durante 60 minutos **89**
- Figura 16: Eletromicrografia de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 50ppb de Temefós durante 60 minutos **91**
- Figura 17: Eletromicrografia de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 1,5ppb de Ivermectina durante 60 minutos **92**
- Figura 18: Eletromicrografia de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 54ppb de Abamectina durante 60 minutos **93**

Lista de Tabelas

Suscetibilidade das larvas de *Culex quinquefasciatus*

Tabela 1: Concentração letal (CL) para os inseticidas em ppm, para larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> após 1h de exposição	60
Tabela 2: Mortalidade de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Cipermetrina	62
Tabela 3: Mortalidade de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Deltametrina	64
Tabela 4: Mortalidade de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Temefós	65
Tabela 5: Mortalidade de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Ivermectina	66
Tabela 6: Mortalidade de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Abamectina	67

Análise do pH intestinal das larvas expostas aos inseticidas

Tabela 7: pH do intestino médio das larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> expostas aos diferentes inseticidas	68
--	-----------

Análise histoquímica e morfológica

Tabela 8: Resultados das reações histoquímicas em intestino e corpo gorduroso de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> após exposição aos inseticidas por um período de 1 h	70
--	-----------

Parâmetros biológicos dos insetos após exposição das larvas aos inseticidas

Tabela 9: Número de ovos e postura dos grupos controle e tratados para adultos de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina **94**

Tabela 10: Teste *t* com cálculo de variâncias separadas para a média do número de ovos por postura para adultos de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas do grupo controle e daquelas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 54ppb de Abamectina e 1,5ppb de Ivermectina **95**

Tabela 11: Teste *t* com cálculo de variâncias separadas para a média da duração de larva à adulto após oviposição das fêmeas de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas do grupo controle e daquelas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina **96**

Tabela 12: Teste *t* com cálculo de variâncias separadas para a média para o número de adultos emergidos após oviposição das fêmeas de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina **97**

Análise da efetividade das telas impregnadas com derivados da avermectina sobre larvas

Tabela 13: Teste *t* para duas amostras presumindo variâncias diferentes para observação do efeito letal das telas impregnadas com os derivados da avermectina sob larvas de *C. quinquefasciatus* por um período de 1 hora e observações feitas após 24 e 48 horas **98**

Assimetria flutuante

Tabela 14: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas às soluções dos diferentes inseticidas utilizados por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação **104**

Tabela 15: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 20 ppb de Cipermetrina por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação **112**

Tabela 16: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 30 ppb de Deltametrina por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação **119**

Tabela 17: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 50 ppb de Temefós por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação **127**

Tabela 18: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 54 ppb de Abamectina por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação **135**

Lista de Gráficos

Suscetibilidade das larvas de *Culex quinquefasciatus*

- Gráfico 1: Percentual de mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após 1 h de exposição a diversas concentrações de inseticidas em intervalos de tempos diferentes **61**
- Gráfico 2: Concentração Letal dos inseticidas, em Log10, para larvas de *C. quinquefasciatus* após 1h de exposição **61**
- Gráfico 3: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Cipermetrina **63**
- Gráfico 4: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Deltametrina **64**
- Gráfico 5: Regressão não linear para o percentual de mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Temefós **65**
- Gráfico 6: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Ivermectina **67**
- Gráfico 7: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Abamectina **68**

Parâmetros biológicos dos insetos após exposição das larvas aos inseticidas

- Gráfico 8: Percentual de adultos emergidos a partir de ovos colocados pelas fêmeas de *C. quinquefasciatus* originadas de larvas do grupo controle e larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina por 60 minutos **97**

Análise da efetividade das redes impregnadas com derivados da avermectina sobre larvas

Gráfico 9: Número de larvas de *C. quinquefasciatus* mortas após exposição à solução de água e rede impregnada com 10ppm de Ivermectina ou 18ppm de Abamectina por um período de 1 hora e observações feitas após 24 e 48 horas durante 10 dias **99**

Análise da exposição dos adultos à tela impregnada com derivados da avermectina

Gráfico 10: Número de adultos de *C. quinquefasciatus* mortos após exposição à tela impregnada com 10ppm de Ivermectina e 18ppm de Abamectina durante 10 dias **100**

Assimetria Flutuante

Gráfico 11: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos **101**

Gráfico 12: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos **101**

Gráfico 13: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos **102**

- Gráfico 14: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos **102**
- Gráfico 15: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos **103**
- Gráfico 16: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos **103**
- Gráfico 17: Assimetria absoluta das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* tendo o sexo como efeito principal **105**
- Gráfico 18: Assimetria absoluta das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* tendo o sexo como efeito principal **106**
- Gráfico 19: Assimetria absoluta no perímetro das nervuras M_1 e M_2 das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas aos inseticidas por 60 minutos **107**
- Gráfico 20: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de inseticidas por 60 min, e sexo da assimetria absoluta **108**
- Gráfico 21: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes

dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos **109**

Gráfico 22: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos **109**

Gráfico 23: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos **110**

Gráfico 24: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos **110**

Gráfico 25: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos **111**

Gráfico 26: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos **111**

- Gráfico 27: Assimetria absoluta no perímetro das nervuras M_1 e M_2 das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 minutos **113**
- Gráfico 28: Assimetria absoluta da nervura M_1 das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 minutos **114**
- Gráfico 29: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 min, e sexo da assimetria absoluta **115**
- Gráfico 30: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos **116**
- Gráfico 31: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos **116**
- Gráfico 32: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos **117**
- Gráfico 33: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes

- dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos **117**
- Gráfico 34: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos **118**
- Gráfico 35: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos **118**
- Gráfico 36: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 30ppb de Deltametrina por 60 minutos **120**
- Gráfico 37: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 30ppb de Deltametrina por 60 minutos **121**
- Gráfico 38: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 30ppb de Deltametrina por 60 min, e sexo da assimetria absoluta **122**
- Gráfico 39: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos **123**

Gráfico 40: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos **124**

Gráfico 41: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos **124**

Gráfico 42: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos **125**

Gráfico 43: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos **125**

Gráfico 44: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos **126**

Gráfico 45: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 50ppb de Temefós por 60 minutos **128**

- Gráfico 46: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 50ppb de Temefós por 60 minutos **129**
- Gráfico 47: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 50ppb de Temefós por 60 min, e sexo da assimetria absoluta **130**
- Gráfico 48: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 50ppb de Temefós por 60 min, e sexo da assimetria absoluta para o comprimento da nervura R_{4+5} **131**
- Gráfico 49: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos **132**
- Gráfico 50: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos **132**
- Gráfico 51: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos **133**
- Gráfico 52: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes

dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos **133**

Gráfico 53: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos **134**

Gráfico 54: Regressão linear da assimetria absoluta ($E - D$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos **134**

Gráfico 55: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 54ppb de Abamectina por 60 minutos **136**

Gráfico 56: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 54ppb de Abamectina por 60 minutos **137**

Gráfico 57: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 54ppb de Abamectina por 60 minutos **138**

Gráfico 58: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 54ppb de Abamectina por 60 min, e sexo da assimetria absoluta **139**

1- Introdução

Nas regiões tropicais e subtropicais, a baixa qualidade de vida decorre entre vários fatores, das doenças parasitárias humanas (ABERCROMBIE & BERG, 1978), e animais (SILVEIRA *et alii*, 1989), que apresentam insetos como vetores.

Alguns destes vetores são mosquitos da ordem Diptera pertencentes à família Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carrapanãs. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na sua grande maioria são hematófagos, enquanto as fases imaturas são aquáticas. Entre os Culicidae encontramos a maior subfamília, Culicinae, com cerca de 3000 espécies divididas em 10 tribos que reúnem 34 gêneros. Destes, os gêneros *Aedes* e *Culex* são os de maior importância sanitária no Brasil, por serem os vetores do dengue e filariose, respectivamente (PESSÔA & MARTINS, 1988).

O *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, mosquito com hábitos antropofílicos e endofílicos, apresenta ampla distribuição geográfica povoando particularmente as regiões urbanas. As suas larvas são capazes de se desenvolverem em quase todos os tipos de habitats modificados pelo homem, de esgotos à água limpa, com preferência para os primeiros (SUBRA, 1980; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). A época das chuvas possibilita maior número de criadouros, no entanto o desenvolvimento das larvas ocorre durante todo o ano nas áreas meridionais da América do Sul (ALMIRÓN & BREWER, 1994).

De acordo com SINTON & SHUTE (1938), a duração de vida dos mosquitos é influenciada por fatores intrínsecos como nutrição larval, metabolismo do adulto, postura de ovos e hibernação, e fatores extrínsecos referentes a temperatura, umidade e outras variáveis ambientais. Segundo SILVEIRA-NETO *et alii* 1976, a temperatura é um dos

principais fatores ecológicos que influi tanto direta como indiretamente sobre os insetos, seja no seu desenvolvimento, seja na sua alimentação.

RIBEIRO (1993) obteve resultados semelhantes a VIANNA *et alii* (1996a) quando verificou, em condições ambientais, que a temperatura influencia no tempo de desenvolvimento das larvas de *C. quinquefasciatus*, cuja variação foi de 8 a 48 dias. Durante seus experimentos a temperatura variou de 6,7°C a 29°C, sendo a temperatura ótima entre 20°C e 29°C, para períodos variáveis de incubação (1 a 8 dias), larval (6 a 31 dias) e pupal (1 a 9 dias). COSTA *et alii* (1994) observaram que, em condições de laboratório a 5°C e 40°C, não houve desenvolvimento de estágios do ciclo aquático de *C. quinquefasciatus* e que a 10°C, apenas as larvas se desenvolveram, mas com baixa viabilidade (4,54%). À temperatura de 35°C, houve desenvolvimento de ovos e pupas, enquanto que as larvas não se desenvolveram.

Para os adultos, VIANNA *et alii* (1996b) mostraram que a temperatura média ambiental maior que 20°C diminui a longevidade, entretanto favorecia o aumento de posturas de ovos, enquanto que uma temperatura média ambiental entre 15 e 20°C prolongava a longevidade do *C. quinquefasciatus* na fase adulta e favorecia a postura de ovos ao mesmo tempo. No Texas, STRICKMAN (1988) constatou aumento na atividade de oviposição de *C. quinquefasciatus* em temperaturas superiores a 22°C, enquanto que em temperatura inferior a 2°C a oviposição praticamente cessou.

O hábito hematófago de fêmeas desses mosquitos, usualmente necessário para que se processe a maturação dos ovos, resulta na capacidade de transmitirem diversas moléstias tanto para o homem como para os outros animais (CLEMENTS, 1996). *C. quinquefasciatus* constitui uma espécie de grande importância na saúde pública e sanidade animal, sendo o

principal vetor de *Wuchereria bancrofti* no Brasil (DEANE, 1951; RACHOU, 1956; FORATTINI, 2002) e causando considerável incômodo pelas suas picadas (SUBRA, 1980).

Segundo CONSOLI & OLIVEIRA (1994), *C. quinquefasciatus* é incriminado como vetor de arboviroses dentro de vilas rurais e cidades, tendo sido naturalmente encontrado infectado com vírus causadores de encefalites. No Brasil, é também responsável pela veiculação do vírus Oropouche, sendo considerado vetor secundário dessa arbovirose (o vetor primário é o *Culicoides paraensis*) em áreas do estado do Pará, onde a doença tem causado epidemias. A sua presença também foi associada à transmissão de várias arboviroses em aves, eqüinos, canídeos e felinos (HURLBUT, 1950; Meyers *et alii*, 1960; HARWOOD & JAMES, 1979).

Nos anos 40 do século passado, várias metodologias para controlar mosquitos eram adotadas em diversas partes do mundo com variados graus de sucesso. Após a descoberta dos inseticidas sintéticos de efeito residual, essas metodologias foram revistas, possibilitando uma melhor padronização (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Os inseticidas sintéticos continuam sendo os principais suportes dos programas de controles (WRIGHT, 1971; MARICONI, 1980). Neste sentido, a indústria química vem investindo na busca de novos produtos, pois existem relatos de vários casos de resistência aos empregados atualmente para controle das espécies de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (BROWN, 1986; GEORGHIOU *et alii*, 1987; MAZZARRI & GEORGHIOU, 1995; RAWLINS & WAN, 1995; SAMES *et alii*, 1996; SUÁREZ *et alii*, 1996). No Brasil, vários registros indicam resistência a inseticidas em populações de *C. quinquefasciatus* (YÉBAKIMA *et alii*, 1995; BRACCO *et alii*, 1997; GONZÁLEZ *et alii*, 1999; CAMPOS & ANDRADE, 2003).

Os equipamentos, técnicas de aplicação e estratégias de planejamento visando o controle de mosquitos encontram-se minuciosamente discutidos em AMCA (1968), WHO (1990) e WHO (2006).

CONSOLI & OLIVEIRA (1994) relata que no Brasil, o DDT (Dicloro-difenil-tricloro-etano) é ainda o inseticida químico mais largamente empregado para o controle de mosquitos. Entre os anos de 2000 e 2002, este inseticida foi o segundo mais utilizado no mundo para o controle de vetores de doenças, perdendo apenas para os organofosforados (Malation, Temefós e Fenitrothion) (WHO, 2004).

Os piretróides pertencem a outro grupo de inseticidas muito usados atualmente no combate a vetores de doenças e tem como derivados mais utilizados no mundo a Cipermetrina, Permetrina e Deltametrina (WHO, 2004).

Piretróides (também conhecidos como piretróides sintéticos) são inseticidas químicos similares às piretrinas encontradas no piretro natural extraído das flores de crisântemos, conhecidas pelas suas atividades inseticidas (CPCN, 2001). Desenvolvido primeiramente em 1973, os piretróides são mais fotoestáveis que o piretro natural, além de possuírem boa atividade inseticida. Atualmente, a classe de piretróides inclui 42 componentes ativos, diferindo na estrutura química ou na composição dos estereoisômeros (NPTN, 1998).

Nos mosquitos, os piretróides assim como o DDT, têm uma ligação a um gene que causa a mutação no canal de sódio (BRENGUES *et alii*, 2003). A Deltametrina por contato ou pela ingestão, atua no sistema nervoso desses artrópodes, causando rápida paralisação e morte (HAUG & HOFFMAN, 1990). Já os organofosforados, utilizados contra mosquitos, entre eles o Temefós, agem inibindo a hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase,

resultando no acúmulo de acetilcolina na sinapse neuromuscular. Estes organofosforados possuem um efeito tóxico agudo devido à hiperestimulação de receptores muscarínicos e nicotínicos, resultando em sintomas que variam do aumento de secreções à morte pela depressão respiratória nos vertebrados (GALLO & LAWRENCE, 1991).

A resistência dos mosquitos aos inseticidas comuns (organoclorados, carbamatos e piretróides) tem sido frequentemente detectada (OMS, 1976; PEIRIS & HEMINGWAY, 1990; BISSET *et alii*, 1991; CHANDRE *et alii*, 1997). Por exemplo, quando a Deltametrina foi introduzida no mercado, era 100 vezes mais ativa que o DDT e com o benefício de não ser acumulativa no meio ambiente (KHAMBAY & JEWESS, 2005). Mais de 30 novas estruturas do piretro têm sido comercializadas nestes últimos 20 anos (BRYANT, 1999; TOMLIN, 2000).

Tem se observado também certa tolerância ao Methoprene - um hormônio regulador de crescimento (ORTEGA *et alii*, 1991).

A resistência aos inseticidas faz com que haja um constante aumento das doses de aplicação dos inseticidas (WHO, 1970; SUBRA, 1980). Além disso, o uso persistente dos inseticidas diretamente nos criadouros, em altas concentrações, faz com que o combate aos vetores torne-se dispendioso economicamente (ABERCROMBIE & BERG, 1978; LASALLE, 1993) além de destruir uma importante e rica fauna associada que pode, juntamente com fatores climáticos, reduzir a presença destes vetores (SILVEIRA *et alii*, 1989).

Os inseticidas piretróides são frequentemente letais a uma ampla variedade de insetos, mesmo em baixas doses (KHAN, 1983). No entanto, doses sub-letais de inseticidas parecem afetar as atividades reprodutivas de várias espécies de insetos (HAYNES, 1988; CLARK

& HAYNES, 1992). Este fenômeno é chamado hormese (LUCKEY, 1968; NEMOTO *et alii*, 1984; SOTA *et alii*, 1998; FUJIWARA *et alii*, 2002).

Segundo FRANCO *et alii* (2002) hormese é definida como sendo a estimulação positiva de um sistema biológico por quantidades sub danosas de qualquer agente físico, químico ou biológico.

Os efeitos de hormese (por exemplo, o aumento do crescimento, fecundidade, longevidade, e diminuição da incidência de doença) sugerem mudanças fundamentais além de afetar milhares de genes. Existem evidências, em numerosas espécies, que alterações específicas nos padrões da expressão dos genes ocorrem em resposta à exposição de agentes tóxicos. Tais respostas podem ser caracterizadas em duas classes: aquelas resultantes de uma acentuada capacidade metabólica para destoxificação (por exemplo, a família do gene citocromo P450) e aquela que oferta uma proteção mais geral contra dano celular causado por uma variedade ampla de agentes (por exemplo, choque de calor ou proteínas de estresse) (CALABRASE & BALDWIN, 1988).

Outro aspecto importante também a considerar é o destino no meio ambiente dos inseticidas e outros compostos químicos, uma vez que o emprego de moléculas estáveis e persistentes podem levar a deterioração do ambiente na superfície e no fundo d'água (HALLBERG, 1989; RICHARDS & BAKER, 1993; LUNDBERGH *et alii*, 1995).

A procura de moléculas estáveis faz com que as indústrias químicas busquem novas gerações de inseticidas tais como as avermectinas, um grupo de lactonas macrocíclicas com baixa solubilidade em água, derivadas da fermentação produzida por um actinomiceto, o *Streptomyces avermetilis* (CAMPBELL *et alii*, 1983). Deste processo fermentativo resulta a produção de quatro pares de homólogos: avermectinas A₁, A₂, B₁ e B₂. A avermectina B₁

(Abamectina, MK-936) e 22,23-Dihydroavermectina B₁ (Ivomec, MK-933) são os principais componentes isolados da fermentação, derivados de homólogos de avermectinas contendo avermectina B_{1a} (80%) e a avermectina B_{1b} (20%) (FISCHER & MROZIK, 1989).

Inicialmente as avermectinas foram utilizadas principalmente contra nematódeos e ácaros parasitos (JACKSON, 1989). Estes compostos têm sido utilizados contra pragas agrícolas, como antiparasitários no tratamento de animais domésticos (AZIZ *et alii*, 1982; CAMPBELL *et alii*, 1983) e também como inseticida sistêmico (JACKSON, 1989).

A seguir demonstrou-se ser uma substância potente contra moscas (SPRADBERY *et alii*, 1985; STRONG, 1986; CVETOVICH *et alii* 1997; BORGES, 2000) e mosquitos (TESH & GUZMAN, 1990; CONSOLI *et alii*, 1986; FOCKS *et alii*, 1991; JONES *et alii*, 1992; GARDNER *et alii*, 1993; FREITAS *et alii*, 1996; ALVES *et alii*, 2004), além de outros insetos (De AZAMBUJA *et alii*, 1985; HORTA *et alii*, 1996a,b; SANT'ANA, 1996; NEVES *et alii*, 1998; VIANNA, *et alii*, 2002a,b).

Em ensaios preliminares, foram observados também, em vários outros invertebrados [*Biomphalaria glabrata* (FARIA *et alii*, 1993; BORGES *et alii*, 1998), *Physa* sp., *Pomacea haustum*, *Dugesia tigrina* (ALVES *et alii*, 1996a,b)], o efeito direto ou indireto da Ivermectina quando utilizada em diferentes concentrações.

Mortalidade e paralisia causadas pela Ivermectina em adultos de *Aedes aegypti*, *A. fluviatilis*, *Anopheles quadrimaculatus*, *C. quinquefasciatus* e outras espécies de mosquitos também tem sido relatadas (CONSOLI *et alii*, 1986; TESH & GUZMAN, 1990; FOCKS *et alii*, 1991; JONES *et alii*, 1992; GARDNER *et alii*, 1993; ALVES *et alii*, 2004).

FREITAS *et alii* (1996) observaram os efeitos da Ivermectina em larvas de *C. quinquefasciatus* expostas às concentrações de 1, 5 e 10ppm, em tempos variados de exposição. As larvas expostas à droga apresentaram ataxia e paralisia progressiva, inclusive as que não apresentaram mortalidade até 48 horas após o início do experimento. Isto foi mais claramente observado nos grupos expostos às concentrações de 5 e 10ppm. Entretanto, o grupo exposto à concentração de 1ppm também apresentou paralisia, porém numa porcentagem menor (65% após 24 horas/5 minutos de exposição). O menor índice de mortalidade ocorreu depois de 5 minutos de exposição à 1ppm enquanto o maior índice foi 24 horas após a exposição quando as larvas foram expostas à 10ppm por 60 minutos.

Em algumas ordens, principalmente DIPTERA e COLEOPTERA, há relatos de acúmulo de água e edema dos indivíduos em consequência da ação das avermectinas. Isto possivelmente ocorre pela interferência da droga na função dos túbulos de Malpighi e dos hormônios relacionados com o balanço hídrico nos insetos (STRONG, 1993).

É possível que as avermectinas afetem outros tecidos incluindo o corpo gorduroso (STRONG & BROWN, 1987; ALVES *et alii*, 2004). Em mosquitos, ele se apresenta como uma placa de células aderidas à parede corporal do tórax e abdome estendendo-se pela cavidade corporal, às vezes circundando certos órgãos (CLEMENTS, 1996). É o principal órgão de metabolismo intermediário em insetos funcionando como órgão armazenador de proteínas, lipídios e carboidratos, além de sintetizar proteínas da hemolinfa (CHAPMAN, 1998). A quantidade de carboidratos e lipídios presentes no adulto provém das reservas energéticas armazenadas durante o estágio larval (CLEMENTS, 1996). O corpo gorduroso de larvas e adultos de dípteros possuem funções específicas relacionadas ao estágio de desenvolvimento. Por exemplo, sintetizando proteínas da hemolinfa em larvas e em adultos,

além disso, em fêmeas, este órgão produz os polipeptídeos do vitelo. Há indícios, também, do seu envolvimento na resposta de defesa.

De fato, peptídeos, entre os primariamente produzidos no corpo gorduroso, são secretados na hemolinfa (HOFFMANN *et alii*, 1999). Há vários tipos de peptídeos, entre eles um grupo de moléculas compactas (3 a 5 kD) protease - resistentes com 3 ou 4 pontes dissulfetos com atividade direta na resposta imune natural contra várias bactérias, fungos e vírus encapsulados conhecido como defensina (ZANETTI *et alii*, 1997).

A defesa dos insetos também pode estar ligada às glicoproteínas-P, que são proteínas de membrana, transportadoras, as quais bombeiam moléculas para fora das células por mecanismos ATP-dependentes (GERMANN & CHAMBERS, 1998). Segundo BUSS *et alii* (2002) a atividade desta proteína parece estar envolvida na defesa de xenobióticos ambientais. Além disso, os autores supracitados mostram que a Ivermectina inibe a glicoproteína-P, podendo ser esta proteína importante para conferir resistência cruzada com outras classes de inseticidas.

Os eicosanóides, além de ajudarem na defesa dos insetos, também estimulam a oviposição em gafanhotos e pode ser importante na reprodução de todos os insetos CHAPMAN (1998). KOGAN & HAGEDORN (2000), observaram que a síntese de poliaminas é um dos primeiros eventos da formação do vitelo em *Aedes aegypti*. Quando essa síntese sofre diminuição induzida experimentalmente, há redução nos níveis de ácidos nucleicos e proteínas, causando um desenvolvimento ovariano anormal. Entretanto quando há inibição da síntese, ocorre uma diminuição da enzima digestiva tripsina (KOGAN & HAGEDORN, 2000).

Similar aos vertebrados, o sistema interno de defesa dos mosquitos tem componentes humoral e celular (CHRISTENSEN & FORTON, 1986; HOFFMANN *et alii*, 1999; LOWENBERGER *et alii*, 1995; MARMARAS *et alii*, 1994). Os hemócitos que tem a capacidade de liberar moléculas sinalizando o início da transcrição e translocação de peptídeos do sistema imune produzidos no corpo gorduroso (BEERNSTEN *et alii*, 2000), têm sido considerados as principais células da resposta imune dos insetos e desta forma muitos estudos tem concentrado na resposta humoral, enfocando as proteínas antimicrobianas solúveis como as defensinas e cecropinas (DIMOPOULOS *et alii*, 2001; LOWENBERGER, 2001). Todavia, os componentes da resposta humoral tem muita importância na morte de parasitos pro e eucariotos, e segundo HILLYER & CHRISTENSEN (2002) os hemócitos são responsáveis por muitas destas respostas.

Além do sistema imune, um outro componente de defesa dos insetos contra microorganismos é a matriz peritrófica (MP) (SHAHABUDDIN *et alii*, 1996; TELLAM, 1996; LEHANE, 1997; TERRA, 2001). A MP é uma lâmina acelular que envolve o alimento separando-o do epitélio do intestino médio de insetos (RICHARDS & RICHARDS, 1977; PETERS, 1992; TERRA, 1996). Há dois tipos fundamentais de MP definidos por seu local de síntese. O tipo I de MP é produzido do epitélio do intestino médio, freqüentemente em resposta à alimentação, enquanto o tipo II de MP é sintetizado constantemente por um grupo pequeno de células altamente especializadas em um órgão chamado de cárdia, situado na região anterior do intestino médio. Ambos os tipos de MP são compostos de proteínas, proteoglicanos e de quitina, o qual dá uma forma estrutural bem como uma função de proteção e semi-permeabilidade à matriz. A MP está presente na maioria dos insetos, pelo menos em algum estágio de seu ciclo de vida (TELLAM, 1996).

PIMENTA *et alii* (1997) sugeriram que a MP pode fornecer a proteção à *Leishmania* contra a ação das enzimas digestivas do hospedeiro. Além disso, já foi sugerido que a MP também protege os insetos, pelo menos parcialmente, do ataque de agentes potencialmente tóxicos (PETERS, 1992; REGEV *et alii*, 1996; BARBEHENN & MARTIN, 1997; LEHANE, 1997). Substâncias químicas tóxicas ingeridas podem cruzar a MP passivamente ou modificar a sua estrutura, afetando a fisiologia do inseto (TELLAM, 1996).

Outro aspecto de importância relevante que se pode observar contra os insetos é o efeito de concentrações sub-letais de drogas. Isso recai dentro de três categorias: inibição alimentar, anormalidades do desenvolvimento e distúrbios reprodutivos (STRONG & BROWN, 1987). Neste sentido, SEIF *et alii* (1997) observaram os efeitos de concentrações sub-letais de alguns inseticidas em larvas de *C. pipiens* e constataram que o desenvolvimento de *Wuchereria bancrofti* foi prejudicado quando os insetos foram expostos a essas concentrações, já que resíduos de inseticidas nas larvas podem perdurar no adulto afetando os fatores nutricionais no mosquito e, conseqüentemente, afetando o desenvolvimento da larva do nematóide. ALVES (2000) observou os efeitos da dose sub-letal de Ivermectina em larvas de *C. quinquefasciatus* e verificou alterações no corpo gorduroso, bem como nas nervuras das asas dos adultos e quantidade de ovos produzidos durante o ciclo de vida da fêmea, no qual a larva foi exposta à dose.

Diferentes insetos têm sido usados para se observar o efeito de concentrações sub-letais de avermectinas entre eles, fêmeas de *Rhodnius prolixus* que, expostas à solução de avermectina, apresentaram redução de 86% na produção de ovos (De AZAMBUJA *et alii*, 1985). Já em dípteros saprofágicos as concentrações sub-letais do inseticida, inibiram a

pupariação e o desenvolvimento de adultos (SPRADBERY *et alii*, 1985; STRONG, 1986; BORGES, 2000). No entanto, pouco se conhece sobre a morfologia externa dos adultos quando as larvas são expostas a concentrações sub-letais de inseticidas em larvas de *C. quinquefasciatus*.

A estrutura morfológica externa, como asas, pode ser afetada pelos inseticidas e desta forma pequenos desvios da perfeita simetria bilateral que definem a assimetria flutuante (AF) (VAN VALEN, 1962), freqüentemente aparecem quando um estresse genético ou ambiental desestabiliza o processo de desenvolvimento de um ser vivo.

A AF tem um padrão que pode ser determinado por um caráter em uma população, sendo este, representado pela distribuição de freqüências da diferença entre os lados do caráter, em uma distribuição normal com média zero, evidenciando a tendência natural dos indivíduos apresentarem caracteres simétricos. A alteração deste padrão pode indicar um aumento na freqüência de indivíduos assimétricos na população. As outras formas de assimetria existentes são adaptativas, ocorrendo em caracteres que são naturalmente mais desenvolvidos em um dos lados, de forma casual (antissimetria) ou não (assimetria direcional). Enquanto a antissimetria é representada por uma curva de distribuição de freqüências bimodal, a simetria direcional é representada por uma curva com desvio para um dos lados (PALMER & STROBECK, 1986).

Desta forma, a assimetria flutuante tem sido usada como um indicador da quantidade do efeito estressante (PARSONS, 1990), podendo ser detectada pela mensuração de algumas partes corporais do organismo, como tíbias, nervuras ou áreas das asas nos insetos. Para realizar essas medidas, tem-se usado um analisador de imagens, que

tem demonstrado maior eficiência sobre outros métodos de medidas da AF (KOKKO *et alii*, 1996).

A AF têm sido analisada em diferentes insetos sob condições de estresse [*Drosophila melanogaster* (WOODS *et alii*, 1999), *Musca domestica* (DAVID *et alii*, 1998; CHAPMAN & GOULSON, 2000; FLOATE & FOX, 2000), *Lucilia cuprina* (CLARKE *et alii*, 2000), *Scathophaga stercoraria* (HOSKEN *et alii*, 2000), dípteros saprofágicos (BORGES, 2000)]. A AF também foi avaliada em adultos de *C. quinquefasciatus* após estresse larval à densidade (MPHO *et alii*, 2000), à temperatura e organofosforado (MPHO *et alii*, 2001), após efeitos genéticos e dos organofosforados (MPHO *et alii*, 2002; BOURGUET *et alii*, 2004) e após estresse larval à Ivermectina (ALVES, 2000) e em todos esses estudos verificaram-se algum tipo de alteração na asa dos insetos expostos ao estresse.

Em ensaios preliminares (ALVES, 2000; ALVES *et alii*, 2004) foi verificado, após exposição de larvas de *C. quinquefasciatus* à Ivermectina na concentração de 1,5ppb, alterações no corpo gorduroso e na duração do desenvolvimento pós-embriônico, na assimetria flutuante dos adultos, a diminuição de postura de ovos pelas fêmeas, assim como o número de ovos.

O conhecimento das possíveis alterações biológicas e morfológicas que inseticidas podem causar em larvas e adultos de *C. quinquefasciatus* torna-se interessante e importante como subsídio para elucidação de mecanismos que poderão minimizar a incidência deste inseto, que é capaz de ser vetor de diversas doenças ao ser humano.

Assim, o presente estudo teve como objetivo geral, verificar alterações morfológicas e fisiológicas durante o desenvolvimento biológico de larvas e adultos de *C. quinquefasciatus* após exposição à dose sub-letal de diferentes inseticidas.

Para tanto, o estudo teve como objetivos específicos:

- a) Verificar a suscetibilidade e a concentração letal das larvas de *Culex quinquefasciatus* aos organofosforado, piretróides e Ivermectinas;
- b) Verificar, após exposições aos organofosforado, piretróides e Ivermectinas, possíveis alterações morfológicas do tubo intestinal e das células do corpo gorduroso com auxílio de microscopia óptica e eletrônica de transmissão, nas larvas expostas aos agentes químicos;
- c) Verificar se a exposição aos inseticidas altera o pH normal do tubo intestinal médio das larvas;
- d) Analisar, com auxílio de técnicas histoquímicas, as alterações do corpo gorduroso das larvas expostas aos agentes químicos, Cipermetrina, Deltametrina, Temefós, Ivermectina e Abamectina
- e) Estudar o desenvolvimento dos insetos após exposição à dose sub-letal de inseticidas por uma geração;
- f) Verificar a efetividade das telas impregnadas com derivados da avermectina sobre larvas;
- g) Verificar a possível suscetibilidade dos adultos expostos a redes de proteção impregnadas com Ivermectina e Abamectina;
- h) Verificar possíveis alterações na frequência de indivíduos assimétricos na população de adultos, após exposição das larvas aos inseticidas.

2- Metodologia

2.1 Obtenção dos Espécimens

As formas imaturas de *Culex quinquefasciatus* foram obtidas segundo GERBERG (1979) com ligeiras modificações, da criação mantida no laboratório de Biologia e Taxonomia de Invertebrados do Departamento de Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Para tanto, as fêmeas dos mosquitos fizeram postura em cubas plásticas (50 X 40 X 25 cm) contendo uma mistura para mosquito feita a partir de 25 litros de água de torneira desclorada e cerca de 8 “pelets” (20g cada) de ração rotineiramente utilizada para a alimentação de camundongos (Labina - Purina®). As cubas eram preparadas cerca de 10 dias antes da primeira postura e deixadas em condições naturais de temperatura e fotoperíodo.

2.2 Inseticidas

Os inseticidas utilizados foram o organofosforado Temefós 500CE (Fersol), os piretróides Cipermetrina 200CE (Fersol) e Deltametrina 25CE (Fersol) e os derivados da avermectina {Ivermectina [Ivomec 1%p/v (Meril do Brasil)] e Abamectina [Vertimec 18CE (Syngenta)]}.

2.3 Concentrações empregadas

A partir de soluções estoque de Temefós (125ppm), Cipermetrina (50ppm), Deltametrina (6,25ppm), Ivermectina (10ppm) e Abamectina (18ppm), foram feitas diluições adicionais em água desclorada para um teste preliminar e posteriormente chegar às concentrações de trabalho.

2.4 Teste de suscetibilidade

2.4.1 Bioensaio

Para cada teste de suscetibilidade utilizou-se um mínimo de 100 larvas de 3º e 4º instares de *C. quinquefasciatus* para cada concentração de inseticida. Estas larvas foram colocadas em número de 10 a 20 em cada recipiente plástico. Colocou-se 100ml da solução a ser testada e as larvas foram deixadas nos recipientes durante 1 hora. Após este período as larvas foram lavadas em água de torneira desclorada e transferidas para outros recipientes plásticos contendo a mistura para mosquitos até se transformarem adultos. O grupo controle foi exposto à 100ml de água desclorada dentro dos recipientes plásticos.

Para todos os testes utilizaram-se recipientes plásticos com a capacidade para 200ml.

2.4.2 Teste de Concentração

Para os testes de concentração letal das larvas em Temefós utilizaram-se as seguintes concentrações: 125 e 62,5ppm; 625; 125; 62,5; 6,25 e 1,25ppb. Os mesmos testes de concentração letal foram feitos para a Cipermetrina (50 e 5ppm; 500; 250; 50; 25; 5; 2,5 e 0,5ppb) e para a Deltametrina (6,25ppm; 625; 62,5; 31,25; 6,25; 3,125 e 0,3125ppb). Para os derivados da avermectina utilizaram-se, para os testes de concentrações letais, a Ivermectina (10 e 1ppm; 100; 10 e 1,25ppb) e a Abamectina (18 e 1,8ppm; 180; 18 e 1,8ppb).

As concentrações foram determinadas utilizando um total de 3550 larvas para se conseguir a melhor concentração sub-letal para os inseticidas supracitados. Os testes foram

feitos de acordo com item 2.4.1. Os testes apresentaram um mínimo de dez repetições e seguiram o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1970).

Após a análise de Probit, foram escolhidas as concentrações de forma aleatória para a verificação do pH intestinal das larvas expostas aos inseticidas. No entanto, sempre dentro da variação da CL50 para os inseticidas. Para as análises morfológicas e de assimetria flutuante, foram utilizadas concentrações próximas à CL50 determinada pela análise de Probit.

2.5 Análise do pH intestinal das larvas expostas aos inseticidas

Foram utilizados os indicadores azul de Bromotimol (pKa 7), vermelho de Fenol (pKa 7,9) e azul de Timol (pKa 8,2), todos em solução a 0,5%. Foram feitas três repetições para cada experimento.

Os tampões utilizados foram: 2-[N-Morfolino] ácido etanosulfônico (MES)/NaOH (pH 6 a 6,5); N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-ácido etanosulfônico] (HEPES)/NaOH (pH 7); tris (hidroximetil) aminometano (TRIS)/HCl (pH 7,5 a 8,5) e borato/NaOH (pH 9 a 9,5). Todos os tampões foram preparados em soluções estoque na concentração de 0,1M. A concentração final usada foi de 0,05M.

As larvas de 3^o e 4^o instares de *C. quinquefasciatus* foram expostas às concentrações de 80ppb de Temefós, 50ppb de Deltametrina, 20ppb de Cipermetrina, 1,25ppb de Ivermectina e 90ppb de Abamectina num período de 1 hora. Foram utilizadas 180 larvas divididas em grupos de 10 em cada recipiente plástico que continha 100ml de solução, para os grupos tratados ou água desclorada para o grupo controle. Após o período de exposição,

as mesmas foram lavadas e transferidas para recipientes plásticos contendo ração e solução dos indicadores de pH por uma hora.

A mensuração do pH foi feita mediante comparação de cores de soluções de pH preparadas e armazenadas em tubos, com o tubo intestinal de larvas expostas ao corante por uma hora. Aos tubos com corantes foram adicionadas 3 gotas de clorofórmio para impedir o crescimento de microorganismos. Este tratamento assegurou que a coloração permanecesse inalterada por vários meses após o término dos ensaios. Os resultados puderam ser observados com a dissecação do tubo intestinal das larvas, sob estereomicroscópio. Cerca de 8 a 10 observações foram feitas para cada tratamento e para cada corante.

2.6 Análise histológica das larvas expostas aos inseticidas

2.6.1 Preparação do material para microscopia óptica

Para análise histológica, utilizaram-se 180 larvas de 3^o e 4^o instares de *C. quinquefasciatus* que foram expostas a concentrações de 50ppb de Temefós, 30ppb de Deltametrina, 20ppb de Cipermetrina, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina num período 30 e 60 minutos. As larvas foram divididas em grupos de 10 para cada grupo de inseticida testado e para o grupo controle. Logo após serem retiradas da exposição às soluções inseticidas, retirou-se a cabeça e o sifão respiratório das larvas para posterior fixação em glutaraldeído a 4,5% em tampão fosfato pH 7,2 a 0,1M, desidratadas em monômero de glicol metacrilato (GMA) (Electron Microscopy Sciences - EMS) e água destilada para banhos posteriores de GMA. Para a infiltração, colocaram-se as larvas em

GMA e catalisador por um período de 12 horas. A embebição ocorreu em seguida, onde as larvas foram colocadas em cápsulas de gelatina com a mistura de GMA, água destilada, butil metacrilato e 2,4-peróxido de diclorobenzoil (EMS). As larvas ficaram expostas à luz ultravioleta até a completa polimerização. A desidratação, infiltração, embebição e polimerização foram feitos de acordo com o fabricante do metacrilato.

Os cortes foram realizados em micrótomo (Porter-Blum MT2-B, Du Pont-Sorvall), utilizando navalhas de vidro e espessura de 0,4µm. As secções foram submetidas às seguintes colorações: (1) azul de Bromofenol para proteínas totais, (2) sulfato azul do Nilo para lipídeos, sendo aqueles corados em vermelho lipídios ácidos e aqueles corados em azul ou preto lipídios neutros, (3) azul de Toluidina-Borax a 1% e (4) Hematoxilina-Eosina (HE) para evidenciação da estrutura celular e nuclear das células. Todos os testes de coloração foram feitos de acordo com PEASE (1964). A seguir as secções foram analisadas e fotografadas sob microscópio óptico no aumento de 100X no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Viçosa.

2.6.2 Preparação do material para microscopia eletrônica de transmissão

As larvas obtidas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio, 0,1M pH 7,2, durante 5 horas à temperatura de 4°C. Após este período o material foi lavado em solução tampão durante 10 minutos por duas vezes. Em seguida, o material foi fixado em solução de tetróxido de ósmio a temperatura de 4°C durante 1 hora. Após este período, foi feita a desidratação do material utilizando-se séries crescentes de etanol, seguindo-se a clarificação em óxido de propileno, a infiltração com resina à base de epon 812 (EMS) e inclusão definitiva do material em cápsulas de plástico. A polimerização

da resina foi realizada em estufa a 60°C por 24-48 horas. Todo o procedimento seguiu o protocolo do fabricante da resina.

Com auxílio de ultra micrótomo (Porter-Blum MT2-B, Du Pont-Sorvall), foram realizados cortes semi-finos que, em seguida, foram corados com azul de Toluidina contendo 1% de bórax, segundo PEASE (1964), para escolha das áreas de observação.

Após delimitação da área adequada, foram realizados cortes ultrafinos que, montados em telas de cobre, foram corados por acetato de uranila a 2% durante 30 minutos (WATSON, 1958), seguida de coloração pelo citrato de chumbo durante 10 minutos, segundo a técnica descrita por REYNOLDS (1963). O material corado foi estudado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, EM 109) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

2.7 Manutenção dos insetos após exposição às drogas para verificar parâmetros biológicos

Utilizou-se um total de 500 larvas de 3º e 4º instar de *C. quinquefasciatus* divididas em grupos de 20 para cada recipiente plástico. O recipiente continha 100ml de solução de 50ppb de Temefós, 30ppb de Deltametrina, 20ppb de Cipermetrina, 54ppb de Abamectina ou apenas água desclorada. As larvas foram expostas por um período de 60 minutos e posteriormente foram lavadas em água de torneira desclorada e transferidas para recipientes plásticos contendo a mistura para mosquitos de acordo com o item 2.1.

Cinco casais dos grupos controle e tratado, sobreviventes do experimento, foram colocados em gaiolas teladas. Três vezes por semana oportunizou-se a hematofagia dos

insetos, expondo-se em cada gaiola *Nothura minor* (codornas) *in natura*. As codornas eram mantidas livres dentro de gaiolas com grade para que os mosquitos pudessem atravessar e realizar a hematofagia. Também era mantido um frasco com capacidade de 30ml onde foi colocado uma solução de mel e água, na concentração de 10% embebida em algodão, para a alimentação dos adultos. Na gaiola onde foram mantidos os mosquitos também havia um frasco com capacidade de 100ml de mistura para mosquito para a oviposição. Todo o experimento foi realizado em temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Foram analisados a quantidade de postura por da fêmea; quantidade de ovos por postura da fêmea; duração do ciclo aquático e quantidade de adultos originados na geração F1.

2.8 Teste de efetividade das telas impregnadas com derivados da avermectina sobre as larvas

Para testar a efetividade da impregnação das telas com os derivados da avermectina, 20 telas de filó, medindo 30x10cm, com malha 156, foram mergulhadas nas concentrações de 10ppm de Ivermectina ou 18ppm de Abamectina (10 redes para Ivermectina e 10 para Abamectina) durante 20 minutos, para posteriormente deixá-las expostas no ambiente, por 10 dias. Durante este tempo, uma tela por dia, impregnada com Ivermectina e outra com Abamectina, foi mergulhada em recipiente contendo 500ml de água desclorada, por 1 minuto e posteriormente retirada. A seguir 50 larvas de 3^o e 4^o instares de *C. quinquefasciatus* foram divididas em grupos de 10 e colocadas em recipientes plásticos, contendo 100ml da solução durante 1 hora. Após este período as larvas foram lavadas em

água de torneira desclorada e transferidas para recipientes plásticos contendo mistura para mosquitos. As larvas foram analisadas por 48 horas.

O mesmo procedimento foi feito para o grupo controle.

2.9 Bioensaios em gaiolas teladas com derivados da avermectina

Os adultos de *C. quinquefasciatus* foram colocados em gaiolas de madeira teladas medindo 50x40x50cm. Dentro das gaiolas foram montados suportes de arame para que pudessem ser colocadas telas de filó, medindo 30x10cm, com malha 156, embebidas em soluções dos inseticidas Ivermectina ou Abamectina nas concentrações de 10ppm e 18ppm, respectivamente. Utilizou-se 100 insetos para cada gaiola, sendo que estes ficaram livres para movimentarem, podendo ou não pousarem na tela impregnada com o pesticida. As observações foram feitas por um período de 10 dias. Os insetos tiveram como alimentados solução de mel e água em concentração de 10%, embebida em algodão, e, além disso, as fêmeas tiveram *Nothura minor* (codornas) *in natura* como fonte para hematofagia, três vezes por semana, durante a noite. As codornas eram mantidas livres dentro de gaiolas com grade para que os mosquitos pudessem atravessar e realizar a hematofagia. Todo o experimento foi feito em temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. O experimento apresentou duas repetições.

Para o grupo controle, a tela de filó foi embebida em água desclorada.

2.10 Assimetria Flutuante

Para a análise de assimetria flutuante utilizou-se 1200 larvas das quais foram selecionados 50 machos e 50 fêmeas adultas dos grupos controle e experimentais sobreviventes da exposição à 50ppb de Temefôs, 30ppb de Deltametrina, 20ppb de Cipermetrina e 54ppb de Abamectina num período de 1 hora. Seguindo o item 2.4.1.

Os adultos tiveram suas asas retiradas e montadas entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá. Estas asas foram observadas em microscópio estereoscópico com câmera de vídeo acoplada. As imagens captadas pela câmera eram digitalizadas e as medidas foram obtidas, utilizando o software de análise de imagem “KS 300” da Zeiss localizado no Laboratório de Triatomíneos do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz em Belo Horizonte, MG.

Foram realizadas medidas de comprimento das nervuras R_3 , R_{4+5} , M_1 , M_2 , M_{3+4} e do perímetro das nervuras M_1 e M_2 de acordo com ALVES (2000).

A assimetria da amostra (Figura 1) foi calculada pela fórmula da assimetria absoluta (PALMER & STROBECK, 1986):

$$A = \frac{\sum |E - D|}{N}$$

Onde, A = assimetria absoluta; E = medida do comprimento do lado esquerdo do caráter; D = medida do comprimento do lado direito do caráter; N = número de indivíduos da amostra.

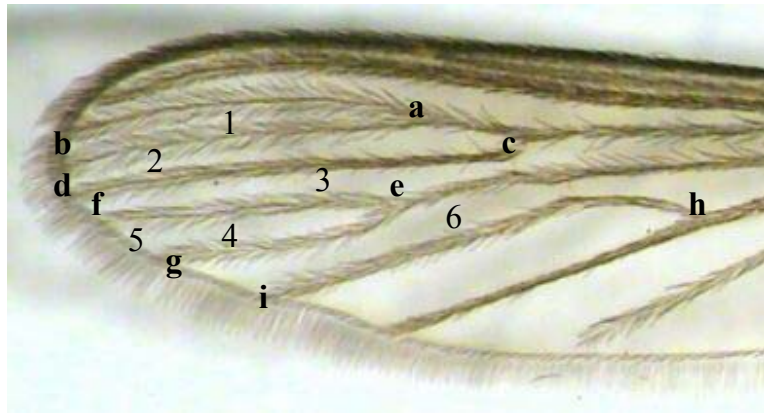


Figura 1: Asa de *C. quinquefasciatus* utilizada para análise da assimetria flutuante dos mosquitos emergentes das larvas expostas à concentração de 1,5ppb de Ivermectina. As letras indicam os pontos marcados para a realização das medidas, enquanto os números correspondem às nervuras. 1 – R₃, ponto a – b; 2 – R₄₊₅, ponto c – d; 3 – M₁, ponto e – f; 4 – M₂, ponto e – g; 5 – perímetro da M₁ e M₂, pontos e – f – g – e; 6 – M₃₊₄, ponto h – i

2.11 Análise Estatística

Os valores para a determinação das concentrações letais foram submetidos à análise de Probit através do programa Micro-Probit (1987). Para a verificação da normalidade utilizou-se a análise de regressão através do programa SAS 8.0.

Para os parâmetros biológicos foi usado o teste *t* para verificar se houve ou não diferença entre os grupos expostos às soluções em doses subletais dos inseticidas por um período de 60 minutos e o grupo controle.

Os resultados obtidos das larvas de *C. quinquefasciatus* após a exposição a soluções de água e redes impregnadas com os derivados da avermectina foram submetidos a análise

do teste t para duas amostras presumindo variâncias diferentes. Já a exposição dos adultos à rede impregnada com derivados da avermectina, a significância da análise foi feita através do teste-F de duas amostras para variâncias da mortalidade dos adultos de *C. quinquefasciatus*.

A presença da AF em cada medida foi verificada através de teste de normalidade [teste W de Shapiro-Wilk (STATSOFT, 1999)], utilizando os valores da diferença entre o lado esquerdo e o direito. A média do lado esquerdo e do direito foi utilizada como índice de tamanho e realizou-se uma regressão linear desta média pela assimetria absoluta, para verificar se o aumento da assimetria estava ligada ao aumento do tamanho.

Foi realizada uma análise de variância de duas vias para cada medida, para cada inseticida e para cada espécie da assimetria em relação ao tratamento e ao sexo.

3- Resultados

3.1 Suscetibilidade das larvas de *Culex quinquefasciatus*

A tabela 1 mostra a concentração letal (CL) para os diferentes inseticidas.

Tabela 1: Concentração letal (CL) para os inseticidas em ppm, para larvas de *C. quinquefasciatus* após 1h de exposição

Concentração Letal	Cipermetrina	Deltametrina	Temefós	Ivermectina	Abamectina
CL10	9×10^{-4}	$4,1 \times 10^{-4}$	9×10^{-3}	5×10^{-4}	$2,8 \times 10^{-2}$
<	$2,8 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$	5×10^{-3}	1×10^{-6}	$1,9 \times 10^{-2}$
>	2×10^{-3}	8×10^{-4}	$1,4 \times 10^{-2}$	3×10^{-3}	$3,7 \times 10^{-2}$
CL50	$2,6 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-2}$	4×10^{-3}	$8,8 \times 10^{-2}$
<	$1,3 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$7,1 \times 10^{-2}$
>	5×10^{-2}	$8,2 \times 10^{-2}$	$9,2 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-1}$
CL90	$7,7 \times 10^{-1}$	7,5	$5,4 \times 10^{-1}$	$3,4 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-1}$
<	$3,7 \times 10^{-1}$	3,7	$3,8 \times 10^{-1}$	$8,6 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-1}$
>	1,9	18,8	$8,3 \times 10^{-1}$	$2,2 \times 10^{-1}$	$3,8 \times 10^{-1}$
CL95	2	30,4	$9,6 \times 10^{-1}$	$6,1 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-1}$
<	$8,9 \times 10^{-1}$	12,8	$6,4 \times 10^{-1}$	$1,7 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-1}$
>	5,8	92,5	1,6	$7,3 \times 10^{-1}$	$5,7 \times 10^{-1}$

< = menor concentração indicada pela análise de probit

> = maior concentração indicada pela análise de probit

Os testes efetuados em larvas de *C. quinquefasciatus* procurando determinar as concentrações letais (CL) resultaram em diferentes concentrações para os inseticidas. Nos testes verificaram-se índices de mortalidade para as menores doses utilizadas que variaram de 2% para Abamectina a 1,8ppb à 39% para Ivermectina à 1,25ppb (Gráfico 1).

Verificou-se também, que o organofosforado, os piretróides e a Abamectina causaram mortalidade mais acentuada nas primeiras 24 horas do que aquelas expostas à Ivermectina (Gráfico 1). Os testes mostraram também que a Ivermectina foi o inseticida que apresentou menor dosagem para as CL50, 90 e 95 (Gráfico 2).

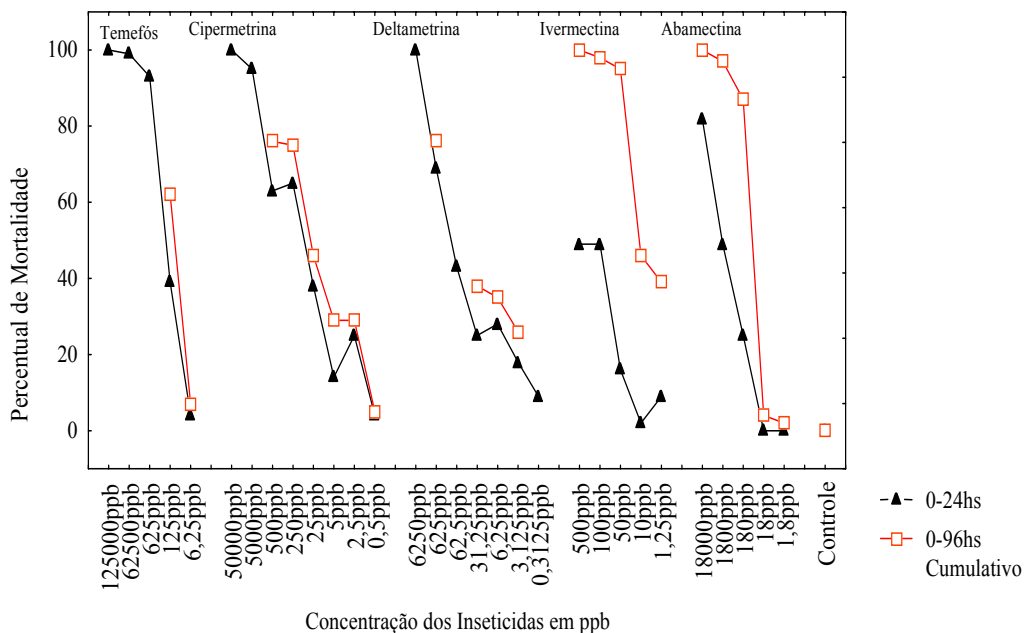


Gráfico 1: Percentual de mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após 1 h de exposição a diversas concentrações de inseticidas em intervalos de tempos diferentes

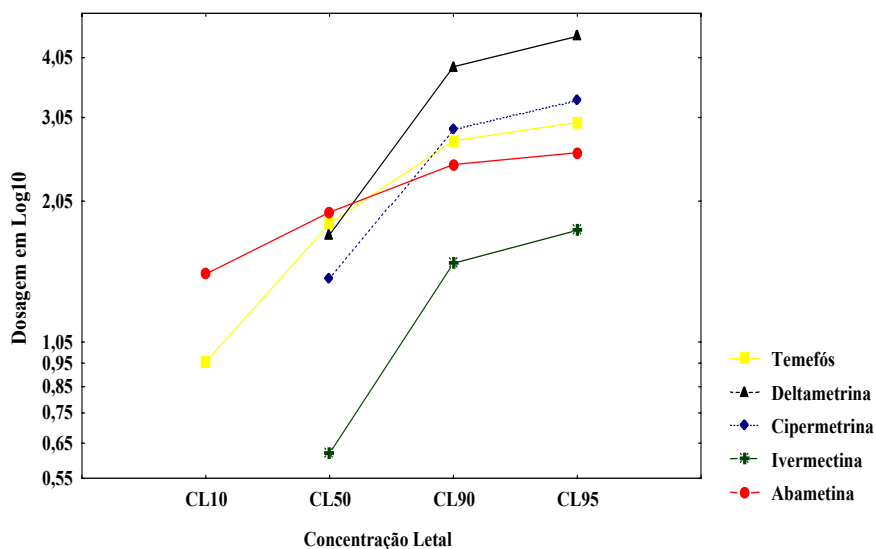


Gráfico 2: Concentração Letal dos inseticidas, em Log10, para larvas de *C. quinquefasciatus* após 1h de exposição

Os experimentos mostraram que nas concentrações mais elevadas, independentemente do inseticida, houve 100% de mortalidade (Gráficos 3 a 7). Nesses mesmos gráficos pode-se observar a função da análise de regressão não linear que serve para estimar a mortalidade para cada inseticida utilizado.

A Cipermetrina mostrou eficiência na mortalidade que variou de 62% a 76% nas 96 h após a exposição em concentração de 500ppb e em concentração de 250ppb a variação no mesmo período foi de 25,4% a 29% (Tabela 2 e Gráfico 3).

Tabela 2: Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Cipermetrina

Tempo após exposição	Diluição do Inseticida								
	50 ppm	5 ppm	500 ppb	250 ppb	25 ppb	5 ppb	2,5 ppb	0,5 ppb	Controle
0 – 24hs	110	104	69	72	42	15	28	4	0
24 – 96hs	-	1	15	10	9	17	4	2	0
Total	110	105	84	82	51	32	32	6	0
% de Mortalidade	100	95	76	75	46	29	29	5	0

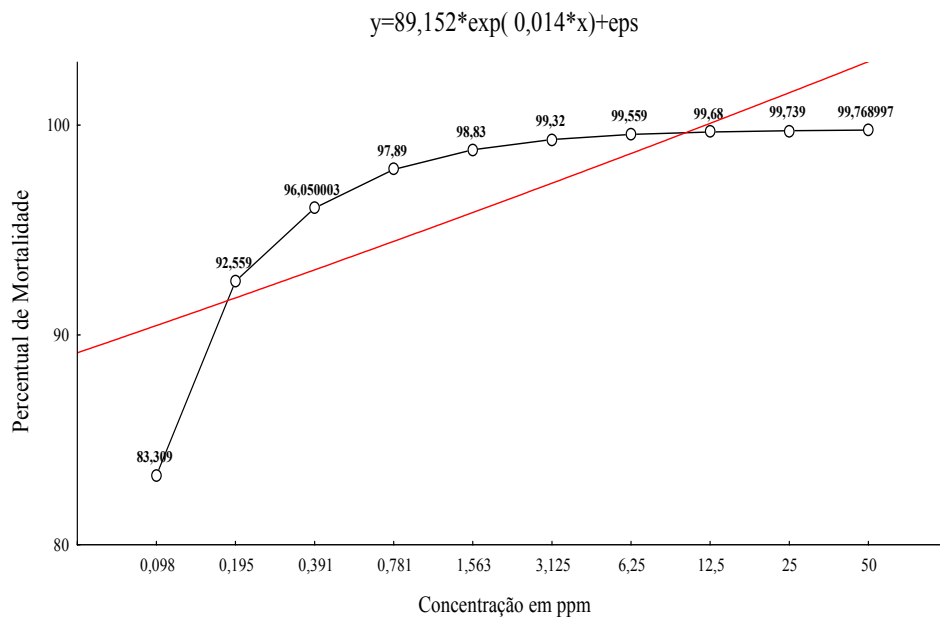


Gráfico 3: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Cipermetrina. Linha em vermelho significa o ajuste do modelo

A Deltametrina em concentração de 625ppb apresentou índice de mortalidade em 24h foi de 69%, entretanto em concentração de 62,5ppb, a mortalidade foi de 43% no mesmo período, permanecendo inalterado até 96 horas. Mantendo-se as reduções, mantém-se a diminuição de mortalidade nessas 24 primeiras horas após a exposição (Tabela 3 e Gráfico 4).

Tabela 3: Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Deltametrina

Tempo após Exposição	Diluição do Inseticida							
	6,25 ppm	625 ppb	62,5 ppb	31,25 ppb	6,25 ppb	3,125 ppb	0,3125 ppb	Controle
0 – 24hs	110	76	47	27	31	20	10	0
24 – 96hs	-	8	0	15	8	7	0	0
Total	110	84	47	42	39	27	10	0
% de Mortalidade	100	76	43	38	35	26	9	0

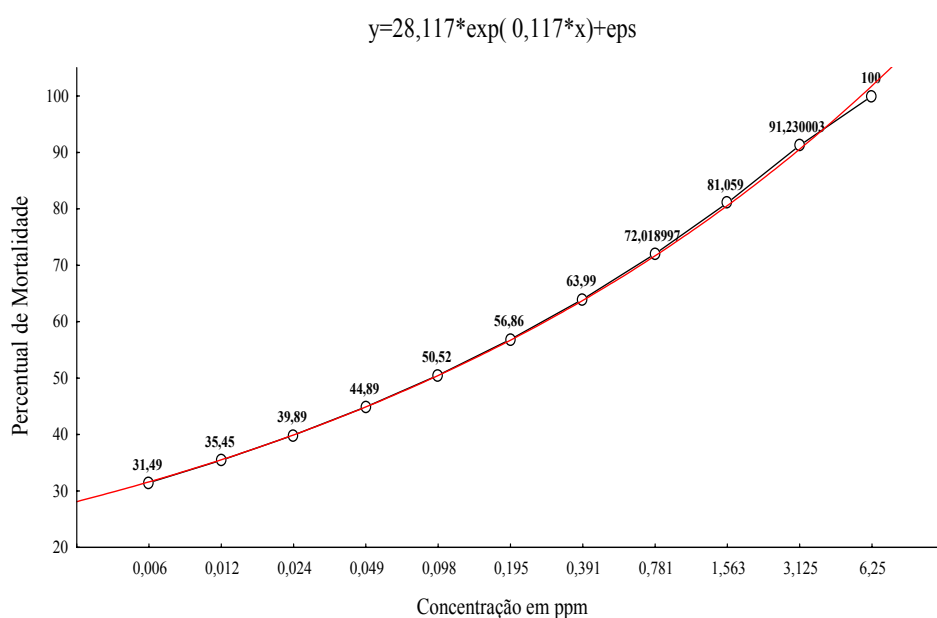


Gráfico 4: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Deltametrina. Linha em vermelho significa o ajuste do modelo

A exposição das larvas em 125ppb de Temefós, apresentou índice de mortalidade nas primeiras 24hs, de 0,036%. No entanto, nas concentrações de 125ppb e 6,25ppb, entre

24 e 96hs, o inseticida mostrou 22,4% e 0,04% de mortalidade, respectivamente (Tabela 4 e Gráfico 5).

Tabela 4: Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Temefós

Tempo após Exposição	Diluição do Inseticida					
	125ppm	62,5ppm	625ppb	125ppb	6,25ppb	Controle
0 – 24hs	110	109	102	43	4	0
24 – 96hs	-	-	-	15	4	0
Total	110	109	102	68	8	0
% de Mortalidade	100	99	93	62	7	0

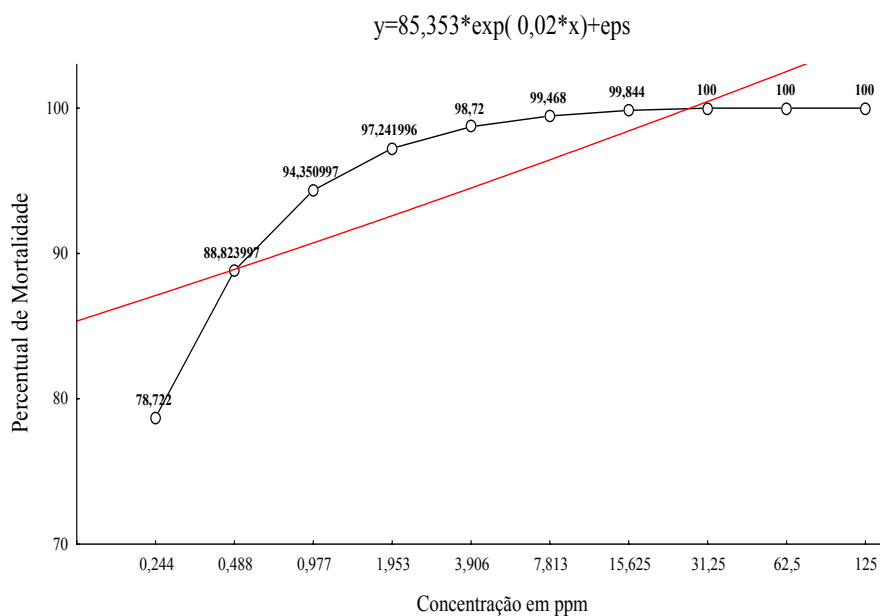


Gráfico 5: Regressão não linear para o percentual de mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Temefós. Linha em vermelho significa o ajuste do modelo

Os testes mostraram que as larvas expostas à Ivermectina nas primeiras 24 horas em concentração de 500ppb, o índice de mortalidade foi de 49%. Reduzindo estas concentrações para 50ppb e 10ppb, o índice foi de 16% e 2%, respectivamente. No entanto, a eficiência do inseticida foi de 100% na concentração inicial e quando reduzida para 100ppb, a eficiência foi de 95% nas 96 horas após a exposição (Tabela 5 e Gráfico 6)

O inseticida Abamectina mostrou uma eficiência de 74,5% na concentração de 18ppm nas 24 primeiras horas após a exposição. Reduzindo para 1,8ppm e 180ppb, a eficiência do inseticida foi de 44,5% e 22,7%, respectivamente, nas 24 primeiras horas. Entretanto, a redução abaixo de 18ppb, o inseticida só mostrou-se eficiente após as 24 primeiras horas (Tabela 6 e Gráfico 7).

Tabela 5: Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Ivermectina

Tempo após exposição	Diluição do Inseticida					
	500ppb	100ppb	50ppb	10ppb	1,25ppb	Controle
0 – 24hs	49	49	16	2	9	0
24 – 96hs	51	49	79	44	30	0
Total	100	98	95	46	39	0
% de Mortalidade	100	98	95	46	39	0

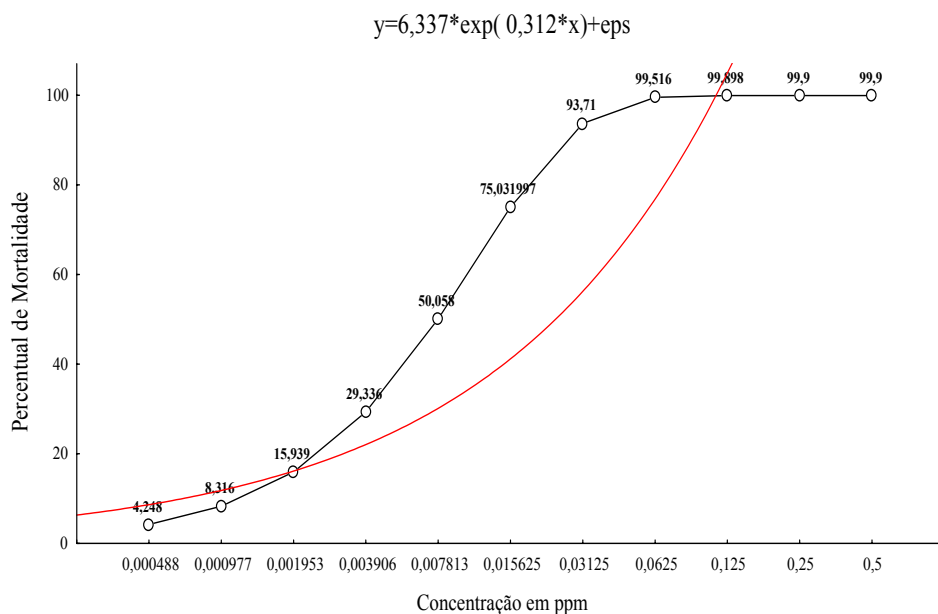


Gráfico 6: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Ivermectina. Linha em vermelho significa o ajuste do modelo

Tabela 6: Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Abamectina

Tempo após exposição	Diluição do Inseticida					
	18ppm	1,8ppm	180ppb	18ppb	1,8ppb	Controle
0 – 24hs	82	49	25	0	0	0
24 – 96hs	28	58	62	4	2	0
Total	110	107	87	4	2	0
% de Mortalidade	100	97	79	4	2	0

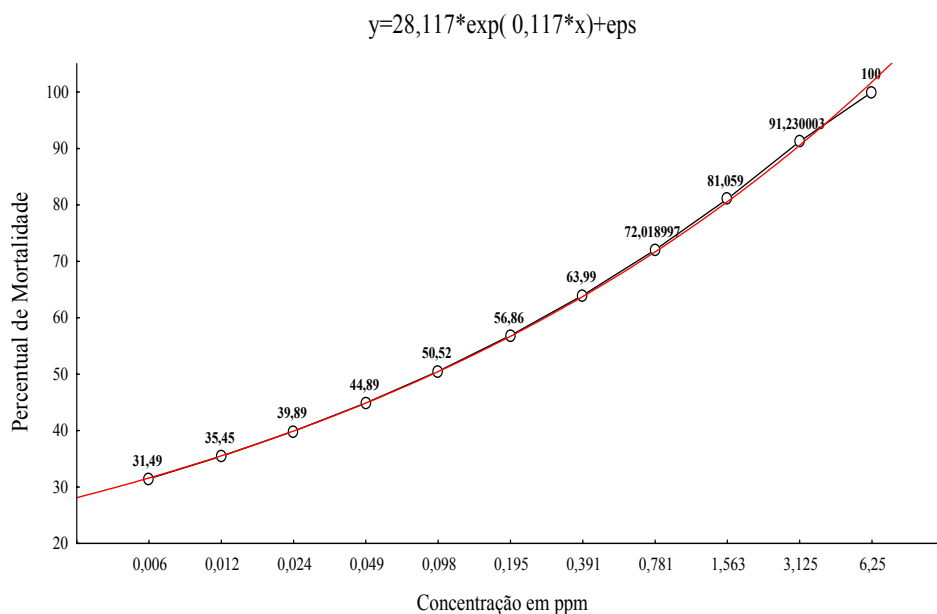


Gráfico 7: Regressão não linear para o percentual de Mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição de 1 h a diferentes concentrações de Abamectina. Linha em vermelho significa o ajuste do modelo

3.2 Análise do pH intestinal das larvas expostas aos inseticidas

Quando as larvas foram expostas aos inseticidas e posteriormente aos corantes, puderam-se observar mudanças na alcalinidade do intestino médio (Tabela 7 e Figuras 2-3).

Tabela 7: pH do intestino médio das larvas de *C. quinquefasciatus* expostas aos diferentes inseticidas

Inseticida	Ivermectina	Abamectina	Temefós	Deltametrina	Cipermetrina	Controle
pH	7,0 – 7,5	7,0 – 7,5	7,0 – 7,5	7,0 – 7,5	7,5 – 8,0	> 9,5



Figura 2: Tubo intestinal de larva de *C. quinquefasciatus* após exposição a água desclorada por 1 h e posterior exposição ao indicador de pH azul de Bromotimol por 1 h. Notar as glândulas cecais (CG), intestino médio anterior (IA) e intestino médio posterior (EP)



Figura 3: Tubo intestinal de larva de *C. quinquefasciatus* após exposição à concentração de 20ppb de Cipermetrina por 1 h e posterior exposição ao indicador de pH azul de timol por 1 h

3.3 Análise histoquímica e morfológica

3.3.1 Análise histoquímica

A Tabela 8 mostra diferenças nos resultados para as reações histoquímicas.

Tabela 8: Resultados das reações histoquímicas em intestino e corpo gorduroso de larvas de *C. quinquefasciatus* após exposição aos inseticidas por um período de 1 h

	Controle		Cipermetrina 20ppb		Deltametrina 20ppb		Temefós 50ppb		Ivermectina 1,5ppb		Abamectina 54ppb	
	AB	NA	AB	AN	AB	AN	AB	AN	AB	AN	AB	AN
	LA LN		LA LN		LA LN		LA LN		LA LN		LA LN	
ACI	+++		++		+		+		+		+++	
NCE	+++		++		+		+		+		++	
GPT	+++	-	+++	+	-	+	+++	+	-	+	+	-

ACI = Ápice das células intestinais; NCE= Núcleo das células epiteliais do intestino; GPT=Grânulos pequenos dos trofócitos no corpo gorduroso; AB=Azul de Bromofenol; AN=Azul do Nilo; LA=Lipídios ácidos; LN=Lipídios neutros; (+++) alta positividade; (++) média positividade; (+) baixa positividade; (-) negativo.

3.3.2 Análise morfológica das larvas em microscopia óptica

3.3.2.1 Larvas do grupo controle

Os cortes histológicos realizados em metacrilato corados em HE, visaram analisar as alterações na morfologia das células do intestino médio e corpo gorduroso das larvas

submetidas ao tratamento com os inseticidas e compará-las com a morfologia normal, encontradas nas células do intestino médio e corpo gorduroso do grupo controle.

A figura 4A mostra o intestino médio e parte do corpo gorduroso destas larvas. Observou-se que as células que constituem a parede do tubo digestivo apresentou-se com morfologia normal e constituído por células cilíndricas dispostas em uma única camada, com citoplasma heterogêneo quanto a coloração, mostrando regiões mais e menos acidófilas e, na sua superfície apical evidenciou-se uma borda em escova, representada por uma delgada linha pouco corada. O núcleo celular apresentou-se esférico e basal, exibindo áreas de eucromatina e heterocromatina bem evidentes. O nucléolo, quando observado, apresentou-se único e esférico, indicando a alta atividade celular. Nesta região, observou-se a presença de uma fina membrana refringente a luz, que se inicia na transição entre o intestino anterior e o médio e que envolve todo o conteúdo alimentar, denominada membrana peritrófica.

Algumas células cilíndricas, desta região, mostraram aspectos morfológicos diferenciados, evidenciando na superfície apical irregular a presença de vesículas secretoras que mostraram uma região central palidamente corada, circundada por uma porção periférica altamente basófila, indicando provavelmente algum processo de secreção.

As células do corpo gorduroso apresentaram-se com o núcleo de tamanho e forma variada, exibindo áreas de eucromatina e heterocromatina bem evidentes. O nucléolo, quando observado, apresentou-se único e esférico, indicando a alta atividade celular. As vesículas apresentaram-se amorfas, com tamanho variado e revestidas por uma membrana.

As secções coradas pelo azul de Toluidina-Borax, mostraram que o tubo digestivo e o corpo gorduroso seguem o padrão morfológico descrito para outros insetos, ou seja,

células cilíndricas do tubo digestivo e células do corpo gorduroso bem desenvolvidas com citoplasma apresentando considerável granulação.

Quando da utilização de azul de Bromofenol, as células do epitélio de revestimento do tubo intestinal apresentaram-se intensamente coradas em azul, indicando a presença de proteínas totais (Figura 4B). O corpo gorduroso apresentou grânulos pequenos corados intensamente em azul, apresentando reação positiva para o corante. No entanto, os grânulos maiores não coraram, indicando ausência das proteínas nestes.

Já as larvas coradas com sulfato azul do Nilo não apresentaram células do tubo intestinal coradas em vermelho, indicando a ausência de lipídios ácidos nesta região. No entanto, os trofócitos, apresentaram grânulos pequenos com a coloração de tonalidade avermelhada, indicando a presença de lipídios ácidos (Figura 4C).

3.3.2.2 Larvas do grupo exposto aos inseticidas

No que se refere às lâminas das larvas que foram submetidas aos inseticidas, verificou-se que houve alterações no tubo intestinal e corpo gorduroso para os diferentes tipos de pesticidas.

3.3.2.2.1 Larvas expostas à concentração de 20ppb de Cipermetrina por 1 hora

A figura 5A mostra, em corte longitudinal, a região mediana do intestino médio, de larvas coradas em HE. Pode ser observado uma mudança na morfologia destas células quando comparadas com as células do grupo controle para a mesma região (Figura 4A). Verificou-se que, uma grande parte das células, apresentou o citoplasma e núcleo mais claros, mostrando cromatina menos densa e nucléolo evidente. Além disso, algumas células apresentaram vesículas secretoras que mostraram uma região central palidamente corada, circundada por uma porção periférica mais basófila. A superfície apical das células do tubo intestinal apresentou a borda em escova com uma coloração mais pálida.

Não se observou alteração no corpo gorduroso, já que os trofócitos apresentaram-se com o núcleo e vesículas lipídicas semelhantes ao do grupo controle. O mesmo padrão morfológico pode ser evidenciado quando as larvas foram submetidas ao corante azul de Toluidina.

Aquelas larvas coradas com azul de Bromofenol apresentaram as células do epitélio de revestimento do tubo intestinal com pouca intensidade de azul, núcleo menos denso e nucléolo mais evidente. A superfície apical das células epiteliais, também mostraram-se mais pálidas. O corpo gorduroso não apresentou grânulos pequenos como o grupamento controle corado em azul, apresentando reação negativa para o corante (Figura 5B).

As larvas coradas com sulfato azul do Nilo mostraram as células do tubo intestinal com padrões morfológicos semelhantes ao grupo controle. No entanto, os trofócitos, apresentaram grânulos pequenos com a coloração de tonalidade azulada, indicando a presença de lipídios neutros (Figura 5C), diferindo do observado nas larvas do grupo controle.

3.3.2.2.2 Larvas expostas à concentração de 30ppb de Deltametrina por 1 hora

O corte longitudinal da região mediana do intestino médio de larvas coradas em HE, mostrado na figura 6, apresenta um padrão morfológico semelhante ao daquelas larvas expostas à concentração de 20ppb de Cipermetrina, porém com um ápice celular apresentando microvilosidades de tamanho menor.

Os trofócitos também apresentaram padrões morfológicos semelhantes ao daquelas larvas expostas ao grupo exposto à solução testada de Cipermetrina.

Os cortes das larvas coradas com azul de Toluidina mostraram padrão morfológico semelhante àqueles cortes corados em HE.

Para o teste histoquímico com azul de Bromofenol, pôde-se notar que as células do epitélio de revestimento do tubo intestinal apresentaram-se com pouca intensidade de azul, com núcleo menos denso e nucléolo mais evidente. A superfície apical das células epiteliais, também mostraram-se mais pálidas, assemelhando-se ao grupo exposto à Cipermetrina (Figura 5B). No entanto, as células do corpo gorduroso apresentaram grânulos pequenos como o grupamento controle, corado em azul, diferindo do grupo exposto à concentração de Cipermetrina.

Para o outro teste histoquímico, as larvas coradas com azul do Nilo mostraram as células do tubo intestinal com padrões morfológicos semelhantes ao grupo controle. No entanto, os trofócitos, apresentaram grânulos pequenos com a coloração de tonalidade azulada, indicando a presença de lipídios neutros, assemelhando-se ao grupo exposto à concentração de Cipermetrina.

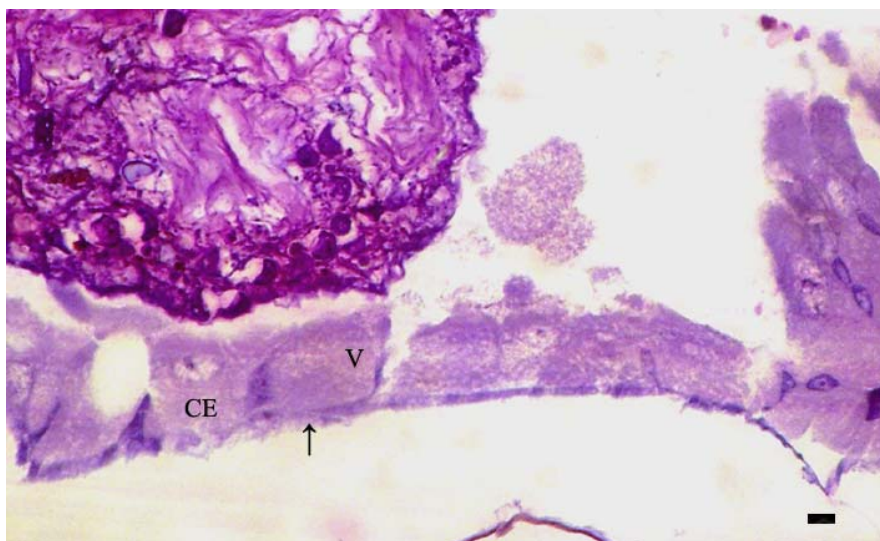


Figura 6: Fotomicrografias da região mediana do intestino médio de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 30ppb de Deltametrina durante 60 minutos e corada por HE. Notar células epiteliais cilíndricas (CE) com microvilos baixos (seta) e várias vesículas na base das células (V). Bar = 1µm

3.3.2.2.3 Larvas expostas à concentração de 50ppb de Temefós por 1 hora

Uma visão geral do intestino médio das larvas expostas à concentração de Temefós coradas em HE e azul de Toluidina, sugere uma mudança na morfologia destas células quando comparadas com as células do grupo controle da mesma região. Verificou-se que, a maioria das células, apresentou o citoplasma cheio de pequenas estruturas esféricas, semelhantes a vacúolos e núcleo palidamente corado em róseo, mostrando cromatina descondensada e nucléolo evidente. O aspecto do tubo intestinal diferiu não só do grupo controle, mas também do grupo exposto às concentrações de piretróides (Figura 7A).

O corpo gorduroso das larvas coradas em HE, mostrou padrão morfológico semelhante ao do grupo controle.

O teste histoquímico realizado com azul de Bromofenol mostrou as células do epitélio de revestimento do tubo intestinal com pouca intensidade de azul, com núcleo menos denso e nucléolo mais evidente (Figura 7B), além de pequenas vesículas não coradas. A superfície apical das células epiteliais, também se mostrou mais pálida. As células do corpo gorduroso não apresentaram grânulos corados em azul, diferindo do grupo controle e daqueles expostos aos piretróides.

As células do tubo intestinal coradas pelo sulfato azul do Nilo apresentaram-se com padrões morfológicos semelhantes ao grupo controle. No entanto, alguns trofócitos, apresentaram grânulos pequenos corados em azul, indicando a presença de lipídios neutros, assemelhando-se aos grupos expostos às concentrações de piretróides.

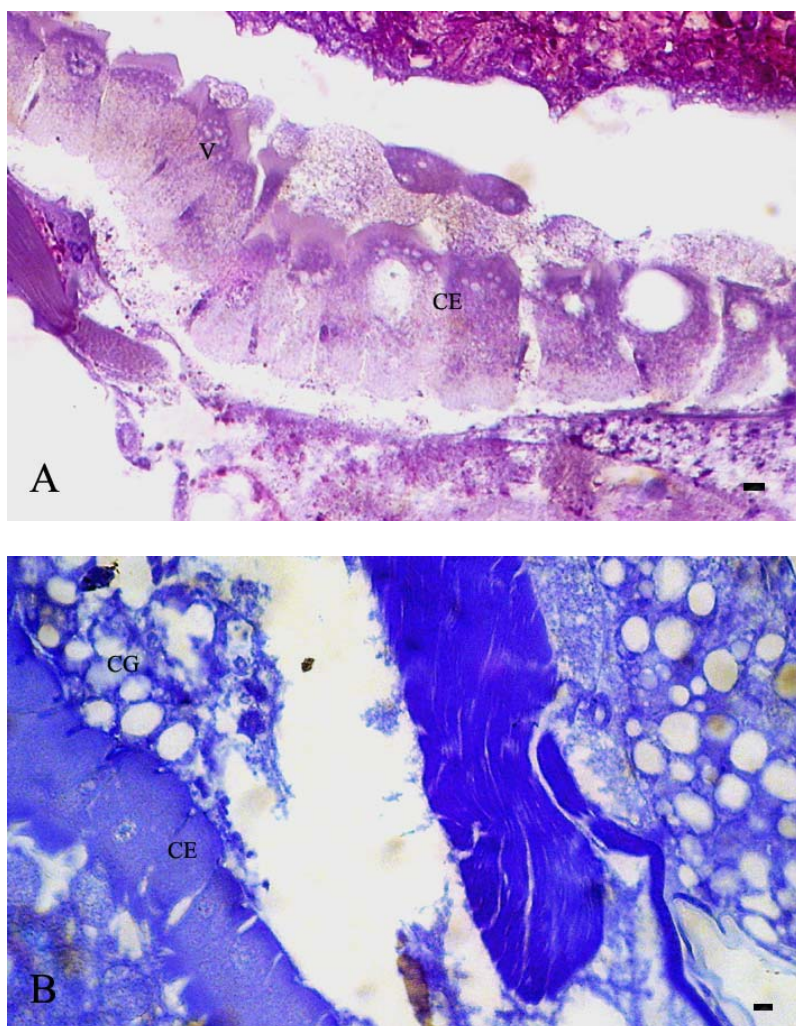


Figura 7: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3^o instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 50ppb de Temefôs durante 60 minutos

A: Região mediana do intestino médio das larvas corada por HE. Notar células epiteliais cilíndricas (CE) com grande número de vesículas na base e no ápice das células (V). Bar = 1μm

B: Região mediana do intestino médio das larvas corada pelo azul de Bromofenol. Notar baixa positividade na base das células epiteliais cilíndricas (CE) e nos trofócitos do corpo gorduroso (CG). Bar = 1μm

3.3.2.2.4 Larvas expostas à concentração de 1,5ppb de Ivermectina por 1 hora

O padrão morfológico da região mediana do intestino médio, mostrado na figura 8A de larvas coradas em HE, difere do grupo controle e dos grupos expostos à piretróides e organofosforados. As células epiteliais estão mais altas e sem nenhuma vesícula secretora como apresentado no grupo exposto ao Temefós. No entanto apresentam citoplasma mais claro e núcleo com cromatina mais descondensada e nucléolo pouco evidente.

O mesmo padrão morfológico pode ser evidenciado quando as larvas foram submetidas ao corante azul de Toluidina.

Para o teste histoquímico com azul de Bromofenol, pôde-se notar que as células do epitélio de revestimento do tubo intestinal apresentaram-se com pouca intensidade de azul, com núcleo menos denso e nucléolo mais evidente, assemelhando-se aos grupos expostos aos piretróides. As células do corpo gorduroso apresentaram granulações coradas em azul, sendo as menores com coloração mais intensa, diferindo dos demais grupos (Figura 8B).

As células do tubo intestinal das larvas coradas pelo sulfato azul do Nilo mostraram-se com epitélio alto, sem nenhum tipo especial de lipídios. No entanto, o corpo gorduroso apresentou trofócitos com pequenas granulações coradas em azul, indicando lipídios neutros. As granulações azuladas mostraram-se semelhantes àquelas evidenciadas para os grupos tratados com piretróides e organofosforado.

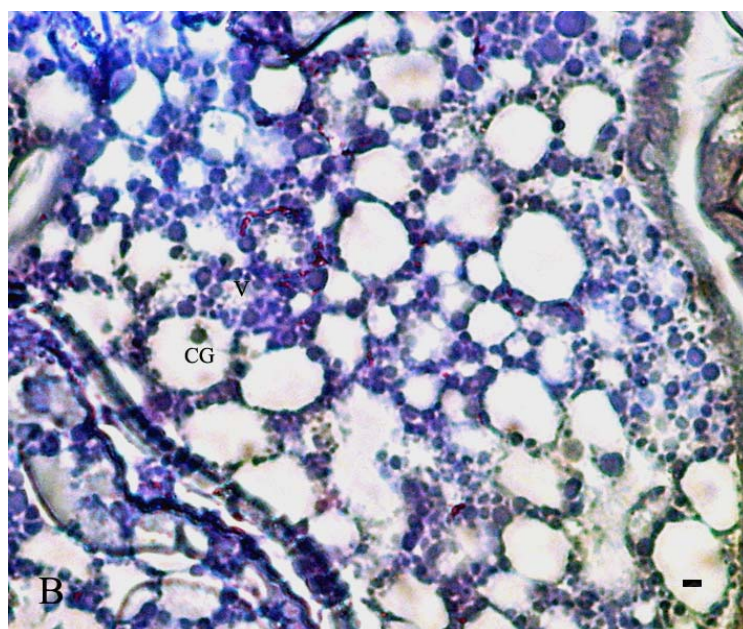
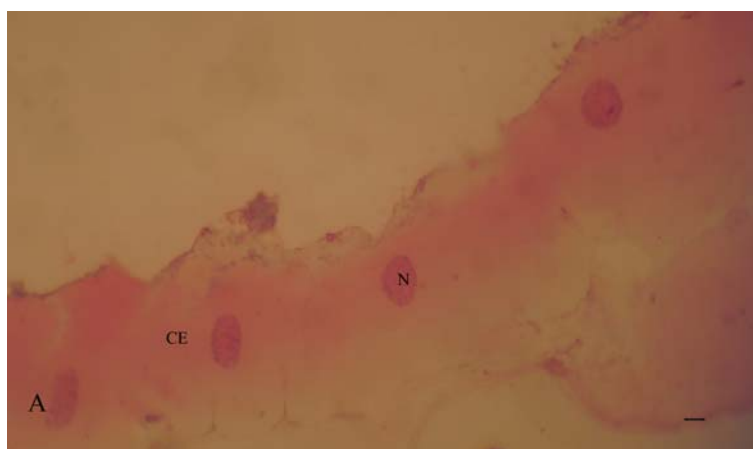


Figura 8: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3^o instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 1,5ppb de Ivermectina durante 60 minutos

A: Região mediana do intestino médio das larvas corada por HE. Notar células epiteliais cilíndricas (CE) com núcleo basófilo (N). Bar = 1 μ m

B: Região do corpo gorduroso das larvas corada pelo azul de Bromofenol. Notar reação positiva nos trofócitos do corpo gorduroso (CG) e grande quantidade de vesículas (V). Bar = 1 μ m

3.3.2.2.5 Larvas expostas à concentração de 54ppb de Abamectina por 1 hora

A figura 9A mostra um corte transversal, corado em HE, da região mediana do intestino médio, evidenciando células epiteliais cilíndricas com a borda em escova nítida, com citoplasma e núcleo mais acidófilos, com cromatina condensada e nucléolo pouco evidente. Nesta figura também, pode-se observar que as células do corpo gorduroso apresentaram-se com granulações pequenas mais acidófilas que os demais grupos.

O mesmo padrão morfológico pode ser evidenciado quando as larvas foram submetidas ao corante azul de Toluidina.

Pode-se notar que as células do epitélio de revestimento do tubo intestinal quando corado pelo azul de Bromofenol, mostraram-se com a superfície apical intensamente corada em azul, assemelhando-se ao grupo controle. O núcleo também mostrou-se muito corado, assim como o grupo controle. Os trofócitos apresentaram-se fracamente corados em azul e com granulações pequenas pouco evidentes, quando comparadas às do grupo controle (Figura 9B).

No teste com sulfato azul do Nilo as células do tubo intestinal mostraram-se com epitélio alto, sem nenhum tipo especial de lipídios. As células do corpo gorduroso apresentaram granulações coradas em azul, indicando lipídios neutros, assim como os grupos expostos às demais concentrações de inseticidas testados.

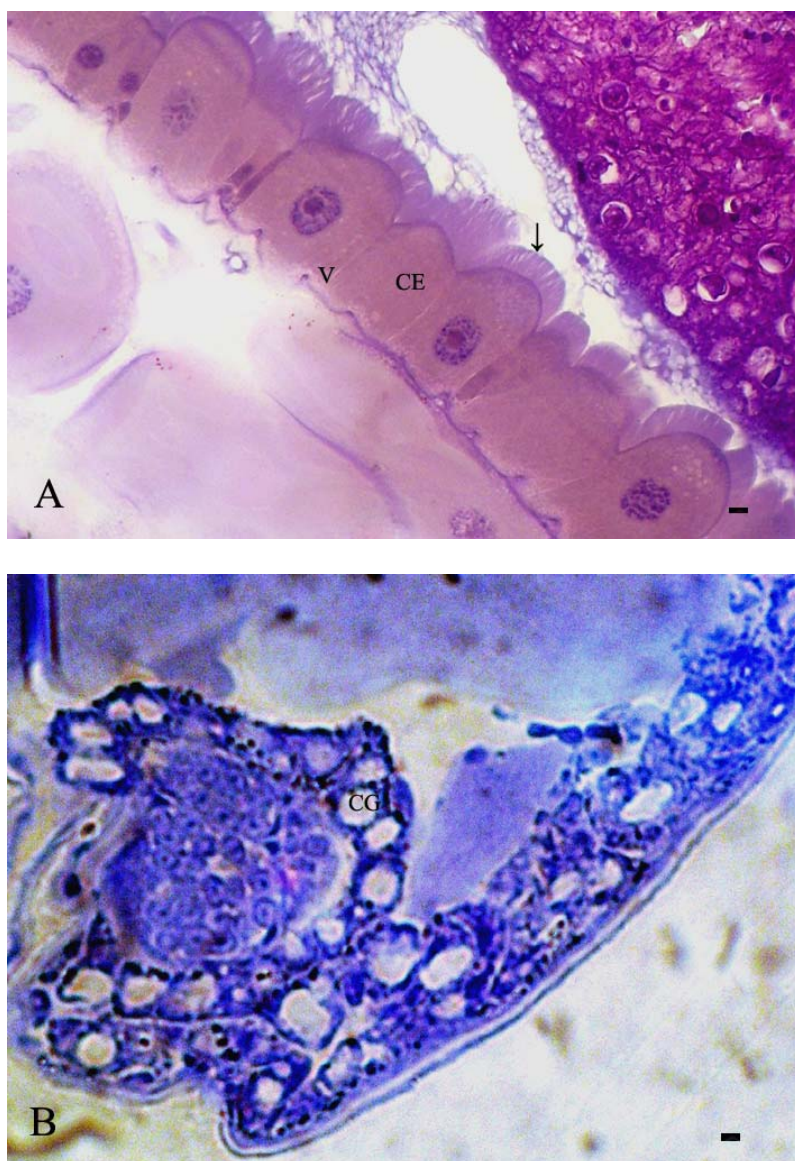


Figura 9: Fotomicrografias de cortes em resina de larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposto a 54ppb de Abamectina durante 60 minutos

A: Região mediana do intestino médio das larvas corada por HE. Notar células epiteliais cilíndricas (CE) com microvilosidades (seta) e vesículas na base das células (V). Bar = 1µm

B: Região do corpo gorduroso das larvas corada pelo azul de Bromofenol. Notar reação positiva nos trofócitos do corpo gorduroso (CG). Bar = 1µm

3.3.3 Análise morfológica das larvas em microscopia eletrônica de transmissão

Os cortes ultrafinos da região mediana do intestino médio das larvas do grupo controle evidenciaram uma membrana peritrófica íntegra, assim como todos os outros grupos expostos às concentrações dos inseticidas (Figura 10).

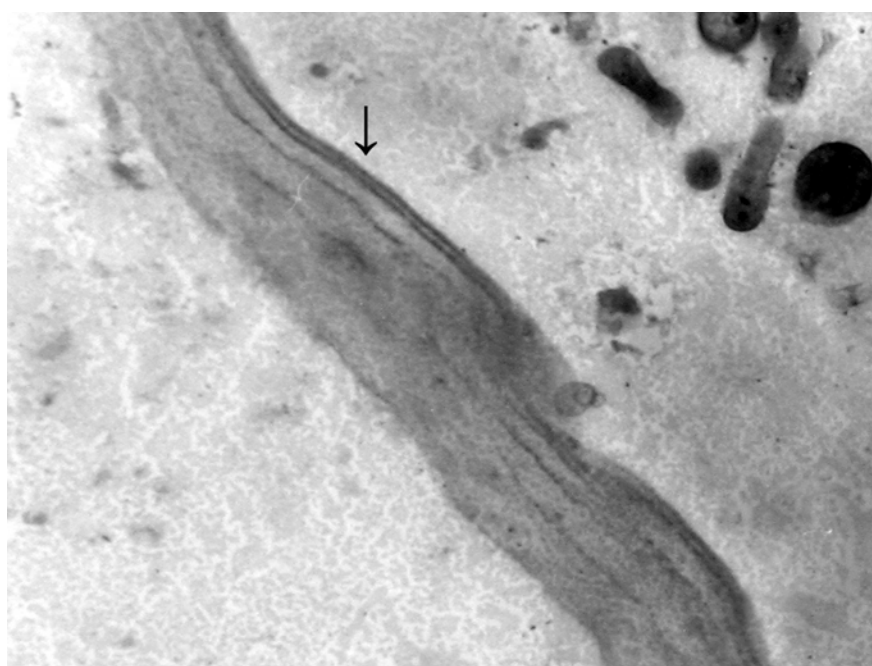


Figura 10: Eletromicrografia da membrana peritrófica do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* exposta à concentração de 30ppb de Deltametrina durante 60 minutos. Notar a integridade da membrana (seta). 4900X

As células do corpo gorduroso apresentaram-se íntegras, com núcleo evidenciando eucromatina e heterocromatina. As vesículas de lipídios apresentaram-se íntegras, de tamanho e forma variada e com membranas bem evidentes, assim como os demais grupos expostos aos inseticidas (Figura 11).

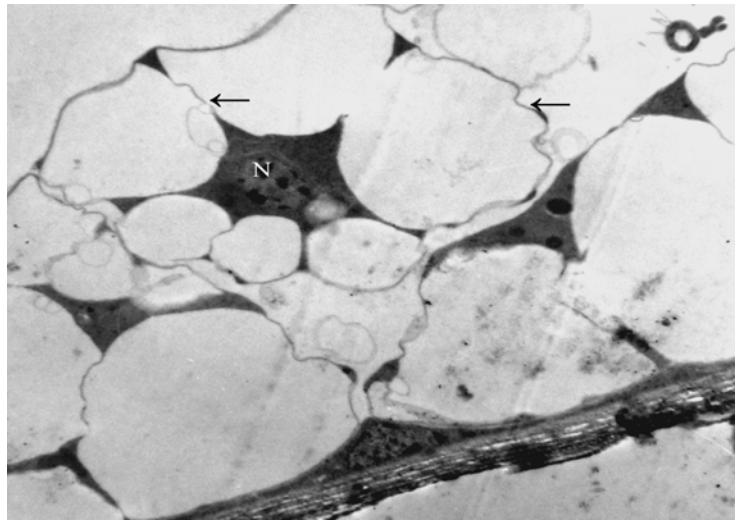


Figura 11: Eletromicrografia de trofócito no corpo gorduroso de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 20ppb de Cipermetrina durante 60 minutos. Notar a integridade das membranas (setas) e do núcleo (N) destas células. 1750X

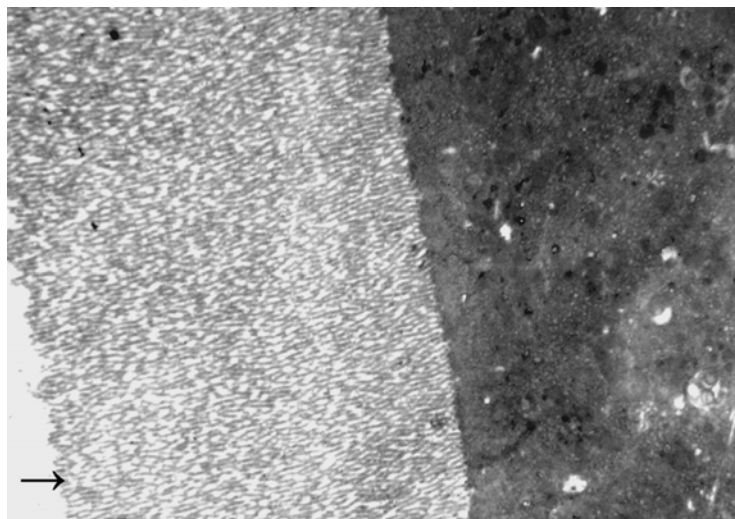


Figura 12: Eletromicrografia do ápice de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo controle. Detalhe das microvilosidades muito desenvolvidas (seta). 1750X

3.3.3.1 Larvas expostas à concentração de 20ppb de Cipermetrina por 1 hora

O núcleo das células epiteliais apresentou-se de forma esférica, evidenciando áreas de eucromatina e heterocromatina e nucléolo distinto (Figura 13).

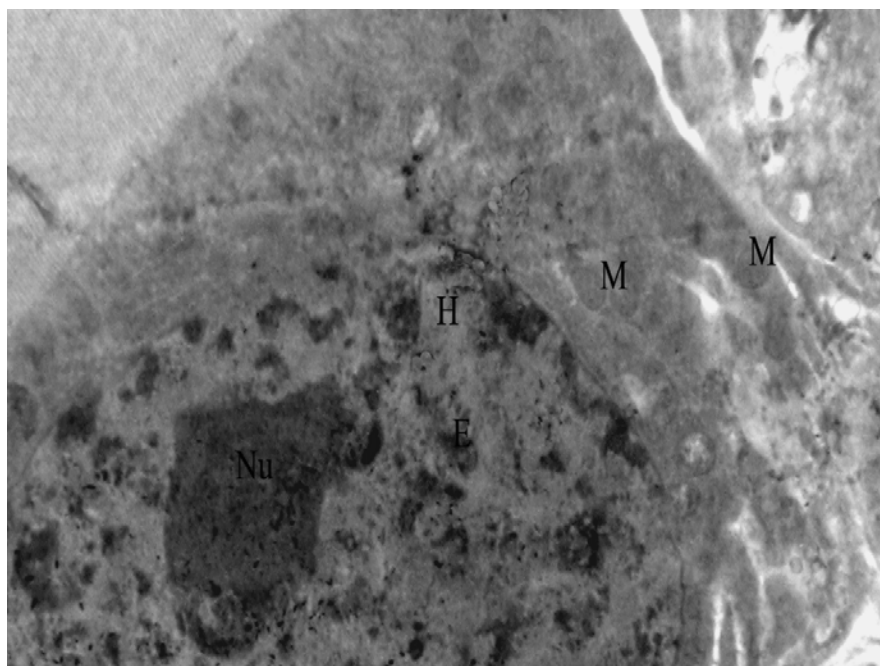


Figura 13: Eletromicrografia de célula do epitélio do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 20ppb de Cipermetrina durante 60 minutos. Detalhe do núcleo evidenciando áreas de eucromatina (E) e heterocromatina (H) e nucléolo (Nu) distinto, além de várias mitocôndrias (M). 3200X

A região basal das células apresentou-se caracterizada por grande quantidade de invaginações da membrana plasmática com vesículas grandes e esféricas. A parte apical das células apresentou pequena diminuição no tamanho das microvilosidades, mas com vesículas entre eles, demonstrando a função secretora destas células epiteliais. Observaram-

se também as estruturas juncionais septadas unindo duas membranas adjacentes de células epiteliais vizinhas, impedindo o tráfego de substâncias pelos espaços intercelulares, bastante comum em células epiteliais de insetos, assim como uma grande quantidade de mitocôndrias no ápice das células epiteliais do intestino médio (Figura 14).

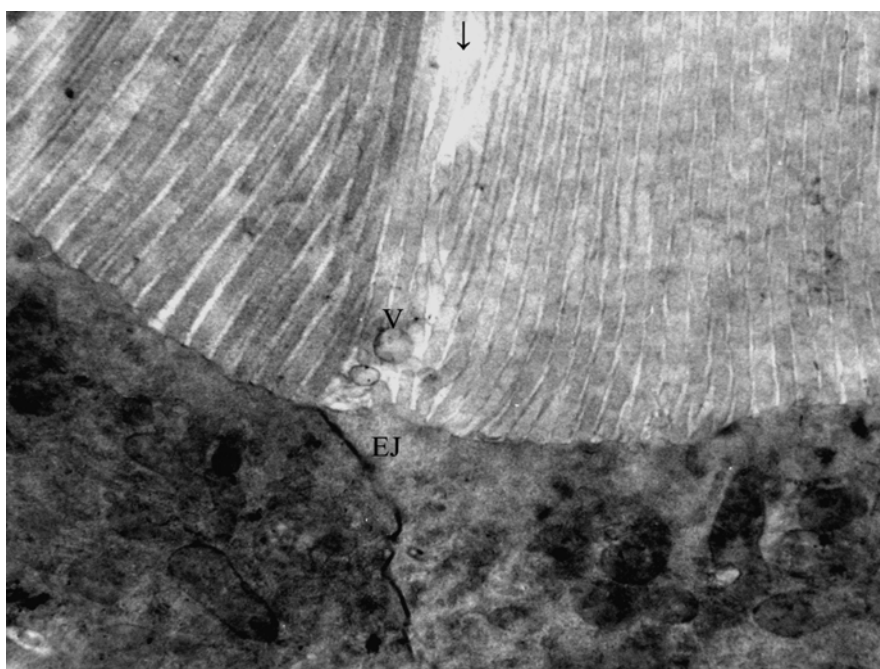


Figura 14: Eletromicrografia do ápice de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 20ppb de Cipermetrina durante 60 minutos. Detalhe das microvilosidades muito desenvolvidas (seta), das vesículas secretoras (V) e das estruturas juncionais (EJ). 9450X

3.3.3.2 Larvas expostas à concentração de 30ppb de Deltametrina por 1 hora

As células apresentaram, na região basal, uma maior quantidade de vesículas pequenas e translúcidas, quando comparado ao grupo exposto ao outro piretróide. Na parte

apical, as células mostraram-se mais baixas, assim como os microvilos, porém, estes se apresentaram mais eletrondensos (Figura 15). Entretanto, a quantidade de mitocôndrias nas células do epitélio do intestino médio, é grande, assim como nas células epiteliais do intestino das larvas expostas à Cipermetrina. Observaram-se também as estruturas juncionais septadas unindo duas membranas adjacentes de células epiteliais vizinhas, assim como nas células do epitélio intestinal das larvas expostas à Cipermetrina. Além disso, observou-se um aumento de dobras na membrana basal para as larvas expostas à Deltametrina.

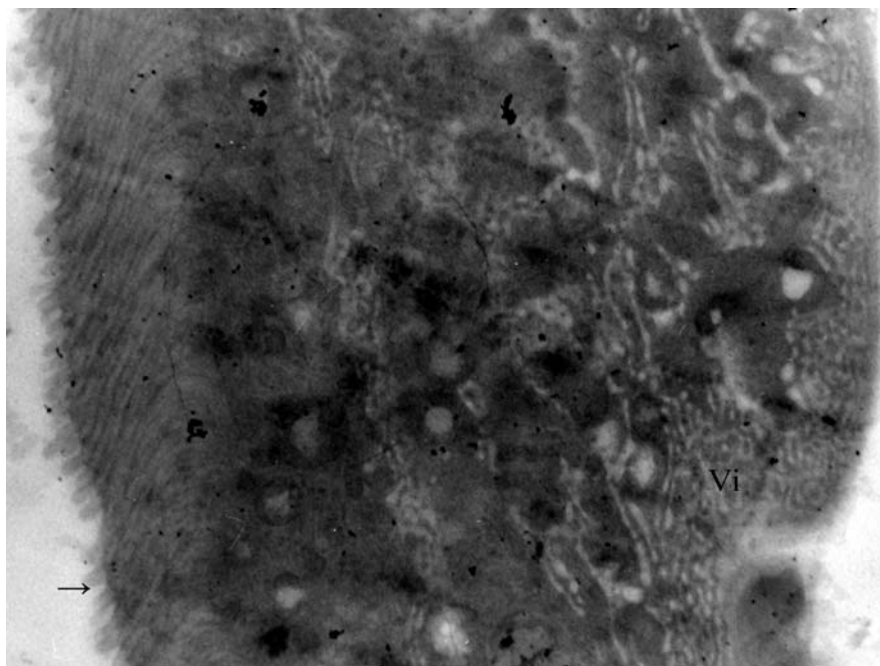


Figura 15: Eletromicrografia de célula epitelial do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 30ppb de Deltametrina durante 60 minutos. Detalhe dos microvilos eletrondensos e pouco desenvolvidos (seta), do grande número de vesículas no interior celular (Vi). 4900X

3.3.3.3 Larvas expostas à concentração de 50ppb de Temefós por 1 hora

As células epiteliais evidenciaram o núcleo como o grupo controle, porém uma parte apical com microvilosidade baixa e uma parte basal com um número grande de invaginações e vesículas translúcidas (Figura 16). As estruturas juncionais apresentaram-se íntegras e bem evidenciadas. Observou-se também que há maior quantidade de mitocôndrias no ápice das células epiteliais quando comparada com o grupo controle. Além disso, observou-se um aumento de dobras na membrana basal para as larvas expostas ao Temefós assim como aquelas expostas à Deltametrina.

As células epiteliais mostram-se com núcleo denso e bem evidente, com um ápice celular com microvilosidades altas e uma parte basal com invaginações e vesículas translúcidas (Figura 17). As células epiteliais do intestino médio apresentam-se mais baixas do que aquelas observadas no epitélio intestinal do grupo controle. Assim como os demais grupos expostos aos inseticidas, apresentou-se com grande quantidade de mitocôndrias e estruturas juncionais íntegras.

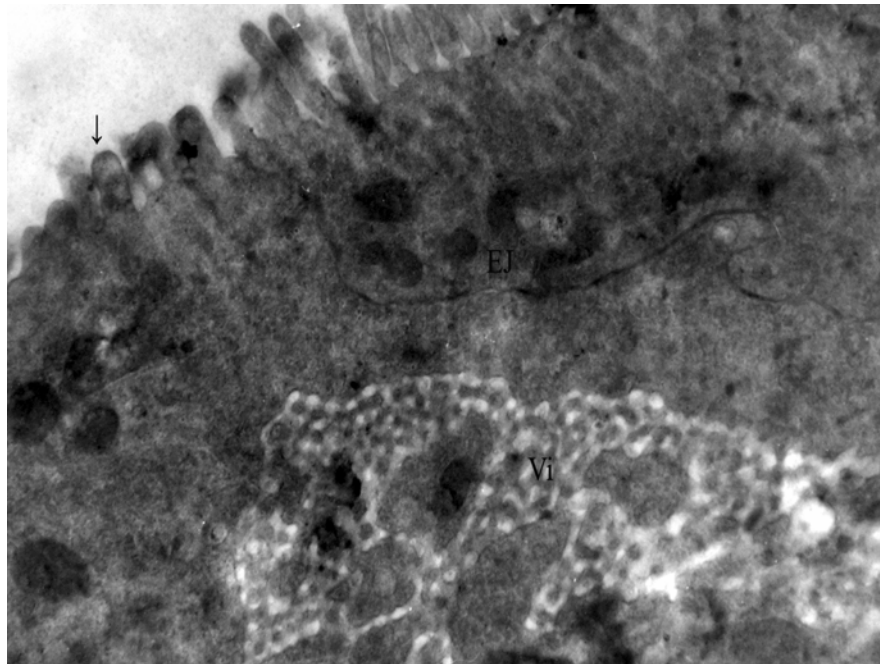


Figura 16: Eletromicrografia de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 50ppb de Temefós durante 60 minutos. Notar o baixo desenvolvimento dos microvilos (seta) parte basal com um número grande de invaginações e vesículas translúcidas (Vi) e as estruturas juncionais (EJ). 9450X

3.3.3.4 Larvas expostas à concentração de 1,5ppb de Ivermectina por 1 hora

As células epiteliais mostram-se com núcleo denso e bem evidente, com um ápice celular com microvilosidades altas e uma parte basal com invaginações e vesículas translúcidas (Figura 17). As células epiteliais do intestino médio apresentam-se mais baixas do que aquelas observadas no epitélio intestinal do grupo controle. Assim como os demais grupos expostos aos inseticidas, apresentou-se com grande quantidade de mitocôndrias e estruturas juncionais íntegras.

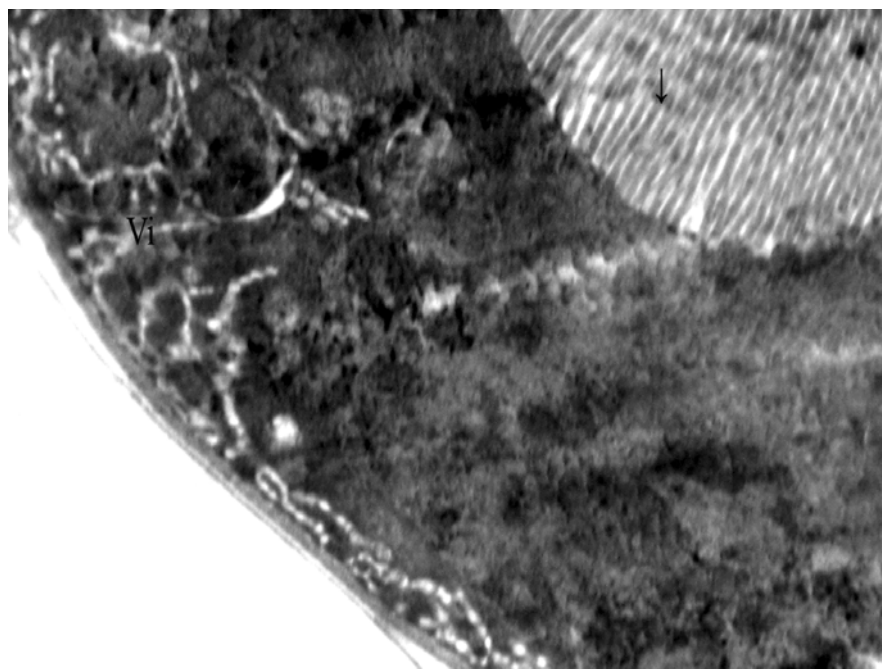


Figura 17: Eletromicrografia de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 1,5ppb de Ivermectina durante 60 minutos. Notar o desenvolvimento dos microvilos (seta) parte basal com um número grande de invaginações e vesículas translúcidas (Vi). 4900X

3.3.3.5 Larvas expostas à concentração de 54ppb de Abamectina por 1 hora

A parte apical do epitélio, mostrou-se com microvilos baixos, assim como alguns outros grupos tratados (Figura 18). Porém, evidenciou-se um número muito grande de invaginações na parte basal destas células, além de um citoplasma mais eletrondenso. As células epiteliais do intestino médio apresentam alterações na quantidade de mitocôndrias, como nos demais grupos expostos aos inseticidas. Estas células apresentaram também estruturas juncionais íntegras. Observou-se também um aumento de dobras na membrana basal para as larvas expostas à Deltametrina.

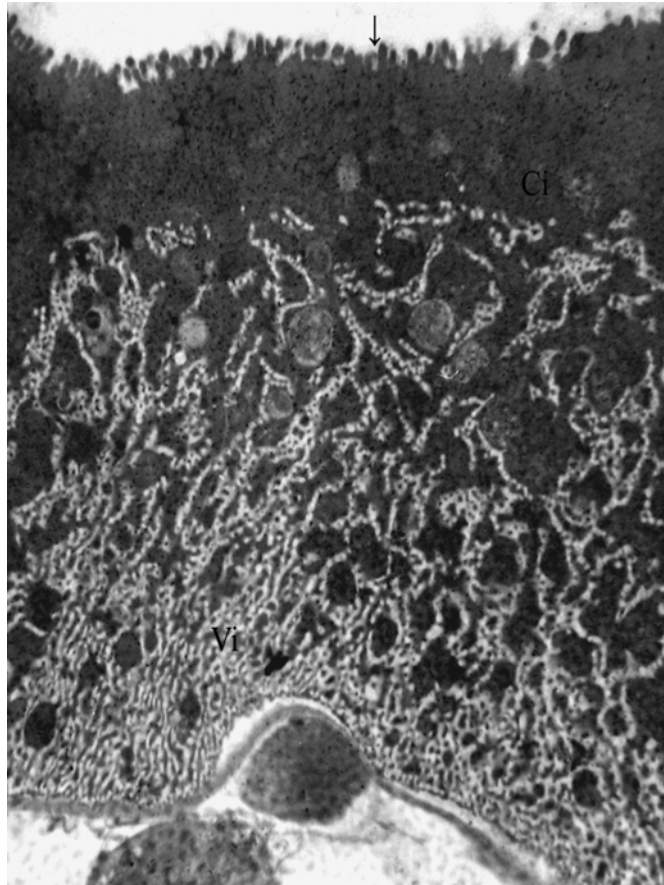


Figura 18: Eletromicrografia de células epiteliais do intestino médio de larva de 3º instar de *C. quinquefasciatus* do grupo exposta à concentração de 54ppb de Abamectina durante 60 minutos. Notar o baixo desenvolvimento dos microvilos (seta) parte basal com um número muito elevado de invaginações e vesículas translúcidas (Vi), além de um citoplasma mais eletrondenso (Ci). 2200X

3.4 Parâmetros biológicos dos insetos após exposição das larvas aos inseticidas

As fêmeas do grupo controle fizeram postura 27 dias após a emergência da pupa. As fêmeas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós e 54ppb de Abamectina fizeram a postura dos ovos 21, 24 e 19 dias, respectivamente, após a emergência das pupas. A oviposição das fêmeas originadas do grupo exposto à solução de 1,5ppb de Ivermectina variou entre 28 e 30 dias após a emergência. Fêmeas originadas de larvas expostas à 30ppb de Deltametrina não fizeram nenhuma postura durante as suas vidas.

O número total de posturas por fêmeas foi maior no grupo dos adultos gerados a partir de larvas submetidas à solução de 20ppb de Cipermetrina, que os demais grupos (Tabela 9).

Tabela 9: Número de ovos e postura dos grupos controle e tratados para adultos de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina

Grupo	Nº de postura	Varição de ovos/postura	Total de ovos
Controle	3	173 – 203	574
Cipermetrina	4	211 - 255	946
Deltametrina	0	-	0
Temefós	2	201 - 225	426
Ivermectina	3	198 - 252	671
Abamectina	2	193 - 199	392

Na Tabela 10 estão representados os valores do teste *t* com cálculo de variâncias separadas para a média do número de ovos por postura dos grupos controle e tratados para adultos emergentes das larvas expostas às respectivas soluções de inseticidas. O cálculo

com variâncias separadas foi necessário, pois o teste de homogeneidade de variâncias foi significativo, o que implica numa diferença das variâncias entre os grupos controle e tratados, já que o número total de posturas por fêmeas foi diferente entre os grupos.

Tabela 10: Teste *t* com cálculo de variâncias separadas para a média do número de ovos por postura para adultos de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas do grupo controle e daquelas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 54ppb de Abamectina e 1,5ppb de Ivermectina

Relação entre os Grupos	Média de ovos do grupo 1*	Média de ovos do grupo 2**	<i>t</i>	gl	<i>p</i>
Controle* x Cipermetrina**	191,3	236,5	-3,3419	5	0,0205
Controle* x Temefós**	191,3	213	-1,4492	3	0,2431
Controle* x Ivermectina**	191,3	223,7	-1,7775	4	0,1501
Controle* x Abamectina**	191,3	196	-0,3829	3	0,7273
Cipermetrina* x Temefós**	236,5	213	1,4842	4	0,2119
Cipermetrina* x Ivermectina**	236,5	223,7	0,7488	6	0,4877
Cipermetrina* x Abamectina**	236,5	196	2,8633	4	0,0458
Temefós* x Ivermectina**	213	223,7	-0,4829	3	0,6622
Temefós* x Abamectina**	213	196	1,3747	2	0,3031
Ivermectina* x Abamectina**	223,7	196	1,3615	3	0,2666

Na tabela 11 estão representados os valores do teste *t* para a duração, em dias, do ciclo aquático dos grupos controle e tratados após a oviposição das fêmeas emergentes das larvas expostas às soluções de 20ppb de Cipermetrina, 30ppb de Deltametrina, 50ppb de Temefós, 1,5 ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina. Observa-se que os valores de *p* não mostram diferenças significativas entre os grupos controle e tratados e nem na interação entre os grupos tratados.

Tabela 11: Teste *t* com cálculo de variâncias separadas para a média da duração de larva à adulto após oviposição das fêmeas de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas do grupo controle e daquelas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina

Relação entre os Grupos	Média do ciclo do Grupo 1 em dias*	Média do ciclo do Grupo 2 em dias**	<i>t</i>	gl	<i>p</i>
Controle* x Cipermetrina**	12,5	13,5	-0,1754	2	0,8769
Controle* x Temefós**	12,5	11	0,2491	2	0,8265
Controle* x Ivermectina**	12,5	12	0,0830	2	0,9414
Controle* x Abamectina**	12,5	14	-0,2774	2	0,8075
Cipermetrina* x Temefós**	13,5	11	0,4704	2	0,6844
Cipermetrina* x Ivermectina**	13,5	12	0,2823	2	0,8043
Cipermetrina* x Abamectina**	13,5	14	-0,1085	2	0,9236
Temefós* x Ivermectina**	11	12	-0,1768	2	0,8759
Temefós* x Abamectina**	11	14	-0,6	2	0,6094
Ivermectina* x Abamectina**	12	14	-0,4	2	0,7278

A tabela 12 mostra a análise do teste *t* sobre o número de adultos emergidos a partir dos ovos colocados por fêmeas originadas de larvas expostas aos grupos controle e tratados. Observa-se efeito significativo na interação entre o grupo controle e aquele exposto à solução de 20ppb de Cipermetrina e na interação entre os grupos expostos aos inseticidas Cipermetrina e Temefós, e Cipermetrina e Abamectina.

O gráfico 8 mostra o percentual de adultos emergidos a partir dos ovos colocados por fêmeas originadas de larvas expostas aos grupos controle e tratados. Pode-se perceber que o maior percentual de adultos emergidos foi do grupo controle. Percebe-se também que entre os grupos tratados, o maior número de adultos originados das larvas foi daquele exposto à 20ppb de Cipermetrina no período de 60 minutos.

Tabela 12: Teste *t* com cálculo de variâncias separadas para a média para o número de adultos emergidos após oviposição das fêmeas de *C. quinquefasciatus* emergentes das larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina

Relação entre os Grupos	Média de adultos do Grupo 1*	Média de adultos do Grupo 2**	<i>t</i>	gl	<i>P</i>
Controle* x Cipermetrina**	180,3	216,5	-2,8716	5	0,0349
Controle* x Temefós**	180,3	184,5	-0,3036	3	0,7814
Controle* x Ivermectina**	180,3	199	-1,1372	4	0,3189
Controle* x Abamectina**	180,3	153,5	2,3455	3	0,1007
Cipermetrina* x Temefós**	216,5	184,5	2,2067	4	0,0919
Cipermetrina* x Ivermectina**	216,5	199	1,1291	5	0,3101
Cipermetrina* x Abamectina**	216,5	153,5	4,8137	4	0,0086
Temefós* x Ivermectina**	184,5	199	-0,741	3	0,5124
Temefós* x Abamectina**	184,5	153,5	2,8721	2	0,1029
Ivermectina* x Abamectina**	199	153,5	2,5233	3	0,0859

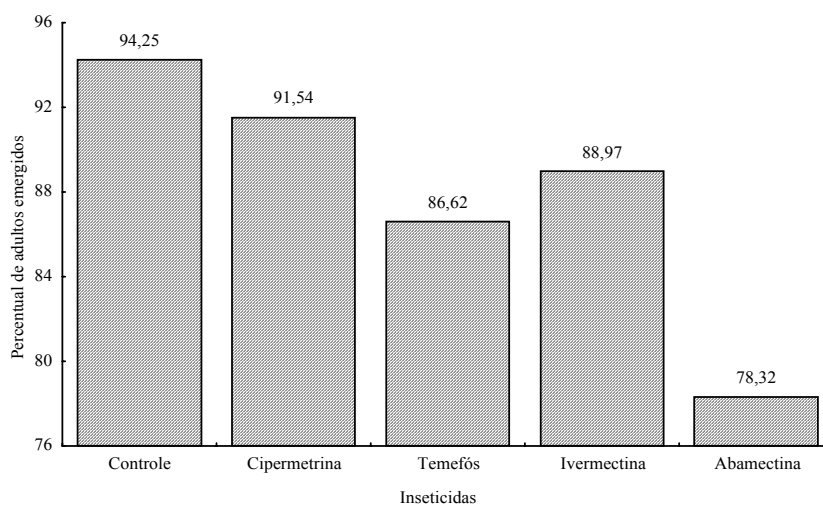


Gráfico 8: Percentual de adultos emergidos a partir de ovos colocados pelas fêmeas de *C. quinquefasciatus* originadas de larvas do grupo controle e larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina, 50ppb de Temefós, 1,5ppb de Ivermectina e 54ppb de Abamectina por 60 minutos

3.5 Análise da efetividade das telas impregnadas com derivados da avermectina sobre larvas

A Tabela 13 mostra um teste estatístico para observação do efeito letal das telas impregnadas com os derivados da avermectina sob as larvas.

Tabela 13: Teste t para duas amostras presumindo variâncias diferentes para observação do efeito letal das telas impregnadas com os derivados da avermectina sob larvas de *C. quinquefasciatus* por um período de 1 hora e observações feitas após 24 e 48 horas

Inseticida e Tempo após exposição	Controle 24-48h	Abamectina 24h	Ivermectina 24h	Abamectina 48h	Ivermectina 48h
Média	0,1	6,2	14,2	17,6	21,1
Variância	0,1	8,63	108,84	149,16	276,1
Observações	10	10	10	10	10
P(T<=t) uni-caudal		< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
t crítico uni-caudal		1,83	1,83	1,83	1,83

Pode-se perceber, no gráfico 9, que a mortalidade foi decaindo ao longo dos 10 dias de observação e o maior efeito da Ivermectina nas 48 horas seguintes ao início do experimento. Fato este que se assemelha aos resultados dos testes de suscetibilidade larval.

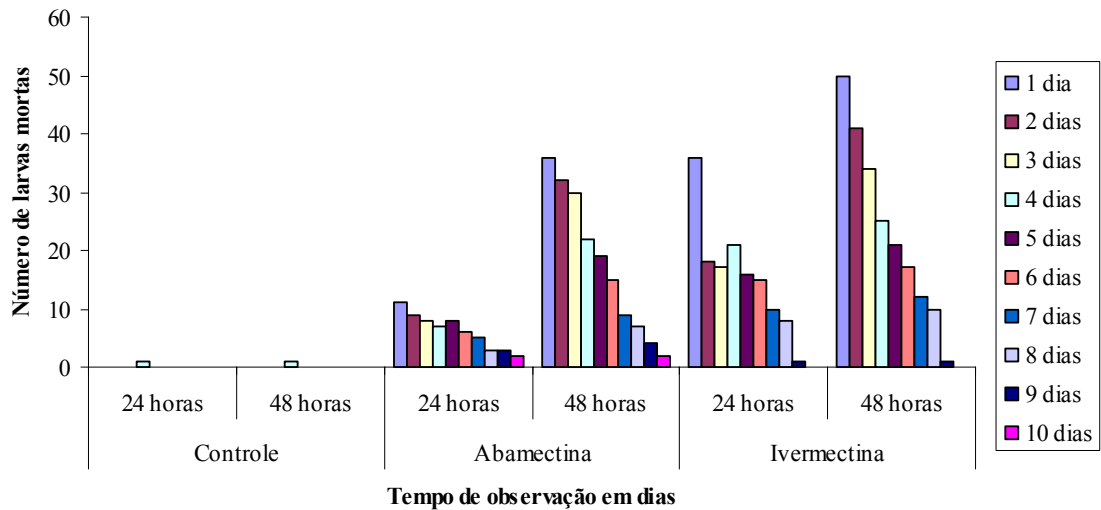


Gráfico 9: Número de larvas de *C. quinquefasciatus* mortas após exposição à solução de água e rede impregnada com 10ppm de Ivermectina ou 18ppm de Abamectina por um período de 1 hora e observações feitas após 24 e 48 horas durante 10 dias

3.6 Análise da exposição dos adultos à tela impregnada com derivados da avermectina

A exposição dos adultos à tela impregnada com derivados da avermectina não apresentou efeito significativo sobre os insetos, apesar de mostrar diferenças de mortalidade entre os inseticidas (Gráfico 10).

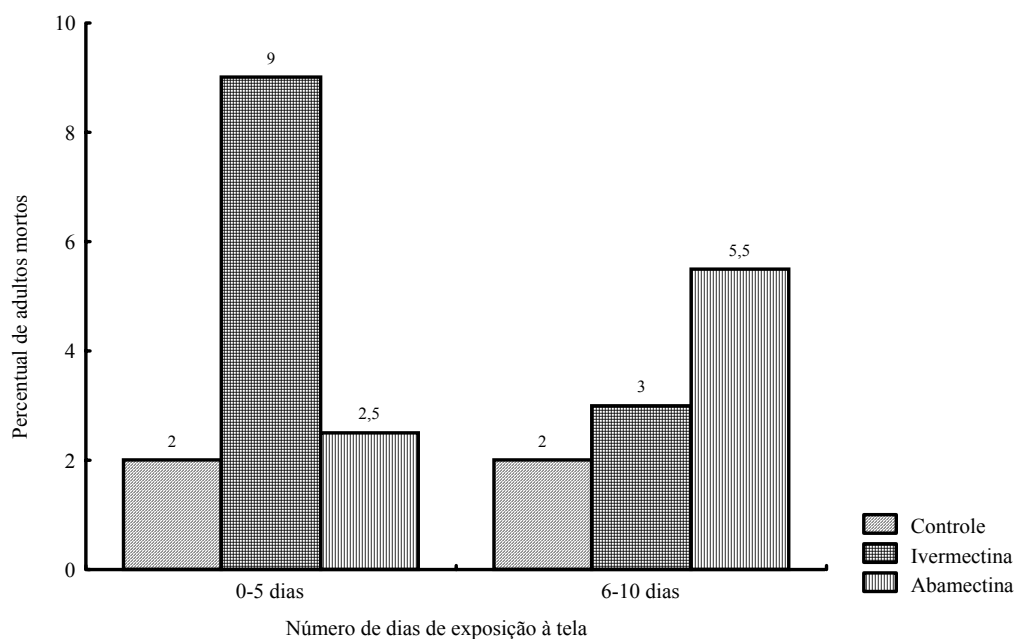


Gráfico 10: Número de adultos de *C. quinquefasciatus* mortos após exposição à tela impregnada com 10ppm de Ivermectina e 18ppm de Abamectina durante 10 dias

3.7 Assimetria flutuante

3.7.1 Análise da assimetria flutuante das asas dos adultos após as larvas serem expostas aos inseticidas

Nenhum dos caracteres estudados apresentaram assimetria direcional ou assimetria ligada ao tamanho (Gráficos 11 a 16) e todos apresentaram distribuição normal.

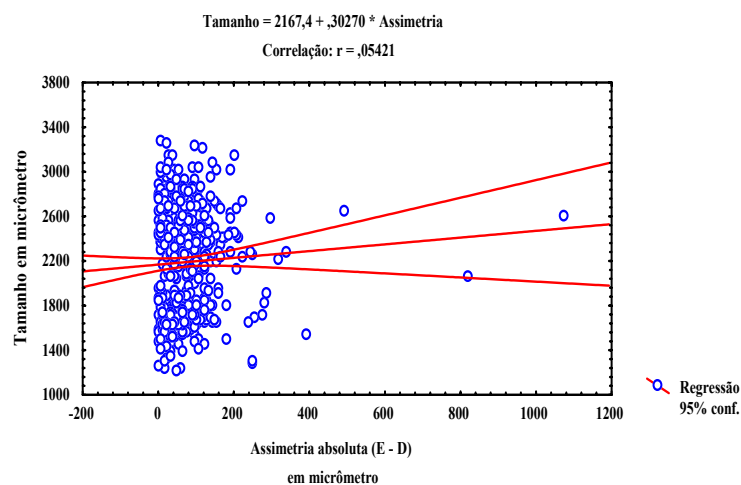


Gráfico 11: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₁ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos

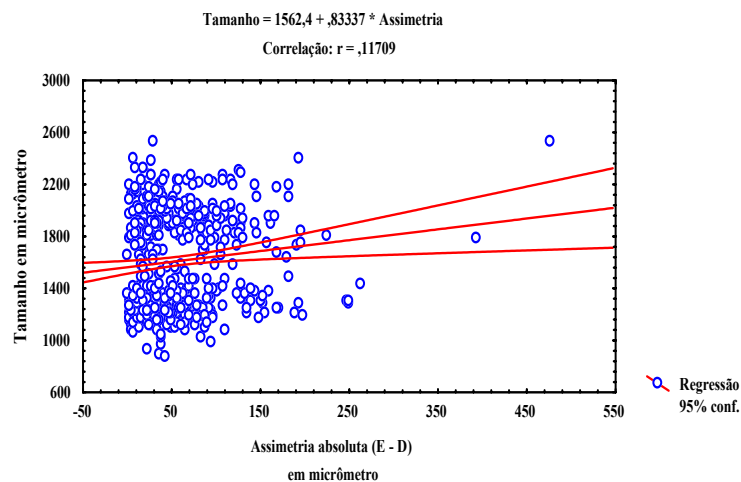


Gráfico 12: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₂ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos.

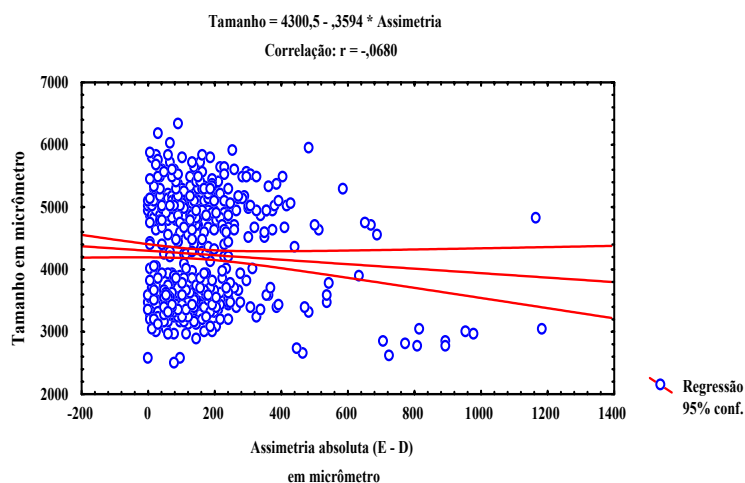


Gráfico 13: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos

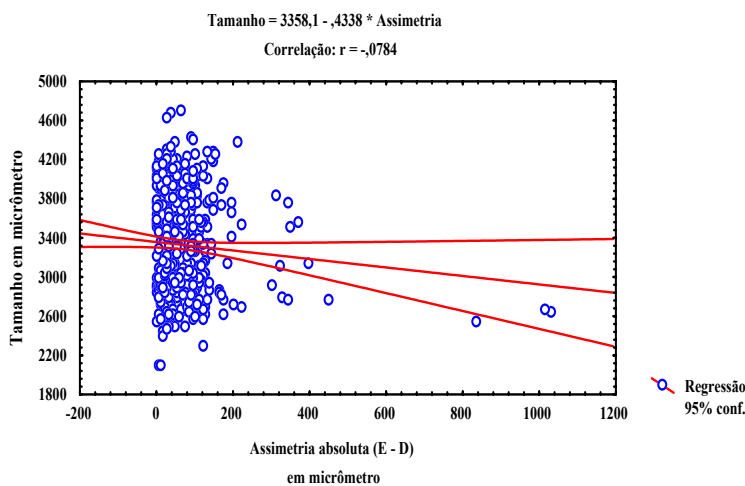


Gráfico 14: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos

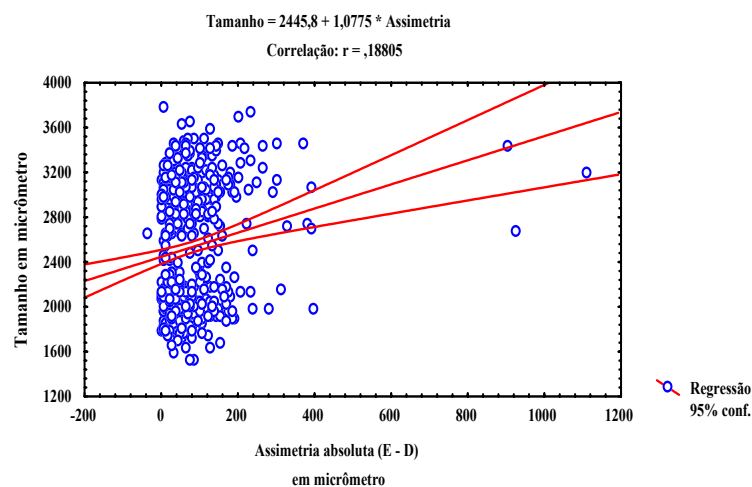


Gráfico 15: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R₃ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos

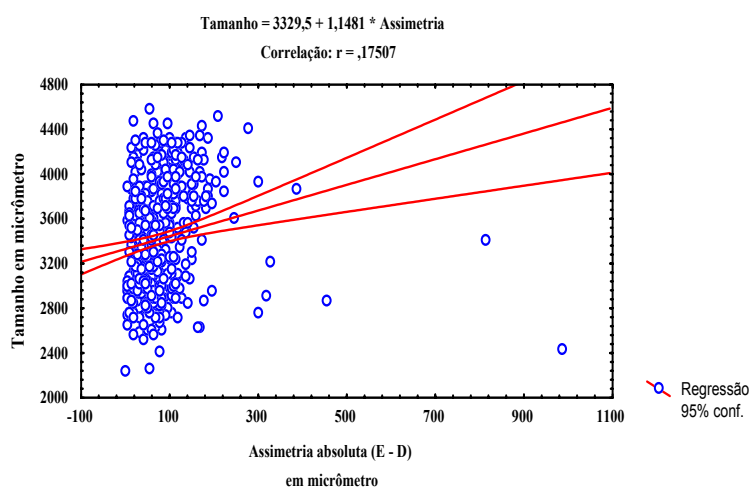


Gráfico 16: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R₄₊₅ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval às soluções dos inseticidas durante um período de 60 minutos

A AF variou entre os sexos e entre os grupos tratados e controle. A tabela 14 mostra os dados referentes à análise de variância entre os efeitos do tratamento e do sexo e de suas interações. O parâmetro da nervura M_{3+4} não teve efeito significativo.

Tabela 14: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas às soluções dos diferentes inseticidas utilizados por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação

Parâmetro	Efeito	F	<i>p</i>
M_1	T	1,394	0,235
	S	4,768	0,029*
	I	1,397	0,234
M_2	T	0,866	0,484
	S	4,588	0,033*
	I	1,609	0,171
M_{3+4}	T	0,361	0,836
	S	1,422	0,234
	I	1,098	0,357
Perímetro M_1M_2	T	2,362	0,052**
	S	0,0003	0,985
	I	9,009	> 0,001*
R_3	T	0,337	0,853
	S	8,273	0,004*
	I	1,197	0,311
R_{4+5}	T	0,807	0,521
	S	19,863	> 0,001*
	I	2,933	0,020*

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,10$

3.7.1.1 Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante

O efeito do sexo no parâmetro AF variou quando se observou as nervuras M_1 , M_2 , R_3 e R_{4+5} , que apresentaram maior assimetria absoluta nas fêmeas, independente do grupo controle ou tratado, como mostrado nos Gráficos 17 a, b e 18 a, b.

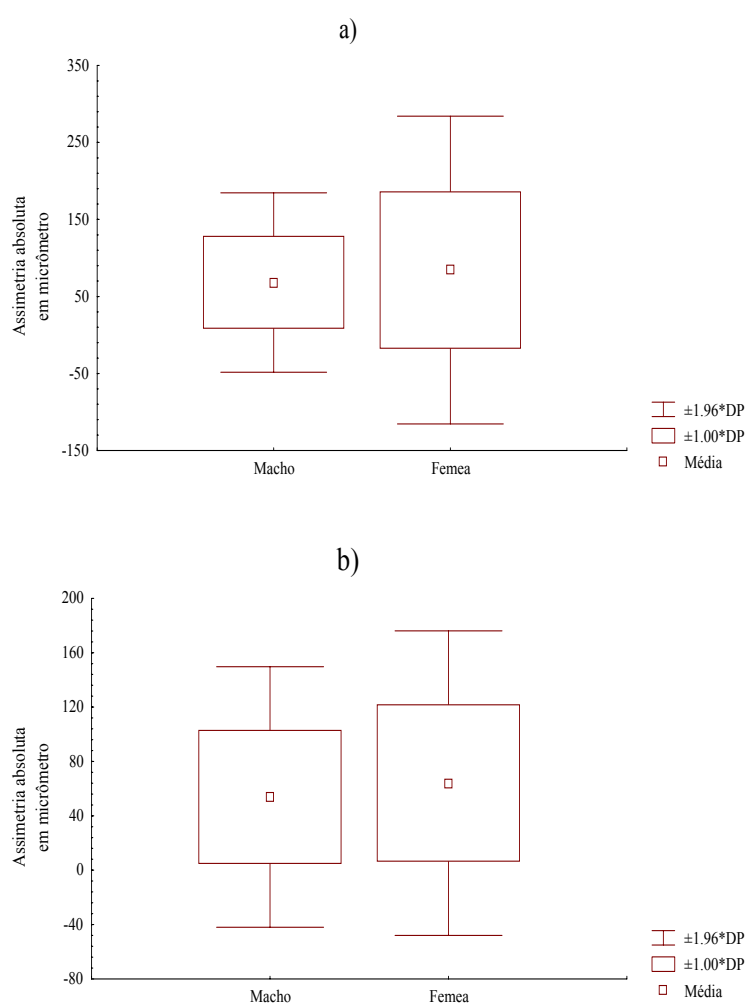


Gráfico 17: Assimetria absoluta das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* tendo o sexo como efeito principal. **a)** Nervura M_1 com $p < 0,029$; **b)** Nervura M_2 com $p < 0,033$

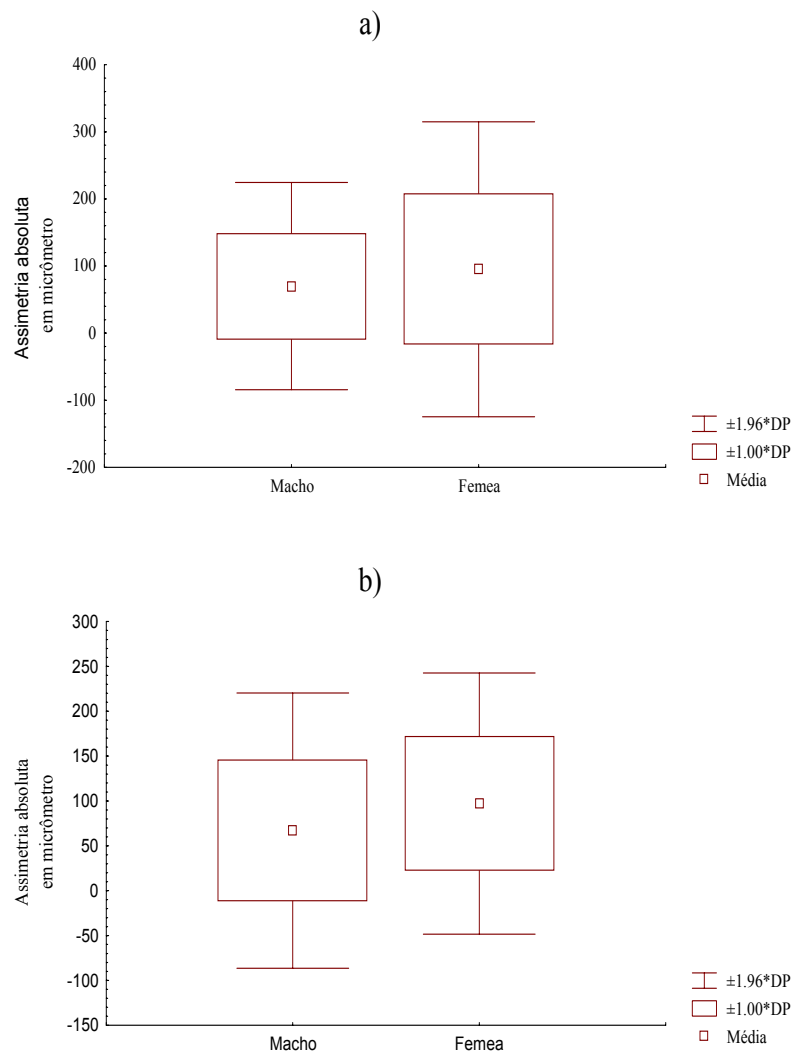


Gráfico 18: Assimetria absoluta das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* tendo o sexo como efeito principal. a) Nervura R₃ com $p < 0,004$; b) Nervura R₄₊₅ com $p < 0,001$

3.7.1.2 Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante

O Gráfico 19 mostra uma maior assimetria no grupo controle quando se observa o perímetro das nervuras M_1 e M_2 , independente do sexo, com $p < 0,052$.

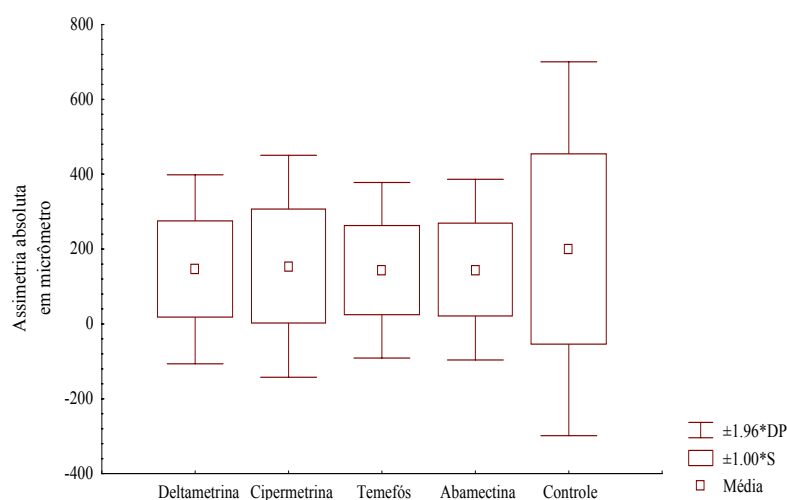


Gráfico 19: Assimetria absoluta no perímetro das nervuras M_1 e M_2 das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas aos inseticidas por 60 minutos

3.7.1.3 Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante

Houve uma interação significativa entre os efeitos do tratamento e sexo para o perímetro das nervuras M_1 e M_2 e para a nervura R_{4+5} da asa com $p < 0,001$ e $p < 0,020$, respectivamente (Gráfico 20 a, b).

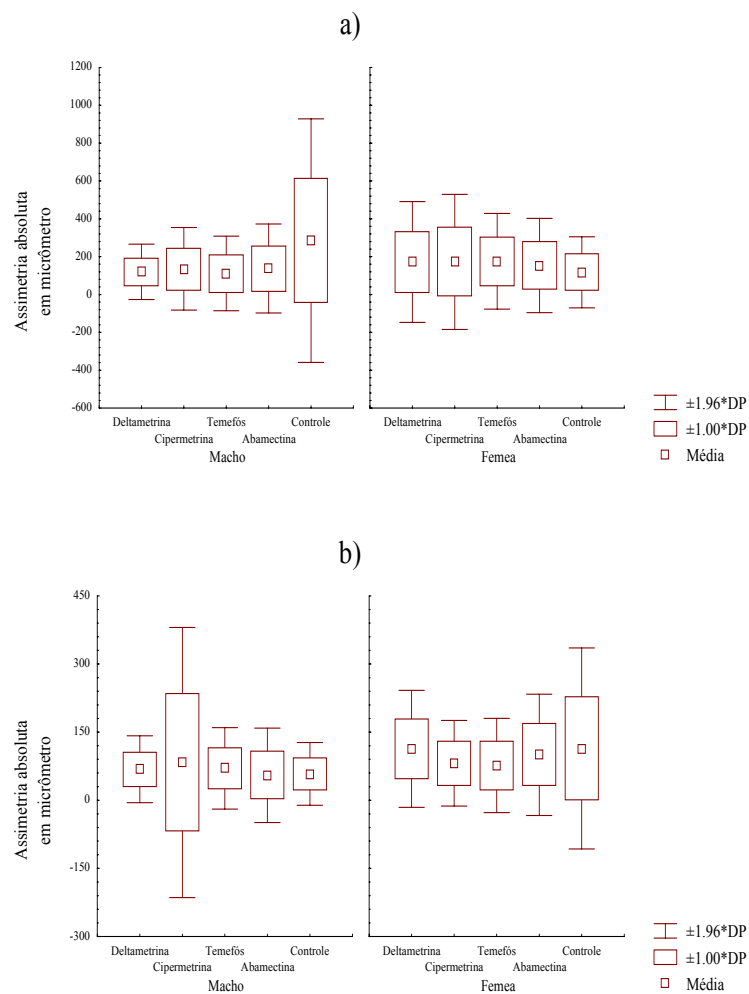


Gráfico 20: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de inseticidas por 60 min, e sexo da assimetria absoluta. **a)** Perímetro das nervuras M_1 e M_2 ; **b)** comprimento da nervura R_{4+5}

3.7.2 Análise da assimetria flutuante das asas dos adultos após as larvas serem expostas à Cipermetrina

Nenhum dos caracteres estudados apresentaram assimetria direcional ou assimetria ligada ao tamanho (Gráficos 21 a 26) e todos apresentaram distribuição normal.

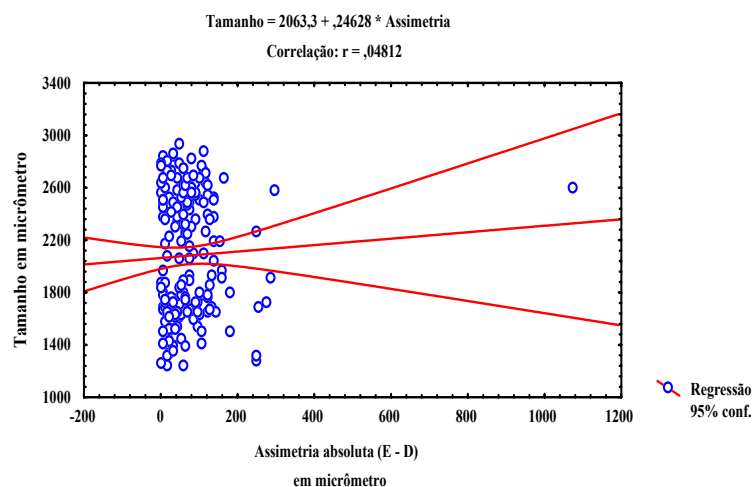


Gráfico 21: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos

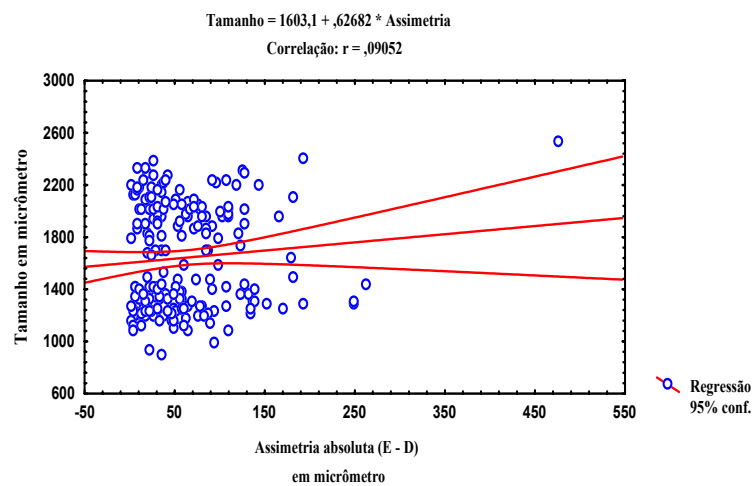


Gráfico 22: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos

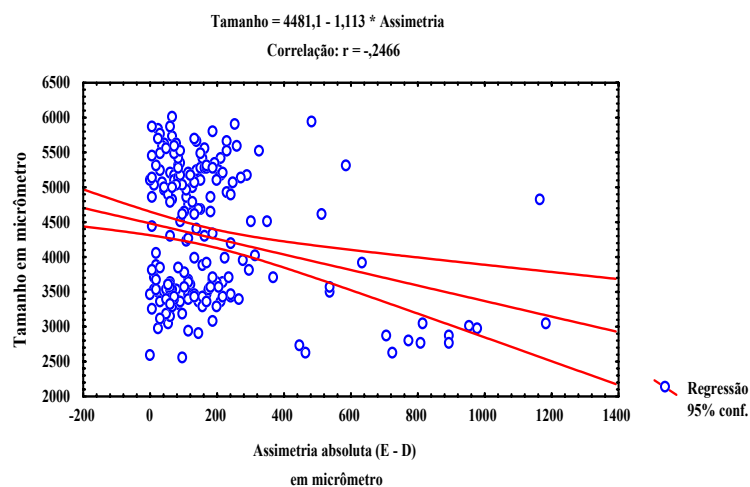


Gráfico 23: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos

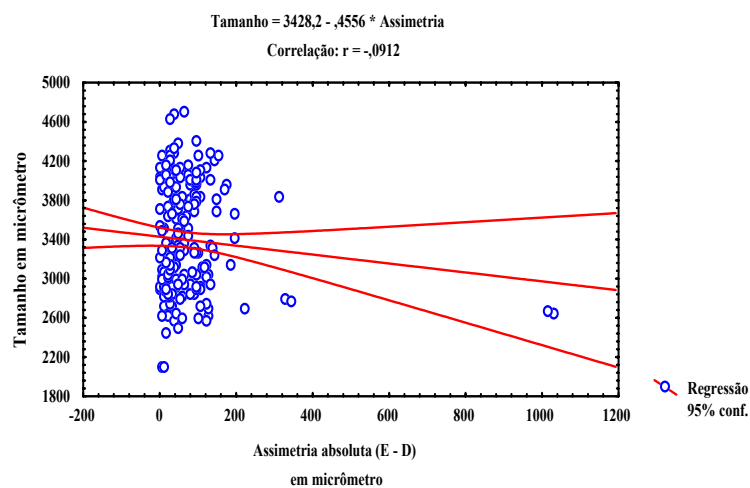


Gráfico 24: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos

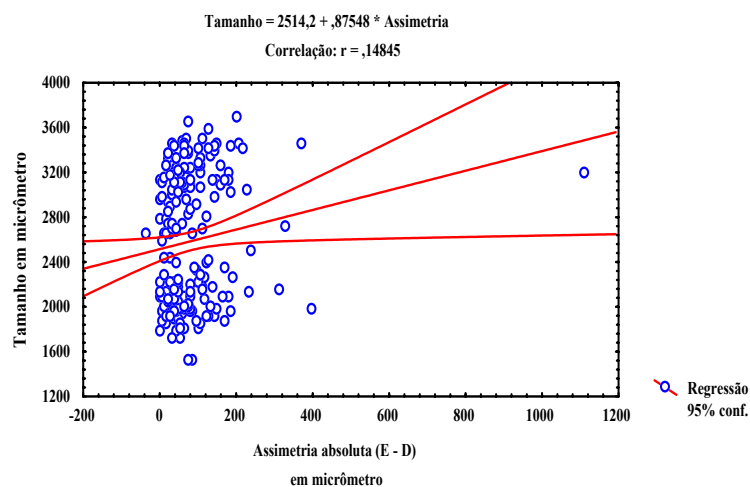


Gráfico 25: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R₃ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos

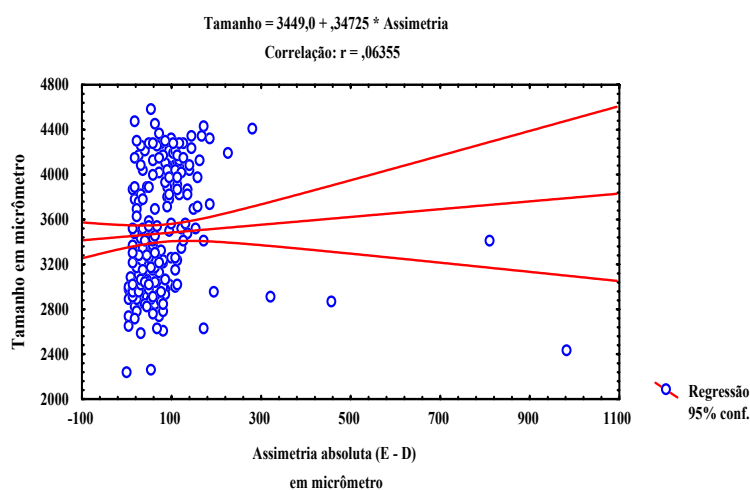


Gráfico 26: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R₄₊₅ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 20ppb de Cipermetrina durante um período de 60 minutos

A tabela 15 mostra variância entre os sexos e entre os grupos tratados e controle para análise da AF de adultos originados de larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 minutos. As nervuras M₂, M₃₊₄ e R₃ não tiveram efeito significativo.

Tabela 15: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 20 ppb de Cipermetrina por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação

Parâmetro	Efeito	F	p
M ₁	T	3,968	0,048*
	S	0,407	0,524
	I	2,379	0,125
M ₂	T	0,129	0,719
	S	0,219	0,641
	I	0,688	0,408
M ₃₊₄	T	0,257	0,613
	S	0,445	0,505
	I	1,067	0,303
PerímetroM ₁ M ₂	T	2,697	0,102
	S	5,260	0,023*
	I	12,718	> 0,001*
R ₃	T	0,041	0,839
	S	2,106	0,148
	I	1,234	0,268
R ₄₊₅	T	0,069	0,793
	S	3,795	0,528
	I	4,247	0,041*

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,10$

3.7.2.1 Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante

O efeito do sexo no parâmetro AF variou quando se observou o perímetro das nervuras M_1 e M_2 com $p < 0,023$, o qual apresentou maior assimetria absoluta nos machos, independente do grupo controle ou tratado, como mostrado na Gráfico 27.

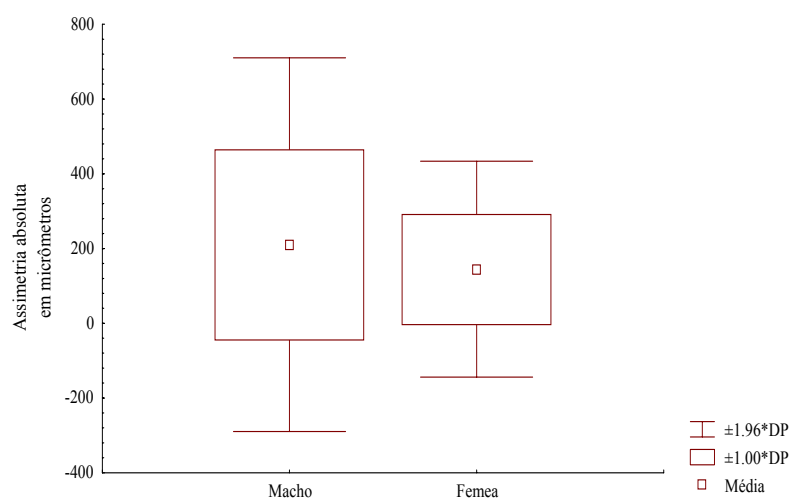


Gráfico 27: Assimetria absoluta no perímetro das nervuras M_1 e M_2 das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 minutos

3.7.2.2 Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante

O Gráfico 28 mostra uma maior assimetria no grupo de adultos onde as larvas foram expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 minutos. O efeito do tratamento foi significativo quando observado o comprimento da nervura M_1 , independente do sexo, sendo $p < 0,048$.

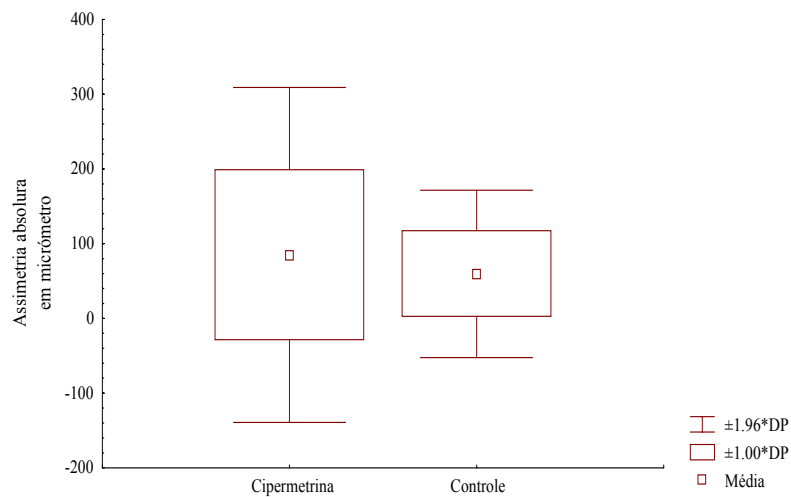


Gráfico 28: Assimetria absoluta da nervura M_1 das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 minutos

3.7.2.3 Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante

Houve uma interação significativa entre os efeitos da interação sexo x tratamento para o parâmetro AF no perímetro das nervuras M_1 e M_2 e no comprimento da nervura R_{4+5} das asas com $p < 0,001$ e $p < 0,041$, respectivamente (Gráfico 29 a, b).

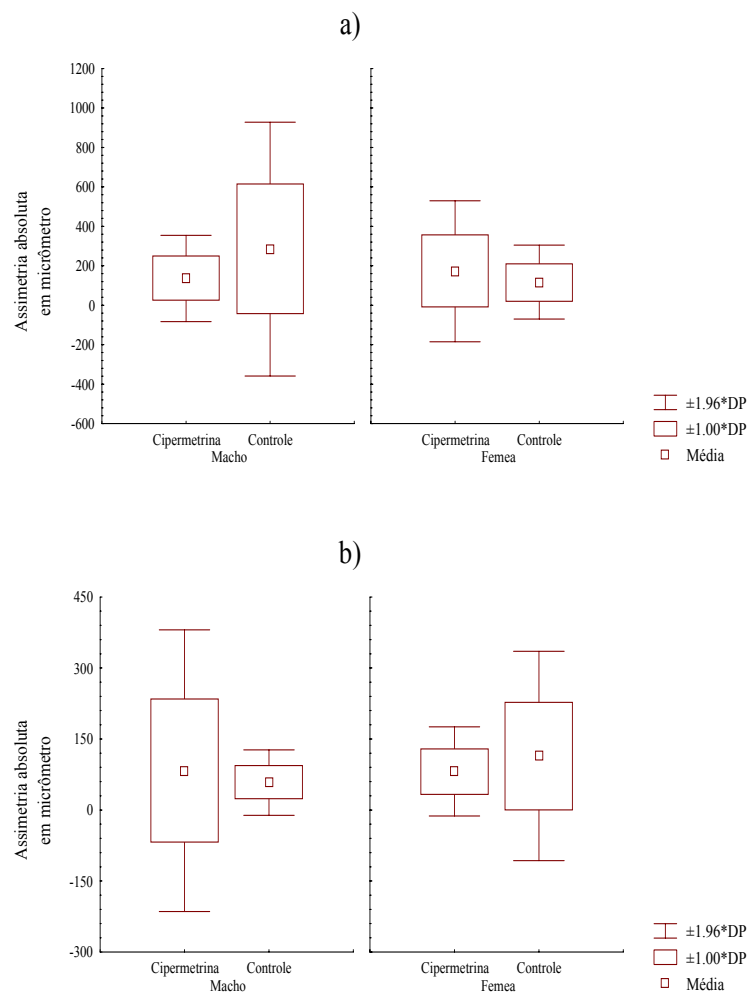


Gráfico 29: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 20ppb de Cipermetrina por 60 min, e sexo da assimetria absoluta. **a)** Perímetro das nervuras M₁ e M₂; **b)** comprimento da nervura R₄₊₅

3.7.3 Análise da assimetria flutuante das asas dos adultos após as larvas serem expostas à Deltametrina

Nenhum dos caracteres estudados apresentaram assimetria direcional ou assimetria ligada ao tamanho (Gráficos 30 a 35) e todos apresentaram distribuição normal.

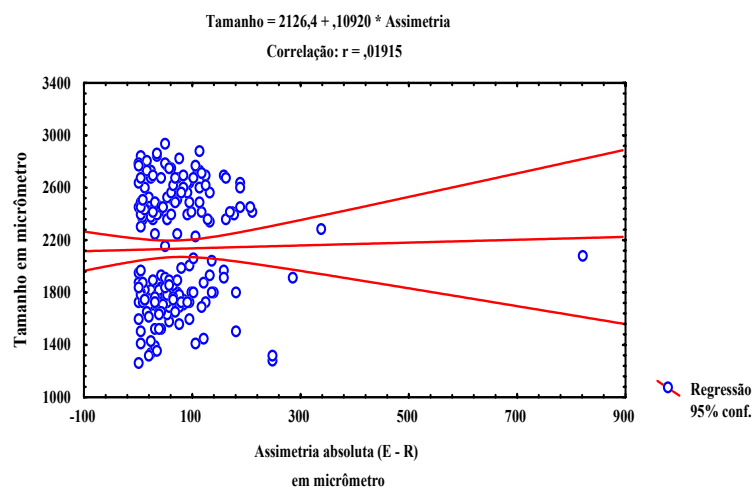


Gráfico 30: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₁ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos

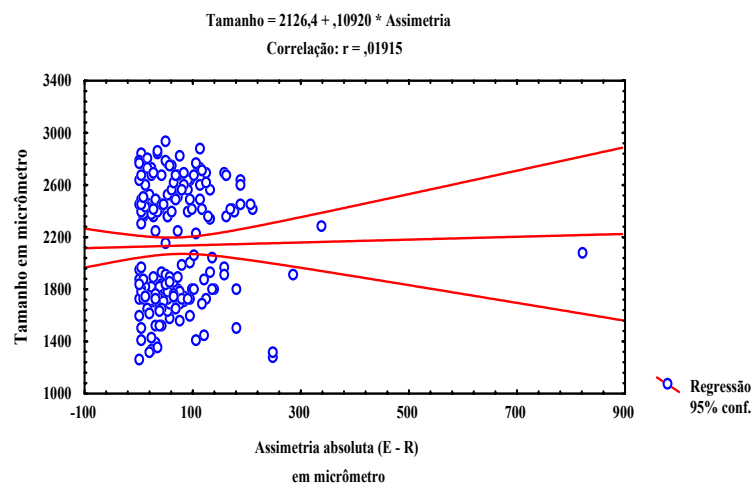


Gráfico 31: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₂ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos

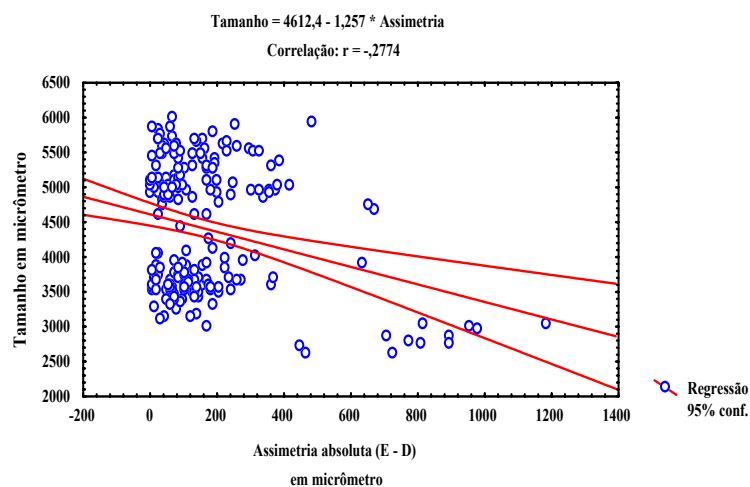


Gráfico 32: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos

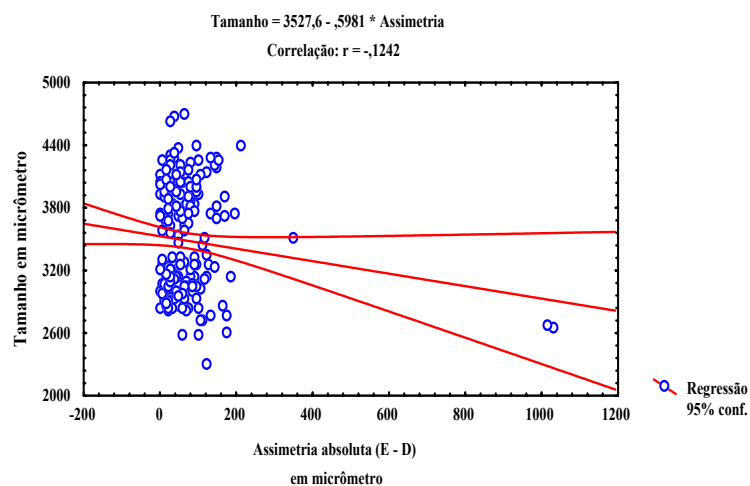


Gráfico 33: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos

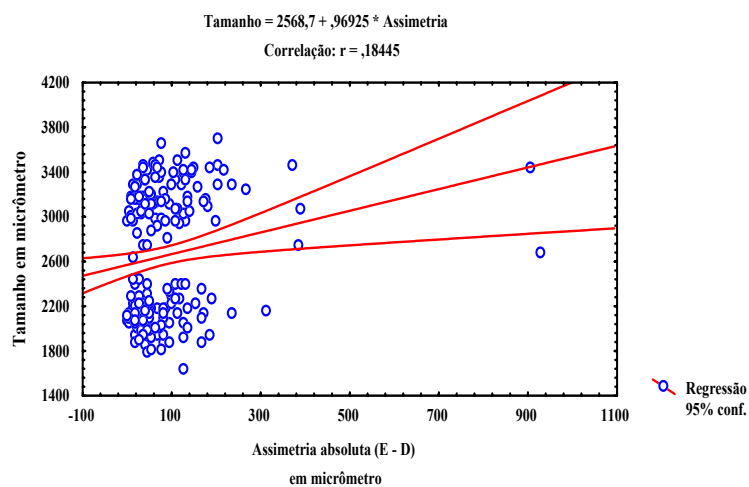


Gráfico 34: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R₃ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos

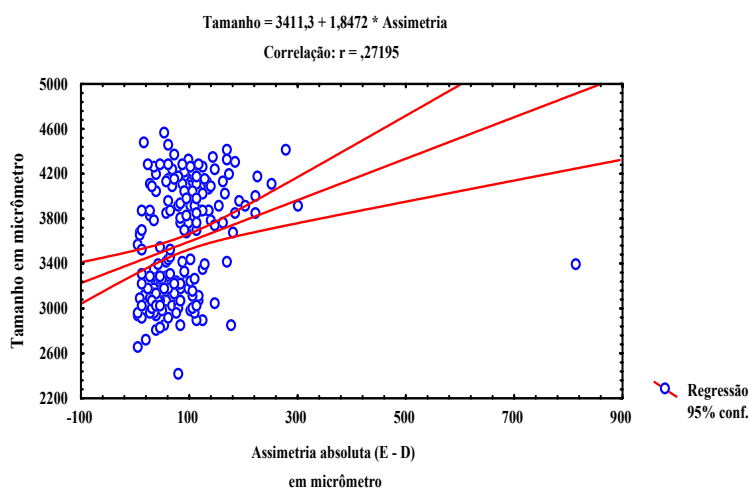


Gráfico 35: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R₄₊₅ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 30ppb de Deltametrina durante um período de 60 minutos

A análise da AF observada nas asas dos insetos os quais as larvas foram submetidas a exposição de 30ppb de Deltametrina por 60 minutos, mostrou variância entre os sexos e entre os grupos tratados e controle. Pode-se observar também que as nervuras M₂, M₃₊₄ e R₃ não tiveram efeito significativo e o parâmetro perímetro das nervuras M₁ e M₂ mostrou um efeito significativo para todos os efeitos analisados (tabela 16).

Tabela 16: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 30 ppb de Deltametrina por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação

Parâmetro	Efeito	F	<i>p</i>
M ₁	T	3,648	0,058**
	S	1,791	0,182
	I	5,726	0,018*
M ₂	T	1,789	0,183
	S	0,663	0,416
	I	1,340	0,248
M ₃₊₄	T	0,708	0,401
	S	0,382	0,537
	I	1,271	0,261
PerímetroM ₁ M ₂	T	4,062	0,045*
	S	4,466	0,036*
	I	16,043	> 0,001*
R ₃	T	0,093	0,761
	S	2,470	0,118
	I	1,586	0,209
R ₄₊₅	T	0,222	0,638
	S	25,935	> 0,001*
	I	0,326	0,569

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,10$

3.7.3.1 Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante

O efeito do sexo no parâmetro AF variou independentemente do grupo e mostrou que o perímetro das nervuras M_1 e M_2 com $p < 0,036$ e o comprimento da nervura R_{4+5} com $p < 0,001$ apresentaram diferenças entre a assimetria absoluta, sendo AF maior nos machos, como mostrado no Gráfico 36 a, b.

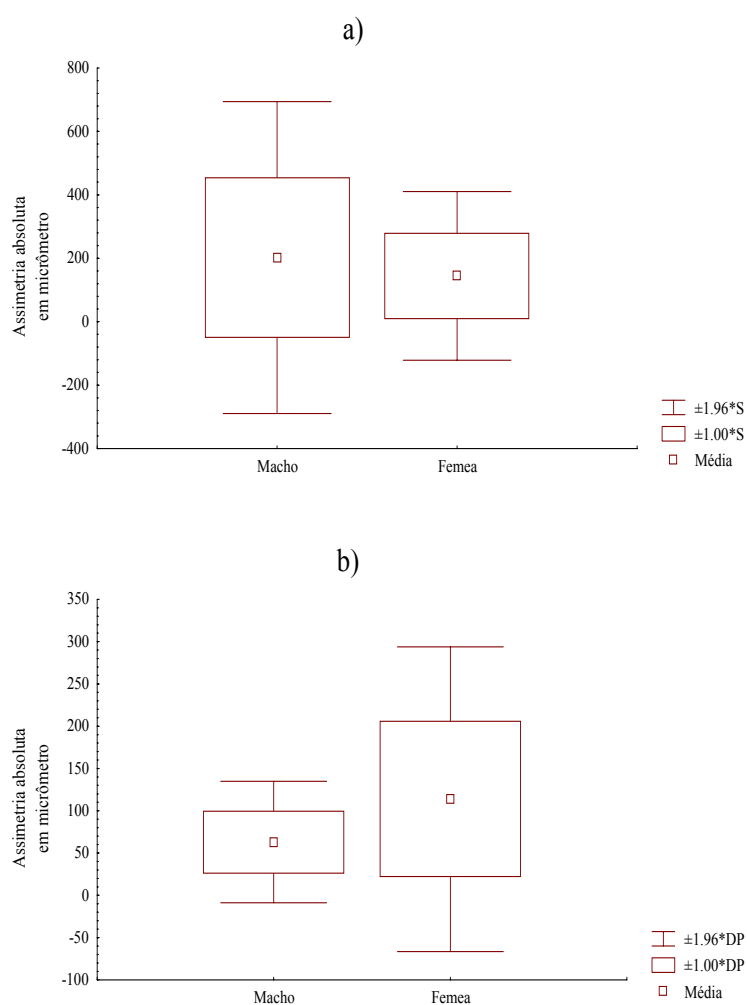


Gráfico 36: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 30ppb de Deltametrina por 60 minutos.

a) Perímetro das nervuras M_1 e M_2 ; **b)** Comprimento da nervura R_{4+5}

3.7.3.2 Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante

O Gráfico 37 mostra uma maior assimetria no grupo de adultos onde as larvas foram expostas à solução de 30ppb de Deltametrina por 60 minutos, independente do sexo, para o comprimento da nervura M_1 , com $p < 0,058$. No entanto, para o perímetro das nervuras M_1 e M_2 , com $p < 0,045$ o grupo controle apresentou AF maior.

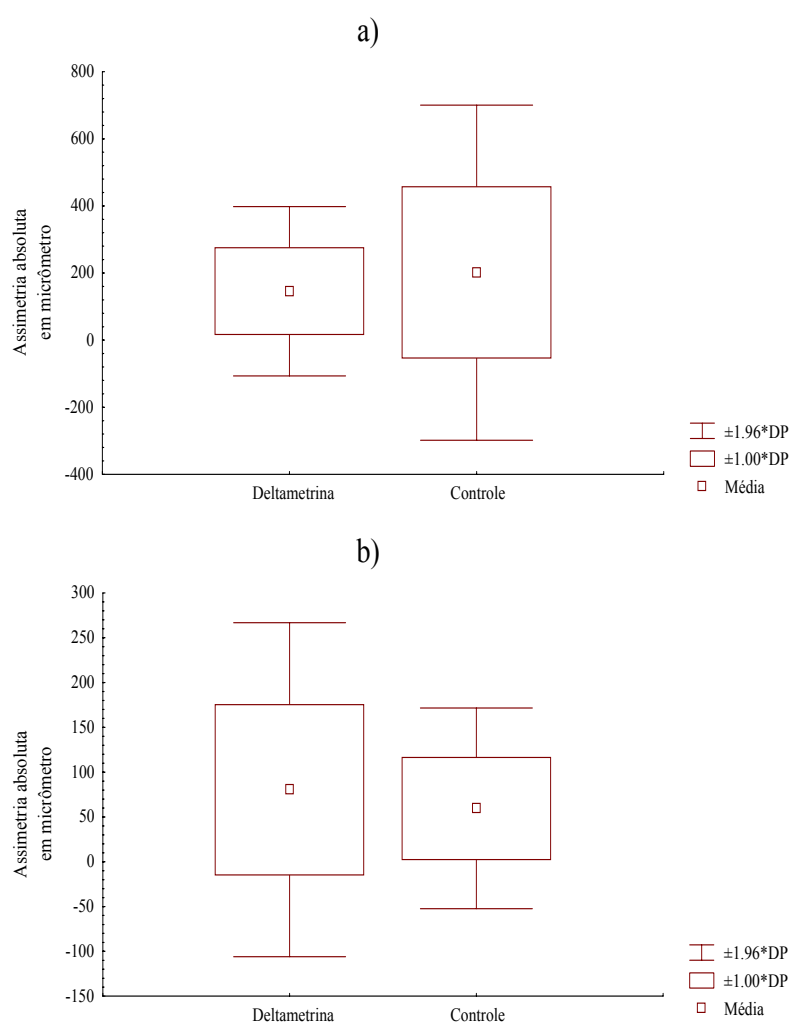


Gráfico 37: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 30ppb de Deltametrina por 60 minutos. **a)** Perímetro das nervuras M_1 e M_2 ; **b)** Comprimento da nervura M_1

3.7.3.3 Efeito da interação sexo x tratamento no parâmetro assimetria flutuante

O gráfico 38 a, b mostra interação significativa entre os efeitos do tratamento e sexo para o perímetro das nervuras M_1 e M_2 e para o comprimento da nervura M_1 da asa.

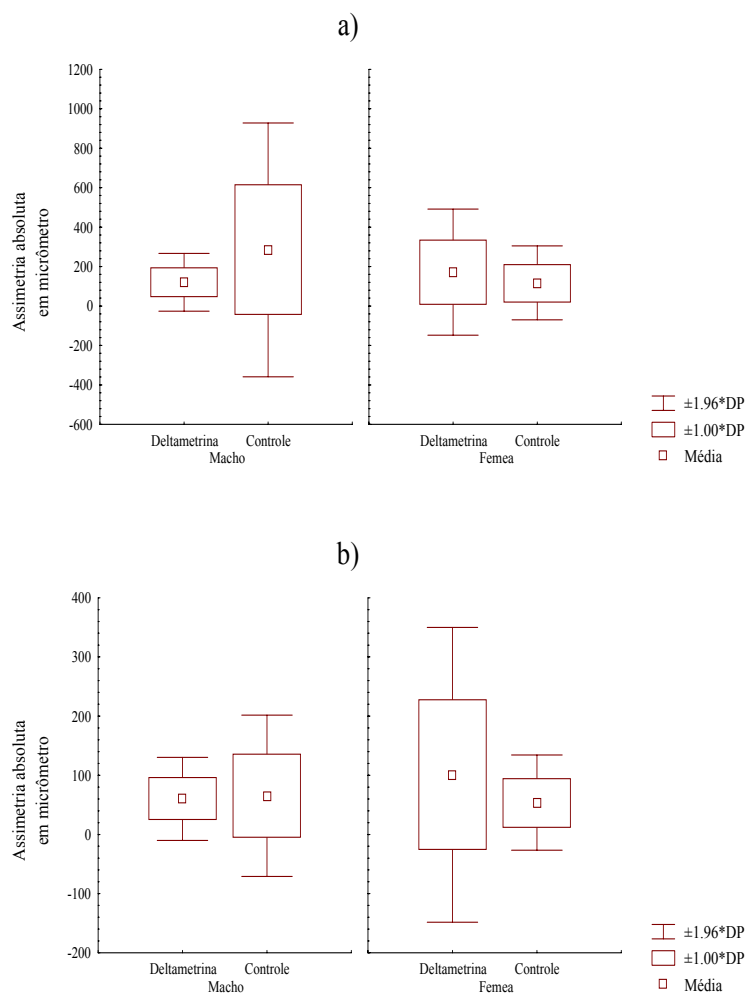


Gráfico 38: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 30ppb de Deltametrina por 60 min, e sexo da assimetria absoluta. **a)** Perímetro das nervuras M_1 e M_2 com $p < 0,001$; **b)** comprimento da nervura M_1 com $p < 0,018$

3.7.4 Análise da assimetria flutuante das asas dos adultos após as larvas serem expostas ao Temefós

Nenhum dos caracteres estudados apresentaram assimetria direcional ou assimetria ligada ao tamanho (Gráficos 39 a 44) e todos apresentaram distribuição normal.

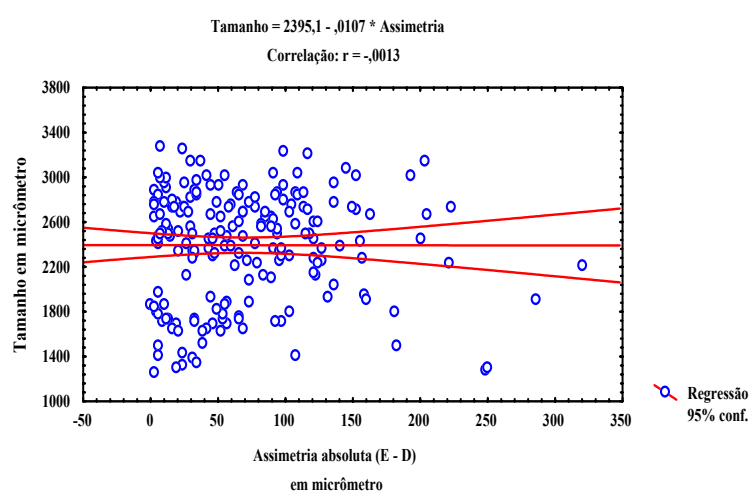


Gráfico 39: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₁ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos

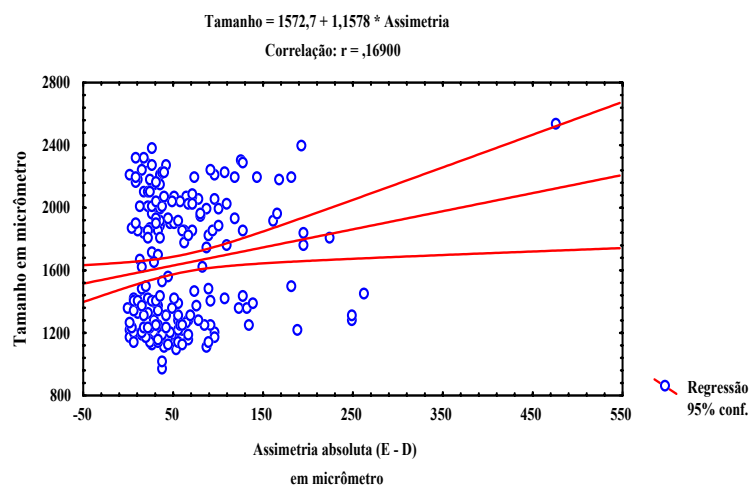


Gráfico 40: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₂ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos

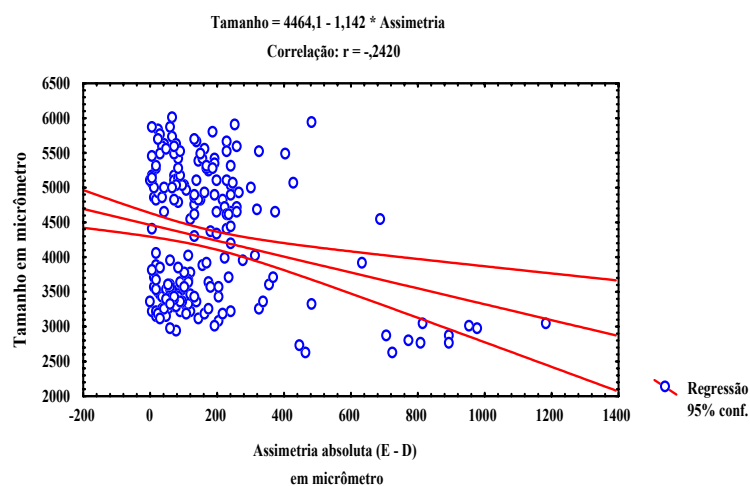


Gráfico 41: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do perímetro das nervuras M₁ e M₂ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos

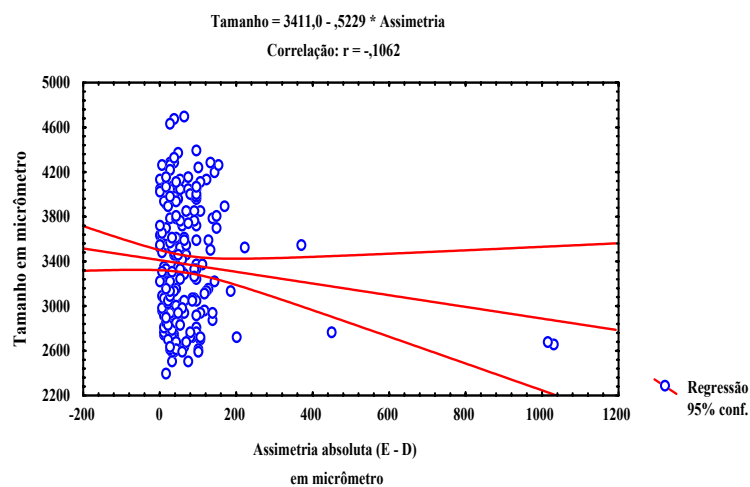


Gráfico 42: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos

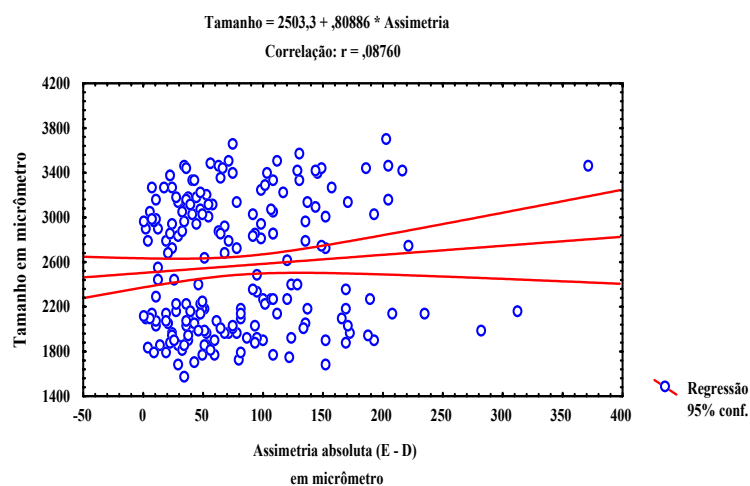


Gráfico 43: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição à solução larval de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos

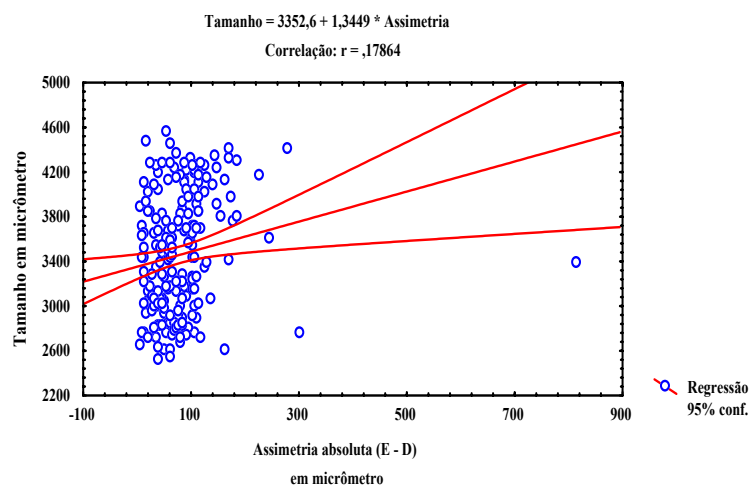


Gráfico 44: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução larval de 50ppb de Temefós durante um período de 60 minutos

As larvas expostas a 50ppb de Temefós por 60 minutos geraram adultos cuja análise da AF mostrou variância entre os sexos e entre os grupos tratados e controle. As nervuras M_{3+4} e R_3 não mostraram efeitos significativos (tabela 17).

Tabela 17: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 50 ppb de Temefós por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação

Parâmetro	Efeito	F	<i>p</i>
M ₁	T	6,089	0,014*
	S	0,008	0,929
	I	2,220	0,138
M ₂	T	0,808	0,369
	S	2,420	0,121
	I	3,682	0,056**
M ₃₊₄	T	0,8108	0,369
	S	0,821	0,366
	I	0,627	0,429
PerímetroM ₁ M ₂	T	4,599	0,033*
	S	3,648	0,058**
	I	18,681	> 0,001*
R ₃	T	1,419	0,235
	S	0,050	0,823
	I	0,096	0,757
R ₄₊₅	T	1,673	0,197
	S	10,374	> 0,001*
	I	6,584	0,011*

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,10$

3.7.4.1 Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante

A AF, tendo o sexo como efeito principal, independente do grupo controle ou tratado, variou e mostrou que o perímetro das nervuras M₁ e M₂ com $p < 0,058$ e o comprimento da nervura R₄₊₅ com $p < 0,001$ apresentaram diferenças entre a assimetria absoluta, pois AF foi maior nos machos, como mostrado no Gráfico 45 a, b.

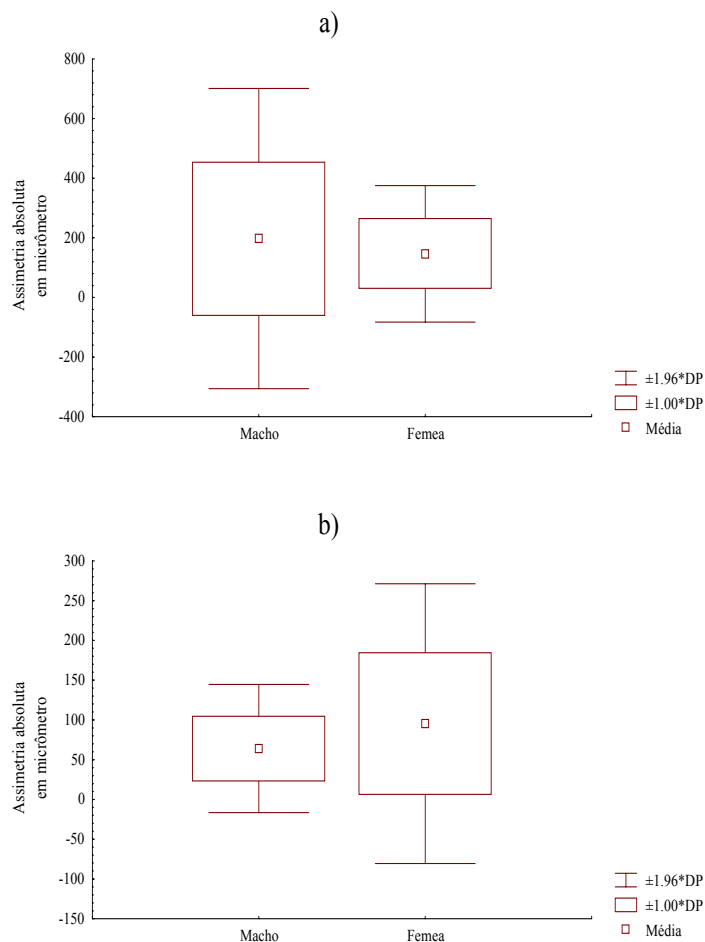


Gráfico 45: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 50ppb de Temefós por 60 minutos. **a)** Perímetro das nervuras M₁ e M₂; **b)** Comprimento da nervura R₄₊₅

3.7.4.2 Efeito do tratamento no parâmetro assimetria flutuante

O Gráfico 46 mostra uma diferença entre a assimetria no grupo de adultos onde as larvas foram expostas à solução de 50ppb de Temefós por 60 minutos, e o grupo controle, para o perímetro das nervuras M₁ e M₂ e comprimento da nervura M₁, independente do sexo, com $p < 0,033$ e $p < 0,014$, respectivamente.

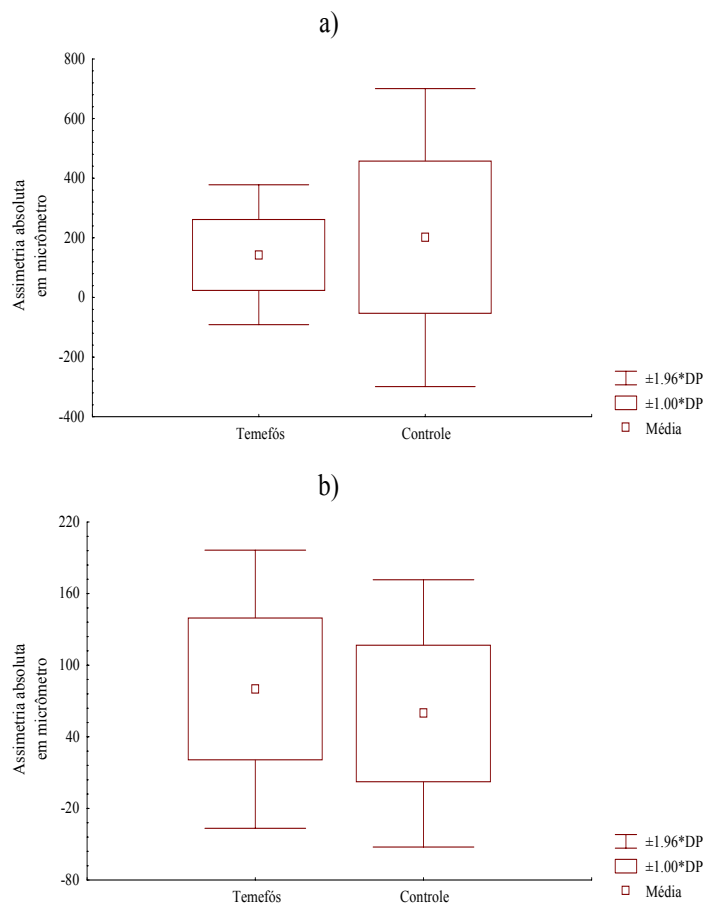


Gráfico 46: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 50ppb de Temefós por 60 minutos. **a)** Perímetro das nervuras M_1 e M_2 ; **b)** Comprimento da nervura M_1

3.7.4.3 Efeito da assimetria flutuante sobre a interação

Houve uma interação significativa entre os efeitos do tratamento e sexo para o perímetro das nervuras M_1 e M_2 e para o comprimento das nervuras M_2 e R_{4+5} da asa com $p < 0,001$, $p < 0,056$ e $p < 0,001$, respectivamente (Gráfico 47 a, b e 48).

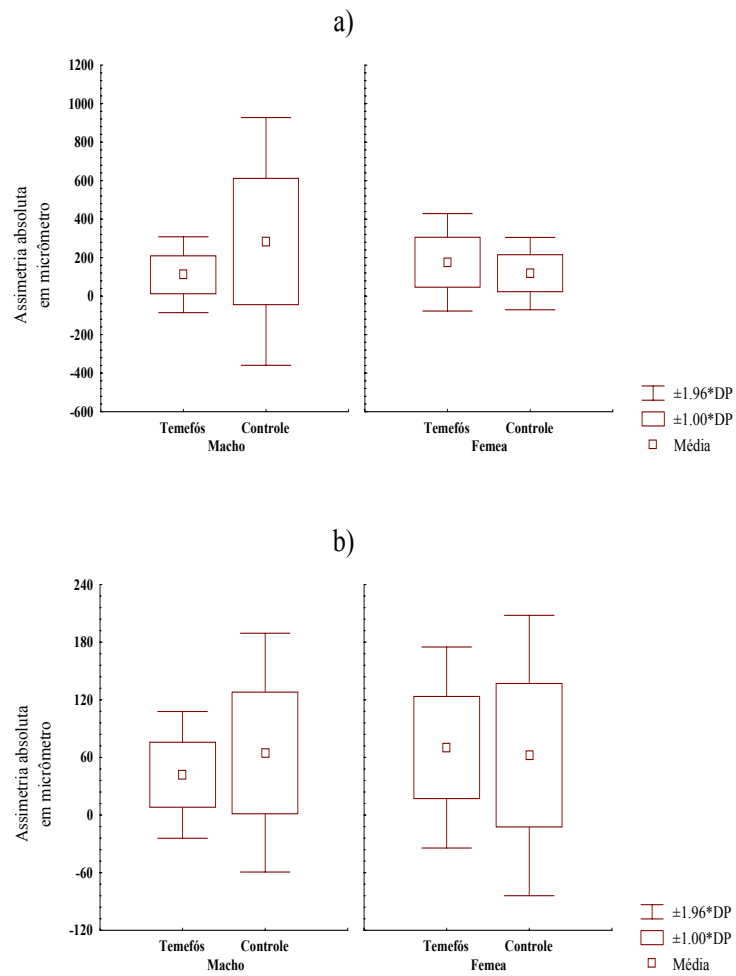


Gráfico 47: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 50ppb de Temefós por 60 min, e sexo da assimetria absoluta. **a)** Perímetro das nervuras M_1 e M_2 ; **b)** comprimento da nervura M_2

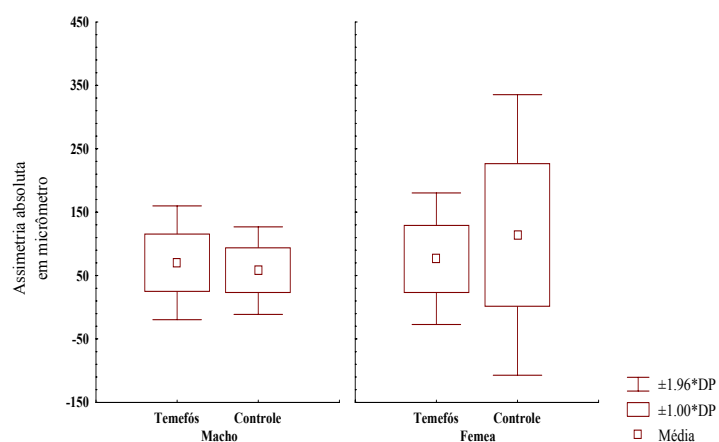


Gráfico 48: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 50ppb de Temefós por 60 min, e sexo da assimetria absoluta para o comprimento da nervura R₄₊₅

3.7.5 Análise da assimetria flutuante das asas dos adultos após as larvas serem expostas à Abamectina

Nenhum dos caracteres estudados apresentaram assimetria direcional ou assimetria ligada ao tamanho (Gráficos 49 a 54) e todos apresentaram distribuição normal.

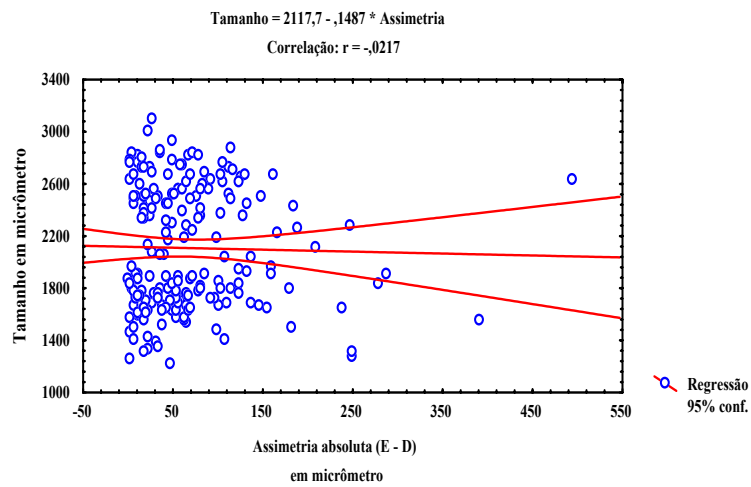


Gráfico 49: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₁ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos

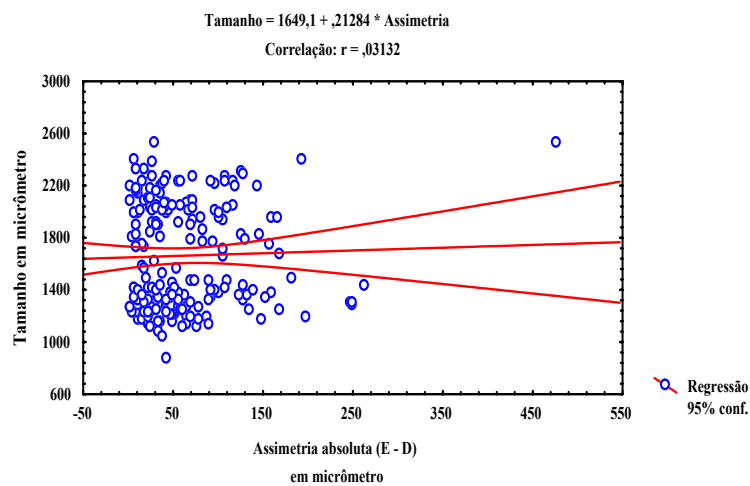


Gráfico 50: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M₂ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos

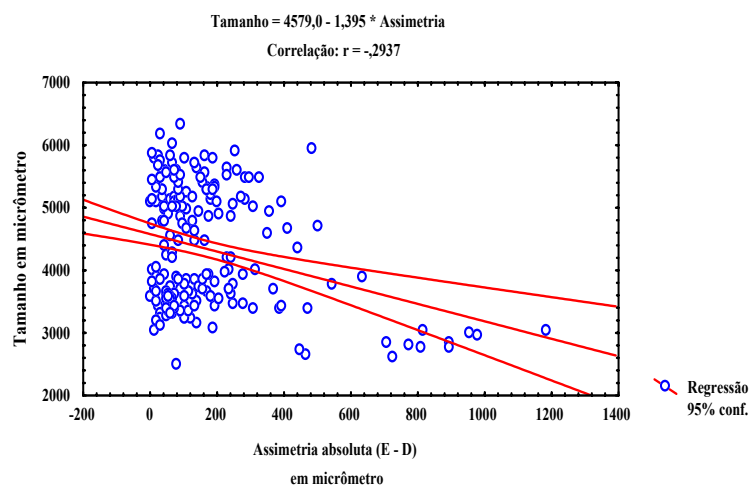


Gráfico 51: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos

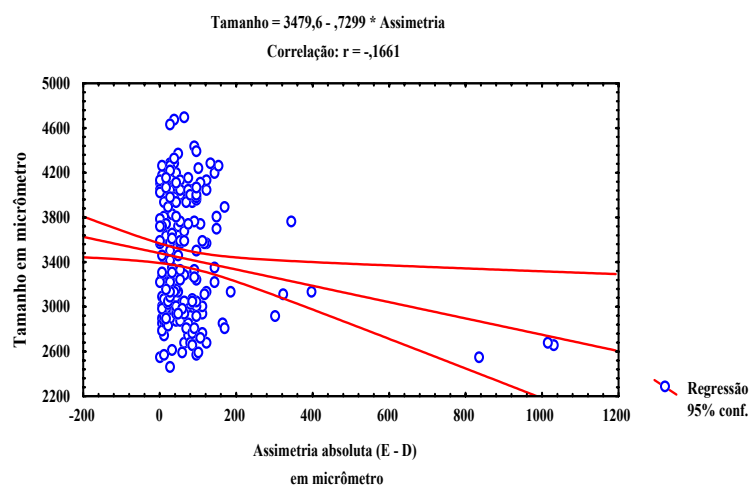


Gráfico 52: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos

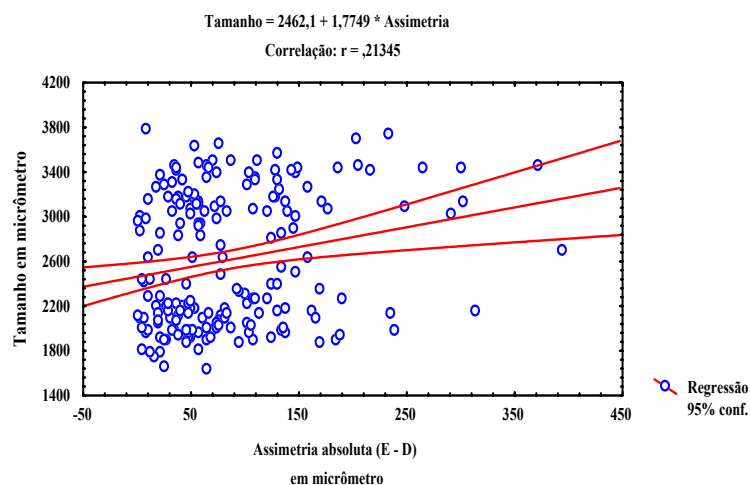


Gráfico 53: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos

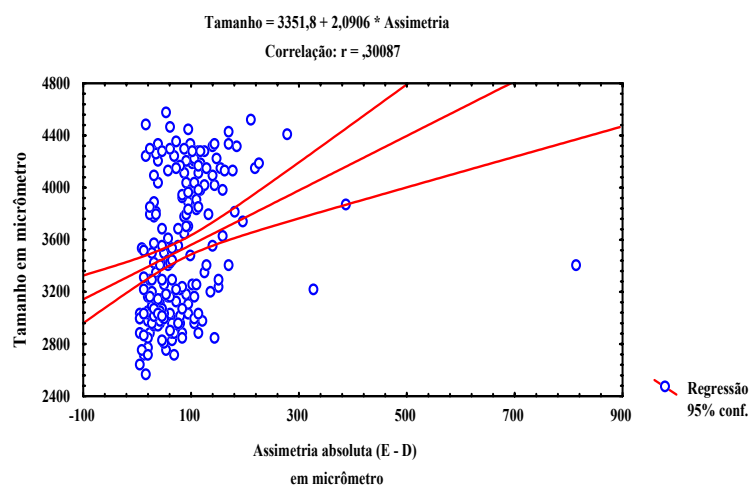


Gráfico 54: Regressão linear da assimetria absoluta (E - D) pelo tamanho (E + D/2) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de 54ppb de Abamectina durante um período de 60 minutos

A análise da AF mostrou variação entre os sexos e entre os grupos tratados e controle. Apenas a nervura M₂ não mostrou efeitos significativos. Observa-se na tabela 18 os dados referentes à análise de variância entre o tratamento e sexo e de suas interações. A análise mostra que o perímetro das nervuras M₁ e M₂ mostrou um efeito significativo para todos os efeitos analisados.

Tabela 18: Análise de variância para as comparações da Assimetria Flutuante das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* entre os efeitos do tratamento, de exposição das larvas à solução de 54 ppb de Abamectina por 60 min, e do sexo. T = tratamento, S = sexo, I = interação

Parâmetro	Efeito	F	P
M ₁	T	2,867	0,092**
	S	0,000	0,982
	I	1,372	0,243
M ₂	T	0,004	0,949
	S	0,108	0,742
	I	0,000	0,983
M ₃₊₄	T	0,199	0,656
	S	3,015	0,084**
	I	0,048	0,826
PerímetroM ₁ M ₂	T	4,216	0,041*
	S	7,756	0,006*
	I	11,339	> 0,001*
R ₃	T	0,001	0,979
	S	5,516	0,019*
	I	3,483	0,063**
R ₄₊₅	T	0,681	0,410
	S	23,963	> 0,001*
	I	0,287	0,593

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,10$

3.7.5.1 Efeito do sexo no parâmetro assimetria flutuante

A AF, tendo o sexo como efeito principal, independente do grupo controle ou tratado, variou e mostrou que o perímetro das nervuras M_1 e M_2 com $p < 0,006$ e o comprimento das nervuras M_{3+4} , R_3 e R_{4+5} com $p < 0,084$, $p < 0,019$ e $p < 0,001$, respectivamente, apresentaram diferenças entre a assimetria absoluta, como mostrado no Gráfico 55 a, b e 56 a, b.

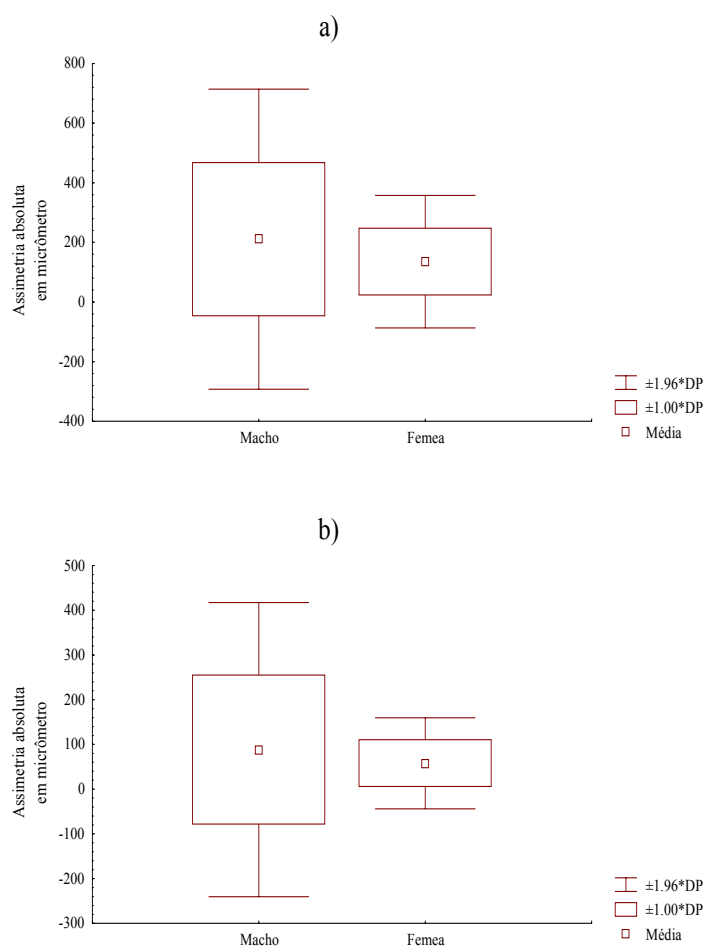


Gráfico 55: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 54ppb de Abamectina por 60 minutos.

a) Perímetro das nervuras M_1 e M_2 ; **b)** Comprimento da nervura R_{3+4}

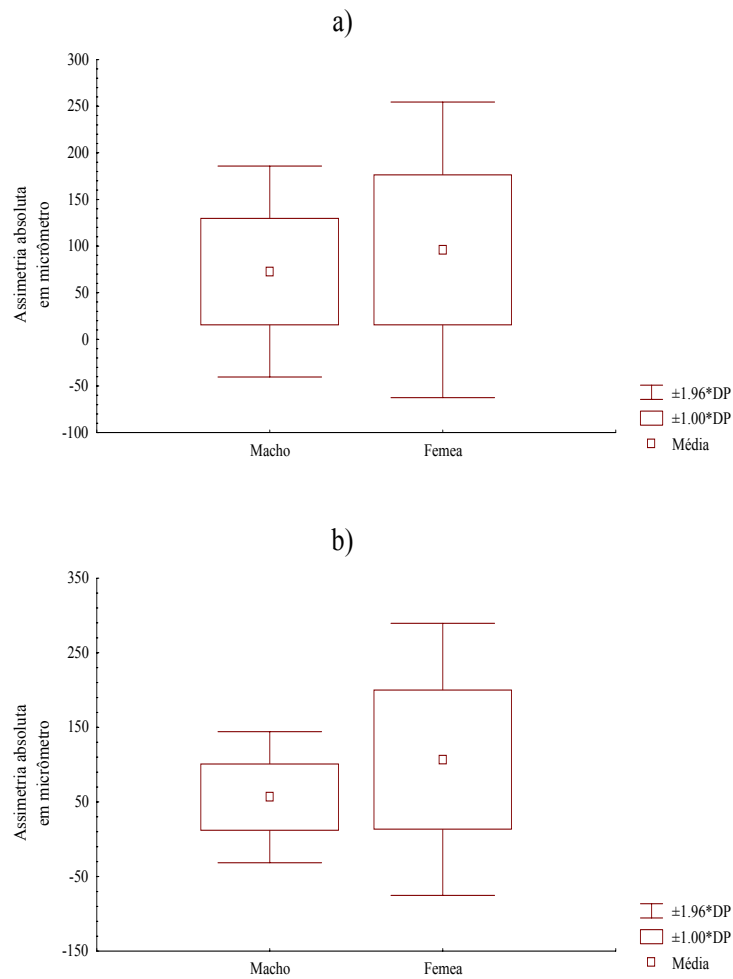


Gráfico 56: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o sexo como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 54ppb de Abamectina por 60 minutos.

a) Comprimento da nervura R₃; **b)** Comprimento da nervura R₄₊₅

3.7.5.2 Efeito da assimetria flutuante sobre o tratamento

O Gráfico 57 mostra diferença entre a assimetria no grupo tratado e controle, para o perímetro das nervuras M1 e M2 e comprimento da nervura M₁, independente do sexo.

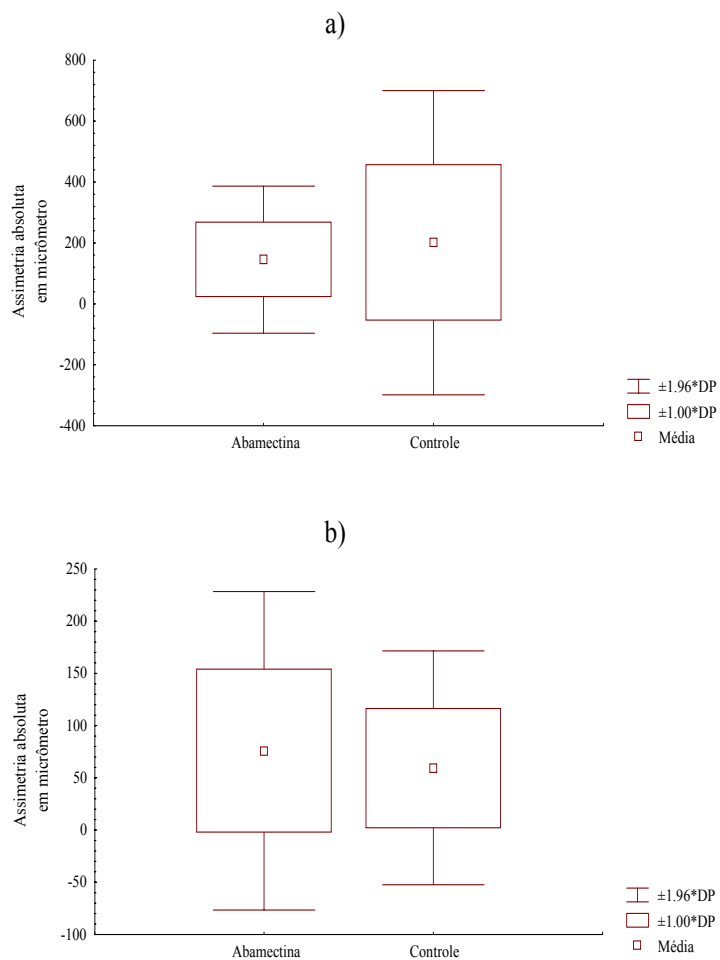


Gráfico 57: Assimetria absoluta das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como o efeito principal para as larvas expostas à solução de 54ppb de Abamectina por 60 minutos. **a)** Perímetro das nervuras M₁ e M₂ com $p < 0,041$; **b)** Comprimento da nervura M₁ com $p < 0,092$

3.7.5.3 Efeito da assimetria flutuante sobre a interação

Houve uma interação significativa entre o tratamento e sexo para o perímetro das nervuras M_1 e M_2 e para o comprimento da nervura R_3 da asa com $p < 0,001$, $p < 0,063$, respectivamente (Gráfico 58 a, b).

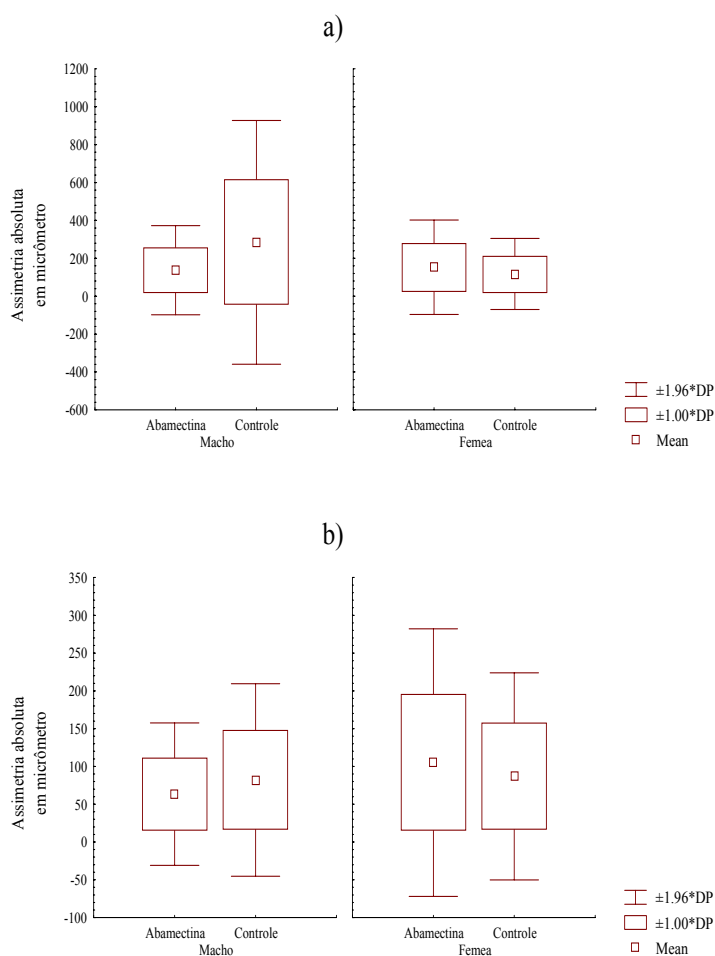


Gráfico 58: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 54ppb de Abamectina por 60 min, e sexo da assimetria absoluta. **a)** Perímetro das nervuras M_1 e M_2 ; **b)** comprimento da nervura R_3

4- Discussão

O controle de insetos vetores no Brasil é baseado no uso intensivo de inseticidas há pelo menos seis décadas. O monitoramento da eficiência dos inseticidas quase nunca foi feito antes de uma aplicação, mesmo que na verdade, precisasse ser feito como rotina dentro dos planos de controle de vetores (GAONA, 2002),

Neste sentido, os testes de suscetibilidade larval apresentados no presente estudo mostraram que os piretróides podem ser utilizados com certo cuidado, pois, o aumento dos registros de espécies de artrópodes resistentes aos piretróides, além da possibilidade de resistência cruzada com os organoclorados, é preocupação em todo o mundo e necessita avaliações periódicas do seu emprego (NEVES *et alii*, 1981; DOVER & CROFT, 1986).

A resistência de algumas linhagens de larvas de dípteros à inseticidas tem sido atribuída pela ação de enzimas destoxicadoras (GEORGHIOU & PASTEUR, 1978; KAO *et alii*, 1984). A destoxificação através da monoxigenase citocromo P450 ou esterases, está entre os mecanismos envolvidos na resistência aos piretróides (SCOTT, 1996; VULUE *et alii*, 1999), e não confere resistência sistemática aos organoclorados, que são preferencialmente metabolizados pela glutathione-S-transferase (YU, 1996). A menor quantidade de larvas mortas nas primeiras 24 h após a exposição aos inseticidas piretróides, em concentrações menores que a CL50 verificada no presente estudo, pode sugerir a presença desta destoxificação nos insetos.

DORTA *et alii* (1993) relataram, para larvas de *C. quinquefasciatus* quando expostas à Deltametrina, uma CL50 que variou de $2,95 \times 10^6$ ppm para linhagens de laboratório a $7,77 \times 10^4$ ppm para linhagens de campo, sendo cerca de 1000 vezes menor que a CL50 obtida no presente estudo, indicando a necessidade de uma quantidade muito maior de Deltametrina que os outros inseticidas para se obter um alto índice de mortalidade

avertando também certa resistência destas larvas ao inseticida utilizado, quando comparado com os outros inseticidas testados.

Os dados obtidos no presente estudo sugerem também que as larvas podem estar resistentes à Cipermetrina e ao Temefós. Considerou-se para isso que registros de letalidade com Cipermetrina para essa espécie são maiores em concentrações menores: CL50 = 0,0016ppm inseticida ativo (i.a.) para larvas de uma linhagem suscetível e CL50 = 0,004ppm i.a. para uma linhagem parental com resistência, em populações cubanas (BISSET *et alii*, 1998) e registro de uma CL50 = 0,003ppm e uma CL90 = 0,01±0,006ppm i.a. deste piretróide para uma colônia resistente de *C. quinquefasciatus*, no Rio de Janeiro, quando comparada com a CL50 = 0,0008ppm da linhagem de referência (GONZÁLEZ *et alii*, 1999). Um fator que contribui para que a resistência possa ser evidenciada para Temefós, é a CL50 verificada no presente estudo ser cerca de 35 vezes maior que aqueles disponibilizados pela WHO (1992) para estes insetos.

No entanto, para os derivados da Ivermectina pôde-se notar uma maior mortalidade larval entre 24 e 96 h posterior à exposição dos insetos aos inseticidas, o que pode sugerir uma ação tardia.

Embora o presente estudo não mostre o mecanismo metabólico envolvido na resistência aos inseticidas, modificações das esterases em populações brasileiras de *C. quinquefasciatus* para organofosforados já foram relatadas por BRACCO *et alii* (1999), GONZÁLEZ *et alii*, (1999) e CAMPOS & ANDRADE (2003). Entretanto, para os derivados de Ivermectina, que geralmente são usados em bovinos, eqüinos e ovinos assim como pesticidas agrícolas (CAMPBELL *et alii*, 1983; DYBAS, 1989; WISLOCKI *et alii*, 1989), ainda não foi relatado a ocorrência de resistência a essas em mosquitos no Brasil.

ALVES *et alii* (2004) verificaram que os trofócitos de larvas que foram expostas à solução de Ivermectina, apresentaram uma granulação mais fina e evidente no citoplasma destas células, sugestivo de um estresse larval quando estas estão expostas à solução deste produto, indicando um sinal de mobilização da reserva energética, em um possível processo de destoxificação, já que a resistência de algumas larvas de mosquitos pode ser devida a ação de enzimas destoxicantes (GEORGHIOU & PASTEUR, 1978; KAO *et alii*, 1984).

Utilizando baixas concentrações de Ivermectina, ALVES *et alii* (2004) também verificaram altos níveis de mortalidade larval e diminuição do desempenho reprodutivo de adultos originados de geração larval exposta à concentração estudada, sugerindo que a mesma poderia ser usada para controlar a população de mosquitos.

Face aos resultados aqui obtidos, sugerem-se avaliações prévias e monitoramento da efetividade dos inseticidas a serem usados em programas de controle contra mosquitos, bem como a utilização de outros pesticidas no combate aos mosquitos, já que, mudanças da CL50 não acompanhadas por mudanças na CL95 podem ser manejadas com a troca temporária do produto (CAMPOS & ANDRADE, 2001). Ou caso seja econômico, pela substituição definitiva do produto por outros que não apresentem risco de resistência cruzada. Entretanto, no caso de *C. quinquefasciatus*, ao contrário do uso de inseticidas, o que melhor permite baixas populações são as práticas como educação para mudança de hábito da população. Todavia, somente o conhecimento das concentrações letais e/ou subletais dos inseticidas ou práticas de educação não são suficientes para que se possam combater os insetos. Há necessidade de outros estudos tais como a fisiologia, bioquímica, ciclo biológico, entre outros, para observar os efeitos dos inseticidas sobre os insetos e assim obter informações para um melhor controle destes artrópodes.

Segundo CLEMENTS (1996) no intestino médio de larvas de *Culex*, há quatro regiões: cárdia, ceco gástrico, intestino médio anterior e posterior. Em todas as regiões, o epitélio é composto por células altas e microvilos, citoplasma evidente e núcleo com cromossomos politênicos. Células basais regenerativas estão distribuídas isoladamente ou em grupos na base do epitélio. O epitélio do intestino médio não tem um revestimento cuticular, mas a membrana peritrófica o separa do alimento ingerido.

O que pôde ser observado no presente estudo, quando feitos os testes com indicadores de pH, foi a alteração desse pH no intestino médio anterior das larvas expostas a qualquer um dos inseticidas utilizados. O pH do intestino médio varia de espécie para espécie, mas é mantido entre 10,5 e 11,0 na região anterior (CLEMENTS, 1996). Esta alteração sugere um desequilíbrio elétrico, já que a manutenção do pH alcalino é o principal gasto energético das larvas, podendo gerar um desarranjo fisiológico também na hemolinfa dos mosquitos.

Para conseguir um pH 11,0, cátions, como Na^+ , ou K^+ e ânions, como OH^- , CO_3^{2-} ou HCO_3^- precisam ser acumulados no lúmen do intestino médio. Assim, duas vias de transporte epiteliais são utilizadas para a alcalinização: uma via catiônica, no qual um cátion forte repõe um fraco, e/ou uma via aniônica, no qual um ânion fraco repõe um forte no lúmen do intestino médio (BOUDKO *et alii*, 2001)

CHAPMAN (1998) relata que íons K^+ ou Na^+ são bombeados ativamente para dentro da hemolinfa, de tal forma que a energia para o movimento destes íons seja provida pela V-ATPase presente no ápice das membranas do ceco anterior de insetos. As ATPases vacuolares (V-ATPases) são enzimas com várias subunidades (FORGAC, 2000). Estas enzimas são bombeadoras de prótons presentes em várias partes das endomembranas de

células eucariotas. Além disso, são encontrados também na membrana plasmática de uma variedade de células eucariotas (WIECZOREK *et alii*, 1999). No intestino médio de larvas de *Manduca sexta* (Lepdoptera, Sphingidae) a V-ATPase está presente em níveis elevados na membrana apical das células, onde energiza todo o processo secundário de transporte ativo através do epitélio (REINEKE *et alii*, 2002).

FILIPPOVA *et alii* (1998) mostraram que a H⁺-V-ATPase está presente na região anterior do intestino médio de larvas de *A. aegypti* e ZHUANG *et alii* (1999) mostraram também que ela se localiza na membrana basal nesta mesma região do intestino médio de larvas de mosquitos. BOUDKO *et alii*, 2001 relatam que o transporte de prótons de células intestinais para a hemolinfa, através da V-ATPase localizada na membrana basal destas, poderá acidificar a hemolinfa, enquanto os prótons que seguem para o lúmen do intestino, tende a alcalinizá-lo. No entanto, este movimento deverá ser hiperpolarizado por enzimas tanto na membrana apical como na membrana basal que contém V-ATPase (BOUDKO *et alii*, 2001).

Tendo em vista os resultados do presente estudo, é possível que os inseticidas aplicados às larvas de *C. quinquefasciatus* possam estar influenciando nesta V-ATPase de tal forma que íons tendem a passar da hemolinfa para o lúmen tendendo a acidificar o intestino médio destas larvas. O aumento das invaginações na membrana basal do tubo intestinal poderia ser um indicativo, pois este aumento pode resultar no aumento de bombas iônicas na tentativa de bombear íons para o lúmen a partir da hemolinfa. No entanto, somente estudos bioquímicos e fisiológicos poderão mostrar isto.

Existem relatos discutindo a ligação da Ivermectina a receptores específicos do GABA. Nesta situação, a droga aumentaria a possibilidade do GABA_A, um receptor

específico, em ativar canais de Cl⁻ de membranas pré-sinápticas. Isso leva a condução de um influxo de íons cloro e hiperpolarização irreversível com conseqüente inibição de sinais de transmissão (CAMPBELL, 1985; TURNER & SCHAEFFER, 1989). A Ivermectina também poderia se ligar diretamente a outros canais iônicos específicos seguindo um desarranjo do balanço elétrico. Entretanto, a ação da Ivermectina pode estar associada à liberação de neurotransmissores em conjunção com o antagonista GABA, provavelmente contribuindo para sinais excitatórios de intoxicação (TURNER & SCHAEFFER, 1989; BLOOMQUIST, 1996). De fato larvas de *C. quinquefasciatus* expostas à solução de 1,5ppb de Ivermectina, apresentaram ataxia, seguida de 73,38% de mortalidade (ALVES, 2000), sugerindo uma ligação deste inseticida aos receptores GABA com conseqüente ação letal da solução de Ivermectina aos mosquitos *C. quinquefasciatus*, confirmando os resultados de FREITAS *et alii* (1996).

Tem-se demonstrado também que os piretróides do tipo II como a Deltametrina e Cipermetrina, agem inibindo canais de sódio, sendo, portanto, antagonistas às Ivermectinas (FORSHAW & RAY, 1990; FORSHAW *et alii*, 1993; FORSHAW *et alii*, 2000), no entanto, ainda é controverso o preciso modo de ação destes inseticidas (KHAMBAY & JEWESS, 2005).

Mudanças no pH ou em concentrações iônicas ao longo do intestino, ou durante a digestão, causam mudanças freqüentes também, na densidade e nas formas moleculares de proteoglicanos da MP. Isto afeta as características de filtração da MP, as quais o inseto poderá usar para propósitos fisiológicos (LEHANE, 1976). Desta forma, os inseticidas podem causar uma mudança do pH no intestino larval, podendo causar uma

hiperpolarização na membrana das células epiteliais do intestino médio das larvas de *C. quinquefasciatus*, e como consequência uma modificação das células epiteliais.

De fato, há indícios sugestivos que possa estar ocorrendo desequilíbrio eletrolítico nas células do trato digestivo de larvas de *C. quinquefasciatus*, tendo em vista a mudança de pH ocorrido nas larvas após 1 h de exposição à doses sub-letais dos inseticidas utilizados, além de mudanças morfológicas ocorridas no epitélio do tubo intestinal médio dessas larvas.

A proteção celular no intestino de mosquitos é feita inicialmente, pela MP. Esta membrana protege o lúmen intestinal das larvas contra microorganismos e também protege o desenvolvimento das células epiteliais do intestino médio dos adultos de enzimas hidrolíticas associadas com a degeneração meconial (MONCAYO *et alii*, 2005), assim como as células do intestino médio de partículas abrasivas do alimento (SHAHABUDDIN *et alii*, 1996; TELLAM, 1996; LEHANE, 1997; TERRA, 2001). DAVIDSON (1979) relatou que larvas de *C. quinquefasciatus* infectadas por *Bacillus sphaericus* apresentaram a membrana peritrófica dobrada em zig-zag devido à expansão do intestino médio e, LACEY & FEDERICI (1979), encontraram um aspecto morfológico semelhante em larvas de *Simulium vittatum* expostas ao *B. thuringiensis*. No entanto, nenhuma evidência de alteração da MP, foi observada neste estudo.

ZHUZHNIKOV (1964), afirma que a MP é permeável a água, sais e pequenas moléculas orgânicas e, em outros experimentos, (ZHUZHNIKOV, 1970), relata também que, a MP de larvas de *A. aegypti* não possui permeabilidade iônica seletiva, sugerindo que trocas iônicas em compostos inorgânicos dissociados não teriam sua passagem afetada através da MP, o que pode fazer com que esta membrana não sofra alterações significativas

na presença dos inseticidas testados no presente estudo. Desta forma, é provável que as moléculas dos inseticidas dissolvidos na água, possam realmente passar pela MP e chegarem às células do intestino médio das larvas de *C. quinquefasciatus*, onde ocorre absorção e conseqüentemente seus efeitos deletérios são pronunciados.

Nas preparações em resina, coradas por HE pôde-se observar alterações histológicas provocadas pelos inseticidas e pelo tempo de exposição a estes. Aquelas larvas expostas aos inseticidas, mostraram-se aos 30 minutos de exposição, semelhantes ao grupo controle, no entanto, quando expostas por 60 minutos ao inseticida, evidenciaram-se modificações apicais nas células, grande quantidade de vesículas excretoras, além de um encurtamento das microvilosidades observadas à microscopia eletrônica. Isto sugere que as células epiteliais estão em intenso trabalho de síntese na tentativa de escapar do estresse provocado pelos inseticidas, sugerindo também, um meio de defesa dos mosquitos para os inseticidas testados no presente estudo, além de uma possível inibição das bombas iônicas.

Apesar de não se observar alterações na MP, o intestino médio mostrou-se diferente para as larvas expostas aos diversos grupos de inseticidas quando comparadas ao grupo controle. A parte basal das células epiteliais de larvas tratadas com os inseticidas mostrou-se pálida e acidófila. SNODGRASS (1935), LAHKIM-TSROR *et alii* (1983) e ARRUDA (2000) observaram aspectos semelhantes em larvas de *A. aegypti*.

O ápice destas células apresentou-se com borda em escova nos grupos controle, Abamectina e Cipermetrina. Entretanto, os grupos expostos à Deltametrina e ao Temefós apresentaram-se com coloração pálida e grande quantidade de vesículas, diferindo do grupo exposto à Ivermectina que apresentou ápice claro, sem borda em escova e sem vesículas.

LACEY & FEDERICI (1979), FERREIRA *et alii* (1981) e LAHKIM-TSROR *et alii* (1983) mostraram que a borda em escova desenvolvida na região posterior do intestino médio de mosquitos é devido ao fato de esta ser o principal sítio de absorção do intestino. Os testes histoquímicos realizados indicaram maior positividade nestas células cilíndricas para as reações de Azul de Bromofenol, nos grupos controle, Cipermetrina e Abamectina, mas os outros grupos também indicaram positividade, sugerindo natureza protéica de substâncias no citoplasma, como anteriormente demonstrado por ARRUDA (2000).

Produtos de secreção como enzimas, são realmente liberados pelas células do intestino médio, visto que, a função dessa região está primordialmente ligada a produção de substâncias contendo enzimas digestivas e a absorção de produtos de digestão (SNODGRASS, 1935; KING & AKAI, 1984; CRUZ-LANDIM, 1985; CHAPMAN, 1998 CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM, 1999) o que pode sugerir natureza protéica dessas vesículas.

No epitélio, observado em microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se presença de vesículas secretoras nas larvas. No entanto, apesar de haver reação positiva para o teste histoquímico, sugerindo vesículas com membranas lipídicas contendo proteínas como enzimas, o tipo de substância presente nestas vesículas não foi identificado, visto que, para tanto, são necessários estudos mais criteriosos, através de reações imunocitoquímicas.

Contudo, puderam-se evidenciar também diferenças entre os tipos de inseticidas aplicados, visto que algumas larvas apresentaram vesículas coradas mais intensamente, sugerindo modo de ação diferente para cada inseticida testado.

Apesar dos mecanismos pelos quais as enzimas são secretadas para dentro do intestino médio serem esclarecidos, SNODGRASS (1935) mostrou que a liberação dos

produtos de secreção é acompanhada pela passagem direta de substâncias através da borda em escova de células, relatando que, em muitos insetos, é possível ocorrer um processo de brotamento de vesículas das células epiteliais, demonstrando a existência de um mecanismo de liberação da secreção holócrina. Para KING & AKAI (1984) o mecanismo de secreção no intestino médio, pode ser do tipo apócrino, envolvendo o rompimento ou extrusão de parte do citoplasma das células epiteliais junto com o produto secretor, e ainda, que extrusões citoplasmáticas podem ocorrer por artefatos de fixação ou em resposta a períodos de jejum.

CRUZ-LANDIM (1985) observou mecanismos do tipo merócrinos e apócrinos em isópteros e himenópteros e BACCETTI (1961 *apud* CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM, 1999) e BERNER *et alii* (1983) relataram a existência de um modo de secreção do tipo merócrino e apócrino em Diptera.

De acordo com as análises morfológicas em microscopia óptica e eletrônica de transmissão do presente estudo, não se pode identificar com exatidão o modo de eliminação destas vesículas. De fato, segundo CRUZ-LANDIM (1985), o preciso mecanismo de eliminação de produtos secretores não é bem esclarecido e, sabe-se que as células digestivas de insetos passam por ciclos diversos de atividade. CHAPMAN (1998) aponta que certas regiões do intestino médio são frequentemente especializadas para funções particulares, podendo ocorrer modificações anatômicas.

Algumas alterações intestinais tais como desintegração e vacuolização, provocadas pela exposição das larvas aos inseticidas verificadas no presente estudo estão de acordo com resultados obtidos para larvas de culicídeos expostas a *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*

(KELLEN *et alii*, 1965; LAKTIM-TSROR *et alii*, 1983), além de extrato de *Magonia pubescens* (ARRUDA, 2000).

De fato, o uso de larvicidas químicos, independentemente do princípio ativo, causa danos fisiológicos e morfológicos em células do epitélio do tubo intestinal, indicando ser este, um local da absorção destes compostos. Ainda, independentemente do tipo de substância utilizada, as alterações destrutivas são muito semelhantes, sugerindo que estas mudanças sejam uma resposta comum a intoxicação celular.

O presente estudo também mostrou, com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão, alterações em determinadas organelas, principalmente na quantidade de mitocôndrias no interior das células epiteliais das larvas expostas aos inseticidas, indicando que a presença de energia é necessária para a vacuolização e conseqüente exportação das vesículas para fora das células, possivelmente, para tentativa de desintoxicação. E esta vacuolização, pode indicar que as células se encontram em estado de lise, possivelmente provocado pela presença das substâncias tóxicas.

Além disso, a presença de substâncias tóxicas também estaria alterando o tamanho das microvilosidade do intestino médio das larvas expostas aos inseticidas, assemelhando-se aos resultados obtidos por ARRUDA (2000).

Quando da análise em microscopia óptica, os testes histoquímicos mostraram alta e baixa positividade para lipídios neutros no grupo controle e no grupo exposto à Cipermetrina, respectivamente. Entretanto, para lipídios ácidos houve baixa positividade nas reações, evidenciadas nos grupos expostos à Deltametrina, Temefós, Ivermectina e Abamectina. Pode-se perceber também a diferença de granulações nos grupos expostos aos inseticidas quando se comparado ao grupo controle. Além disso, no grupo exposto aos

derivados da avermectina há grânulos menores nos trofócitos. Esta baixa positividade para os lipídios associado à diferente granulação nos trofócitos corrobora os resultados de ALVES *et alii* (2004) que mostraram a diminuição do tamanho da granulação lipídica nos trofócitos de larvas de *C. quinquefasciatus* expostas a 1,25ppb de Ivermectina por 30 minutos.

Quando se associa as evidências dos testes histoquímicos com a quantidade de vesículas secretoras nas células epiteliais das larvas expostas aos inseticidas, a possibilidade de ocorrer metabolização dos inseticidas fica mais evidente, já que para haver este processo é necessária energia, além da produção de enzimas que podem ser originadas no corpo gorduroso.

Além de ser um órgão de reserva energética, o corpo gorduroso também está associado com a síntese de lipídios e, segundo CHAPMAN (1998), ácidos graxos polinsaturados com 20 átomos de carbonos na cadeia, estão presentes nos fosfolipídios de muitas espécies de insetos. Derivados de ácidos graxos polinsaturados, conhecidos como eicosanóides, podem ser importantes na termorregulação e na mobilização dos lipídios, além de poderem mediar a resposta imune contra bactérias na hemolinfa (STANLEY-SAMUELSON *et alii*, 1991). Em larvas de mosquitos a falta de ácidos graxos com 20 átomos de carbono na sua cadeia faz com que os adultos que emergirem saiam fracos e sem a capacidade de vôo CHAPMAN (1998).

Segundo VALLE (1993), o corpo gorduroso também sintetiza a vitelogenina (Vg) da qual deriva a maior proteína do vitelo, a vitelina, cuja expressão mostra o desenvolvimento sexual, hormonal e a especificidade do tecido. A síntese de Vg ocorre em um curto período de tempo, envolvendo extensiva remodelagem citológica do corpo

gorduroso e ovário (VALLE, 1993). Segundo CLEMENTS (1996), algum aumento no tamanho celular ocorre com o acúmulo de lipídios e glicogênio, e o englobamento de proteínas está associado com um aumento considerável no volume das células do corpo gorduroso. Desta forma, para os derivados de piretróide, a possível liberação de energia para a metabolização destes inseticidas, pode estar levando os adultos a não produzirem ovos, como verificado no presente estudo em adultos originados de larvas expostas à Deltametrina ou a gerarem um número significativamente menor em comparação ao grupo controle, já que durante a vitelogênese as células do corpo gorduroso sofrem mudanças, passando de células armazenadoras de lipídios e glicogênio para células com uma excessiva síntese de proteínas (RAIKHEL & LEA, 1983, 1987).

ALVES *et alii* (2004) mostraram que as fêmeas originadas de larvas expostas à 1,5ppb de Ivermectina diminuíram o número de postura comparado ao grupo controle, porém o número de ovos gerados por essas fêmeas não foi significativamente diferente ao grupo controle, assemelhando-se aos dados obtidos no presente estudo.

TESH & GUSMAN (1990) relataram que a ingestão de sangue contendo doses subletais de Ivermectina causou diminuição na produção de ovos e redução na eclosão larval de mosquitos, entre eles o *C. quinquefasciatus*. MAHMOOD *et alii* (1991), mostraram que fêmeas de *A. aegypti* quando ingeriram sangue contendo Ivermectina, apresentaram pouco ou nenhum depósito de vitelo nos folículos ovarianos.

No presente estudo, as larvas de *C. quinquefasciatus* sobreviventes à exposição das soluções de inseticidas originaram adultos, assim como o grupo controle, que fizeram postura de ovos em tempos diferentes, demonstrando uma possível diferença na via de atuação dos inseticidas.

O prejuízo no corpo gorduroso causado nas larvas expostas ao inseticida, pode induzir um dano também no sistema de defesa no adulto, já que a síntese de proteínas deste órgão é necessária para a produção das células de defesa (CLEMENTS, 1996). Algo semelhante parece ter acontecido neste estudo, uma vez que com frequência, foi observada a proliferação de bactérias na cavidade do corpo das larvas expostas aos inseticidas, sugerindo uma deficiência das células de defesa destes insetos. Estudos metabólicos do corpo gorduroso poderão indicar se o sistema enzimático está sendo afetado (STRONG & BROWN, 1987), principalmente no corpo gorduroso de larvas, já que segundo TIMMERMANN & BRIEGEL (1999), a maior síntese de lipídios e proteínas acontece no quarto instar larval de mosquitos.

O desenvolvimento das gerações F1 dos grupos tratados e controle condiz com os resultados de VIANNA *et alii* (1996b), que mostraram uma variação do ciclo aquático entre 8 e 48 dias inversamente proporcional às temperaturas de 6,7°C e 29°C. No entanto, nos grupos tratados, essas gerações adiantaram, no mínimo, 1 dia o seu desenvolvimento de ovo a adulto. Esses resultados evidenciam que o período do ciclo aquático desta espécie pode estar sendo influenciado pela exposição da geração parental à solução de inseticidas, sugerindo uma alocação de energia maior para o rápido desenvolvimento larval e pupal, no sentido de evitar um possível estresse no meio ambiente.

A alocação de energia pode estar envolvida com diferentes processos fisiológicos, ou seja, o incremento de algum processo (por exemplo, longevidade), é contraposto a uma diminuição da alocação de recursos energéticos de outro (reprodução) (MAGALHÃES *et alii*, 2002). Este fenômeno, baseado no Princípio de Alocação, é conhecido como hormese (SIBLY & CALOW 1986). Então, de acordo com esse princípio, pode estar ocorrendo

hormese nas fêmeas originadas de larvas expostas à 20ppb de Cipermetrina durante 1 hora, pois após a fecundação, houve uma postura de ovos significativa quando comparada ao grupo controle. Fato este não observado para os demais grupos tratados.

Segundo MAGALHÃES *et alii* (2002) a modificação na alocação de energia no organismo do inseto, otimiza a viabilidade dos ovos, diminuindo o desperdício desta energia. Ainda segundo MAGALHÃES *et alii* (2002), o desperdício de energia diminuiu porque como se obteve mais ovos férteis por fêmea, gastou-se menos energia em ovos que não geraram descendentes. Os presentes resultados indicam que, provavelmente, houve uma resposta compensatória do inseto mesmo sob uma interferência no seu desenvolvimento para aqueles insetos oriundos de larvas expostas à concentração de 20ppb de Cipermetrina.

Apesar de serem raros os estudos de hormese com incremento de um parâmetro sem detrimento de outro (FORBES, 2000), isso pode acontecer. WINNER & FARREL (1976) demonstraram que várias características fisiológicas podem ser aumentadas quando estudaram a resposta de quatro espécies de *Daphnia* expostas a cobre. Baixos níveis de cobre estimularam várias características de uma dessas espécies estudadas. Considerando que todos os processos biológicos são atividades que requerem energia e a energia é limitante, é esperado que haja balanços energéticos entre os processos fisiológicos (MAGALHÃES *et alii*, 2002). Fato condizente com os dados obtidos no presente estudo, já que larvas expostas aos diferentes inseticidas mostraram-se com padrões diferentes quando se observou a morfologia do corpo gorduroso, principal órgão de alocação de energia nas larvas deste *C. quinquefasciatus* (CLEMENTS, 1996).

Observando também os dados de suscetibilidade do presente estudo e comparando com os dados dos parâmetros biológicos, nota-se que os insetos podem estar mais resistentes à Deltametrina que os outros inseticidas, pois SUÁREZ *et alii* (1998) mostra que a resistência aos inseticidas produz um efeito inversamente proporcional à reprodução. FERRARI & GEORGHIU (1981) obtiveram resultados semelhantes quando compararam uma linhagem suscetível de *C. quinquefasciatus* com duas linhagens que possuíam diferentes níveis de resistência à Temefós

ROBERT & OLSON (1989) trabalhando com doses sub-letais de inseticidas em *C. quinquefasciatus* chegaram a conclusão de que somente uma exposição a estes produtos tem um efeito importante na reprodução dos mosquitos. No entanto, SUÁREZ *et alii* (1998) relata que a pressão de seleção a que determinada linhagem de *C. quinquefasciatus* foi submetida à Cipermetrina, provavelmente selecionou genes de resistência diminuindo o potencial biótico da espécie. O mesmo foi observado para linhagens de *C. quinquefasciatus* expostas ao Temefós (FERRARI & GEORGHIU, 1981).

SUÁREZ *et alii* (1998) sugerem que o aumento da resistência, aumenta conjuntamente a sobrevivência dos adultos e a presença de efeito compensatório (*trade-off*) entre a longevidade e a reprodução produzido por um efeito pleiotrópico dos genes que conferem resistência aos inseticidas, o que provocam, de forma colateral a diminuição da taxa de reprodução das populações pressionadas, condizendo com os dados deste estudo.

A resistência a inseticidas ou a observação da eficácia de possíveis inseticidas são observados tanto em larvas, quanto em adultos. Uma das formas de se observar estes parâmetros em adultos é a utilização de telas impregnadas a inseticidas.

Segundo HOUGARD *et alii* (2003), a eficácia de piretróides usados para impregnação de redes de proteção contra mosquitos é resultado de uma atividade intrínseca entre o inseticida e o comportamento do mosquito alvo. Isto é relevante para inseticidas de ação rápida, como piretróides e DDT, com propriedades irritantes e de knock-down. A atividade intrínseca pode ser testada em mosquitos adultos fazendo com que estes tenham um contato tarsal com o material da tela impregnada. Através desta atividade, os resultados do presente estudo sugere que derivados da avermectina não são bons candidato ao tratamento de telas de proteção contra mosquitos, já que não mostrou significância no efeito knock-down ao *C. quinquefasciatus*.

Além disso, observando os testes de efetividade das telas impregnadas com avermectinas, para larvas destes mosquitos, percebe-se que o número de mortos diminui ao longo do tempo observado. O que pode sugerir que o tempo de exposição à luz pode fazer com que haja uma modificação na estrutura das moléculas das avermectinas impedindo a sua atividade sobre os insetos, já que a luz interfere na meia vida destes pesticidas (HALLEY *et alii*, 1989).

Os inseticidas podem causar alterações morfológicas e fisiológicas como observados no presente estudo. Vários outros estudos têm demonstrando que a genética também é influenciada pela ação dos inseticidas.

A genética dos indivíduos (elevado endocruzamento, baixa taxa de heterozigoze ou hibridação) juntamente com o ambiente (poluentes, parasitos, baixa oferta alimentar, temperatura) são dois pontos de distúrbios que podem elevar o nível de AF em um caráter.

A AF reflete então a habilidade de um organismo em desenvolver caracteres com precisão, enfrentando alterações genéticas ou ambientais. Esta habilidade varia

consideravelmente entre indivíduos de uma mesma população (SOULÉ, 1967; WATSON & THORNHILL, 1994).

No presente estudo utilizaram-se asas de *C. quinquefasciatus* da geração parental, cujas larvas foram submetidas a um estresse por inseticidas. A razão pela escolha da asa foi pela facilidade com a qual ela pode ser medida, além da boa precisão das medidas e da facilidade para se executar repetições. Numerosos estudos correlacionam os níveis de AF nas asas, com o grau de estresse químico devido a poluição ambiental com agentes químicos, tais como fertilizantes e pesticidas (CLARKE, 1993a,b; HARDENSEN *et alii*, 1999). A análise dos dados está de acordo com diversos estudos que utilizaram inseticidas como fator estressante (ALVES, 2000; BORGES, 2000; CHAPMAN & GOULSON, 2000; CLARKE *et alii*, 2000; FLOATE & FOX, 2000; HOSKEN *et alii*, 2000; BOURGUET *et alii*, 2004), já que houve pequenos distúrbios na perfeita simetria das asas, tanto em análise feita entre todos os inseticidas e o controle, quanto em análise feita apenas entre um inseticida e o controle.

Entretanto, quando se observaram as asas dos adultos originados de larvas expostas ao Temefós, pode perceber que tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram níveis substanciais de assimetria. MPHÓ *et alii* (2001) mostraram assimetria somente em machos originados de larvas expostas às concentrações, que variaram de 0,00011 a 0,00032 mg/l de Temefós, no entanto não observaram assimetria utilizando o parâmetro temperatura como variável. Explicações para a diferença dos resultados deste estudo para aqueles apresentados por MPHÓ *et alii* (2001), poderiam ser a dose utilizada e o tempo de exposição do inseticida, além da variação populacional.

Elevados níveis de AF foram detectados em populações que vinham sofrendo estresse genético (SOULÉ, 1967; PARSONS, 1990; SARRE & DEARN, 1991). Baixas taxas de heterozigose promovem um decréscimo na homeostase (SOULÉ, 1979; PARSONS, 1990; HUTCHISON & CHEVERUD, 1995; SHERRY & LORD, 1996) e elevados níveis de alterações morfológicas e de AF foram observados em casos em que a heterozigose foi diminuída (WAYNE *et alii*, 1986; CLARKE, 1992; HUTCHISON & CHEVERUD, 1995). A qualidade fenotípica é muito importante para a evolução, definida como habilidade esperada de um indivíduo para o sucesso na vida (POLAK & TRIVERS, 1994).

No entanto, BOURGUET *et alii* (2004) propõe que os alelos de resistência ao Temefôs em *C. pipiens*, não afetam a assimetria nas asas, pois a AF não tem componente genético hereditário, como proposto por MPHÓ (2002). Além disso, BOURGUET *et alii* (2004), também propõe que a variação alélica do *ace-1* e *Ester*, genes da resistência para Temefôs, não prejudicam a estabilidade do desenvolvimento de nenhuma característica morfológica e que a resistência dos alelos rompe um número restrito de caracteres, os quais não incluem as asas (CLARKE *et alii*, 2000).

A simetria é útil na variedade do contexto, além da escolha do parceiro; por exemplo, na alocação de recursos para a prole (THORNHILL & GANGESTAD, 1993). Da mesma forma, organismos são esperados a valorizarem a qualidade fenotípica em seus parceiros. Porém, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, é sugestivo que as fêmeas utilizem a AF em ornamentos, ou caracteres sexuais secundários, como indicador de qualidade fenotípica dos parceiros, preferindo machos com caracteres simétricos para o acasalamento.

Sabe-se que machos de *C. quinquefasciatus* formam um enxame para que as fêmeas voem durante o processo de acasalamento (DOWNES, 1969). Os machos necessitam de um controle de vôo preciso para serem capazes de copularem com a fêmea no vôo e a assimetria da asa poderá interferir nesta precisão. Indivíduos mais assimétricos obteriam menor sucesso reprodutivo (MØLLER, 1993; MØLLER & ERIKSON, 1995).

Além do estresse genético, vários autores têm discutido também o estresse ambiental fazendo uma relação com a AF causada por este estresse (MØLLER, 1995; WAUTERS *et alii*, 1996; DAVID *et alii*, 1998; WOODS *et alii*, 1999; ALVES, 2000; BORGES, 2000; CHAPMAN & GOULSON 2000; CLARKE *et alii*, 2000; FLOATE & FOX, 2000; HOSKEN *et alii*, 2000; BOURGUET *et alii*, 2004). De acordo com isto, a AF pode ser utilizada como biomarcador para determinar se o ambiente poluído está afetando o sistema biológico (PEAKALL & WALKER, 1994). Segundo MPHÓ (2000) o desvio de caráter simétrico, como asas em insetos, pode ser utilizado como biomarcador de certos tipos de ambientes estressantes, tal como a temperatura, verificada em asas de *C. pipiens* (MPHÓ *et alii*, 2002). Mas, neste caso, somente em condições extremas, como foi proposto por PARSONS (1992) e LEUNG *et alii* (2000).

Segundo CLARKE (1993a) o estresse que causa um aumento na assimetria é biologicamente relevante e este aumento da AF reflete numa diminuição da média da qualidade dos indivíduos numa população. No presente estudo, a análise das nervuras dos mosquitos tendo os efeitos sexo, tratamento e a interação destes, apresentaram significância para a AF. Os dados sugerem também que, os mecanismos por trás das relações de qualidade e AF são importantes de serem examinados.

A interação significativa entre os efeitos do tratamento e sexo para diferentes nervuras, tanto entre todos os inseticidas e os inseticidas separados, sugere que outras características da biologia da espécie, além do sexo, possam estar influenciando as alterações na AF em resposta ao tratamento.

Nem todas as nervuras avaliadas apresentaram o mesmo efeito. Quando foram avaliados os parâmetros envolvendo todos os inseticidas, pôde-se observar que somente a nervura M_{3+4} não mostrou resultado significativo. Entretanto esta nervura apresentou um efeito significativo para o sexo quando as larvas foram expostas à solução de 54ppb de Abamectina e analisadas somente com o grupo controle. A nervura M_2 também apresentou efeito significativo quando a análise foi feita entre o grupo exposto à solução de 50ppb de Temefôs e o grupo controle, no entanto o efeito foi entre a interação, o tratamento e o sexo.

Uma explicação para os resultados não significativos para a AF das nervuras das asas de *C. quinquefasciatus* pode-se basear na hipótese da “mortalidade diferencial” (FLOATE & FOX, 2000). Esta hipótese tem como princípio básico a assimetria medida em um subconjunto da população estudada, isto é, os indivíduos que se tornam adultos. Se a população for submetida a um pequeno aumento no estresse, o nível de assimetria dos indivíduos suscetíveis aumentará, assim como a média da assimetria de toda a população. Se esta mesma população for submetida a um estresse mediano, os indivíduos suscetíveis não alcançariam a idade adulta e conseqüentemente haveria uma diminuição na AF, uma vez que os resistentes, normalmente mais assimétricos na ausência do inseticida, não apresentam um aumento na assimetria se submetidos a inseticidas.

No entanto, somente estudos posteriores com diferentes dosagens, poderiam indicar se as nervuras avaliadas estariam sofrendo ou não com a ação dos inseticidas.

De acordo com o resultados obtidos, pôde-se observar que os objetivos propostos para este trabalho mostraram que os inseticidas em suas doses sub-letais causam alterações morfológicas no corpo gorduroso e mudanças no pH do tubo intestinal médio das larvas, além de modificações estruturais nas asas dos adultos causando assimetria flutuante.

5- Conclusões

O presente trabalho permite concluir que, nas condições experimentais descritas:

1. As larvas são suscetíveis a todos os inseticidas testados quando em concentrações elevadas.
2. Há uma necessidade de um monitoramento dos inseticidas utilizados.
3. Os inseticidas causam uma diminuição do pH intestinal das larvas.
4. Os inseticidas afetam o corpo gorduroso e o epitélio do intestino médio das larvas.
5. As fêmeas originadas de larvas expostas à concentração subletal de Deltamentrina não fazem postura de ovos.
6. A Cipermetrina reduz o número de adultos na geração F1.
7. Os derivados da avermectina têm maior eficiência sobre as larvas.
8. A assimetria flutuante tem efeito sobre o sexo, tratamento e a interação destes.
9. A Ivermectina pode ser utilizada em menor concentração que os demais inseticidas utilizados.

6- Bibliografia

ABERCROMBIE, J.; BERG, C.O. Malacophagous diptera of South America: Biology and immature stages of *Dictyodes dictyodes* (Sciomyzidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 22, p. 23-32, 1978.

ALDRIDGE, W.N. Insectidis, past, present and future: practice and the understanding of mechanisms. *The Annals of Occupations Hygiene*, v. 22, p. 407-409, 1979.

ALVES, S.N. Efeitos da exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à dose sub-letal de ivermectina. 2000. 60f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

ALVES, S.N., HORTA, M.A.P., FARIA, M.A.; MELO, A.L. 1996b. Efeito da ivermectina em *Pomacea haustum* e *Physa* sp. In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 21, 1996, Porto Alegre. **Resumos...**, Porto Alegre: p.37, 1996b.

ALVES, S.N., HORTA, M.A.P.; MELO, A.L. Efeito de benzodiazepínico e ivermectina em *Dugesia tigrina* (Plathyhelminthes - Turbellaria). In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 21, 1996, Porto Alegre. **Resumos...**, Porto Alegre: p.15, 1996a.

ALVES, S.N.; SERRÃO, J.E.; MOCELIN, G.; MELO, A.L. Ivermectin effects on the life cycle and larval fat body of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera, Culicidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, n.3, p. 433-499, 2004.

ARMSTRONG, K.F.; BONNER, A.B. Investigation of a permethrin-induced antifeedant effect in *Drosophila melanogaster*: an ethological approach. *Pesticide of Science*, v. 16, p. 641–650, 1985.

ARRUDA, W. Estudo morfohistológico do tubo digestivo de larvas de *Aedes aegypti* submetidos ao extrato da planta *Magonia pubescens* (Tinguí) 143f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

AZIZ, M.A.; DIOP, I.M.; DIALLO, S.; LARIVIERE, M.; PORTA, M. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. *Lancet*, v. 2, p.171-173, 1982.

BARBEHENN, R.V.; MARTIN, M.M. Permeability of the peritrophic envelopes of herbivorous insects to dextran sulfate: a test of the polyanion exclusion hypothesis. *Journal of Insect Physiology*, v. 43, p. 243-249, 1997.

BECKER, B. Effects of 20-hidroxyecdysone, juvenile hormone, dimilin and captan on *in vitro* synthesis of peritrophic membrane in *Calliphora erythrocephala*. *Journal of Insect Physiology*, v. 24, p. 699-705, 1978

BEERNSTSEN, B.T.; JAMES, A.A.; CHRISTENSEN B.M. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p. 115–137, 2000.

BERNER, R.; RUDIN, W.; HEACKER, H. Peritrophic membranes and protease activity in midgut of the malaria mosquito, *Anopheles stphensi* (Liston) (Insecta: Diptera) under normal and experimental conditions. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 83, p. 195-204, 1983.

BISSET, J.A.; RODRIGUEZ, M.M.; HEMINGWAY, J.; DIAZ, C.; SMALL, G.J.; ORTIZ, E. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 5, p. 223-228, 1991.

BLOOMQUIST, J.R. Ion channels as targets for insecticides. *Annual Reviews of Entomological.*, v. 41, p.163-190, 1996.

BORGES, M.A.Z. Efeitos da Ivermectina em dípteros saprofágicos das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae. 60f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Departamento de Parasitologia /Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

BORGES, M.A.Z.; HORTA, M.A.P.; MELO, A.L. Diminuição do potencial reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* após exposição à ivermectina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, XXII, 1998, Recife. **Resumos...**, Recife: p.71, 1998.

BOUDKO, D.Y.; MOROZ, L.L.; LINSER, P.J.; TRIMARCHI, J.R.; SMITH, P.J.S.; HARVEY, W.R. *In situ* analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. *Journal of Experimental Biology*, v. 204, p. 691-699, 2001.

BOURGUET, D.; GUILLEMAUD, T.; CHEVILLON, C.; RAYMOND, M. Fitness costs of insecticide resistance in natural reading sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, v.58, p. 128–135, 2004.

BRACCO, J.E.; BARATA, J.M.S.; MARINOTTI, O. Evaluation of insecticide resistance and Biochemical Mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 115-20, 1999.

BRENGUES, C.; HAWKES, N.J.; CHANDRE, F.; McCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.S.; MANGUIN, S.; MORGAN, J.C.; HEMINGWAY, J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 17, p. 87-94, 2003.

BROWN, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of American Mosquito Control Association*; v. 2, p. 123-40, 1986.

BRYANT, R. Agrochemicals in Perspective: Analysis of the Worldwide Demand for Agrochemical Active Ingredients. In: The Fine Chemicals Conference 1999 [sinopse na internet] <http://agranova.co.uk/agtalk99.asp> Acessado em 24 de agosto de 2007

BUSS, D.S.; McCAFFERY, A.R. and CALLAGHAN, A. Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 16, p. 218-222. 2002

CAMPBELL, W. C. Ivermectin: na uptdate. *Parasitology Today*, v. 1, p.10-16, 1985.

CAMPBELL, W.C.; FISHER, M.H.; STAPLEY, E.O.; ALBERS-SHÖNBERG, G; JACOB, T. A. Ivermectin: a potent antiparasitic agent. *Science*, v. 221, p. 823-828, 1983.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C.F.S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, p. 232-6, 2001.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C.F.S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, v. 37, p. 523-7, 2003.

CAVALCANTE, V.M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia*, v. 24, p. 19-40, 1999.

CHANDRE, F.; DARRIET, F.; DOANNIO, J.M.C.; RIVIÈRE, F.; PASTEUR, N.; GUILLET, P. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in west Africa. *Journal of Medical Entomology*, v. 34, n. 6, p. 664-671, 1997.

CHAPMAN, J.W.; GOULSON, D. Environmental versus genetic influences on fluctuating asymmetry in the house fly, *Musca domestica*. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 70, p. 403–413, 2000.

CHAPMAN, R.F. *The insects: structure and function*. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770p.

CHINN, K.; NARAHASHI, T. Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Physiology (London)*, v. 380, p.191-207, 1986

CHRISTENSEN, B.M.; FORTON, K.F. Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. *Journal of Parasitology*, v. 72, p. 220–225, 1986.

CLARKE, G.M. Fluctuating asymmetry: A technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin. *Acta Zoologica Fennica*, v. 191, p.31-35, 1992.

CLARKE, G.M. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environmental Pollution*, v. 82, p.207-211, 1993a.

CLARKE, G.M. Patterns and development stability of *Chrysopa perla* L. Neuroptera: Chrysomelidae in response to environmental pollution. *Environmental Pollution*, v. 22, p.1362-1366, 1993b.

CLARKE, G.M.; YEN, J.L.; MCKENZIE, J.A. Wings and bristles: character specificity of the asymmetry phenotype in insecticide-resistant strains of *Lucilia cuprina*. *Proceedings of the Royal Society of London B*, n. 267, p. 1815–1818, 2000.

CLEMENTS, A.N. *The biology of mosquitoes*. London: Chapman & Hall, 1996. v.1.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 225p.

CONSOLI, R.A.G.B.; PEREIRA, J.P.; SILVEIRA, J.N.; CASTRO, M.M.T. Suscetibilidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* (Say) e *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) a diversos inseticidas em laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 30, p. 79-85, 1986.

CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo de insetos. *Anais da ACIESP*. n. 44-IV, p 28-49, 1985;

CVETOVICH, R.J.; SENANAYAKE, C.H.; AMATO, J.S.; DiMICHELLE, L.M.; BILL, T.J. *et alii* Practical synthesis of 13-O-[(2-methoxyethoxy) methyl]-22, 23-dihydroavermectin B1 aglycon [dimelectin isopropanol, MK-324] and 13-epi-O-(2-methoxymethyl)- 22, 23-dihydroavermectin B1 aglycon [L-694,554], flea active ivermectin analogues. *Journal of Organic Chemistry*, v. 62, p. 3989-3993, 1997.

DAVID, P.; HINGLE, A.; GREIG, D.; RUTHERFORD, A.; POMIANKOWSKI, A.; FOWLER, K. Male sexual ornament size but not asymmetry reflects condition in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v. 265, p.2211–2216, 1998.

DAVIDSON, E.W. Ultrastructure of midgut in the pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SSII-1 infection of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 25, p. 178-184, 1979.

DEANE, L.M. Observações sobre alguns hábitos dos adultos de *Culex fatigans*, o principal tranmissor da filariose em Belém, Pará. *Rev. S. E. S. P.* v. 4, p. 423-464, 1951.

DE AZAMBUJA, P.; GOMES, J. E. P. L.; LOPES, F. & GARCIA, E. S. Efficacy of ivermectin against the bloodsucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p.439-442, 1985.

DIMOPOULOS, G.; MULLER, H.M.; LEVASHINA, E.A.; KAFATOS, F.C. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Current Opinion in Immunology*, v. 13, p. 79–88, 2001.

DORTA, M.D.; VASUKI, V.; RAJAVEL, A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species. *Revista de Saúde Pública*, v. 27, p. 391-397, 1993.

DOVER, M.J.; CROFT, B.A. Pesticide resistance and public policy. *Bio-Science*, v. 36, p. 78-85, 1986.

DOWNES, J.A. The swarming and mating flight of Diptera. *Annual Review of Entomology*, v. 14, p. 271-298, 1969.

DYBAS, R.A. Abamectin use in crop protection. In: CAMPBELL, W.C., ed. *Ivermectin and abamectin*. New York, Springer-Verlag, 1989; p.287-310.

FARIA, M.A.; MELO, A.L.; PEREIRA, L.H. Efeito da ivermectina em *Biomphalaria glabrata*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS, IV, 1993. Rio de Janeiro. **Resumos...**, Rio de Janeiro: p. 234, 1993.

FERRARI, J.A.; GEORGHIU, G.P. Effect of insecticidal selection and treatment on reproductive potential of resistant, susceptible and heterozygous strains of the Southern house mosquito. *Journal of Economic Entomology*, v. 4, p. 323-327, 1981.

FERREIRA, C; RIBEIRA, A.F.; TERRA, W.R. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. *Journal of Insect Physiology*, v. 25, p. 559-570, 1981.

FILIPPOVA, M; ROSS, L.S.; GILL, S.S. Cloning of the V-ATPase B subunit cDNA from *Culex quinquefasciatus* and expression of the B and C subunits in mosquitoes. *Insect Molecular Biology*, v. 7, p.223-232,1998.

FISHER, M.H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W.C., *Ivermectin and Abamectin*. New York: Springer-Verlag, 1989. p. 1-23.

FLOATE, K.D.; FOX, A.S. Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. *Ecology Applied*, v. 10, p. 1541–1550, 2000.

FOCKS, D.A.; McLAUGHLIN, R.E.; LINDA, S.B. Effects of ivermectin (MK-933) on the reproductive rate of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 28, p. 501-505, 1991.

FORATTINI, O.P. *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. v. 2, 860p.

FORBES, V.E. Is hormesis an evolutionary expectation? *Functional Ecology*, v. 14, p. 12-24, 2000.

FORGAC, M. Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H⁺-ATPases. *Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 71–80, 2000.

FORSHAW, P.J.; LISTER, T.; Ray, D.E. Inhibition of a neuronal voltage-dependent chloride channel by the type II pyrethroid, deltamethrin. *Neuropharmacology*, v. 32, p.105-111, 1993

FORSHAW, P.J.; LISTER, T.; Ray, D.E. The role of voltage-gated chloride channels in type II pyrethroid insecticide poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 163, p.1-8, 2000.

FORSHAW, P.J.; RAY, D.E. A novel action of deltamethrin on membrane resistance in mammalian skeletal muscle and non-myelinated nerve fibres. *Neuropharmacology*, v. 29, p.395-401, 1990

FRANCO, J.G.; ARTHUR, V.; FRANCO, S.S.H. Efeito das radiações microondas nas fases de ovo e larva de *Sitophilus oryzae* (Linné, 1763) (Coleoptera, Curculionidae) em

arroz, visando o seu controle. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v.69 (supl.), p. 271-274, 2002.

FREITAS, R.M.C.; FARIA, M.A.; ALVES, S.N.; MELO, A.L. Effects of Ivermectin on *Culex quinquefasciatus* larvae. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, p.111-115, 1996.

GALLO, M.A.; LAWRENCE, N.J. Organic phosphorus pesticides. In: *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W. J.; Laws, E. R. J. (Ed.). New York: Academic Press, 1991. p. 917-1123.

GAONA, J.C. Análise citológica de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicinae). 100f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

GARDNER, K.; MEISH, M. V.; MEEK, C. L.; BIVIN, W. S. Effects of ivermectin in canine blood on *Anopheles quadrimaculatus*, *Aedes albopictus* and *Culex salinarius*. *Journal of American Mosquito Control Association*, v. 9, p. 400-402, 1993

GEORGHIOU, G.; PASTEUR, N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *Journal of Economic Entomology*, v. 71, p.201-205, 1978.

GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M.; TRAN, H.; SAUME, F; KNUDSEN, B. Potencial for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *Journal of Medical Entomology*, v. 24, p.290-294, 1987.

GERBERG, E.J. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *American Mosquito Control Association Bulletin 5*: Ed. Collins, DL. 1979. 109p

GERMANN, U.A. & CHAMBERS, T.C. Molecular analysis of the multidrug transporter, p-Glycoprotein. *Cytotechnology*, v. 27, p. 31-60, 1998.

GLUCK, S. V-ATPases of the plasma membrane. *Journal of Experimental Biology*. v. 172, p. 29-37, 1992.

GONZÁLEZ, T.; BISSET, J.A.; DÍAZ, C.; RODRÍGUEZ, M.M.; BRANDOLINI, M.B. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; v. 94; p.121-2, 1999.

HALLBERG, G. R. Pesticide pollution of groundwater in the United State. *Agriculture and Ecosystems Environment*, v. 26, p.299-367, 1989.

HALLEY, B.A.; NESSEL, R.J.; LU, A.Y.H. Environmental aspects of ivermectin usage in livestock: general considerations. In: CAMPBELL, W.C., *Ivermectin and Abamectin*. New York: Springer-Verlag, 1989. p. 162-172.

HARDERSEN S.; WRATTEN, S.D.; FRAMPTON, C.M. Does carbaryl increase fluctuating asymmetry in damselflies under field conditions? A mesocosm experiment with *Xanthocnemis zealandica* (Odonata: Zygoptera). *Journal of Applied Ecology*, v. 36, p. 534-543, 1999.

HARWOOD, R.F.; JAMES, M.T. *Entomology in human and animal health*. New York: Macmillian Publishing Co., 1979. 548p.

HAUG, G.; HOFFMAN, H. (Ed). *Chemistry of Plant Protection*. Synthetic Pyrethroid Insecticides: Structures and Properties. New York: Springer-Verlag, 1990. V. 4

HILLYER, J.F.; CHRISTENSEN, B.M. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 117, p. 431-440, 2002.

HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY, C.A.; EZEKOWITS, R.A.B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, v. 284, p. 1313-1318, 1999.

HORTA, M.A.P.; CUNHA, F.A.F.; MELO, A.L. *Belostoma anurum*: efeitos da predação de *Biomphalaria glabrata* exposta à ivermectina. In; Semana de Iniciação Científica da UFMG, 3, 1994. Belo Horizonte **Resumos...** Belo Horizonte: p.99, 1994a.

HORTA, M.A.P., CUNHA, F.A.F., FREITAS, R.M.C. MELO, A.L. *Martarega uruguayensis*: predação de larvas de *Culex quinquefasciatus* expostas à ivermectina. In: Encontro de Pesquisa do ICB, 4, 1994. Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: p.96, 1994b.

HOSKEN, D.J.; BLANCKENHORN, W.U.; WARD, P.I. Developmental stability in yellow dung flies (*Scathophaga stercoraria*): fluctuating asymmetry, heterozygosity and environmental stress. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 13, p. 919–926, 2000.

HOUGARD, J.; DUCHON, S.; DARRIET, F.; ZAIM, M.; ROGIER, C.; GUILLET, P. Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, p. 324-333, 2003.

HURLBUT, H.S. The transmission of Japanese B Encephalitis by mosquitoes after experimental hibernation. *American Journal of Hygiene*, v. 51, n. 3, p. 265-268, 1950.

HUTCHISON, D.W.; CHEVERUD, J.M. Fluctuating asymmetry in Tamarin (*Saguinus*) cranial morphology: Intra- and interespecific comparisons between taxa with varying levels of genetic heterozygosity. *Journal of Heredity*, v. 86, p.280-288, 1995.

JACKSON, H.C. Ivermectin as a systemic insecticide. *Parasitology Today*, v. 5, p. 146-156, 1989

JONES, J.W.; MEISH, M.V.; MEEK, C.L.; BIVIN, W.S. Lethal effects of ivermectin on *Anopheles quadrimaculatus*. *Journal of American Mosquito Control Association*, v. 8, p. 278-280, 1992.

KAO, L.R.; MOTOYAMA, N.; DAUTERMAN, W.C. Study on hydrolases in various housefly strains and their role in malathion resistance. *Pesticide Biochemistry Physiology*, v. 22, p. 86-92, 1984.

KELLEN, W.R.; CLARK, T.B.; LINDEGREN, J.E.; HO, B.C.; ROGOFF, M.; SINGER, S. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquito. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 7, p. 442-448, 1965.

KHAMBAY, B.P.S.; JEWESS, P.S. Pyrethroids. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier: New York, 2005.

KING, M.M.; AKAI, H. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: *Insect ultrastructure*. Plenum Press, New York, 1984.

KOGAN, P.H.; HAGEDORN, H.H. Polyamines, and effects from reducing their synthesis during egg development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, v. 46, p.1079–1095, 2000.

KOKKO, E.G.; FLOATE, K.D.; COLWELL, D.D.; LEE, B. Measurement of fluctuating asymmetry in insect wings using image analysis. *Annals of the Entomology Society American*, v. 89, n. 3, p.398-404, 1996.

LACEY, L.A.; FEDERICI, B.A. Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 33, p. 171-182, 1979.

LAHKIM-TSROR, L.; PASCAR-GLUZMAN, C.; MARGALIT, J.; BARAK, Z. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*, serovar H14 in *Aedes aegypti*: Hystopathology studies. *Journal of General Virology*, v. 41, p. 104-1116, 1983.

LASSALE, J. Parasitic Hymenoptera, Biological Control and Biodiversity. In: LASSALE, J. & GAULD, I. D. (Eds.), *Hymenoptera and Biodiversity*. Wallingford: CAB, 1993. 350pp.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Reviews of Entomology*, v. 42, p. 525–550, 1997.

LEHANE, M.J. The formation and histochemical structure of the peritrophic membrane in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Journal of Insect Physiology*, v. 22, p. 1551–1557, 1976.

LEUNG, B.; FORBES, M.R.; HOULE, D. Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traits. *The American Naturalist*, v. 155, p. 101–115, 2000.

LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, p. 219–229, 2001.

LOWENBERGER, C.; BULET, P.; CHARLET, M.; HETRU, C.; HODGEMAN, B.; CHRISTENSEN, B.M.; HOFFMANN, J.A. Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 25, p. 867–873, 1995.

LUNDBERGH, I.; KREUGER, J.; JOHNSON, A. Pesticide in Surface Waters. *Council of Europe Report*. Council of Europe Press, 1995. 56 p. (CD-P-sp/t v. 94, n. 87).

MAGALHÃES, L.C.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, E.E.; TUELHER, E.S. Desenvolvimento e reprodução do predador *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) frente a doses subletais de permetrina. *Neotropical Entomology*, v. 31, p. 445-448, 2002.

MAHMOOD, F.; WALTERS, L.L.; GUZMAN, H.; TESH, R. Effect of ivermectin on the ovarian development os *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 28, p. 701-707, 1991.

MARICONI, F.A.M. *Inseticidas e seu emprego no combate às pragas*. 4^a ed. São Paulo: Editora Nobel, 1980. v. 1

MARMARAS, V.J.; CHARALAMBIDIS, N.D.; LAMBROPOULOU, M. Cellular defense mechanisms in *C. capitata*: recognition and entrapment of *E. coli* by hemocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 26, p. 1–14, 1994.

MAZZARRI, M.B.; GEORGHIOU, G.P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of American Mosquito Control Association*; v. 11, p. 315-22, 1995.

MEYERS, E.G.; LOMIS, E.C.; FUGIMOTO, F.Y. OTA, M.I.; LENNETTE, E.H. California encephalitis surveillance program. *American Journal of Hygiene*, v. 71, p. 368-377, 1960.

MIADOKOVÁ, E.; VLCKOVÁ, V.; DUHOVÁ, V.; TREBATICÁ, M.; GARAJOVÁ, L.; GROLMUS, J.; PODSTAVKOVÁ, S.; VLCEK, D. Effects of supercypermethrin, a synthetic developmental pyrethroid, on four biological test systems. *Mutagenic Research*, v. 280, p. 161-168. 1992

MØLLER, A.P.; ERIKSON, M. Pollinator preference for symmetrical flowers and sexual selection in plants. *Oikos*, v. 73, p.15-22, 1995.

MØLLER, A.P. Patterns of fluctuating asymmetry in sexual ornaments predict female choice. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 6, p.481-491, 1993.

MØLLER, A.P. Patterns of fluctuating asymmetry in sexual ornaments of birds from marginal and central populations. *American Naturalist*, v. 145, p.316-327, 1995.

MONCAYO, A.C.; LERDTHUSNEE, K.; LEON, R.; ROBICH, R.M.; ROMOSER, W.S. Meconial peritrophic matrix structure, formation, and meconial degeneration in mosquito pupae/pharate adults: histological and ultrastructural aspects. *Journal of Medical Entomology*, v. 42 p. 939-944, 2005.

MPHO, M.; CALLAGHAN, A.; HOLLOWAY, G.J. Temperature and genotypic effects on life history and fluctuating asymmetry in a field strain of *Culex pipiens*. *Heredity*, v. 88, p. 307–312, 2002.

MPHO, M.; HOLLOWAY, G.J.; CALLAGHAN, A. Fluctuating asymmetry and larval density stress in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, v. 90, p. 279-283, 2000.

MPHO, M.; HOLLOWAY, G.J.; CALLAGHAN, A. A comparison of the effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on fluctuating asymmetry and life history traits in *Culex quinquefasciatus*. *Chemosphere*, v. 45, p. 713–720, 2001.

NEVES, D.P.; LINARDI, P.M.; CUNHA, H.C. Emprego do K-othrine (Decamethrin NRDC-161) no controle de *Aedes fluviatilis* e de *Culex pipiens fatigans*: testes de laboratório e campo. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 41, p. 607-14, 1981.

NEVES, F.S.; VIANNA, G.J.C.; TEIXEIRA, B.M.; MELO, A.L. Ação tóxica da ivermectina em *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattellidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, XVII, 1998. Rio de Janeiro. **Resumos...**, Rio de Janeiro: p.31, 1998.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Resistencia de vetcores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. 22º informe del Comité de Expertos de la OMS en Insecticidas. 1976. 585p. (Série de Informes Técnicos).

ORTEGA, A.N.; MARQUETTI, M.C.; VALDES, S.; GARCIA, F.A. Tolerance of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) to Methoprene in Cuba. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, p.493, 1991.

PALMER, A.R.; STROBECK, C. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology Systematics*, v. 17, p.391-421, 1986.

PARSONS, P.A. Fluctuating asymmetry: An epigenetic measure of stress. *Biology Review*, v. 65, p.131-145, 1990.

PARSONS, P.A. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genetics stress. *Heredity*, v. 68, p. 361-364, 1992

PEAKALL, D.B.; WALKER, C.H. The role of biomarkes in environmental assessment (3). *Vertebrates. Ecotoxicology*, v.3, p. 173-179, 1994.

PEASE, D.C. *Histological techniques for electron microscopy*. London: Academic Press, 1964. pp. 50-53.

PEIRIS, H.T.R.; HEMINGWAY, J. Temephos resistance and the associated cross-resistance spectrum in a strain of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from Peliyagoda, Sri Lanka. *Bulletin of Entomological Research*, v. 80, p.49-55, 1990.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. *Parasitologia Médica*. 11^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988. 872p.

PETERS, W. Peritrophic membranes. In: BRADSHAW, S.D.; BURGGREN, W.; HELLER, H.C.; ISHII, S.; LANGER, H.; NEUWILER, G.; RANDALL, D.J. (Ed.), *Zoophysiology*, Berlin: Springer-Verlag, 1992. vol. 30, 238p.

PIMENTA, P.F.P.; MODI, G.B.; PEREIRA, S.T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D.J. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, v. 115, p. 359-369, 1997.

POLAK, M; TRIVERS, R. The science of symmetry in biology. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 9, p.122-124, 1994.

RACHOU, R.G. Transmissores da filariose bancroftiana no Brasil. *Revista Brasileira de Malária e Doenças Tropicais*, v. 8, p. 267-279, 1956.

RAIKHEL A.S.; LEA, A. O. Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: An ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue & Cell*, v. 15, p.281-300, 1983.

RAIKHEL A.S.; LEA, A. O. Analysis of mosquito yolk protein by monoclonal antibodies. *In: LAW, J. (Ed.) Molecular Entomology*. New York: Alan R. Liss Inc., 1987. p.403-13

RAWLINS, S.C; WAN, J.O.H. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *Journal of American Mosquito Control Association*; v. 11, p. 56-59, 1995.

REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SNEH, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A.

Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Apply of Environment Microbiology*, v. 62, p. 3581-3586, 1996.

REINEKE, S; WIECZOREK; H; MERZENDORFER; H. Expression of *Manduca sexta* V-ATPase genes *mvb*, *mvg* and *mvd* is regulated by ecdysteroids. *The Journal of Experimental Biology* v. 205, p. 1059–1067, 2002.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 17, p. 208-212, 1963.

RIBEIRO, P.B. Exigências térmicas do ciclo aquático do *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae) em Pelotas, RS. (Tese) – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1993.

RICHARDS, R.P.; BAKER, D.V. Pesticide contamination patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie basin. *Environment Toxicology Chemistry*, v. 12, p.13-26, 1993.

RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insects. *Annual Reviews of Entomology*, v. 22, p. 219-240, 1977.

ROBERT, L; OLSON, J.K. Effects of sublethal dosage of insecticides on *Culex quinquefasciatus*. *Journal of American Mosquito Control Association*; v. 5, p. 39-46, 1989.

SAMES, W.J.; BUENO Jr., R., HAYES, J. OLSON, J.K. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and t *Aedes albopictus* in the Lower Rio Grande Valley of Texas and Mexico. *Journal of American Mosquito Control Association*; v. 12, p. 487-490, 1996.

SANT'ANNA, M.R.V.; MELO, A.L. Efeitos tóxicos da ivermectina em estádios imaturos de *Martarega uruguayensis* (Heteroptera – Notonectidae) em laboratório. In: ENCONTRO DE PESQUISA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFMG, V, 1996. Belo Horizonte. **Resumos...**, Belo Horizonte: p. 27 1996

SARRE, S.; DEARN, J. D. Morphological variation and fluctuating asymmetry among insular populations of the sleepy lizard, *Trachydosaurus rugosus* Gray (Squamata: Scincidae). *Australian Journal of Zoology*, v. 39, p.91-104, 1991.

SCOTT, J.G. Cytochrome, P450 monooxygenase-mediated resistance to insecticides. *Journal Pesticide Science*, v. 21, p. 241–245, 1996.

SEIF, A. I. HUSSEINY, I. M.; SOLIMAN, B. A., SOLIMAN, M. A. & EL-KADY, M. A. Development of *Wuchereria bancrofti* in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) exposed in the larval instar to sublethal dosages of insecticides and one insect growth regulator and their influence on reproduction of filaria-infected mosquitoes. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 27, n. 3, p.843-853, 1997.

SHAHABUDDIN, M.; LEMOS, F.J.A.; KASLOW, D.C.; JACOBS-LORENA, M. Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsins blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 739-743, 1996.

SHERRY, R.A.; LORD, E.M. Developmental stability in leaves of *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae) as related to population outcrossing rates and heterozygosity. *Evolution*, v. 50, p.80-91, 1996.

SIBLY, R.M.; CALOW, P. *Physiological ecology of animals - an evolutionary approach*. Blackwell, Scientific Publications, Oxford. 1986.

SILVEIRA, G.A.R., MADEIRA, N.G., DE AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; PAVAN, C. Levantamento de Microhimenópteros parasitóides de dípteros de importância médico-veterinária no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84 (supl. 4), p. 505-510, 1989.

SINTON, J. A. & SHUTE, P. G. A report on the longevity of mosquitoes in the relation to the transmission of Malaria in nature. Reports on Public Health and Medical Subjects. Ministry of Health, H. M. S. O., London. 1938. (Rep. n. 85).

SNODGRASS, R.E. The alimentary canal. In: *Principles of Insect Morphology*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1935.

SOULÉ, M. E.; COUZIN-ROUDY, J. Allomeric variation 2. Developmental instability of extreme phenotypes. *American Naturalist*, v. 120, p.765-786, 1982.

SOULÉ, M. E. Heterozigosity and developmental stability: another look. *Evolution*, v. 33, p.396-401, 1979.

SOULÉ, M. E. Phenetics of natural populations II. Asymmetry and evolution in a lizard. *American Naturalist*, v. 101, 141-160, 1967.

SPRADBERY, J.P.; TOZER, R.S.; DREWETT, N.; LINDSEY, M.J. The efficacy of ivermectin against larvae of the screw-worm fly (*Chrysomya bezziana*). *Australian Veterinary Journal*, v. 62, p.311-314, 1985.

STANLEY-SAMUELSON, D.W.; JENSEN, E.; NICKERSON, K.W.; TIEBEL, K.; OGG, C.L.; HOWARD, R.W. Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 88, p. 1064-1068, 1991.

STATSOFT, INC. *Eletronic Statistics Textbook*. Tulsa: StatSoft, 1999. Disponível em: <http://www.statsoft.com/textbook/stahome.html>. Acesso em maio de 2007.

STRONG, L. Overview: The impact of avermectins on pastureland ecology. In: HERD, R., STRONG, L.; WARDHAUGH, K., (Ed.), Environmental impact of avermectina usage in livestock. *Veterinary Parasitology* n. 48, p. 3-17. 1993 (special issue).

STRONG, L. Ivermectin prevents head eversion in the blowfly *Calliphora vomitoria* (L.). *Experientia*, v. 42, p.1295-1296, 1986.

STRONG, L.; BROWN, T.A. Avermectins in insect control and biology: a review. *Bulletin of Entomological Research*, v. 77, p. 357-389, 1987.

SUÁREZ, M.F.; GONZÁLEZ, R.; MORALES, C.A. Temephos resistance to *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. In: Abstract of the 45th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1996. Baltimore, Maryland, **Resumos...**, Baltimore: p. 257

SUÁREZ, S.; MONTADA, D.; FUENTES, O.; CASTEX, M.; LEYVA, M. Efecto de la resistencia a los insecticidas sobre algunos parámetros demográficos de 3 cepas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), en condiciones de laboratorio. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, v. 50, p. 124-8, 1998.

SUBRA, R. Biology and control of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera - Culicidae) with special reference to Africa. 1980, 40p. (WHO/VBC/ 80.781)

TELLAM, R.L. The peritrophic matrix. In: Lehane, M. J.; Billingsley, P. F. (Ed.), *Biology of the Insect Midgut*, London: Chapman & Hall, 1996. p. 86-114.

TERRA, W.R. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência e Cultura*, v. 48, p. 317-324, 1996.

TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 47, p. 47-61, 2001.

TESH, R.B.; GUZMAN, H. Mortality and infertility in adult mosquitoes after the ingestion of blood containing ivermectin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 43, p. 229-233, 1990.

TIMMERMANN, S. E. & BRIEGEL, H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, v. 45, p.461-470, 1999.

THORNHILL, R.; GANGESTAD, S.W. Human facial beauty: averageness, symmetry and parasite resistance. *Human Nature*, v. 4, p.237-269, 1993.

TOMLIN, C.D.S. The Pesticide Manual: a World Compendium, 12th edn. British Crop Protection Council, Farnham, UK. 2000

TURNER, M.J.; SCHAEFFER, J.M. Mode of action of ivermectin. *In*: CAMPBELL, W.C. (Ed.) *Ivermectin and abamectin*. New York, Springer-Verlag, 1989, pp.73-88.

VALLE, D. Vitellogenesis in insects and other groups – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 1, p.1-26, 1993.

VAN VALEN, L. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*, v. 16, p. 125-142, 1962.

VIANNA, E.E.S.; COSTA, P.R.P.; RIBEIRO, P.B. Longevidade e viabilidade do ciclo aquático do *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 1, p.53-56, 1996a.

VIANNA, E.E.S.; COSTA, P.R.P.; RIBEIRO, P.B. Oviposição e longevidade de adultos do *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 1, p.47-52, 1996b.

VIANNA, G.J.C.; GAZZINELLI, S.E.P.; MELO, A.L. . Efeito da ivermectina em *Limnocoris maculiceps* (Insecta, Heteroptera). In: XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2002. **Resumos...**, Itajaí: p. 261 2002.

VIANNA, G.J.C.; CARVALHO, A.G.; MELO, A.L. . Avaliação da toxicidade da ivermectina em *Hydrobiomorpha* (Coleoptera: Hydrophilidae) sob condições laboratoriais. In: 4º Encontro Nacional de Biólogos/2º Encontro de biólogos do CRBio4/1º Encontro de Biologia de Ouro Preto, 2002, Ouro Preto. 4º Encontro Nacional de Biólogos/2º Encontro

de biólogos do CRBio4/1º Encontro de Biologia de Ouro Preto, 2002. **Resumos...**, Ouro Preto: p. 160 2002.

VULULE, J.M.; BEACH, R.F.; ATIEMI, F.K.; MOUNT, D.L.; ROBERTS, J.M.; MWANGU, R.W. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin impregnated bednets and curtains in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 8, p. 71–75, 1999.

YÉBAKIMA, A; YP-TCHA, M.M.; REITER, P.; BISSET, J.; DELAY, B.; CHEVILLON, C.; PASTEUR, N. Detoxifying esterases in *Culex pipiens quinquefasciatus* from the Caribbean countries. *Journal of American Mosquito Control Association*; v. 11, p. 363-6, 1995.

YU, S.J. Insect glutathione-S-transferase. *Zoological Studies*, v. 35, p. 9-19, 1996.

WATSON, M.L. Straining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, v. 4, p. 575, 1958.

WATSON, P.J.; THORNHILL, R. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 9, p.21-25, 1994.

WAUTERS, L.A.; DHONDT, A.A.; KNOTHE, H.; PARKIN, D.T. Fluctuating asymmetry and body size as indicators of stress in red squirrel populations in woodland fragments. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 33, p.735-740, 1996.

WAYNE, R. K.; MODI, W. S.; O'BRIEN, S. J. Morphological variability and asymmetry in the Cheetha (*Acinony jubatus*), a genetically uniform species. *Evolution*, v. 40, p.78-85, 1986.

WIECZOREK, H., BROWN, D., GRINSTEIN, S., EHRENFELD, J.; HARVEY, W.R. Animal plasma membrane energization by proton motive VATPases. *BioEssays*, 21, p. 637–648, 1999.

WINNER, R.W.; FARREL, M.P. Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *Journal of Fished Research*, v. 33, p. 1685-1681, 1976.

WISLOCKI, P.G.; GROSSO, L.S.; DYBAS, R.A. Environmental aspects to abamectin use in crop protection. In: CAMPBELL, W.C., ed. *Ivermectin and abamectin*. New York, Springer-Verlag, 1989; p.182-200.

WOODS, R.E.; SGRO, C.M.; HERCUS, M.J.; HOFFMANN, A.A. The association between fluctuating asymmetry, trait variability, trait heritability, and stress: a multiply replicated experiment on combined stresses in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* v. 53, p. 493–505, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Techn. Rep. Ser. Resistance of vectors and reservoirs of diseases to pesticides. 1970. Ser., (585)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Vector resistance to pesticides*. Geneva; 1992.
(WHO - Technical Report)

WRIGHT, J.W. The WHO programme for the evaluation and testing of new insecticides. *Bulletin World Health Organization*, v. 44, p. 11-22, 1971.

ZANETTI, M.; GENNARO, R.; ROMEO, D. The Cathelicidium family of antimicrobial peptide precursors: A component of the oxygen – independent defense mechanisms of neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 832, p. 147-162, 1997.

ZHUANG, Z.; LINSER, P.J.; HARVEY, W.R. Antibody to H⁺ V-ATPase subunit E colocalizes with portosomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti*). *Journal of Experimental Biology*. v. 202, p. 2449-2460, 1999.

ZHUZHNIKOV, D.P. Function of the peritrophic membrane in *Musca domestica* L. and *Calliphora erythrocephala* Meig. *Journal of Insect Physiology*, v. 10, p. 273-278, 1964.

ZHUZHNIKOV, D.P. Permeability of the peritrophic membrane in the larvae of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, v. 16, p. 1193-1202, 1970.