

A eficácia do Diflubenzuron no controle de larvas de duas populações de *Aedes aegypti* com diferentes níveis de suscetibilidade ao Temephos, em condições de laboratório

The efficacy of Diflubenzuron for the control of larvae from two populations of *Aedes aegypti* with different susceptibility levels to Temephos, under laboratory conditions

Angela Aparecida Machado¹, Ana Carla Coleone², Flavia Renata Abe³, Juliana Heloisa Pinê Américo¹, José Bento Pereira Lima⁴, Joaquim Gonçalves Machado Neto¹

1. Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV/UNESP) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, Brasil. 2. Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública (FSP/USP), São Paulo, Brasil. 3. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. 4. Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Introdução: O Temephos, durante muito tempo, foi o único larvicida disponível para o controle do *Aedes aegypti*. O larvicida Diflubenzuron (DFB) destaca-se como um substituto do Temephos. **Objetivos:** Objetivou-se avaliar o efeito do DFB sobre larvas de duas populações de *Aedes aegypti* sendo elas de Vila Velha - ES (VVE) e Santarém - PA (STR) com distintos níveis de suscetibilidade ao Temephos e investigar as potenciais anormalidades morfológicas provocadas nos indivíduos. **Métodos:** Os bioensaios foram realizados com o larvicida DFB, com larvas das duas populações resistentes ao Temephos e com a cepa Rockefeller, utilizada como padrão de suscetibilidade para se obterem os valores de razão de resistência. Nos bioensaios com o DFB, os números de larvas, pupas e adultos foram registrados durante dez dias. O DFB causa 95% de redução na emergência de adultos da cepa Rockefeller na concentração de 2,88 µg.L⁻¹, de 3,11 µg.L⁻¹ na população VVE (RR95 = 1,07) e 3,30 µg.L⁻¹ na população STR (RR95 = 1,15), além de provocar anormalidades morfológicas nos diferentes estágios de desenvolvimento. **Resultados:** O DFB, com concentrações acima de 3,0 µg.L⁻¹, é efetivo para a VVE e para a STR, que apresentam resistência intermediária e baixa ao Temephos, respectivamente. **Conclusão:** Nesta concentração, o DFB causa a inibição total da emergência de adultos viáveis nestas populações.

Palavras-chave: Resistência. Inseticidas. *Aedes aegypti*.

Abstract

Introdução: Temephos, for a long time was the only available larvicide to control *Aedes aegypti*. The larvicide Diflubenzuron (DFB) stands out as a substitute to Temephos. **Objectives:** The aim was to evaluate the effect of DFB on larvae of two populations of *Aedes aegypti* from Vila Velha, ES (VVE) and Santarém, PA (STR) with different levels of susceptibility to Temephos and investigate potential morphological abnormalities caused in individuals. **Methods:** Bioassays were performed with the DFB larvicide, with larvae of the two populations resistant to Temephos and with Rockefeller strain, used as the susceptible control to obtain the ratio of resistance values. Bioassays with DFB numbers of larvae, pupae and adults were recorded for ten days. **Results:** The DFB causes 95% reduction in adult emergence of the Rockefeller strain at a concentration of 2.88 µg.L⁻¹, 3.11 µg.L⁻¹ in VVE population (RR95 = 1.07) and 3.30 µg.L⁻¹ in STR population (RR95 = 1.15), and causes morphological abnormalities in different stages of development. The DFB, with over 3.0 microg.L⁻¹ concentrations, is effective for the VVE and the STR, which have intermediate resistance to Temephos and low, respectively. **Conclusion:** At this concentration, the DFB causes total inhibition of the emergence of viable adults in these populations.

Keywords: Resistance. Insecticides, *Aedes aegypti*.

INTRODUÇÃO

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O principal transmissor do vírus da dengue é a fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)¹.

Devido à grande facilidade de associação com os humanos, o *Ae. aegypti* é essencialmente urbano. Estudos comprovam que o período de desenvolvimento embrionário do *Ae. aegypti* é de aproximadamente 77,4 horas². Em geral, os ovos, que são postos nas paredes de superfícies que contêm água, eclodem e completam o desenvolvimento embrionário. Entretanto, em condições desfavoráveis, como períodos de seca, os ovos

podem resistir viáveis por até um ano³.

O combate ao vetor da dengue é realizado por meio da eliminação de criadouros potenciais; aplicação de larvicidas em depósitos de água de consumo e uso de inseticidas para as formas adultas, durante os períodos de transmissão⁴.

O principal larvicida utilizado há décadas no país foi o Temephos, na dosagem de 1,0 mg.L⁻¹, formulado em grãos de areia, com 1% do ingrediente ativo⁵. O uso frequente tem selecionado populações de mosquito da dengue resistentes ao Temephos. Em áreas com populações resistentes, a aplicação

Correspondência: Angela Aparecida Machado. Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV/UNESP) - Universidade Estadual Paulista. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, CEP: 14884-900 - Jaboticabal, SP. E-mail: angela_machado88@hotmail.com

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 10 Out 2014; Revisado em: 11 Nov 2014; 4 Dez 2014; Aceito em: 5 Fev 2015.

do Temephos não reduz a densidade do mosquito e resulta em falha no controle da transmissão de doenças em diversas regiões do Brasil⁶⁻⁸. A resistência de populações do mosquito *Ae. aegypti* ao Temephos tem sido constatada em monitoramentos, com bioensaios de dose-diagnóstica e testes bioquímicos, em diversas localidades do País⁹⁻¹¹. Porém, estudos recentes relacionados com a construção de mapeamento de Locos de Caracteres Quantitativos (LCQ) permitem identificar genes candidatos envolvidos na resistência¹². O mapeamento LCQ já possibilitou a identificação de regiões genômicas associadas à resistência aos inseticidas em mosquitos da espécie *Ae. aegypti*¹³.

Para contornar o problema da resistência das populações do mosquito ao Temephos, a estratégia é substituí-lo por outro larvicida com mecanismo de ação diferente. Este grupo de inseticidas inibe a enzima acetilcolinesterase que é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina. A inibição desta enzima leva ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses neuronais e neuromusculares, impedindo a propagação do impulso elétrico e provocando rápidas contrações nos músculos voluntários, o que causa a paralisia e a morte do inseto^{14,15}.

O Diflubenzuron (DFB), um larvicida do grupo dos reguladores de crescimento dos insetos que pertence à classe das benzoil fenil-ureias, destaca-se como substituto do Temephos. O DFB inibe a síntese da quitina e causa modificações fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento das larvas devido à inibição da ecdise¹⁶.

A Quitina (N-acetil-D-glicosamina) é um dos polímeros biológicos mais abundantes. É o componente fundamental do exoesqueleto, e está presente na endocutícula e na exocutícula, fornece suporte mecânico e estrutural ao exoesqueleto do inseto. A principal função da Quitina é a proteção contra possíveis agressões ambientais. Por possuir um exoesqueleto rígido, os insetos necessitam realizar mudas periódicas de seu exoesqueleto¹⁷.

O DFB, na formulação pó molhável (25%) e na diluição de 1 mg.L⁻¹, tem eficácia de 100% de mortalidade das larvas do *Ae. aegypti* em todos os estádios de desenvolvimento¹⁸. Além do mecanismo de ação diferente do Temephos nas larvas, o DFB tem baixa toxicidade para mamíferos, é biodegradável e causa baixo impacto ambiental¹⁶.

O principal efeito da exposição dos seres vivos ao DFB é a formação de um pigmento sanguíneo denominado de metemoglobina, a qual tem a característica de não se ligar à molécula do oxigênio e causa a hipóxia nos órgãos em casos de exposição¹⁹.

Objetivou-se avaliar o efeito do DFB sobre larvas de duas populações de *Ae. aegypti* sendo elas de Vila Velha, ES (VVE) e Santarém, PA (STR) com distintos níveis de suscetibilidade ao Temephos, e investigar potenciais anormalidades morfológicas provocadas nos indivíduos.

MÉTODOS

Origem das larvas do *Ae. aegypti*

As larvas utilizadas foram oriundas de ovos depositados em cartelas de papel de filtros cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), do Ministério da Saúde - MS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Nos bioensaios, foram avaliadas duas populações de larvas no estágio L3 de *Aedes aegypti* com indicações de resistência ao Temephos, sendo elas de Vila Velha, ES (VVE) e Santarém, PA (STR), e a cepa Rockefeller que foi utilizada como referência, pois é considerada padrão mundial de susceptibilidade a inseticidas para a espécie *Ae. aegypti*²⁰.

Criação das larvas

A criação das larvas e os bioensaios foram realizados em sala climatizada (26±2°C). A eclosão das larvas foi estimulada em água de criação de larva e filtrada, em copos descartáveis de polietileno 50 mL. As larvas recém-eclodidas foram transferidas para bandejas de polietileno (33x24x8 cm), com 1 L de água desclorada e 1 g de ração para gatos triturada (Friskies®, Purina, Camaquã/RS). Após três dias nas bandejas, ou quando se encontravam no estágio L3, as larvas foram utilizadas nos bioensaios.

Bioensaios com inseticidas para larvas de *Ae. aegypti*

Os bioensaios com o Temephos foram realizados com a solução estoque de 3g.L⁻¹, preparada com etanol PA e Temephos em grau técnico (Pestanal®, 95,6%). A solução-estoque foi mantida entre 4 e 10 °C em refrigerador e utilizada por até 30 dias. A solução de uso foi preparada aos 15 minutos antes da realização dos bioensaios com a solução-estoque em etanol P.A.

Os bioensaios com o DFB foram realizados com a solução-estoque de 0,01 g.L⁻¹, preparados em acetona P.A. e DFB em grau técnico (Champion - 99,6%). A solução-estoque foi mantida em um freezer a -40°C até o uso. A solução de uso (3000 µg.L⁻¹) foi preparada aos 15 minutos antes da realização dos bioensaios com a solução-estoque em acetona P.A.

As razões de resistência ao Temephos das populações de campo VVE e STR foram determinadas em bioensaios de dose-resposta. As larvas foram expostas a concentrações crescentes do Temephos. A concentração letal 95% (CL95) do Temephos foi calculada com auxílio do programa estatístico Probit²¹.

A razão de resistência (RR95) foi determinada pela divisão do valor da CL95 do Temephos para as populações VVE e STR, pelo valor correspondente obtido para cepa de referência²²⁻²⁴. Para classificar as duas populações, foram usados critérios já estabelecidos¹⁹: resistência baixa (RR95 < 5); intermediária (5 > RR95 < 10) e alta (RR95 > 10).

Depois de realizados os bioensaios dose-resposta com Temephos, de acordo com as recomendações da OMS²² e seguindo os padrões estabelecidos previamente^{10,25}, grupos de 20 larvas de terceiro estágio foram separados e transferidos

para copos de polietileno com capacidade para 50 mL, sendo esses copos preenchidos até 20 mL com água desclorada. As larvas foram mantidas em repouso por 30 minutos e após esse período, as larvas mortas foram imediatamente substituídas.

Foram utilizadas concentrações diferentes para cada população. Para a cepa referência, foram utilizadas nove concentrações que variaram de 0,16 a 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para VVE, foram utilizadas nove concentrações entre 3,0 e 30,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para STR foram utilizadas dez concentrações entre 1,5 e 15,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Todos os bioensaios foram realizados com cinco réplicas para cada concentração, além do controle (água desclorada sem adição de larvicida).

Aproximadamente 15 minutos depois da montagem do bioensaio e da adição do inseticida nos copos, as larvas foram transferidas aos recipientes junto com os 20 mL de água, completando um volume final de 100 mL por réplica.

As larvas foram mantidas em contato com o produto por 24 horas, quando foi realizada a leitura, sendo computados os números de espécimes vivos e mortos. Os critérios utilizados para a determinação da mortalidade das larvas foram os propostos pela OMS²². Todos os bioensaios foram repetidos três vezes, em dias diferentes. Os resultados obtidos foram avaliados por meio de análise Probit²¹.

Nos bioensaios com o DFB, a razão de resistência foi determinada pela divisão do valor de porcentagem de inibição de emergência de adultos (%IE) para as populações VVE e STR, pelos valores correspondentes obtidos com a cepa referência²²⁻²⁴.

A eficácia do DFB no controle das larvas resistentes ao Temephos foi avaliada em bioensaios conduzidos de acordo com o protocolo estabelecido por Belinato et al(26). Foram testadas oito concentrações de DFB entre 0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, além da condição controle, apenas com o diluente do inseticida. Para cada concentração, foram utilizados cinco recipientes com capacidade para 250 mL, contendo 130 mL de água desclorada.

As larvas foram colocadas nos recipientes depois de 30 minutos da diluição do inseticida. Em cada recipiente foram colocadas 10 larvas (L3) previamente selecionadas, com bom estado aparente.

Os números de larvas vivas e mortas, de pupas e de adultos emergidos foram registrados diariamente durante o período experimental, que variou entre 10 e 12 dias. A emergência de adultos foi determinada por meio do registro do número de exúvias limpas nos recipientes^{27,28}. Os mosquitos presos às exúvias foram considerados mortos. O bioensaio foi encerrado quando não havia mais larvas e/ou pupas vivas nos recipientes do tratamento controle. Todos os bioensaios foram realizados em ambiente com temperatura controlada de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa entre 60 e 70%.

Análise de dados

Todos os bioensaios descritos foram repetidos três vezes. A dose efetiva do DFB para IE50 e IE90 foi calculada por análise

Probit²¹. Como, no Brasil, os valores de RR95 são utilizados para recomendação de aplicação de Temephos em campo, as razões de resistência (RR) de populações de campo de *Ae. aegypti* para o Temephos foram calculadas por meio dos valores de concentração letal que causaram a morte em 95% das larvas (CL95).

As razões de resistência foram obtidas pela divisão da CL das populações de campo pela CL equivalente da cepa Rockefeller.

RESULTADOS

Em todos os resultados obtidos com o inibidor de síntese de Quitina para as larvas de *Ae. aegypti*, constatou-se que a mortalidade além de ser dose-dependente também aumenta com o passar do tempo de exposição ao produto, devido a seu modo de ação.

A população VVE foi classificada como de baixa resistência ao Temephos e à STR, como de resistência intermediária, de acordo com as classes definidas por Mazzari e Georghiou²³. Os valores de RR95 calculados para o DFB foram de 1,07 para a VVE e 1,15 para a STR. Os valores de coeficiente angular ("slope") obtidos por meio da análise da curva de mortalidade apontam que as duas populações de campo avaliadas apresentam maior heterogeneidade quando comparadas à cepa Rockefeller (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração letal (CL) e razão de resistência (RR) para Temephos de larvas de duas populações de *Ae. aegypti*. Rockefeller foi utilizada como controle de susceptibilidade.

População	Geração	CL95 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)*	RR95	Slope
Rockefeller	4,0 (3,0 - 5,6)	1,0	2,94 \pm 0,22
Vila Velha (ES)	F2	30,0 (25,0 - 35,0)	7,5	0,33 \pm 0,032
Santarém (PA)	F2	15,5 (14,0 - 18,0)	3,9	0,57 \pm 0,06

(*) Valores entre parênteses representam os intervalos de confiança 95%.

Nos bioensaios com DFB, também foi possível verificar que a precocidade da mortalidade varia de acordo com a concentração. Em concentrações menores, a mortalidade geralmente ocorre mais tardiamente, nos estágios de pupa e adulto. Em concentrações maiores, a mortalidade atinge principalmente os estágios iniciais de larvas e pupas. A mortalidade no controle foi mínima, não tendo ultrapassado 1,25% em todos os bioensaios realizados.

Na tabela 2, estão apresentadas as doses efetivas e as razões de resistência. Os valores de RR obtidos com os bioensaios foram muito baixos, não ultrapassando 1,15. A população VVE apresentou RR95 igual a 1,07. Esta população apresentou RR intermediária ao Temephos, porém, mostrou-se susceptível ao DFB. A população STR apresentou resultados similares aos da VVE em relação à DFB.

A mortalidade das larvas das populações VVE e STR foram similares e diretamente proporcionais às concentrações de DFB. Verifica-se que o DFB foi efetivo no controle das populações

VVE e STR de *Ae. Aegypti* e de resistência intermediária e baixa ao Temephos, respectivamente. Além da mortalidade, o DFB causou anormalidades na aparência dos insetos nos estágios de larva, pupa e adulto (Tabela 3).

Tabela 2. Efeito do DFB sobre a inibição da emergência de adultos de duas populações brasileiras de *Ae. aegypti* e da cepa referência. IE e RR indicam, respectivamente, as doses efetivas para a inibição da emergência e as razões de resistência (usando a cepa Rockefeller como referência).

População	Geração	IE95	RR95	Slope
Rockefeller	2,88 (2,15 – 4,32)	1,00	4,10 ± 0,39
Vila Velha (ES)	F2	3,11 (2,56 – 4,24)	1,07	1,81 ± 0,28
Santarém (PA)	F2	3,30 (2,74 – 4,24)	1,15	2,84 ± 0,27

Tabela 3. Registro de anormalidades de larvas, pupas e adultos a partir das larvas das duas populações *Ae. aegypti* e da cepa referência Rockefeller expostas à distintas concentrações de DFB. As anormalidades encontradas foram similares para as duas populações ao Temephos e para a cepa referência.

Classes de Anormalidades	Concentrações de DFB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	2,0	2,5	3,5
Larva	-	-	+
Pré-pupa	+	+	+
Pupa albina	-	+	-
Adulto com emergência parcial	+	+	-
Adulto com tarsos deformados	+	+	-

Ausência de anormalidade (-) e presença de anormalidade (+).

DISCUSSÃO

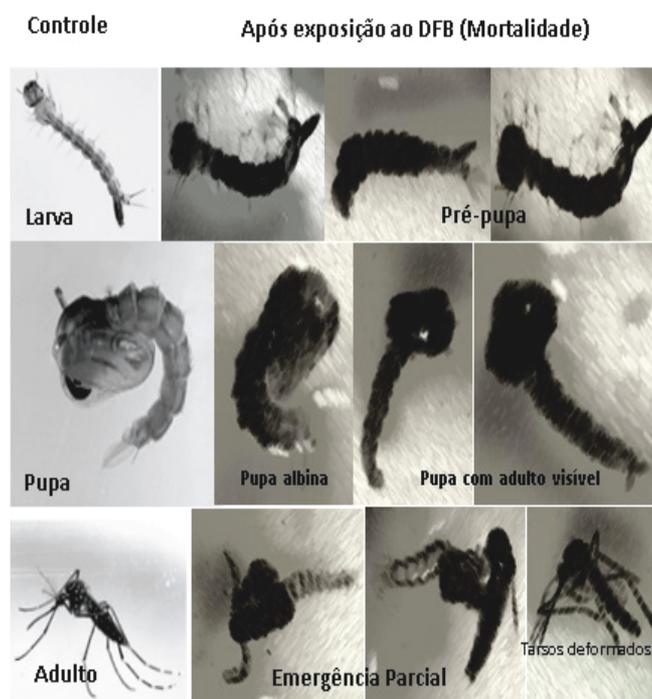
Os resultados encontrados no presente trabalho foram similares aos de outros estudos^{10,25}, com o larvicida Novaluron, do mesmo grupo químico e mecanismo de intoxicação do DFB.

As anormalidades registradas nas fases de desenvolvimento do vetor, classificadas de acordo com Braga et al²⁸⁻³⁰, foram as seguintes: 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 1).

A utilização de inseticidas químicos para o controle do *Ae. aegypti* no Brasil intensificou-se após a primeira epidemia em 1986. Devido à extensa utilização do organofosforado Temephos, relatos de resistência começaram a surgir. Por isso, é de extrema importância verificar o status de resistência das populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas utilizados.

Devido à ocorrência de resistência aos inseticidas convencionais, é necessário o desenvolvimento de novos compostos com mecanismos de ação diferentes. No caso de larvas do mosquito da dengue resistentes ao Temephos, o DFB pode ser utilizado como uma alternativa de controle.

Figura 1. Anormalidades morfológicas observadas em larvas, pupas e adultos de duas populações de *Ae. Aegypti* após exposição contínua desde o terceiro estágio larval ao Diflubenzuron. Identificação das anomalias de acordo com Talaat e Mulla, Braga et al^{29,31}. Os controles de cada estágio do mosquito foram retirados do trabalho de Fontoura et al³³.



Em estudos com diferentes concentrações de DFB, foi constatada eficácia no controle de larvas de *Ae. aegypti*, com redução de emergência entre 85 e 90%, a partir da concentração de 0,1 mg.L⁻¹²². No presente estudo, as concentrações efetivas do DFB para o controle de larvas do mosquito da dengue foram menores que as do Triflumuron no controle de larvas de *Ae. aegypti*, que também é um inibidor de Quitina³¹.

As duas populações de larvas testadas foram susceptíveis ao DFB, independente de seu status de resistência ao Temephos. Estudos detectaram que populações de campo resistentes a inseticidas neurotóxicos podem ser mais susceptíveis a IGRs do que populações de laboratório³².

Nos resultados do presente estudo, confirma-se que o DFB é efetivo para o controle de populações resistentes a organofosforados. Tais resultados reforçam o potencial desse CSI para o controle de populações de *Ae. aegypti*.

CONCLUSÃO

O DFB é efetivo para o controle de larvas das populações avaliadas de *Ae. aegypti* com resistência ao Temephos, em condições de laboratório. Este inibidor de síntese de Quitina, que pode ser considerado uma potencial alternativa para o controle de larvas com distintos níveis de resistência a outros inseticidas em áreas urbanas, também provoca anormalidades morfológicas nas larvas, pupas e adultos expostos.

REFERÊNCIAS

1. Brasil Ministério da Saúde. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue – Serie A. Normas e manuais técnicos. Ministério da saúde, secretaria de vigilância em saúde, departamento de vigilância epidemiológica – Brasília: Ministério da saúde, 2009.
2. Vargas HCN, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.* 2014 Mar; 62:54-60. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.001>. PubMed PMID: 24534672.
3. Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.
4. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad. Saúde Pública.* 2001; 17(Sup): 99-102.
5. Lima EP, Oliveira Filho MA, Lima JWO, Ramos Jr NA, Cavalcanti LPG, Pontes RJS. Resistência do *Aedes aegypti* ao temephos em Municípios do Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006 Maio-Jun; 39 (3): 259-263. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000300006>.
6. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB, et al Alteração da resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 1999; 33(5): 521-522. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101999000500013>.
7. Braga IA, Lima JBP, Silva SS, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004 Mar; 99(2): 199-203. PubMed PMID: 15250476.
8. Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito federal. *Rer. Saúde Pública* 2004 Out; 38(5): 623-629. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102004000500002>.
9. Anastácio DB. Estudo da distribuição espacial da resistência ao inseticida químico temephos em populações de *Aedes aegypti*, no município do Recife-PE [monografia]. Recife: Faculdade Frassinetti do Recife; 2003.
10. Lima JBP, Da Cunha MP, Da Silva, RC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(3): 329-333. PubMed PMID: 12685640.
11. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Braco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphate insecticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003 Jan-Jul; 98(5):703-708. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000500020>.
12. Hartl DL; Clark AG. Genética Quantitativa Evolutiva: Princípios de Genética de Populações. Porto Alegre: Artmed, 2010.
13. Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Suarez AF, Salas IF, Ranson H, Hemingway J, et al. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics.* 2008 Oct; 180:(2): 1137-1152. PMID: PMC 2567363.
14. Ware GWE, Whitacre DM. The Pesticide Book, 6.ed. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio, 2004.
15. Braga IA, Valle DV. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2007 Out-Dez; 16(4):279-293.
16. Fournet F, Sannier C, Monteny N. Effect of the insect growth regulators OMS 2017 and Diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1993 Dec; 9(4):426-430. PubMed PMID: 8126477.
17. Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: *Pest Manag. Sci.* 2001 Oct; 57(10): 946-950. PubMed PMID 11695188.
18. Martins F, Silva IG. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004 Mar; 37(2): 135-138. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000200004>.
19. Silva CB. Avaliação da exposição ao diflubenzuron em guardas de endemias da região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2013.
20. Kuno G. 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: 528 Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J. Med. Entomol.* 2010 Nov; 47 (6):957–971. PubMed PMID 21175042.
21. Raymond M. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur. *Cahiers Orstrom SérEnt Med Parasitol.* 1985; 22: 117-121.
22. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae insecticides. 1981;WHO/VBC/81.807:1-6.
23. Mazzari MB, Georghiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq Control Assoc* 1995 Sep; 11(3): 315-322. PubMed PMID: 8551300.
24. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. 2005; WHO/CDS/WHOPES/GCDPP:13.
25. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007 Sep; 77(3): 467-477. PubMed PMID 17827362.
26. Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Valle, D. Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. *Parasites & Vectors.* 2013 Apr 4; 6: 83. doi: 10.1186/1756-3305-6-83. PubMed PMID 23557173.
27. Mulla MS. Laboratory and field evaluation of insect growth regulators against mosquitoes. *Proc. Papers Calif. Mosq. Contr. Assoc.* 1974; 42: 175-176.
28. Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chompoonsri J, Zaim M, SU T. Laboratory and field evaluation of novaluron a new acylurea insect growth regulator against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* 2003 Dec; 28: 241-254. PubMed PMID 14714674.
29. Awad TI, Mulla MS. Morphogenetic and histopathological effects of the insect growth regulator cyromazine in larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1984 Jul 26; 21(4): 427-431. PubMed PMID 6492086.
30. Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JBP, Martins-Jr AJ, Medeiros PFV, et al. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 2005 Sep; 42(5): 830-837. PubMed PMID 16363168.
31. Batra CP, Mittal PK, Adak T, Ansari MA. Efficacy of IGR compound Starycide 480 SC (triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. *J. Vect. Borne Dis.* 2005 Sep; 42(3): 109-116. PubMed PMID: 16294809.
32. Fontoura NG, Bellinato D. F, Valle D, Lima JB. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 2012 May; 107(3):387-395. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000300014>

Como citar este artigo/How to cite this article:

Machado AA, Coleone AC, Abe FR, Américo JHP, Lima JBP, Machado JG, Neto. A eficácia do Diflubenzuron no controle de larvas de duas populações de *Aedes aegypti* com diferentes níveis de susceptibilidade ao Temephos, em condições de laboratório *J Health Biol Sci.* 2015 Jan-Mar; 3(1):25-29

J. Health Biol Sci. 2015; 3(1):25-29