

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA E PERÍODO RESIDUAL DO DIFLUBENZURON
PARA O CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti*
RESISTENTES AO TEMEFÓS**

Angela Aparecida Machado

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

JUNHO DE 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA E PERÍODO RESIDUAL DO DIFLUBENZURON
PARA O CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti*
RESISTENTES AO TEMEFÓS**

Aluno: Angela Aparecida Machado

Orientador: Prof. Dr. Joaquim G. Machado Neto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

JUNHO DE 2012

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Angela Aparecida Machado – Nascida em 07 de Julho de 1988, na cidade de Jaboticabal, SP, filha de Maria José Silva Santos Machado e José Jorge Machado. Em 2007, ingressou no curso de Biologia da Faculdade de Educação São Luís de Jaboticabal, e recebeu o título de Bióloga em Março de 2010. Trabalhou durante toda a graduação com Ecotoxicologia, acumulando mais de 9.400 horas em estágios na área. Atuou como estagiária no Departamento de Fitossanidade, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, no laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq durante dois anos na FCAV Unesp de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, onde realizou seu trabalho de Graduação intitulado “ Aspectos ecotoxicológicos da oxitetraciclina para *Oreochromus niloticus*, *Daphnia magna* e *Lemna minor*”. Em 2010 ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Entomologia Agrícola, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto. Durante este período desenvolveu estudos sobre o controle de populações de mosquito da dengue *Aedes aegypti* resistentes ao larvicida temefós com outros inseticidas de diferentes grupos, como os inibidores do crescimento de insetos.

*“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos”.*

Clarice Lispector

Aos meus pais José e minha mãe Maria, pela excelente educação que me proporcionaram. Pelo incondicional amor e apoio sempre presente em minhas decisões. Pelos conselhos. Por serem meu alicerce. Sem o vosso amor eu não teria chegado tão longe. Nada que eu faça ou diga irá retribuir tudo o que fizeram por mim.

Aos meus amigos por sempre acreditarem em mim e estarem presentes em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meus caminhos, guiar meus pensamentos e por me dar saúde para a realização deste trabalho, pois sem Ele nada seria realidade.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, pela amizade e responsabilidade, pela confiança depositada em meu trabalho e principalmente por sua orientação e ensinamentos, que foram fundamentais e muito enriquecedores.

Aos meus amigos, e companheiros de trabalho do Laboratório de Ecotoxicologia dos agrotóxicos e Saúde Ocupacional, do Departamento de Fitossanidade da FCAV, Carla de Barros Sant'Anna, Juliana Trevisoli Donadon, Manuela Oliveira, Melina Espanhol. Meu agradecimento especial às minhas grandes amigas Ana Carla Coleone, Flavia Renata Abe e Marcia Macri, pelo companheirismo, ajuda e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Rio de Janeiro (LAFICAVE), Prof. Bento Lima, Profa. Denise Valle,

Luciana Dias, Diogo Belinato, Thiago Belinato e Gabriela Azambuja, muito obrigada, pela ajuda e ensinamentos.

Aos meus pais José Jorge Machado e Maria José S. S. Machado, e a minha irmã Ariane Aparecida Machado, pela paciência nas horas de estresse e pelo apoio nas horas difíceis.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram comigo durante esta caminhada.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
SUMARY	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Agentes Etiológicos	4
2.2. Epidemiologia	5
2.3. <i>Aedes aegypti</i>	6
2.4. Mecanismos de Transmissão	8
2.5. Influências das variáveis climáticas no controle da Dengue	9
2.6. Inseticidas Químicos	10
2.6.1. Organofosforados	10
2.7. Resistência a inseticidas químicos.....	11
2.8. Larvicidas alternativos ao temefós para o controle de <i>Aedes aegypti</i>	12
2.8.1. Reguladores de Crescimento de insetos	13
2.8.2. Inibidores de Síntese de Quitina	14
2.8.2.1. Diflubenzuron (DFB)	16
III. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Em laboratório.....	18
3.1.1. Origem das larvas de <i>Ae. aegypti</i> utilizadas no experimento.....	18
3.1.2. Criação das larvas a serem utilizadas.....	18
3.1.3. Espécimes utilizados nos ensaios	19
3.1.4. Inseticidas utilizados	20
3.1.4.1. Organofosforado – Temefós	20

3.1.4.2. Inibidor de síntese de quitina - diflubenzuron.....	20
3.2. Ensaio realizado.....	21
3.2.1. Ensaio de dose-resposta.....	21
3.2.1.1. Ensaio com o temefós.....	22
3.2.1.2. Ensaio com diflubenzuron.....	23
3.3. Testes de campo.....	25
3.3.1. Local de realização dos testes.....	25
3.3.2. Concentração de diflubenzuron utilizada.....	26
3.3.3. Preparação dos recipientes para a exposição de larvas.....	26
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Ensaio de Laboratório.....	29
4.1.1. Temefós.....	29
4.1.2. Diflubenzuron.....	30
4.2. Testes em Campo.....	36
V. CONCLUSÕES.....	44
VI. REFERÊNCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema dos estágios de desenvolvimento evolutivo do <i>Ae. Aegypti</i> . (http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html).....	7
Figura 2. Estrutura química do inseticida temefós.	11
Figura 3. Estrutura química do inibidor de síntese de quitina diflubenzuron (A), grupo benzoil-fenil-uréia (B).	16
Figura 4. Bandeja de criação, para larvas de <i>Ae. aegypti</i>	19
Figura 5. Recipientes de vidro de um ensaio concentração-resposta para avaliação de resistência das larvas da população susceptível Rockefeller (A) e da população de campo (B) ao temefós.....	22
Figura 6. Recipientes de vidro de um ensaio com o diflubenzuron: controle (A) e tratamento com o larvicida (B).....	24
Figura 7. Locais de estudo dos ensaios testes de campo.....	25
Figura 8. Recipientes utilizados para a realização dos ensaios testes de campo, para avaliação do período de controle das larvas de <i>Ae. aegypti</i> pelo DFB.....	27
Figura 9. Valores médios de inibição da emergência de adultos após exposição das larvas ao DFB.....	32
Figura 10. Valores médios de mortalidade dos estágios de desenvolvimento do mosquito da dengue a partir de larvas expostas ao DFB.....	33
Figura 11. Anormalidades morfológicas observadas em larvas, pupas e adultos após exposição contínua desde o terceiro estágio larval ao novaluron. Identificação das anomalias de acordo com AWAD & MULLA (1984) e BRAGA et al., (2005b). Fotos de Giglio NF e Rezende GL.....	34

- Figura 12.** Variação dos parâmetros da qualidade de água nos diferentes recipientes ao longo da eficácia do DFB entre os dias de exposição ao produto, no simulado de campo com a cepa suscetível Rockefeller. 41
- Figura 13.** Variação dos parâmetros da qualidade de água nos diferentes recipientes ao longo da eficácia do DFB entre os dias de exposição ao produto, no simulado de campo com a População de campo A. 42
- Figura 14.** Variação dos parâmetros da qualidade de água nos diferentes recipientes ao longo da eficácia do DFB entre os dias de exposição ao produto, no simulado de campo com a População de campo B. 43

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de concentração letal (CL95) média e de razão de resistência (RR95) das larvas das populações A e B ao temefós (média de três ensaios).....	30
Tabela 2. Valores de concentração letal (CL95) média e de razão de resistência (RR95) das larvas das populações A e B ao DFB (média de três ensaios).....	30
Tabela 3. Comparação entre o nível de resistência ao temefós e ao DFB de populações de <i>Aedes aegypti</i>	31
Tabela 4. Porcentagem de Eficiência do DFB, para a cepa susceptível Rockefeller, em três tipos de recipientes em diferentes dias de exposição ao DFB.....	37
Tabela 5. Porcentagem de Eficiência do DFB, para a População resistente (Pop A), em três tipos de recipientes em função dos diferentes dias de exposição ao DFB.	37
Tabela 6. Porcentagem de Eficiência do DFB, para a População resistente (Pop B), em três tipos de recipientes em função dos diferentes dias de exposição ao produto.	38

EFICÁCIA E PERÍODO RESIDUAL DO DIFLUBENZURON PARA O CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* RESISTENTES AO TEMEFÓS

RESUMO - O temefós é o larvicida mais utilizado no país, mas tem-se constatado populações resistentes a este inseticida em diversos locais, e a necessidade de substituição por outro larvicida com mecanismo de ação tóxica diferente ao temefós. O diflubenzuron (DFB), inibidor de síntese de quitina, destaca-se com grande potencial para substituir o temefós. Objetivou-se determinar a razão de resistência (RR95) de larvas de duas populações de campo (Pop. A e Pop. B) ao temefós; avaliar a eficácia do DFB para as duas populações, em condições laboratoriais; e avaliar a eficácia do DFB para as duas populações, em condições de campo, em recipientes de plástico, vidro e borracha, com a concentração de 0,25 mg/L. Em condições de laboratório, os ensaios foram realizados em sala climatizada com $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, para avaliar a razão de resistência das populações de campo ao temefós, por meio de ensaios concentração-resposta, e para avaliar a eficácia do DFB. Em condições de campo, os testes foram realizados à sombra, em abrigo coberto, com médias de temperatura de $22,4^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 61%, para a avaliação da eficácia do DFB às três populações de larvas, em recipientes de plástico, vidro e borracha. A população suscetível Rockefeller foi utilizada como padrão de referência em todos os testes. O período de controle do DFB foi determinado com o tempo em que o DFB causou mortalidade de larva $\geq 80\%$. A RR95 é de 7,5 para da Pop. A e de 3,9 para a Pop. B. Nos ensaios de laboratório, o DFB causou inibição total da emergência de adultos viáveis das Pop. A e B a partir da concentração 2,0 $\mu\text{g/L}$. Nos testes de campo, o DFB é eficaz no controle da cepa suscetível por quatro semanas nos recipientes de plástico e borracha, e por três semanas em vidro. Para a Pop. A, o DFB é eficaz por cinco semanas nos três recipientes testados e para a Pop. B, por três semanas para os recipientes de plástico e vidro e por sete semanas para o recipiente de borracha. O DFB é eficaz no controle das larvas de *Aedes aegypti*, independente do grau de resistência ao temefós.

Palavras chave: Ação tóxica; Arbovirose, inibidor de síntese de quitina.

EFFICACY AND RESIDUAL PERIOD OF DIFLUBENZURON TO THE CONTROL OF *Ae. aegypti* LARVAE RESISTENT TO TEMEPHOS

SUMMARY - The temephos is the most widely used larvicide in the country, but it has been found resistant populations this insecticide in several places, and the need for replacement by another larvicide with different mechanism of toxic action to temephos. The diflubenzuron (DFB), chitin synthesis inhibitor, stands out with great potential to replace temephos. The aim were to determine the resistance reason (RR95) of larvae of two field populations (Pop A and Pop B) to temephos; to evaluate the efficacy of the DFB for both populations, under laboratory conditions; and to evaluate the effectiveness of the DFB for both populations, in the field conditions, in plastic, glass and rubber test vessels, with a concentration of 0.25 mg/L. Under laboratory conditions, bioassays were performed in controlled room with temperature $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, to evaluate the resistance reason of field populations to temephos, by concentration-response tests, and to evaluate the effectiveness of the DFB. In field conditions, tests were carried out in the shade, under cover, with average temperatures of 22.4°C and relative humidity of 61%, to evaluate the effectiveness of the DFB to three populations of larvae in plastic, glass and rubber test vessels. The susceptible population Rockefeller was used as a reference standard in all tests. The residual period of the DFB was determined over time that DFB caused larval mortality $\geq 80\%$. The RR95 is 7.5 to Pop A and 3.9 to Pop B. In laboratory bioassays, the DFB caused complete inhibition emergence of viable adult of Pop A and B at the concentration $2.0 \mu\text{g/L}$. In field tests, the DFB is effective in controlling the susceptible strain for four weeks in plastic and rubber test vessels, and for three weeks in glass test vessel. To Pop A, the DFB is effective for five weeks in all test vessels, and to Pop B, for three weeks in glass and plastic test vessels and for seven weeks in rubber test vessel. The DFB is effective in controlling the larvae of *Aedes aegypti*, regardless of the degree of resistance to temephos.

Key words: arbovirus, chitin synthesis inhibitor; toxic action

I. INTRODUÇÃO

A dengue se tornou uma das principais doenças para a saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O principal vetor do vírus da dengue é a fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Como ainda não há vacina contra a ação deste vírus que previna esta infecção, o controle do vetor é o método existente mais utilizado para controlar a transmissão do vírus causador da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Devido à grande facilidade de associação com humanos, o *Aedes aegypti* é um mosquito essencialmente urbano. Logo pós ter completado todo seu desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir à dessecação por cerca de um ano. A eclosão da larva ocorre de um a dois dias da postura se os ovos forem imerso em água. Em condições favoráveis ao seu desenvolvimento, as larvas deste mosquito passam por quatro estádios de desenvolvimento em cinco dias (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

O combate do mosquito adulto em condições de epidemia da doença geralmente é realizado com pulverizações perifocais de inseticidas dos grupos químicos organofosforados e piretróides. Para o controle das larvas, o principal larvicida empregado há décadas no país é o inseticida organofosforado temefós. Este larvicida é recomendado para a diluição de 1 mg/L, e é formulado em grãos de areia, na concentração 1% do ingrediente ativo (LIMA et al. 2006).

Outra medida para o combate dos vetores da dengue é a identificação e a remoção de criadouros de larvas do mosquito nas áreas internas e externas de cada imóvel, para impedir a complementação do ciclo e a formação de adultos.

Esta medida de combate ao mosquito da dengue é prioritária e deve ser realizada continuamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

O uso frequente de inseticidas durante os períodos de transmissão da doença pode levar à seleção de populações do mosquito resistentes a estes compostos; o que compromete o controle e favorece a transmissão da doença. O número de casos de resistência aos inseticidas está aumentando em países da Ásia, Caribe e Américas Central e do Sul (MARCORIS et al. 1999).

Em relatórios epidemiológicos divulgados pelo Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, nos anos de 2000 e 2002, confirmam a resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em grande parte dos municípios investigados. As populações avaliadas das cidades de Recife e Jaboatão dos Guararapes foram classificadas como resistentes ao temefós (MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000).

A resistência das populações de *Aedes Aegypti* ao larvicida temefós está amplamente disseminada em populações do mosquito, inclusive em populações de municípios que ainda não tiveram a epidemia de dengue (ANASTACIO, 2003; LIMA et al. 2003 e MARCORIS et al. 2003). Devido este fato, foram estabelecidos critérios para direcionar melhor as estratégias de controle, como a implantação do monitoramento da resistência, por meios de ensaios de concentração-diagnóstica (LIMA et al. 2003).

Os inseticidas reguladores de crescimento de insetos IGRs (insect growth regulators) causam modificações fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento do inseto pela inibição da produção de quitina (FOURNET et al. 1997). Estes inseticidas atuam seletivamente ao interromper o desenvolvimento e o crescimento ao invés de intoxicação direta. Por tanto, são de baixa toxicidade para mamíferos, em comparação com outros inseticidas (MULLA, 1974 e SILVA & MENDES, 2002).

O diflubenzuron (DFB) é um inseticida e larvicida do grupo dos inibidores de crescimento dos insetos, cujo mecanismo de ação tóxica é a inibição da síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto. O DFB é muito utilizado na agricultura para o controle de pragas, principalmente das ordens: Coleoptera,

(MSCASLAND, 1998); Orthoptera, (DELGADO et al. 1999) e Lepidoptera (VILLANUEVA-JIMENEZ et al. 2000).

Devido à comprovação da resistência das larvas de *Aedes aegypti* em diversas regiões do país ao inseticida temefós, é necessária a realização de pesquisas com larvicidas alternativos ao temefós, para o controle químico das larvas em localidades com ocorrência de alta transmissão vetorial de dengue.

Neste contexto, o DFB destaca-se como um larvicida alternativo para o controle de larvas de populações resistentes ao temefós. Portanto, há a necessidade de se realizar pesquisas para determinar a eficácia do DFB para larvas resistentes ao temefós e da influencia dos possíveis materiais dos recipientes criadouros de larvas na eficácia do DFB aplicado nas águas.

Desta forma, o objetivo geral deste estudo foi controlar as larvas de populações de *Aedes aegypti* resistentes ao temefós com o larvicida diflubenzuron.

Os objetivos específicos foram os seguintes.

Em condições de laboratório:

- a) Determinar a razão de resistência (RR95) de larvas de duas populações de campo (A e B) ao temefós;
- b) Avaliar a eficácia do diflubenzuron para as duas populações, em condições laboratoriais;

Em condições de campo

- c) avaliar a eficácia do DFB para as duas populações em condições de campo em recipientes de plástico, vidro e borracha, com a concentração de 0,25 mg/L.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agentes Etiológicos

A dengue é uma doença transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, no qual se enquadram as espécies *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Ae. aegypti*; que é o vetor de maior importância (BRAGA et al. 2007).

O agente causal da dengue é um arbovirus, que tem sorotipos (DEN I, DEN II, DEN III e DEN IV), com semelhanças filogenéticas e epidemiológicas (HOLMES et al. 1998). NOGUEIRA et al. (2001) citam que, por não existir imunidade cruzada efetiva, uma pessoa infectada por um destes sorotipos fica imunizada toda vida contra apenas este sorotipo, mas fica imunizada apenas temporária ou parcialmente aos outros três sorotipos (RIGAU-PEREZ et al. 1998 e FUNASA, 2001).

A doença pode ser de curso benigno ou grave, de acordo com a manifestação clínica na pessoa infectada. As manifestações podem ser invisíveis ou não aparentes, dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SDC); que pode levar o indivíduo ao óbito. Devido a estes aspectos, a dengue é considerada como um dos maiores problemas de saúde pública de ordem mundial, especialmente nos países tropicais, cujas condições ambientais são favoráveis à proliferação e disseminação do principal vetor; o *Ae. aegypti*.

No Brasil, a dengue é uma das doenças mais frequentes e atinge toda a população, independente da localidade e do nível social (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.2. Epidemiologia

As infecções arbovirais; viroses transmitidas por artrópodes, são os principais casos de doenças transmissíveis, principalmente a dengue (WHO, 2006).

A dengue pode apresentar-se de forma assintomática ou evoluir benignamente como Dengue Clássica, ou ainda pode originar quadros mais graves e preocupantes, como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e o mais temido a Síndrome de Choque por Dengue (SCD), que pode levar o paciente ao óbito (RIGAU-PERÉZ et al. 1998).

As manifestações clínicas são diversas, com níveis variáveis de gravidade, (GUBLER & CLARK, 1995). Os aspectos clínicos mais comuns são aqueles em que o indivíduo apresenta febre alta (39° a 40°), com início súbito, seguido de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, náuseas, vômitos, prurido cutâneo, entre outros sintomas, conhecido como dengue clássica, (REGAZZI, 2003). Os sintomas da dengue clássica duram de cinco a sete dias, em média, porém a fadiga pode perdurar mais tempo (CASALI et al. 2004).

Os sintomas típicos da FHD são caracterizados por febre alta, hemorragia, hepatomegalia e insuficiência circulatória. Nos casos graves, o choque pode ocorrer entre o terceiro e sétimo dia de doença, precedido de fortes dores abdominais. Esta doença requer atenção especial por ter curta duração e pode levar o paciente ao óbito entre 12 e 24 horas. Entretanto, se for detectada a tempo e o paciente tratado, a recuperação pode ser rápida, desde que seja feita a terapia apropriada (FIGUEIREDO & FONSECA, 2002).

A SCD define-se como a FHD, pode causar, além dos sinais citados anteriormente, falência circulatória, hipotensão, pele fria e úmida, agitação, vômito persistente e letargia, sinais e sintomas que levam o paciente ao choque (CASALI et al. 2004).

A ocorrência de epidemias de dengue está, geralmente, associada à presença e à densidade dos vetores *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* (BRAGA & VALLE, 2007).

Ressalte-se ainda que os quatro sorotipos da dengue podem causar formas benignas e graves da doença. Os fatores responsáveis pelas formas graves da doença ainda não são totalmente conhecidos. Os fatores como imunidade do hospedeiro, infecções sequenciais, virulência de determinadas cepas, são apontados como responsáveis pelo avanço de casos hemorrágicos e de choque (TEIXEIRA et al. 1999).

2.3. *Aedes aegypti*

A origem desta espécie de mosquito é africana, e acredita-se que foi introduzida nas Américas por meio de barcos oriundos da Europa, que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações europeias ao chamado novo Mundo (REY, 2001). A espécie é encontrada em extensa faixa do continente americano, que se estende desde o Uruguai até o Sul dos Estados Unidos da América (EUA). A ocorrência de surtos já foi registrada na Venezuela, Cuba, Brasil, e recentemente Uruguai. No Brasil, encontra-se o mosquito nos 26 Estados e no Distrito Federal (BRAGA & VALLE, 2007).

O *Aedes aegypti* é classificado como um mosquito tropical e subtropical, pois é encontrado entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul, que correspondem à isoterma de inverno de 10°, sendo restrita também em relação à altitude extrema, FAY & ELIASON (1966). Além de ser altamente adaptado ao ambiente urbano (FUNASA, 2001).

O ciclo de vida deste mosquito é holometabólico (metamorfose completa), apresenta quatro estágios divididos em duas fases evolutivas: a fase larvária ou imatura (fase aquática), representado por larvas e pupas e a fase adulta ou alada (fase aérea), no qual se encontram os adultos. O estágio larval subdivide-se em quatro estádios (L1, L2, L3 e L4), e o estágio de pupa é o último do ciclo aquático do inseto (REGAZZI, 2003), conforme se observa na Figura 1.

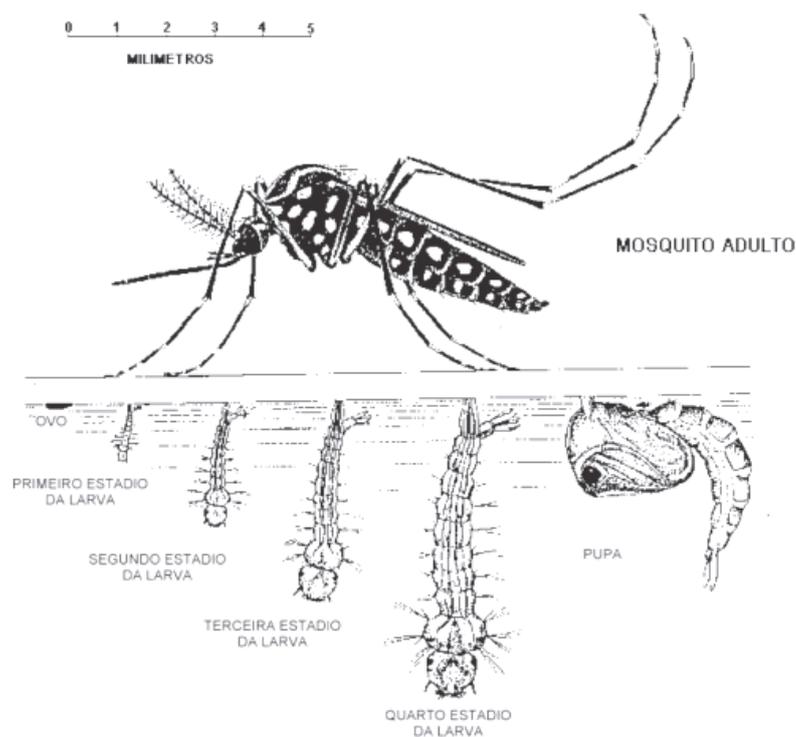


Figura 1. Esquema dos estágios de desenvolvimento evolutivo do *Ae. Aegypti*. (http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html)

O mosquito tem corpo escuro, listas brancas transversais nas pastas e no corpo, e tamanhas inferiores a um centímetro. O adulto vive em torno de 30 a 35 dias. Os ovos são depositados pelas fêmeas em paredes internas de possíveis criadouros, sempre acima do nível da água (LOPES et al. 2006). Os ovos são a forma mais resistente deste vetor, pois pode permanecer viáveis a dessecação por

período superior a um ano. Os ovos eclodem quando entram em contato com a água presente nos possíveis criadouros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Normalmente, os criadouros são objetos ou artefatos que podem conter e reter águas, como vasos de planta, pneus usados, garrafas, entre outros. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A alimentação dos mosquitos depende da ingestão de carboidratos, oriundos de seivas, flores e frutos. O acúmulo destes componentes está intimamente associado ao potencial de atividade e longevidade do mosquito. Além desta alimentação, a fêmea também faz repasto sanguíneo em humanos. O repasto sanguíneo das fêmeas do *Ae. Aegypti* está relacionado primordialmente com a maturação e desenvolvimento dos ovos. As fêmeas podem fazer vários repastos sanguíneos entre duas posturas. O intervalo entre a alimentação (repasto) e a oviposição é de aproximadamente 72 a 84 horas (DIVE, 2008).

2.4. Mecanismos de Transmissão

A transmissão inicia-se após o mosquito ingerir sangue virêmico de algum hospedeiro infectado. Uma vez que a fêmea se infecta com vírus, permanece assim por toda sua vida, independente do número de repastos sanguíneos que a mesma tenha feito (DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

Após o repasto sanguíneo, o período de incubação ocorre entre 12 e 14 dias, tempo necessário para que o vírus se replique e dissemine pelo interior do mosquito, até que atinja as glândulas salivares, podendo ser transmitido aos hospedeiros (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2005).

Outro tipo de transmissão é a mecânica, no qual o vírus ainda se encontra alojado no aparelho bucal do inseto, após o mesmo ter se alimentado de um hospedeiro contaminado. Não existe transmissão por contato direto com um doente ou através do contato de suas excreções com uma pessoa sadia (DIVE, 2008).

O período de incubação intrínseco ocorre dentro de 14 dias e, após este período, a pessoa infectada começa a apresentar os sintomas da doença (GUBLER, 1998).

2.5. Influências das variáveis climáticas no controle da Dengue

O *Ae. aegypti* caracteriza-se por ter um comportamento estritamente urbano e é cada vez mais raro encontrar foco de ovos no ambiente rural. O controle deste mosquito no meio urbano está se tornando uma atividade extremamente complexa, devido a diversos fatores externos ao setor de saúde, que são importantes para a manutenção e dispersão da doença e do vetor.

A dengue está intimamente associada com as estações chuvosas e altas temperaturas. Dentre estes o clima e as alterações de temperatura são extremamente importantes para alterar a transmissão desta arbovirose (DONALÍSIO & GLASSER, 2002). Desta forma, para a realização de estudos sobre a dengue, é indispensável considerar o clima, pois o vetor é diretamente influenciado pelas condições climáticas (OLIVEIRA, 2004).

As variações de temperatura e pluviosidade afetam diretamente a transmissão da dengue (RIBEIRO et al. 2006). Constatou-se ainda que a temperatura alta favorece a proliferação do mosquito. Estes fatores são responsáveis pelo aumento da densidade vetorial e dos índices de infestação (OLIVEIRA, 2004).

2.6. Inseticidas Químicos

O controle químico com inseticidas, de origem orgânica ou inorgânica, continua sendo uma das estratégias mais adotadas de manejo sustentável, que integrada no controle de vetores em saúde pública (ROSE, 2001).

Compostos orgânicos que atuam sobre o sistema nervoso, como os inseticidas organofosforados, carbamatos ou piretróides, atualmente são os mais utilizados no controle de vetores de agente etiológico de doenças (MELLON & GEORGHIOU, 1984; PALCHICK, 1996).

Além destes compostos, existem ainda os chamados inseticidas alternativos, como toxinas de bactérias entomopatogênicas (*Bt* – *Bacillus thuringiensis* e *Bs* – *Bacillus sphaericus*) e os reguladores de crescimento de insetos (IGRs – Insect Growth Regulators).

Devido ao mecanismo de ação tóxica diferente dos que atuam no sistema nervoso, os inseticidas IGRs destacam-se como importante alternativa de uso para o controle de populações de mosquitos resistentes aqueles inseticidas.

2.6.1. Organofosforados

Os compostos organofosforados (OP), são inseticidas derivados de ésteres fosfóricos. A principal vantagem deste inseticida é a ação rápida em relação aos outros inseticidas, porém as principais desvantagens são o baixo poder residual e a alta toxicidade para mamíferos (LARINI, 1999).

Atualmente os OPs mais utilizados em saúde pública para o controle de insetos em geral são o fenthion, temefós, malathion e fenitrothion (WHO, 1997). O mecanismo de ação deste grupo de inseticida é a inibição da enzima acetilcolinesterase; responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina. A inibição desta enzima leva ao acúmulo de acetilcolina nas

sinapses neuronais e neuro-musculares. Esta inibição da enzima impede a interrupção da propagação do impulso elétrico e provoca rápidas contrações nos músculos voluntários, o que causa a paralisia e a morte do inseto (WHO, 1984; WARE & WHITACRE, 2004). Na Figura 2 encontra-se a fórmula estrutural do temefós; que é um dos inseticidas recomendados para o controle de larvas do mosquito da dengue.

No Brasil, os inseticidas OP vêm sendo utilizados desde o ano 1967, no combate do mosquito da dengue *Ae. aegypti* (BRAGA et al. 2004). O uso excessivo destes compostos durante décadas resultou na seleção de várias populações resistentes do mosquito da dengue (LIMA et al. 2003; BRAGA et al. 2004).

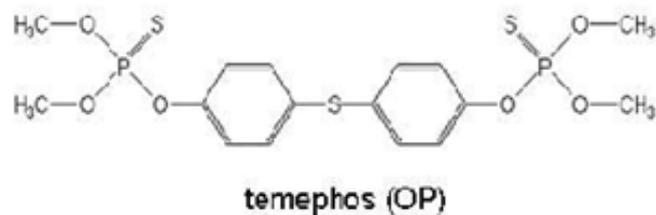


Figura 2. Estrutura química do inseticida temefós.

2.7. Resistência a inseticidas químicos

A resistência é definida como a habilidade de um organismo de tolerar concentrações de tóxicos que seriam letais para a maioria da população susceptível da mesma espécie (LIMA, 2003).

A resistência pode ser considerada como um processo de evolução acelerada de uma dada população, que responde a uma intensa pressão seletiva. Como consequência desta pressão seletiva, sobrevive apenas àqueles indivíduos

em cujo material genético, possua genes alelos que conferem a resistência (BRAGA & VALLE, 2007).

A resistência também pode ser cruzada e múltipla, que se manifesta para dois ou mais compostos químicos de grupos químicos distintos. A resistência cruzada ocorre com um único mecanismo que confere resistência a dois ou mais compostos. A resistência múltipla ocorre quando pelo menos dois mecanismos coexistentes, que conferem resistência a dois ou mais compostos químicos (IRAC-BR, 2006; MONTELLA et al. 2007).

Segundo MILLER (1988), a resistência pode ser classificada em quatro tipos: comportamental, redução da penetração do inseticida, por alteração do sítio alvo e resistência metabólica.

No Brasil, o controle do *Ae. Aegypti* é realizado com o temefós desde 1967 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1968). A resistência do vetor à este larvicida tem sido relatado nos Estados de Goiás, MARCORIS et al. (1995), Rio de Janeiro, Alagoas, Sergipe (BRAGA et al. 2004), Ceará (LIMA et al. 2006), Manaus (PINHEIRO & TADEI, 2002), Distrito Fedfoil (CARVALHO et al. 2004) e na cidade de Santos (MARCORIS et al. 2003).

2.8. Larvicidas alternativos ao temefós para o controle de *Aedes aegypti*

Divido aos diversos relatos da resistência de populações de *Ae. Aegypti* ao larvicida temefós, estudos com inseticidas com mecanismos de ação diferente, vem sendo desenvolvidos como controle alternativo. Exemplos bastante promissores são os reguladores do desenvolvimento de insetos (IGR; do inglês – *Insect Growth Regulator*).

Os IGRs mais utilizados para o controle de mosquitos pertencem ao grupo das benzoil-feniluréias (inibidores de síntese de quitina e seus análogos sintéticos

(CSI, do inglês *chitin synthesis inhibitor*.), ou então são compostos quimicamente relacionados ao hormônio juvenil (AHJ) (SLAMA et al. 1974).

2.8.1. Reguladores de Crescimento de insetos

Em comparação com os inseticidas convencionais, os IGRs agem de forma diferente, pois atuam seletivamente no desenvolvimento, metamorfose e reprodução dos insetos alvo, ao invés de causarem intoxicação direta (HOFFMANN & LORENZ, 1998; MARTINS & SILVA, 2004).

A maioria dos IGRs é eficaz no controle de vetores, incluindo os que apresentam resistência aos inseticidas convencionais, devido seu mecanismo de ação diferencial (SILVA & MENDES, 2002; THAVARA et al. 2007).

Os IGRs podem ser divididos em três grupos de acordo com seu modo de ação: análogos e antagonistas do hormônio juvenil; análogos e antagonistas de ecdisona e inibidores de síntese de quitina (CSI - *chitin synthesis inhibitor*) (GRAF, 1993); (HOFFMANN & LORENZ, 1998; KOSTYUKPVSKEY & TROSTANETSKY, 2006).

Os aspectos positivos e de grande importância dos IGRs é serem de baixa toxicidade para mamíferos e de degradação rápida no ambiente (KOSTYUKPVSKEY & TROSTANETSKY, 2006). Entretanto, podem causar danos aos artrópodes não-alvo e desequilibrar os ecossistemas. Contudo, vários estudos demonstram que a utilização dos IGRs causa baixo impacto ambiental (ALI & KOK-YOKOMI, 1989); (ARREDONDO-JIMENÉZ & VALDEZ-DELGADO, 2006).

Os IGRs causam anormalidades e efeitos retardados nos insetos como aberrações morfogénéticas, declínio na reprodução e fertilidade e falhas na reprodução (MULLA, 1995).

2.8.2. Inibidores de Síntese de Quitina

A quitina (N-acetilglucosamina e glucosamina) é um dos polímeros biológicos mais abundantes. Este polímero é produzido em grandes quantidades por insetos invertebrados e por crustáceos, e em pequenas quantidades por moluscos, anelídeos e nematoides (ovos) (COHEN, 2001).

O exoesqueleto dos insetos é constituído por três partes na seguinte ordem: cutícula, a mais externa, epiderme e a membrana basal. A cutícula do exoesqueleto, por sua vez, divide-se em três partes distintas: epicutícula, exocutícula e endocutícula (TELLAM et al. 2000).

A quitina é o componente fundamental do exoesqueleto, e está presente somente na endocutícula e na exocutícula, e fornece suporte mecânico e estrutural ao exoesqueleto. A principal função da quitina é a proteção contra possíveis agressões ambientais. Por possuir um exoesqueleto rígido, os insetos necessitam realizar mudas periódicas (BOGWITZ, 2005).

O processo de construção de um novo exoesqueleto envolve várias etapas, iniciando-se pela degradação da cutícula antiga; síntese dos componentes para a nova cutícula, no qual ocorre uma multiplicação das células da epiderme; seguida pela apólise: processo de separação das células epidérmicas da cutícula, precedente pela secreção do fluído de muda e, assim, ocorre à formação da membrana. A formação da nova cutícula inicia-se após a secreção de proteínas da cutícula e fibras de quitina pelas membranas apicais das células epidérmicas. Assim ocorre a formação de uma cutícula quitinosa não esclerotizada, a procutícula. A procutícula é responsável por fechar a epiderme e protegê-la contra as enzimas digestivas do fluído da muda. Após todas estas etapas, finalmente ocorre a ecdise e a liberação da cutícula velha, que proporciona a expansão da nova cutícula antes de seu enrijecimento por esclerotização (MERZENDORFER & ZIMOCH, 2003).

Portanto, interferências em qualquer um dos estágios envolvidos com o processo de muda, seja por fontes endógenas de hormônios ou de seus análogos

sintéticos, resultam na interrupção no desenvolvimento do inseto (HOFFMANN & LORENZ, 1998).

Os inibidores de quitina, deferentemente dos análogos do hormônio juvenil, agem nas larvas durante o processo de muda e não ocorre a liberação completa da cutícula procedente, possivelmente devido a inibição da deposição de quitina, o que impede que se livrem da cutícula velha (MULLA, 1995).

Muitas substâncias são capazes de inibir a síntese de quitina em insetos, mas a grande maioria pertence ao grupo das benzoil-fenil-uréias (BPU), (MERZENDORFER & ZIMOCH, 2003; MERZENDORF, 2005).

O mecanismo de ação das BPU, ainda não está completamente esclarecido. Porém, vários estudos relatam que estes compostos interferem na atividade ou biossíntese de quitina-sintetase, enzima-chave, para a síntese de quitina (TELLAM et al. 2000; MERZENDORFER & ZIMOCH, 2003). As BPU causam efeito pronunciado sobre as larvas e impede a sobrevivência à muda, devido a malformação da cutícula nova (GRAF, 1993).

Os efeitos causados pela ação destes inibidores de síntese de quitina já foram comprovados por vários autores, que utilizaram diferentes tipos de insetos. VASUKI (1992), constataram que o inibidor de síntese de quitina hexaflumuron, causou inibição total na emergência de adultos viáveis na concentração de 0,001 a 0,1 mg/L.

CHARMILLOT et al. (2001) verificaram que os compostos diflubenzuron, hexaflumuron e triflubenzuron possuem alto potencial larvicida e ovicida sobre *Cydia pomonella*. O BPU Alsystin afeta o desenvolvimento e a secreção da cutícula de larvas de *Culex pipiens pipiens*, e causa redução significativa no tegumento, quando comparados com o grupo controle (REHIMI & SOLTANI, 1999).

BATRA et al (2005) verificaram que 0,2 ppm de triflumuron produz, em laboratório, 100% de inibição da emergência de adultos de *Anopheles stephensis*, *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

Alterações morfológicas internas e externas foram constatadas por BORGES et al. (2004) em larvas de *Ae. aegypti* às concentrações 0,1 e 1,0 mg/L

de DFB. As alterações externas observadas foram as seguintes: superfície corporal destruída, aspecto corporal escurecido e segmentos corporais danificados. O que caracteriza a ação deste grupo de inseticidas.

2.8.2.1. Diflubenzuron (DFB)

O diflubenzuron (DFB), 1 – (4 – clorofenil) – 3 – (2,6 – difluorobenzoil) uréia, é um composto que inibe o crescimento dos insetos, conhecido pela sigla IGRs (insect growth regulator), cuja fórmula estrutural encontra-se na Figura 3.

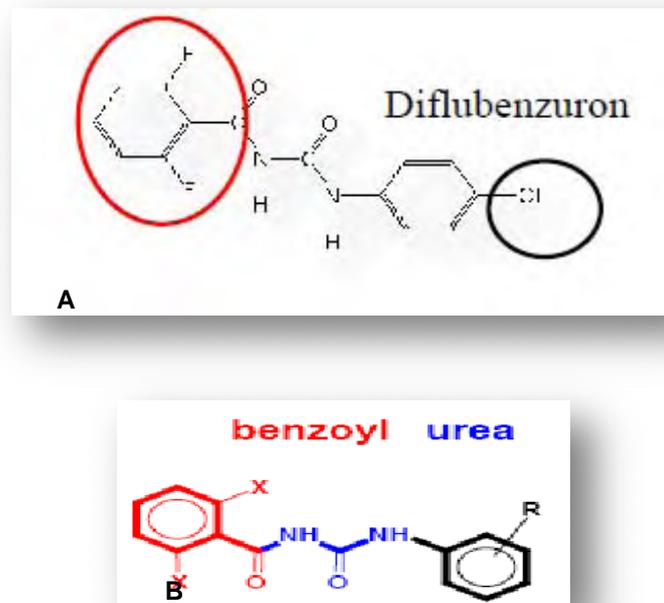


Figura 3. Estrutura química do inibidor de síntese de quitina diflubenzuron (A), grupo benzoil-fenil-uréia (B).

A dissipação do DFB na água ocorre por hidrólise e fotólise. Em condições com temperatura de 25 °C, devido à hidrólise, a meia vida do DFB foi superior a

180 dias em água com pH 5 e 7 e 32,5 dias em pH 9. Portanto, é um composto pH dependente. Em relação à fotólise, este produto é razoavelmente estável (WHO, 2006).

Quanto ao uso em saúde pública, o DFB é eficiente contra as larvas do *Ae. aegypti* (SECCACINI et al. 2008). O DFB foi eficaz no controle de larvas de populações de *Ae. aegypti* oriundas da cidade de Uberlândia (SILVA, 2006; SILVA & MENDES, 2007). O DFB também foi eficaz para populações desta espécie de mosquito da Malásia (CHEN et al. 2008).

MARTINS & SILVA (2004) avaliaram a atividade inibidora do DFB na ecdise de larvas do *Ae. aegypti* e constataram que o larvicida é eficiente para o combate ao mosquito transmissor da dengue.

Recomenda-se que o produto seja aplicado nos estádios iniciais de desenvolvimento larvário do inseto, que normalmente ocorre nos locais mais comuns a postura de ovos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Em laboratório

3.1.1. Origem das larvas de *Ae. aegypti* utilizadas no experimento

As larvas utilizadas no experimento foram obtidas de ovos provenientes de colônias mantidas no insetário do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, LAFICAVE sediado no Instituto de Biologia do Exército. Os ovos foram ovipositados em papéis de filtro.

Os ovos foram da cepa de laboratório Rockefeller, susceptível ao temefós e das populações A e B do Município do Rio de Janeiro, com comprovada resistência ao temefós.

3.1.2. Criação das larvas a serem utilizadas

Os papéis de filtro com os ovos foram colocados em recipientes plásticos contendo água proveniente da rede de abastecimento do Campus da UNESP de Jaboticabal. A água foi reservada em barrilete de 50 L com aeração externa por 24 horas, para evaporação de cloro.

Os papéis-filtro com os ovos foram cortados em pedaços pequenos e colocados em copos descartáveis de 50 mL, contendo a água de criação (água retirada das bacias de criação), que antecipadamente foi passada por uma peneira, para eliminar resquícios de outras populações. O uso da água oriunda de uma criação prévia susceptível serve como estímulo para eclosão das larvas.

As larvas recém-eclodidas, com aproximadamente uma hora de idade, foram transferidas para bandejas retangulares (33x24x8 cm) contendo 1 litro de água desclorada e 1 grama de ração para gatos (Friskies®, Purina, Camaquã/RS) (Figura 4). As larvas utilizadas nos ensaios permaneceram nas bacias por aproximadamente três dias ou até que atingissem o terceiro estágio larval (L3).



Figura 4. Bandeja de criação, para larvas de *Ae. aegypti*.

A criação de espécimes para utilização nos ensaios foi realizada em sala climatizada com a temperatura controlada de em $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.1.3. Espécimes utilizados nos ensaios

Nos ensaios foram utilizadas a cepa Rockefeller e as populações de campo (A e B) da geração F1. A cepa Rockefeller foi utilizada em todos os ensaios como

padrão de susceptibilidade. Essa cepa foi originalmente estabelecida no Rockefeller Institute (Nova York, NY) por DW Jenkins em 1959. Esta cepa é utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticidas para em todo o mundo (HARTBERG & CRAIG-JR, 1970).

3.1.4. Inseticidas utilizados

3.1.4.1. Organofosforado – Temefós

Os ensaios com o organofosforado temefós foram realizados a partir de uma solução estoque de 3g.L^{-1} , com temefós em grau técnico (Pestanal[®] 95,6%), previamente preparada em etanol PA. Esta solução estoque foi mantida em freezer com a temperatura entre 4 -10 °C, e usada por até um mês após o preparo.

A solução de uso foi preparada em etanol PA a partir da solução estoque 15 minutos antes da instalação dos ensaios de laboratório. As concentrações dos tratamentos dos ensaios foram constituídas a partir de alíquotas da solução de uso.

3.1.4.2. Inibidor de síntese de quitina - diflubenzuron

O diflubenzuron em grau técnico (Champion[®] 99,6%) foi utilizado nos ensaios de laboratório, para a avaliação da inibição da emergência de adultos de *Ae. aegypti*.

A solução-estoque foi preparada com 0,01g diluídas em acetona PA e mantidas em freezer a -40 °C. A solução de uso foi preparada em acetona PA a

partir da solução estoque 15 minutos antes dos ensaios de laboratório. As concentrações dos tratamentos dos ensaios foram constituídas a partir de alíquotas da solução de uso.

3.2. Ensaio realizados

Inicialmente foram realizados ensaios preliminares com amplo espectro de dosagens do temefós para determinar o intervalo de mortalidade (0 e 100%) para cada população de larvas em estudo. Em seguida foram realizados os ensaios definitivos para calcular as concentrações efetivas: Concentração Letal 95% (CL95), para o temefós e Inibição de Emergência (IE) para o diflubenzuron.

As larvas das Populações A e B foram classificadas pela resistência ao temefós pelas classes de resistência estabelecidas por MAZZARI & GEORGHIOU (1995), que são as seguintes: valor de $RR < 5$ = Resistência baixa; $5 > RR < 10$ = Resistência intermediária; e $RR > 10$ = Resistência alta.

3.2.1. Ensaio de dose-resposta

Os primeiros ensaios foram realizados com a cepa de referência Rockefeller, para a obtenção dos valores da razão de resistência (RR95) das populações em estudo.

Os valores de RR95 foram calculados a partir da divisão dos valores calculados de CL ou IE das populações pelos valores correspondentes da cepa referência (OMS 1981; MAZZARI & GEORGHIOU 1995; OMS 2005), de acordo com a fórmula seguinte:

$$RR = \text{CL ou IE Pop. Resistente} / \text{CL ou IE Pop. Suceptivel.}$$

Os ensaios foram realizados em sala climatizada com temperatura controlada ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$). As larvas foram mantidas em contato com o temefós por 24 horas, quando foi registrado o número de larvas vivas e mortas. O critério utilizado para determinação da mortalidade das larvas foi o proposto pela OMS (1981). Após a contagem, todas as larvas foram descartadas.

Os ensaios foram repetidos três vezes em dias diferentes. Os valores de mortalidade obtidos, médias de três ensaios, foram transformados em *probit* (Raymond, 1985) para calcular os valores de CL95.

Os valores de razão de resistência das larvas das populações A e B foram calculados por meio da divisão da CL95 da população A ou B pela CL95 da cepa Rockefeller.

3.2.1.2. Ensaio com diflubenzuron

Os ensaios foram realizados em sala climatizada com temperatura e controlada, de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os três ensaios com o diflubenzuron foram realizados com nove tratamentos: oito concentrações do larvicida ($\mu\text{g/L}$): 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5; e um controle, com cinco repetições. O procedimento experimental utilizado foi o protocolo estabelecido por BELLINATO (2007).

As parcelas experimentais utilizadas foram compostas recipientes de vidro transparentes com capacidade para 250 mL, com 130 mL de água-desclorada contendo as concentrações do DFB (Figura 6).

Uma solução de 1g de ração para gatos (Friskies®, Purina, Camaquã/RS), diluída em 100 mL de água desclorada foi feita, a partir dela foi adicionado 1 mL, em cada recipiente. Esta quantidade de comida foi o suficiente para todo o período de ensaio, esta foi aplicada somente uma vez, no dia da montagem do experimento.

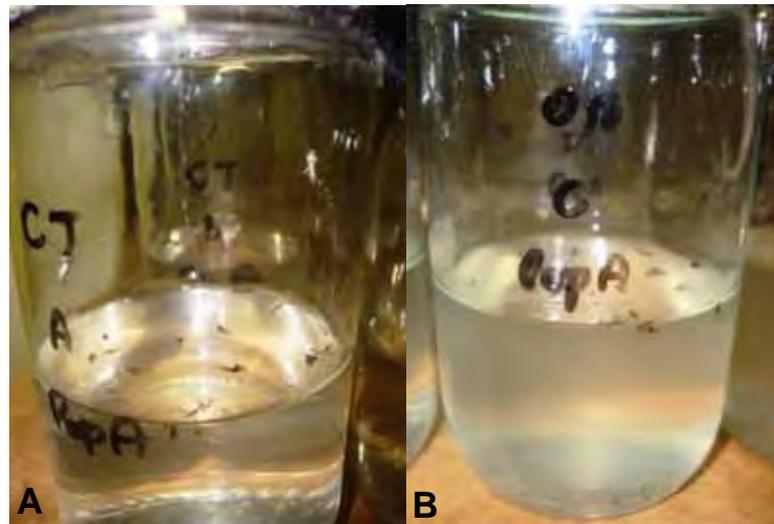


Figura 6. Recipientes de vidro de um ensaio com o diflubenzuron: controle (A) e tratamento com o larvicida (B).

Após 30 minutos da diluição do DFB nos recipientes, 10 larvas (L3) previamente separadas foram transferidas aos recipientes junto com os 20 mL de água, completando um volume final de 150 mL por réplica. No segundo dia, os recipientes foram tampados com tela de nylon (afixada com elástico), para evitar a fuga de possíveis adultos emergidos.

As avaliações foram realizadas diariamente por meio do registro da mortalidade das larvas e o número de adultos emergidos pela presença de exúvias limpas (MULLA 1974; MULLA et al 2003). Os adultos presos às exúvias foram considerados mortos.

O ensaio foi encerrado quando não havia mais larvas e/ou pupas vivas nos controles. Os dados obtidos foram transformados em *probit* (Raymond 1985) para realizar os cálculos dos valores de CL95. Com os valores de CL95 foi calculada a razão de resistência das populações pela divisão da CL95 das populações A e B, pela cepa Rockefeller.

3.3. Testes de campo

O período de controle das larvas das populações A e B e da cepa Rockefeller ao DFB foi testado em condições de campo, com três recipientes compostos com os seguintes materiais: plástico (vasos), vidro (aquários) e borracha (pneus cortados transversalmente).

3.3.1. Local de realização dos testes

O ensaio sobre período de controle das larvas com o DFB nos recipientes de plástico, vidro e borracha foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

Os ensaios foram realizados em área externa em um local de aproximadamente 12 m², cercada para evitar a entrada de pessoas ou qualquer tipo de animal, com cobertura de telhas de amianto, para proteger os recipientes testes da chuva e da incidência direta do sol, com passagem parcial de luz solar (Figura 7).



Figura 7. Locais de estudo dos ensaios testes de campo.

3.3.2. Concentração de diflubenzuron utilizada

Neste estudo foi utilizado o produto comercial DIFLUBENZURON 25% Champion, na formulação pó molhável, com 25% do ingrediente ativo, fabricado pela empresa Champion Farmoquímica Ltda, Brasil. Em todos os tratamentos foi utilizada a concentração de 0,25 mg/L, obtida a partir de uma solução estoque de 750 mg/L (3,0 g da formulação/L de água destilada), que foi homogeneizada com agitador magnético.

3.3.3. Preparação dos recipientes para a exposição de larvas

No primeiro ensaio, com a cepa suscetível Rockefeller (agosto-setembro 2011), e no segundo, com a Pop A (outubro-novembro 2011), foram utilizados recipientes de:

- Borracha compostos por bandas de pneus cortados transversalmente, de aro 14;
- Aquários de vidro com capacidade para 3L, e;
- Vasos plásticos com capacidade de 10L.

No terceiro ensaio, com a Pop B (março-maio 2012), foram utilizados recipientes de:

- Borracha compostos por bandas de pneus cortados transversalmente, de aro 17,5;
- Aquário de vidro com capacidade de 10L, e;
- Vasos plásticos com de 10L.

Cada recipiente utilizado para a exposição de larvas nos dois primeiros ensaios foi preenchido com 2 litros de água. No terceiro ensaio, os três os recipientes foram preenchidos com 6 litros de água. A água utilizada nos três ensaios foi proveniente da rede de abastecimento do Campus da UNESP de

Jaboticabal. A água foi mantida em reservatórios de amianto com capacidade de 1000L, dois dias antes de ser colocada nos recipientes.

Os tratamentos utilizados nos três ensaios para os três tipos de recipientes foram realizados com a concentração de 0,25 mg de DFB/L, com cinco repetições e um tratamento controle para cada repetição, totalizando dez repetições para cada tipo de material do recipiente. Em cada recipiente foram colocadas 20 larvas no estágio L3 depois de 24 hora da diluição do DFB nas águas.

Todos os recipientes de estudo foram cobertos com telas de nylon (tunil), para evitar a colonização de mosquitos de campo e também para evitar que eventuais mosquitos do teste escapassem (Figura 8).



Figura 8. Recipientes utilizados para a realização dos ensaios testes de campo, para avaliação do período de controle das larvas de *Ae. aegypti* pelo DFB.

A cada seis dias de exposição, as larvas vivas e mortas, pupas e adultos formados foram registrados e retirados dos recipientes. Em seguida, novas 20 larvas no estágio L3 foram colocadas e expostas por mais seis dias, e assim sucessivamente. O primeiro e o segundo ensaios foram conduzidos até a sexta semana e o terceiro, até a décima semana de exposição das larvas do mosquito

ao DFB. O critério para determinar o sucesso da emergência dos adultos foi a detecção de exúvias limpas de pupas (MULLA, 1974; MULLA et al. 2003a).

Após a retirada das larvas, pupas e adultos a cada seis dias, foram registrados a temperatura, o pH, o oxigênio dissolvido e a condutividade elétrica das águas dos recipientes com a sonda da marca Uribe, modelo YSI 156. Os dados dos parâmetros de água foram analisados pelo Coeficiente de Correlação de Pearson, com nível de significância a 5%.

A mortalidade das larvas foi corrigida, em relação ao tratamento controle de cada recipiente, com o uso da fórmula de ABBOTT (1925), descrita a seguir:

$$Mc(\%) = \frac{\%Mo - \%Mt}{100 - \%Mt} \times 100, \text{ onde:}$$

Mc = Mortalidade corrigida

Mo = Mortalidade observada

Mt = Mortalidade na testemunha

As médias das mortalidades corrigidas dos tratamentos com os três tipos de material dos recipientes foram comparadas com o teste estatístico de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Os cálculos foram realizados com o programa computacional SISVAR (FERREIRA, 1999).

O critério utilizado neste trabalho para a determinação do período de controle das larvas pelo DFB foi à ocorrência de mortalidade de larvas acima de 80%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de Laboratório

4.1.1. Temefós

Inicialmente foi constatado que ocorreu mortalidade inferior a 10% das larvas nos tratamentos controles dos ensaios realizados. Os valores de CL95 calculados para a cepa Rockefeller e para as populações A e B e a razão de resistência encontram-se na Tabela 1. Pelos valores de razão de resistência (RR95) a População A classifica-se com resistência intermediária, $RR95 = 7,5$; ($5 < RR95 < 10$) ao temefós e a População B, baixa $RR95 = 4,0$; ($RR95 < 5$). De acordo com este critério as duas populações testadas são resistentes ao temefós; apesar de apresentarem valores de RR95 próximos, as larvas da População A são mais resistentes ao temefós que as da Pop B, quando comparadas com a cepa Rockefeller.

Tabela 1. Valores de concentração letal (CL95) média e de razão de resistência (RR95) das larvas das populações A e B ao temefós (média de três ensaios).

População	Geração	CL95 ($\mu\text{g/L}$)	RR95
Rock	4,00	1,00
Pop A	F1	30,00	7,50
Pop B	F1	16,00	4,00

4.1.2. Diflubenzuron

Inicialmente foi constatado que ocorreu mortalidade inferior a 10% das larvas nos tratamentos controles dos ensaios realizados. Os valores de CL95 calculados para a cepa Rockfeller e para as populações A e B e a razão de resistência encontram-se na Tabela 2.

Pelos valores de razão de resistência (RR95) as larvas das populações A e B classificam-se com de resistência baixa ($\text{RR95} < 5$) ao DFB.

Tabela 2. Valores de concentração letal (CL95) média e de razão de resistência (RR95) das larvas das populações A e B ao DFB (média de três ensaios).

População	Geração	IE95 ($\mu\text{g/L}$)	RR95
Rock	2,88	1,00
Pop A	F1	3,33	1,07
Pop B	F1	3,11	1,15

Os valores de RR95 obtidos nos ensaios foram muito baixos, não ultrapassando 1,15. A pop A apresentou RR95 igual a 1,07, próximo ao da cepa susceptível. Esta população apresenta RR intermediária ao temefós, porém foi altamente susceptível ao DFB. O valor de RR95 para as larvas da Pop B foi próximo ao da Pop A.

As populações de campo exibiram padrões de resposta similares pra o DFB aos encontrados pela cepa susceptível Rockefeller, independente do seu nível de resistência ao organofosforado temefós (Tabela 3). Portanto, não existe relação entre a resistência das larvas ao temefós e a susceptibilidade ao DFB.

Tabela 3. Comparação entre o nível de resistência ao temefós e ao DFB de populações de *Aedes aegypti*.

População	Geração	Temefós	Diflubenzuron
		RR95	RR95
Rock	1,00	1,00
Pop A	F1	7,50	1,07
Pop B	F1	4,00	1,15

Na Figura 9 encontram-se os resultados de Inibição de Emergência de adultos das larvas cepa Rockefeller e para as populações de campo expostas às diferentes concentrações de DFB.

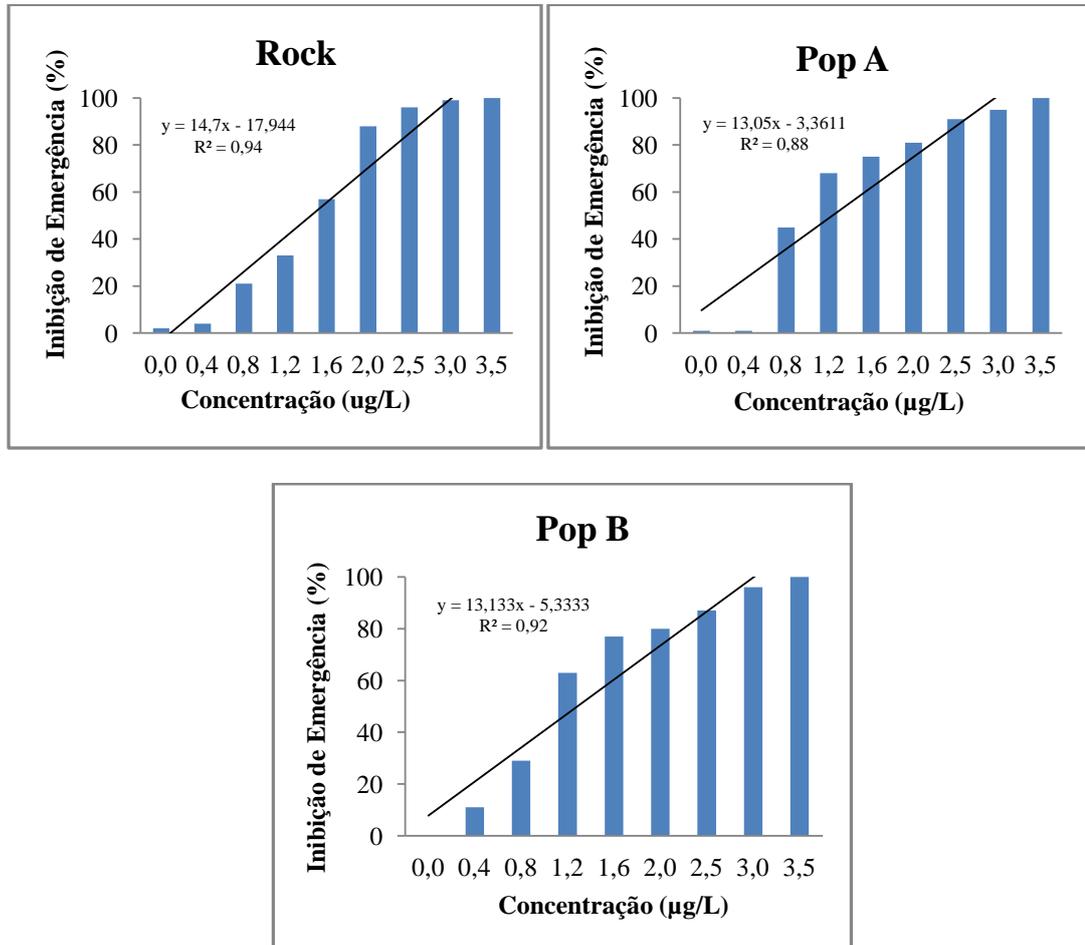


Figura 9. Valores médios de inibição da emergência de adultos após exposição das larvas ao DFB.

Na Figura 10 encontram-se os valores de mortalidade causada pelo DFB nos diferentes estágios de desenvolvimento dos mosquito da Pop A (RR95 de 1,07 para diflubenzuron). Verifica-se que ocorreu inibição total de formação de adultos pelo DFB a partir da concentração de $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, e para a cepa Rockefeller, a partir da concentração $3,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

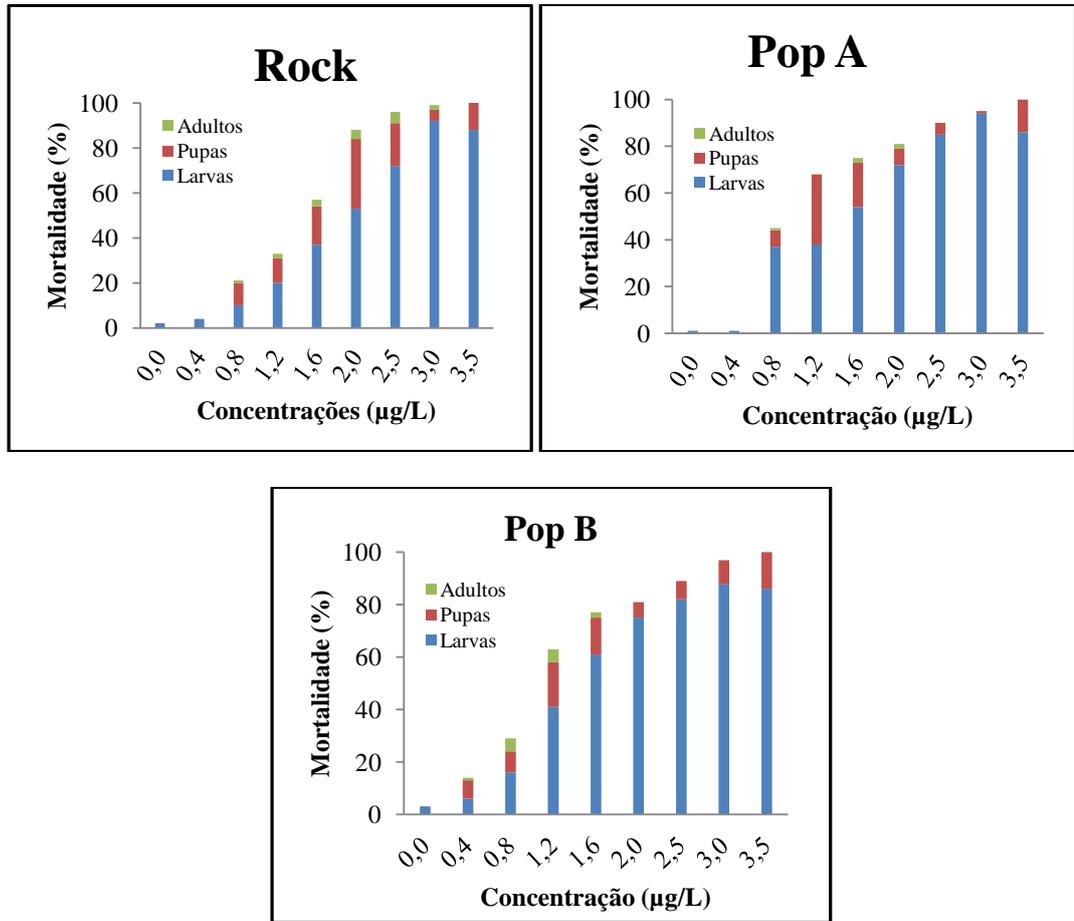


Figura 10. Valores médios de mortalidade dos estágios de desenvolvimento do mosquito da dengue a partir de larvas expostas ao DFB.

Nos ensaios foi observado que além do efeito concentração-dependente sobre a mortalidade, o DFB também causou anormalidades similares às observadas em espécimes mortos após a exposição contínua ao DFB em outros estudos. Por exemplo, com o novaluron, também do grupo IGR, em larvas de *Ae. aegypti* (AWAD & MULLA, 1984 e BRAGA et al., 2005b).

Tais anormalidades foram classificadas por AWAD & MULLA (1984) e BRAGA et al., (2005) em: mortalidade em larva, mortalidade como pré-pupa, pupa albina, pupa distendida, pupa com adulto visível no interior, adulto com emergência parcial e adulto com tarsos deformados (Figura 11).

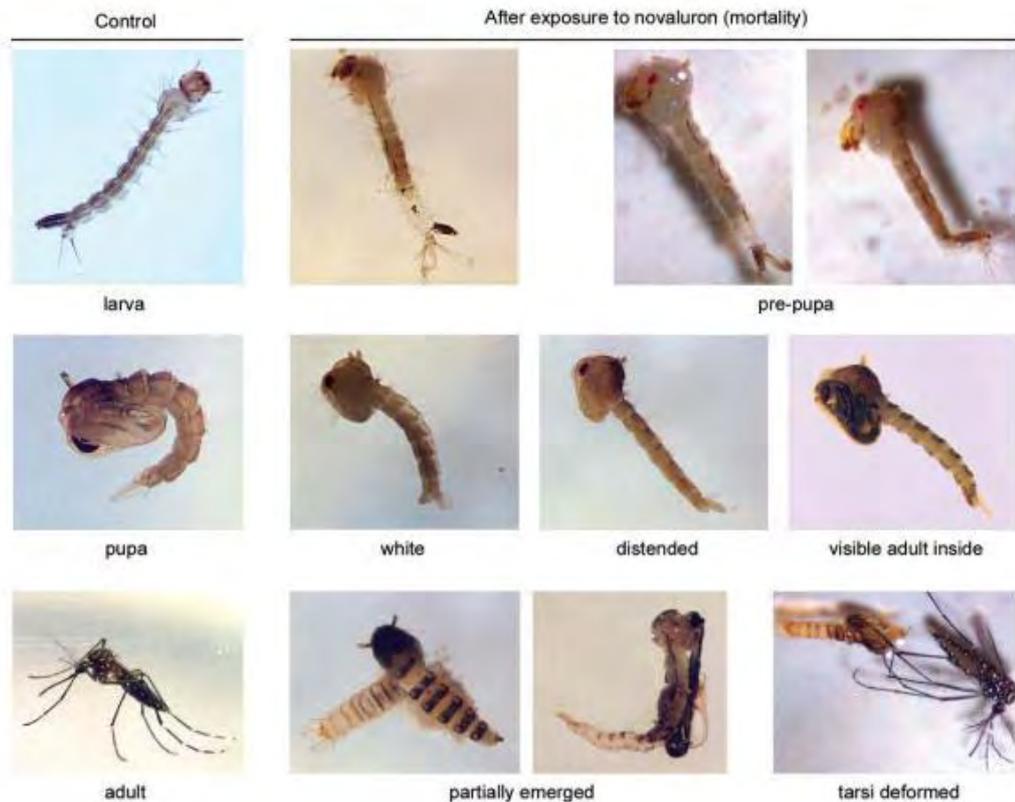


Figura 11. Anormalidades morfológicas observadas em larvas, pupas e adultos após exposição contínua desde o terceiro estágio larval ao novaluron. Identificação das anomalias de acordo com AWAD & MULLA (1984) e BRAGA et al., (2005b). Fotos de Giglio NF e Rezende GL.

A utilização de inseticidas químicos para o controle do mosquito da dengue intensificou-se após a primeira epidemia em 1986. Devido à extensa utilização do organofosforado temefós, relatos de resistência começaram a surgir. Por isso é de extrema importância verificar o nível de resistência desse mosquito aos inseticidas utilizados.

O teste recomendado para tal constatação é o de concentração-resposta, onde é possível verificar os níveis de alteração de susceptibilidade, no qual o resultado de razão de resistência é obtido em comparação com a cepa de referência.

Devido à ocorrência de resistência aos inseticidas usados repetidamente, é necessário a avaliação da eficácia de novos compostos com mecanismos de ação tóxica diferentes. No caso de larvas do mosquito da dengue resistentes ao temefós, o DFB pode ser utilizado com alta eficácia de controle.

Em estudos com diferentes concentrações de DFB foi constatado eficácia no controle de larvas de *Ae. Aegypti*, com redução de emergência entre 85 e 90%, a partir da concentração na água de 0,1 mg/L (MARTINS & SILVA, 2004).

Para as larvas de populações resistentes ao temefós, foi constatado neste estudo a eficácia do DFB em concentrações na água bem menores que as utilizadas por outros autores. BATRA et al. (2005) obtiveram 100% na inibição de emergência de adultos de *Ae. aegypti* e *Anopheles stephensi* com a concentração de 0,02 mg/L. KAMAL & KHATHER (2010) obtiveram 50% na inibição de emergência de adultos de *Ae. aegypti* com a concentração de 0,00036 mg/L de DFB.

Outros larvicidas inibidores de crescimento de insetos como novaluron também são eficientes para o controle de outros insetos como *Musca doméstica* (CETIN et al. 2006), *Leptinotarsa decemlineata* (MALINOWSKI & PAWINSKA, 1992) e flebotomíneos (MASCARI et al. 2007).

Conforme os resultados obtidos (Figuras 9 e 10) a eficácia do DFB para o controle de larvas de *Ae.aegypti* é concentração-dependente. Quanto maior a concentração, mais precoce é a mortalidade.

MULLA et al. (2003) constataram 100% de inibição de emergência de larvas de *Ae. aegypti*, de segundo e quarto instar, nas concentrações de 0,25 e 1,0 mg/L de novaluron. FONTOURA et al (2012), também com o novaluron, obtiveram inibição de 100% de adultos viáveis com a concentração de 0,4 µg/L. MARTINS et al. (2008), com o triflumuron; obtiveram, com a cepa Rockefeller, a inibição de emergência de 90% com a concentração de 1,8 µg/L.

As três populações de larvas testadas foram susceptíveis ao DFB, independente de seu nível de resistência ao temefós. As populações A e B têm sensibilidade ao DFB similar à da cepa de referência.

Estudos comprovam que populações de campo resistentes a inseticidas químicos podem ser mais susceptíveis a IGRs que populações de laboratório, conforme a constatação de FONTOURA (2012) de que larvas de *Aedes aegypti* resistentes ao temefós foram mais sensíveis ao novaluron do que a cepa referência.

4.2. Testes em Campo

Nestes ensaios de campo foi constatado que o DFB causou a morte das larvas do mosquito ao longo de dias, devido ao seu modo de ação. A mortalidade se tornava mais expressiva a partir do quinto dia de exposição das larvas ao produto. Este efeito já era esperado e, por isto as avaliações foram estabelecidas para serem realizadas no sexto dia de exposição. Os testes foram realizados com a concentração de 0,25 mg/L, conforme certificado pelo Ministério da Saúde.

No primeiro ensaio, com a cepa suscetível Rockefeller (agosto-setembro 2011), o produto foi eficaz por quatro semanas para os recipientes de plástico e borracha e de três semanas para o recipiente de vidro (Tabela 4).

No segundo ensaio, com a Pop A (outubro-novembro 2011), o produto foi eficaz por cinco semanas para os três recipientes testados (Tabela 5).

No terceiro e último ensaio, com a Pop B (março-maio 2012), o produto foi eficaz por três semanas, para os recipientes de plástico e vidro, e sete semanas para o recipiente de borracha (Tabela 6).

A mortalidade de 100% dos espécimes expostos foi observada nas quatro primeiras semanas apenas para a Pop B. Nas populações Rockefeller e Pop A ocorreram variações na eficácia nas primeiras semanas, mas em todas ficaram próximas a 100% de controle.

Tabela 4. Porcentagem de Eficiência do DFB, para a cepa susceptível Rockefeller, em três tipos de recipientes em diferentes dias de exposição ao DFB.

Dias de Avaliação	Recipientes							
	Pneu		Vaso		Vidro		F	
6	73,2	B b	93,6	A a	94,6	A a	11,72*	
12	49,6	C b	86,2	A a	59,0	C b	2,06 ^{ns}	
18	73,8	B a	87,2	A a	88,0	A a	41,33*	
24	92,0	A a	98,0	A a	35,6	D b	20,13*	
30	60,6	C a	74,6	B a	28,2	D b	7,94*	
36	48,4	C b	75,6	B a	75,4	B a	4,73*	
F	9,06*		2,84*		26,11*			

Medias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ^{n/s} não significativo. * significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Porcentagem de Eficiência do DFB, para a População resistente (Pop A), em três tipos de recipientes em função dos diferentes dias de exposição ao DFB.

Dias de Avaliação	Recipientes							
	Pneu		Vaso		Vidro		F	
6	98,0	A a	99,0	A a	100,0	A a	0,00 ^{ns}	
12	100,0	A a	100,0	A a	100,0	A a	14,78 *	
18	98,0	A a	66,0	C b	100,0	A a	51,67*	
24	72,0	B a	75,0	B a	75,4	B a	0,95 ^{ns}	
30	92,8	A a	83,8	B a	85,2	B a	14,11*	
36	65,8	B a	45,6	D b	75,4	B a	0,04 ^{ns}	
F	9,06*		50,23*		6,06*			

Medias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott. n/s não significativo. * significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Porcentagem de Eficiência do DFB, para a População resistente (Pop B), em três tipos de recipientes em função dos diferentes dias de exposição ao produto.

Dias de Avaliação	Recipientes							
	Pneu		Vaso		Vidro		F	
6	100,0	A a	100,0	A a	100,0	A a	0,00 ^{ns}	
12	100,0	A a	100,0	A a	100,0	A a	0,00 ^{ns}	
18	100,0	A a	100,0	A a	100,0	A a	0,00 ^{ns}	
24	84,0	B a	65,2	B b	72,2	B b	451.40*	
30	85,0	B a	65,6	B b	59,0	C b	913.26*	
36	95,0	A a	53,0	C b	58,0	C b	2631.66*	
42	95,0	A a	52,2	C c	67,0	B b	2362.40*	
48	65,0	C a	53,6	C a	58,2	Ca	164.46*	
54	46,4	D a	45,8	C a	31,4	D b	360.60*	
60	34,0	E b	50,2	C a	30,2	D b	564.06*	
F	51,27*		45,46*		60,97*			

Medias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott. n/s não significativo. * significativo a 5% de probabilidade.

A diferença de seis e dez semanas de condução dos ensaios de campo não alterou o período de controle das larvas pelo DFB com base no critério de 80% de mortalidade.

Foi possível também observar que, ao longo das semanas, a mortalidade variou, aumentando e diminuindo no mesmo recipiente tratado. Observações similares às encontradas neste estudo também foram constatadas em outros estudos com diversas classes de larvicidas para o controle de larvas de *Ae. Aegypti*. FONTOURA et al. (2012) realizaram testes de campo com o novaluron, também do grupo dos inibidores de síntese de quitina, em baldes de plásticos, com larvas com altos níveis de resistência ao temefós. Constataram que o período residual foi de 42 dias em ambiente externo.

MULLA et al. (2003) com novaluron, nas concentrações de 0,05 a 1,0 mg/L, testadas em condições de campo, em reservatórios de água, observaram que o controle das larvas foi de 100% no período de três meses.

THAVARA et al (2007), com o DFB, na formulação de pastilhas aplicadas em reservatórios para armazenamento de água, constataram que na menor concentração testada de 0,02 mg/L, a eficácia foi de 100%, por um período de 21 semanas.

LIMA et al (2005) com *Bti*, em simulados de campo, constataram níveis de mortalidade superior a 70%, por um período de duas à cinco semanas, aplicados nos recipientes de plástico, cimento e amianto.

BATRA et al (2005) com triflumuron em ensaio de campo, observaram que este inibidor de síntese de quitina causa 100% de inibição na formação de pupas, quando expostos à concentração de 0,5 mg/L.

Essas variações foram também detectadas para outras espécies, como observado por ARREDONDO-JIMÉNEZ e VALDEZ-DELGADO (2006) com novaluron sobre larvas de *Anopheles albimanus* e *Culex coronator*.

Os estudos com o DFB sobre a ecotoxicidade ainda são muito escassos, mas ele foi classificado como extremamente tóxico em testes agudos para o microcrustáceo *Daphnia magna*, que depende exclusivamente da síntese de quitina para crescer se desenvolver. Por outro lado, como ponto positivo, o DFB classifica-se como praticamente não tóxico para o peixe *Poecilia reticulata* e para a macrófita *Lemna minor* (SOUZA, 2008).

Dentre os relatos destes estudos, observa-se que o DFB constitui-se em um larvicida adequado para ser utilizado no controle de larvas de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao temefós, devido sua alta atividade inibidora na ecdise das larvas. Por outro lado, o DFB destaca-se também por ser praticamente atóxico para mamíferos, biodegradável, não sistêmico e de baixo impacto ambiental (FOURNET et al. 1993).

A cepa de referência Rockefeller, em algumas semanas dos períodos de exposição (Tabelas 4) foi menos susceptível ao DFB do que as populações de campo testadas. Esse fato pode ser resultado de diferenças na condição fisiológica das larvas de campo em relação às mantidas em laboratório, com as da cepa Rockefeller. Estas se desenvolvem mais rapidamente que larvas de

populações do campo, por já estarem adaptadas ao laboratório (FONTOURA et al. 2012).

Nos testes de campo, a temperatura da água e do ambiente foram registrados nos dias das avaliações; uma única vez na semana. A temperatura média ambiental foi de 19,7 °C e a umidade relativa do ar média foi de 68,16%, durante a condução do primeiro ensaio com a cepa suscetível; de 20,06 °C e 52% no segundo ensaio com a População A; e de 27,4 °C e 61,6%, com a População B.

No ensaio com a cepa suscetível Rockefeller, nos tratamentos com o DFB, a temperatura e a condutividade das águas ao longo do tempo de exposição apresentaram correlação negativa significativa a mortalidade das larvas, para os três recipientes testados ($p < 0,05$), de acordo com o teste de correlação de Pearson (Figura 12).

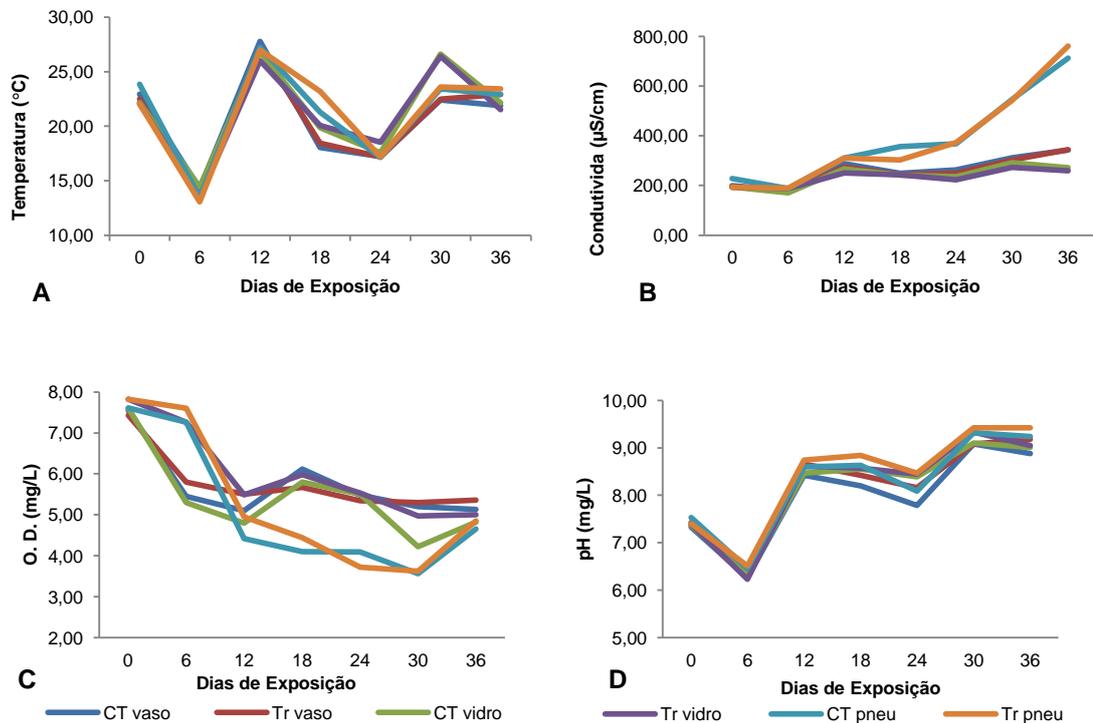


Figura 12. Variação dos parâmetros da qualidade de água nos diferentes recipientes ao longo da eficácia do DFB entre os dias de exposição ao produto, no simulado de campo com a cepa suscetível Rockefeller. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). A: $r=-0,4312$ e $p<0,017$ para Vaso; $r=-0,5371$ e $p<0,0022$ para Vidro; $r=-0,4090$ e $p<0,00248$ para Pneu; B: $r=-0,5734$ e $p<0,0009$ para Vaso; $r=-0,4954$ e $p<0,0054$ para Vidro; $r=-0,4137$ e $p<0,0231$ para Pneu; C: $r=0,1299$ e $p<0,4928$ para Vaso; $r=-0,3594$ e $p<0,0511$ para Vidro; $r=-0,1195$ e $p<0,5291$ para Pneu; D: $r=-0,4770$ e $p<0,077$ para Vaso; $r=-0,5407$ e $p<0,0020$ para Vidro; $r=-0,3197$ e $p<0,0850$ para Pneu.

Nos testes com a população de campo (A), os parâmetros de qualidade de água praticamente não apresentaram diferenças significativas, com exceção do pH para os recipientes vaso e vidro, que aumentou com a diminuição da eficácia, ($p<0,05$) (Figura 13).

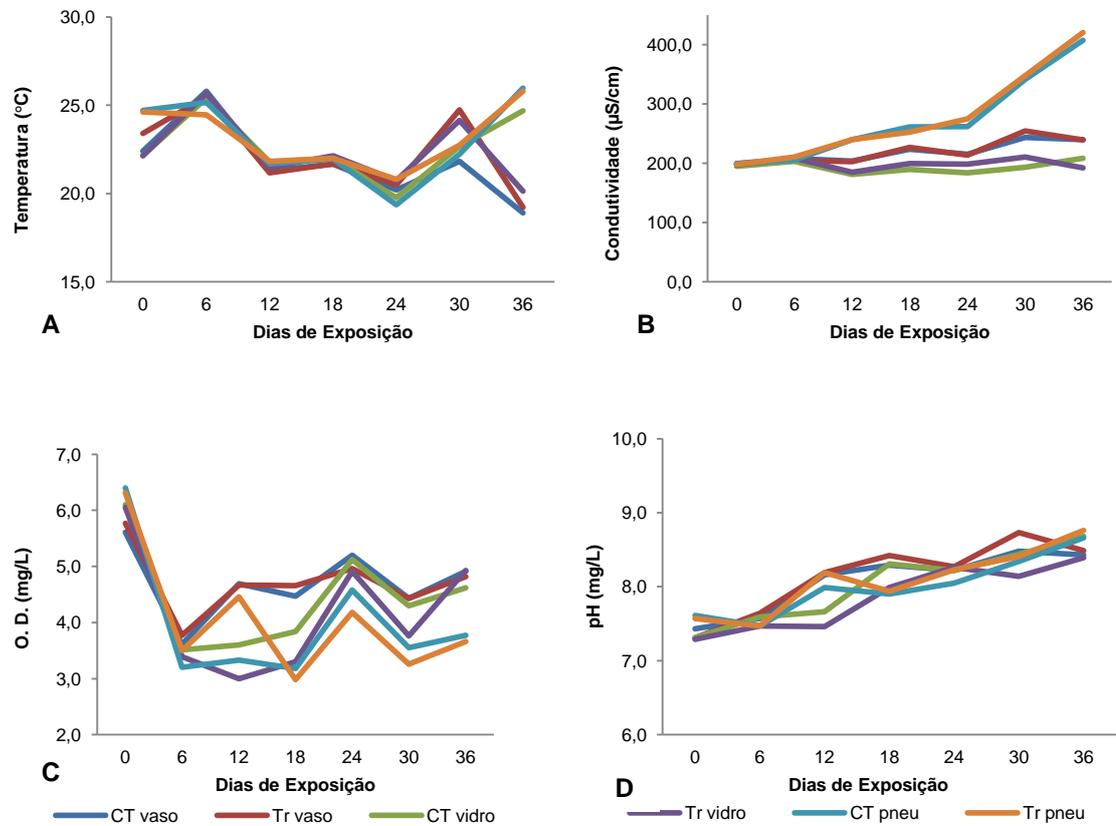


Figura 13. Variação dos parâmetros da qualidade de água nos diferentes recipientes ao longo da eficácia do DFB entre os dias de exposição ao produto, no simulado de campo com a População de campo A. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). A: $r=0,02131$ e $p<0,9110$ para Vaso; $r=0,1924$ e $p<0,1601$ para Vidro; $r=-0,4854$ e $p<0,0065$ para Pneu; B: $r=-0,4876$ e $p<0,0063$ para Vaso; $r=-0,0837$ e $p<0,6600$ para Vidro; $r=-0,2251$ e $p<0,2317$ para Pneu; C: $r=-0,1129$ e $p<0,5524$ para Vaso; $r=-0,2630$ e $p<0,1601$ para Vidro; $r=0,1557$ e $p<0,4111$ para Pneu; D: $r=-0,4530$ e $p<0,011$ para Vaso; $r=-0,3611$ e $p<0,0499$ para Vidro; $r=0,1245$ e $p<0,5199$ para Pneu.

Para a população de campo (B), ao contrário da população (A), houve correlação positiva entre a temperatura e a eficiência ($p<0,05$). Entretanto a eficiência diminui com o aumento dos parâmetros condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e pH ($p<0,05$) (Figura 14).

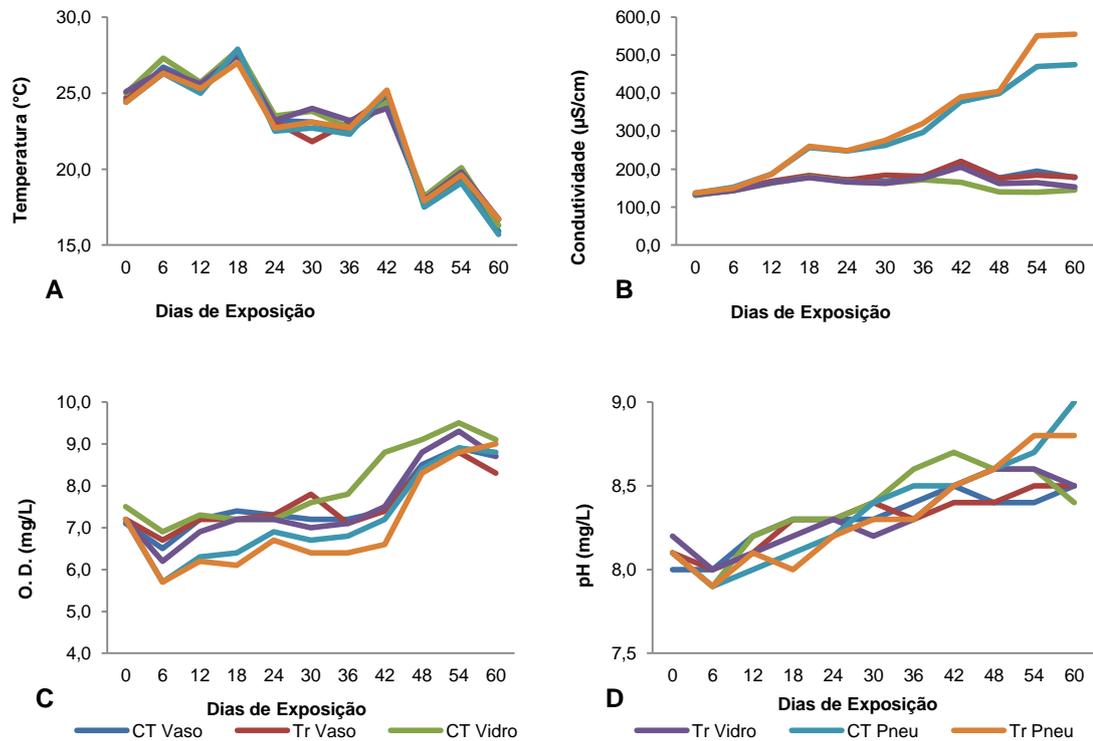


Figura 14. Variação dos parâmetros da qualidade de água nos diferentes recipientes ao longo da eficácia do DFB entre os dias de exposição ao produto, no simulado de campo com a População de campo B. Teste de Coeficiente de Correlação de Pearson (alfa=5%). A: $r=0,7087$ e $p<0,0001$ para Vaso; $r=0,8345$ e $p<0,0001$ para Vidro; $r=0,9017$ e $p<0,0001$ para Pneu; B: $r=-0,4803$ e $p<0,004$ para Vaso; $r=0,0413$ e $p<0,7755$ para Vidro; $r=-0,8324$ e $p<0,0001$ para Pneu; C: $r=-0,5996$ e $p<0,0001$ para Vaso; $r=-0,7389$ e $p<0,0001$ para Vidro; $r=-0,9232$ e $p<0,0001$ para Pneu; D: $r=-0,7681$ e $p<0,0001$ para Vaso; $r=-0,7567$ e $p<0,0001$ para Vidro; $r=-0,8244$ e $p<0,0001$ para Pneu.

A temperatura muitas vezes pode ser um dos fatores de mortalidade das larvas, ou até a causa, de forma isolada, altos percentuais de mortalidade. As temperaturas muito extremas (baixas ou altas), além de provocarem a morte das larvas, podem afetar o desenvolvimento (FONTOURA et al. (2012), o que provavelmente não correu durante a realização dos ensaios de campo.

V. CONCLUSÕES

As larvas da população A de *Aedes aegypti* tem resistência intermediária e a da população B, resistência baixa ao temefós.

O DFB inibe a emergência de *Aedes aegypti* adultos em concentrações da ordem de microgramas por litro de água (IE95 de Rockefeller 2,0 µg/L), em condições de laboratório.

O DFB é eficaz no controle da cepa Rockefeller e de populações de campo com resistência baixa e intermediária ao temefós.

O período de controle do DFB (mortalidade larval acima de 80%) na concentração de 0,25 mg/L varia, de acordo com o recipiente, entre três e sete semanas em condições de campo.

VI. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of the insecticide. **J. Econ. Entomol.** 18:265-7. 1925.

ALI, A. E KOK-YOKOMI, M. L. Field studies on the impact of a new benzoylphenylurea insect growth regulator (UC-84572) on selected aquatic nontarget invertebrates. **Bull Env Contam Tox** 42(1): 134-141, 1989.

ANASTÁCIO, D. B. **Estudo da distribuição espacial da resistência ao inseticida químico temephos em populações de *Aedes aegypti*, no município do Recife-PE.** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)-Faculdade Frassinetti do Recife, Recife, 27p, 2003.

ARREDONDO-JIMÉNEZ, J. I. E VALDEZ-DELGADO, K.M. Effect of Novaluron (Rimon® 10 EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. **Med Vet Entomol** 20: 377–387, 2006.

AWAD, T. I. & MULLA, M. S. Morphogenetic and histopathological effects of the insect growth regulator cyromazine in larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol** 21(4): 427-431, 1984a.

BATRA, C. P.; P. K. MITTAL.; T. ADAK & M. A. Ansari. Efficacy of IGR compound starycide 480 SC (Triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. **J. Vect Borne Dis** 42: 109-116, 2005.

BELINATO, T. A. **Efeito do triflumuron - um inibidor da síntese de quitina – sobre o desenvolvimento e a reprodução de culicídeos vetores de doenças.** Tese de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2007.

BOGWITZ, M. R. **The genetics of resistance to lufenuron in *Drosophila melanogaster*.** Tese de Doutorado. University of Melbourne. Estados Unidos, 2005.

BORGES, R. A., CAVASIN, G. M., SILVA, I. G., ARRUDA, W., OLIVEIRA, E. S.; SILVA, H. H. G.; MARTINS, F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do *Diflubenzuron* na ecdise de larvas de *Aedes aegypti*. **Revista de Patologia Tropical**. **33**: 91-104, 2004.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S. E VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in sevfoil municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **99**(20): 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; MELLO, C. B., MONTELLA, I. R.; LIMA, J. B. P.; MARTINS-JR, A. J.; MEDEIROS, P. F. V. e VALLE, D. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. **J Med Entomol** **42**(5): 830-837, 2005a

BRAGA, I. A.; MELLO, C. B., MONTELLA, I. R.; LIMA, J. B. P.; MARTINS-JR, A. J.; MEDEIROS, P. F. V. e VALLE, D. Effectiveness of methoprene, an in--sect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities under laboratory conditions. **J Med Entomol** **42**: 830-837, 2005b.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência Epidemiol. **Serv. Saúde, Brasília**,**16**(4):279-293, out-dez, 2007.

CARVALHO, M DO S.L. DE, E.D. CALDAS, N. DEGALLIER, P. DE T.R. VILARINHOS, L.C.K. DE SOUZA, M.A.C. YOSHIZAWA, M.B. KNOX & C. OLIVEIRA. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* Públ. **38**: 623-629, 2004.

CASALI, C. G.; PEREIRA, M. R. R.; SANTOS, L. M. J. G.; PASSOS, M. N. P.; FORTES, B. P. M. D.; VALENCIA, L. I. O.; ALEXANDRE, A. J. E MEDRONHO, R. A. A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. **Rev Soc Bras Med Trop** **37** (4): 296-299, 2004.

CHARMILLOT, P. J.; GOURMELON, A.; FABRE, A. L. E PASQUIER, D. Ovicidal and larvicidal effectiveness of sevfoil insect growth inhibitors and regulators on the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lep. Tortricidae). **J Appl Entomol** **125**: 147-153, 2001.

CETIN, H.; ERLER, F. E YANIKOGLU, A. Larvicidal activity of novaluron, a chitin synthesis inhibitor, against the housefly, *Musca domestica*. **J Insect Science** **6**(50): 1-4, 2006.

CHEN, X.; TIAN, H.; ZOU, L.; TANG, B.; HU, J.; ZHANG, W. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A, with RNA interference. **Bull Entomol Research**, **98**: 613–619, 2008.

COHEN E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Manag Sci** **57**: 946-950, 2001.

DELGADO, F. X.; BRITTON, J. H. ANSAGER, J. A.; SWEARINGEN, W. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savanna grasshopper complex (Orthopteroi) in Mali. **Journal of Invertebrate Pathology** **73**:34-39, 1999.

DENGUE Fever and It's Management. Disponível em: <<http://neeladri.wordpress.com/2008/10/12/denguefever-and-its-managemet/>>. Acesso em 21 Nov.2011.

DENGUE. Mosquito da Dengue Disponível em: <http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html >. Acesso em 18 Dez.2011.

DONALÍSIO, M. R. E GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Rev Bras Epidemiol SP** **5**: 259-272, 2002.

DIVE. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Guia de orientação para treinamento de técnicos de laboratório de entomologia. Santa Catarina, 2008.

FAY, R. W. E ELIASON, D. A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosqu. News**, **26**: 531-5, 1966.

FERREIRA, D.F. SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA. 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M. E FONSECA, B. A. L. Dengue. In: Veronesi R, Focaccia R. **Tratado de Infectologia**, 204-217, 2002.

FONTOURA, N. G.; BELLINATO, D. F.; VALLE, D. E LIMA, J. B. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, **107**, 000-000, 2012.

FOURNET, F.; SANNIER C.; MONTENY, N. Effect of the insect growth regulators OMS 2017 and Diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association** **9**:426-430, 1993.

FOURNET, F.; SANNIER, C.; MONTENY, N. Effects of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Dipteroi: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). **Journal of the American Mosquito Control Association** **13**: 40-42, 1997.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor: **manual de normas técnicas**, 3a Ed. Ministério da Saúde, Brasília, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue – instruções para pessoal de combate ao vetor**: manual de normas técnicas. 3ª Ed., rev. BrasíliaqMinistério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 84p, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Dengue. <http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengue0.htm>, 2002. Acesso em 27 fevereiro 2010.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitol today** **9** 471-474, 1993.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev** **11**(3): 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. E CLARK, G. G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: The emergence of a global health problem. **Emerg Infect Dis** **1**: 55-57, 1995.

HARTBERG, W. K E CRAIG-JR, G. B. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitos. II Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. **Evolution** **24**: 692-703, 1970.

HOFFMANN, K. H. E LORENZ, M. W. Recent advances in hormones in insect pest control. **Phytoparasitica** **26**: 1-8, 1998.

HOLMES, E.C., BARTLEY, L. M. E.; GARNETT, G. P. The emergence of dengue: past, presente, and future. Em: Krause RM. **Emerging infections, Academic Press**, Nova York, 1998.

IRAC-BR. 2006. Comitê Brasileiro de ação a resistencia a inseticida.Modo de ação de inseticidas e acaricidas [on line]. Disponível em: <http://www.irac-br.org.br>. Acesso em: 5 Maio 2011.

KAMAL, H. A. & KHARTER, E. I. The biological effects of the insect growth regulators; pyriproxyfen and diflubenzuron on the mosquito *Aedes aegypti*. **J Egypti Soc. Parasitol**, **40**: 565-74, 2010.

KOSTYUKPVSKY, M. E TROSTANETSKY, A. The effect of a new chitin synthesis inhibitor, novaluron, on various developmental stages of *Tribolium castaneum* (Herbst). **J Stored Prod Res** **42**: 136-148, 2006.

LARINI, L. Toxicidade dos praguicidas. In. **Toxicologiadados praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. Cap. 3, p.47.

LIMA, J. B. P. ***Aedes aegypti* e *Anopheles neotropicais*, vetores de importância médica no Brasil: Aspectos básicos de biologia e controle**. Tese de Doutorado em Biologia Parasitária. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 2003.

LIMA, J. B. P., M. CUNHA, P.; SILVA-JR, R. C.; GALARDO, A. K. R.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A.; RAMOS, R. P. e Valle, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in sevfoil municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **Am. J. Trop.Med. Hyg.** **68**: 329-333, 2003.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; LIMA, J. W. O.; RAMOS-JR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. G. E PONTES, R. J. S. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39**: 259-263, 2006.

LOPES, J.; SILVA, M. A. N.; BORSATO, A. M.; OLIVEIRA, V. D. R. B. E OLIVEIRA, F. J. A. *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. e a culicidaeofauna associada a área urbana da região sul, **Brasileira Revista Saúde Pública** **27**: 226-333, 2006.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. Em Coura, JR 85 Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, **Guanabara-Koogan**, **2**: 2025, 2005.

MALINOWSKI, H. E PAWINSKA, M. Comparative evaluation of some chitin synthesis inhibitors as insecticides against Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Pestic Science** **35**: 349-353, 1992.

MARCORIS, M. L. G.; CAMARGO, M. F.; SILVA, I. G. et al. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 24, p.31-40, 1995.

MARCORIS MLG, ANDRIGHETTI MTM, TAKAKU L, GLASSER CM, GARBELOTO VC, CIRINO VCB. Altfoição da resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** **33**: 521-2, 1999.

MARCORIS, M.L.G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98**: 703-708, 2003.

- MARTINS, F. E SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptfoi, Culicidae). **Rev Soc Bras Med Trop** **37**: 135-138, 2004.
- MARTINS, A. J.; BELINATO, T. A.; LIMA, J. B. P. E VALLE, D. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. **Pest Manag Sci**, **68**:1547, 2008.
- MASCARI, T. M.; MITCHELL, M. A.; ROWTON, E. D. E FOIL, L. D. Evaluation of novaluron as a fedd-through inseticide for control of immature sand flies (Diptfoi: Psychodidae). **Journal Med Entomol** **44**: 714-717, 2007.
- MAZZARI, M. B. E GEORGHIOU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **J Am Mosq Assoc** **11**: 315-322, 1995.
- MELLON, R. B.; GEORGHIOU, G. P. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. Proceedings and papers of the fifty-second **annual Conference of the California and Vector Control Association**: 65-67, 1984.
- MERZENDORF H. Insect chitin synthases: a review. **J Comp Physiol B** **176**: 1-15, 2005.
- MERZENDORFER, H. E ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J Exp Biol**, **206**: 4393-4412, 2003.
- MILLER, T. A. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitol Today* **4**: 13-15, 1988.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Endemias Rurais – Métodos de trabalho adotados pelo DNERU, **Departamento Nacional de Endemias Rurais**, 1968.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Reunião técnica para a discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Brasília. **Relatório final**, 30 pp, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção Básica, Departamento de atenção Básica, série A. **Normas e Manuais Técnicos**, Cadernos de atenção Básica nº 21. Brasília – DF, 2008.
- MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; BRAGA, I. A. E VALLE, D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **Am J Trop Med Hyg** **77**(3): 467-477, 2007.

MSCASLAND, C. S.; COOPER, R. J.; BARNUM, D. A. Implications for the use of diflubenzuron to reduce arthropod populations inhabiting evaporation ponds of the San Joaquin Valley, California. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **60**:702-708, 1998.

MULLA, M. S. Laboratory and field evaluation of insect growth regulators against mosquitoes. **Proc. Papers Calif. Mosq. Contr. Assoc.** **42**: 175-176, 1974.

MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. **J Am Mosq Control Assoc** **11**: 269-273, 1995.

MULLA S, U. THAVARA.; A. TAWATSIN.; J. CHOMPOOSRI.; M. ZAIM & SU. TYANIUM. Laboratory and field evaluation of novaluron a new acylurea insect growth regulator against *Aedes aegypti* (Diptfoi: Culicidae). **J Vector Ecol** **28**: 241-254, 2003.

NOGUEIRA, R. M. E.; MIAGOSTOVICK, M. P.; DE FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S E SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **96**(7): 925-926, 2001.

OLIVEIRA, M. M. F. **A dengue em Curitiba: uma abordagem climatológica do episódio de março/abril – 2002.** R RA"E GA 8:45-54. Editora UFPR, 2004.

OMS. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae inseticides. Organização Mundial de Saúde. **WHO/VBC/81.807**, 1981.

OMS. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Organização Mundial de Saúde. **WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/:13**, 2005

PALCHICK S. Chemical Control of Vectors In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado, 1996.

PINHEIRO, V. C.; TADEI, W. P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptfoi, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, **18**: 1529-1536, Nov/Dez., 2002.

RAYMOND, M. Presentation d"une programme d"analyse logprobit pour microordinateur. Cahiers Orstrom Sér Ent **Med Parasitol** **22**: 117-121, 1985.

REGAZZI, A. C. F. **Avaliação do Efeito Residual e da Mortalidade de Larvas de *Aedes aegypti* Expostas ao *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* e ao temefos.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Saúde Comunitária da Faculdade de Medicina da Universidade Fedfoil do Ceará, Fortaleza, CE, 2003.

REY, L. **Parasitologia**, 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 856p. 2001

REHIMI, N.; SOLTANI, N. Laboratory evaluation of Alstylin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* : Effect of development and cuticle secretion. **Journal of Applied Entomology**, 1999.

RIBEIRO, A. F.; MARQUES, G. R. A. M.; VOLTOLINI, J. C. E CONDINO, M. F. L. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública** **40**: 671-6, 2006.

RIGAU-PÉREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J. E VORNDAM. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Lancet** **352**: 971-977, 1998.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**; **7**: 17-23, 2001.

SECCACINI, E.; LUCIA, A.; HARBURGUER, L.; ZERBA, E.; LICASTRO, S.; MASUH, H. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 3, p. 398-403, 2008.

SILVA, J. J. E MENDES, J. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptfoi, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gfoiis, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **97**:679-682, 2002.

SILVA, J. J. **Potencial dos reguladores de crescimento de insetos (IGRs) diflubenzuron e methoprene, no controle de *Aedes aegypti* (L.) (Diptfoi: Culicidae) em Uberlândia – MG.** Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas), Universidade Fedfoil de Uberlândia, Uberlândia, 75p. 2006.

SILVA, J. J. E MENDES, J. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, state of Minas Gfoiis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **40**: 612-616, 2007.

SLAMA, K.; ROMANUK, M.; SORM, F. Insect Hormones and Bioanalogues. New York: **Springer Verlag**; 1974.

SOUZA, J. P. **Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 78p, 2008.

THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; CHANSANG, C.; ASAVADACHANUKORN, P.; ZAIM, M. E MULLA, M. S. Simulated fiel evaluation of the efficacy of two formulations of diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes*

aegypti (L) (Diptfoi: Culicidae) in water-storage containers. **South Asian J Trop Med Public Health** **38**: 269-275, 2007.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. E GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Infor Epid do SUS** **8**: 5-33, 1999.

TELLAM, R. L.; VUOCOLO, T.; JOHNSON, S. E.; JARMEY, J. E PEARSON, R. D. Insect Chitin Synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. **Euro J Biochem** **267**: 6025-6042, 2000.

VASUKI, V. Adult longevity of certain mosquito species after larval and pupal exposure to sublethal concentration of an insect growth regulator hexaflumuron. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, **23**: 121-124. 1992.

VILLANUEVA-JIMENEZ, J. Á.; HOY, M. A.; DAVIES, F. S. Field evaluation of integrated pest management-compatible pesticides for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptfoi: Gracillariidae) and its parasitoid *Ageniaspis citricola* (Hymenoptfoi: Encyrtidae). **Journal of Economic Entomology** **93**:357-367, 2000.

WARE, G. W. E WHITACRE, D. M. The Pesticide Book, 6ª edição. Editora **Meister Media Worldwide**, Willoughby, Ohio, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention, Diagnosis and treatment of insecticide poisoning. WHO Technical report series 889. World Health Organization, Genebra, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Chavasse DC, Yap HH, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue [monography on the internet] Geneve: WHO; 2002. Disponível em: [HTTP://www.who.int/ctd/dengue/burdens.htm](http://www.who.int/ctd/dengue/burdens.htm)

WORLD HEALT ORGANIZATION (WHO). 2006. **Who specifications and evaluations for public health pesticides**. Disponível em: <http://www.who.int/whopes/quality/diflubenzuron_eval_march_2006.pdf> Acesso dia 20 de fevereiro de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of the ninth WHOPES working group meeting, WHOHQ, Geneva, 5-9 December 2005. **WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2**. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue/dengue haemorrhagic fever. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>>. Acesso em: 07 set. 2010.