
MECANISMOS DA AÇÃO LARVICIDA
DO DIFLUBENZURON SOBRE *Aedes aegypti*
EVIDENCIADOS PELAS ALTERAÇÕES
ULTRAESTRUTURAIS

Rosana Alves Borges,¹ Walquíria Arruda,¹ Ellen Synthia Fernandes de Oliveira,¹ Gláucia Maria Cavasin,¹ Heloisa Helena Garcia da Silva² e Ionizete Garcia da Silva²

RESUMO

O dengue é uma doença viral transmitida por *Aedes aegypti* em mais de 100 países na faixa intertropical do mundo e, até o momento, as principais formas de controle são as ações antivetoriais. Neste trabalho, são apresentadas as alterações ultraestruturais provocadas pelo diflubenzuron (DFB) nas larvas de *Ae. aegypti*. Os experimentos foram realizados com larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* com DFB nas concentrações de 0,1 e de 1 µg/mL. Após 24 horas de exposição, as larvas foram coletadas, fixadas, desidratadas, emblocadas, cortadas, contrastadas com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo e analisadas em microscópio eletrônico. As alterações ultraestruturais foram observadas na cutícula e no mesêntero dessas larvas. Por meio de microscopia de varredura, observou-se o aumento do número das cerdas, que se apresentaram mais delgadas e mais longas do que o controle e exibiram um padrão de enrolamento nos sulcos intersegmentares. As análises no microscópio eletrônico de transmissão revelaram que as epicutículas antigas se desprenderam quase que totalmente da nova epicutícula e não possuíam pontos de reforço comumente encontrados no controle. As células do mesêntero de larvas expostas ao DFB apresentaram um arcabouço esponjoso e nas secções ultrafinas se apresentaram danificadas e vacuolizadas, mas com a presença de vesículas de secreção e integridade mitocondrial. Este estudo mostrou que o DFB interfere no processo da ecdise e impede a liberação da cutícula velha que se acumula nos espaços intersegmentares estrangulando as porções segmentares num processo sucessivo e acumulativo, também bloqueia a muda e provoca a morte da larva. Este é o mecanismo de ação larvicida do DFB sobre *Ae. aegypti*, entretanto o produto age também no mesêntero destruindo as células.

DESCRITORES: *Aedes aegypti*. Diflubenzuron. Ultraestrutura. Mesêntero.

-
- 1 Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO.
 - 2 Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos/Bioatividade de Plantas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Endereço para correspondência: Ionizete Garcia da Silva. Rua Delenda Rezende de Melo, eq. com 1ª Avenida, Setor Universitário, CEP 74605-50, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: profionizete@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 30/3/2012. Revisto em: 22/5/2012. Aceito em: 27/5/2012.

ABSTRACT

Mechanisms of the larvicidal effect of diflubenzuron on *Aedes aegypti* larvae, as evidenced by ultrastructural changes

Dengue is a viral disease transmitted by *Aedes aegypti* in over 100 countries in the intertropical band in the world and the main forms of control are antivectorial actions. In this paper, ultrastructural changes caused by diflubenzuron (DFB) are presented. The experiments were performed with 3rd instar larvae of *Ae. aegypti* with DFB at concentrations of 0.1 and 1 µg/mL. After 24h of exposure, larvae were collected, fixed, dehydrated, embedded, cut, contrasted with uranyl acetate and 3% lead citrate and examined under the electron microscope. Ultrastructural alterations caused by the diflubenzuron inhibitory activity were observed in the cuticle and in the midgut of *Ae. aegypti* larvae treated with 0.1 and 1 µg/mL, for 24 hours. The alterations observed by scanning microscopy included higher number of bristles, which were thinner and longer than the controls and exhibited a coiling pattern in the intersegmental grooves. Transmission electron microscopy analysis revealed that the epicuticle almost came entirely off the new epicuticle and had no points of reinforcements commonly found in the control. The midgut cells of the larvae treated with diflubenzuron presented a spongy skeleton and in the ultrathin sections, the cells showed intense vacuolation and damage, however with secretion vesicles present and mitochondria preserved. These studies indicate that the diflubenzuron can also act in the midgut cells, being a promising product for use in *Ae. aegypti* control. This study showed that the DFB interferes with the process of ecdysis, prevents the release of the old cuticle that accumulates in the intersegmental spaces and strangle the segmental portions in a successive and cumulative process, blocked the changes, causing the death of the larva. It also acts destroying the midgut cells.

KEY WORDS: *Aedes aegypti*. Diflubenzuron. Ultrastructure. Midgut.

INTRODUÇÃO

O dengue é uma das mais importantes enfermidades do mundo e endêmica em todos os continentes na faixa intertropical do planeta, com exceção da Europa. No Brasil, o dengue ocorre em todas as unidades federadas e sua expansão se deve ao aumento da densidade do seu principal transmissor, o *Aedes aegypti*. As fases imaturas deste mosquito se desenvolvem em qualquer coleção de água. Assim, todo e qualquer recipiente gerado pelo descarte do lixo sólido serve de acúmulo de água, transformando-se em criadouro potencial, o que dificulta o controle (3, 8, 21, 25, 26, 31).

Até o momento, o único modo de se evitar a doença é por meio da eliminação do mosquito transmissor, seja pelo combate aos criadouros ou pela aplicação de inseticidas e larvicidas químicos (9, 12, 16, 24). Como este último método tem se tornado intensivo ao longo dos anos, surgiram populações resistentes e/ou com alta taxa de adaptabilidade, o que, conseqüentemente, tornou mais difícil o controle (11, 18, 19, 22, 31). Por esse motivo, novas estratégias de controle do *Ae. aegypti*, que sejam mais seguras e causem menos danos ao meio ambiente, têm sido amplamente pesquisadas como alternativas ao uso de inseticidas químicos. Dentre essas, encontra-se o diflubenzuron (DFB), que poderá constituir-se numa importante ferramenta, pois este produto é praticamente atóxico para mamíferos, biodegradável, não sistêmico e de baixo impacto ambiental (20, 30).

O DFB é um composto regulador do crescimento de insetos que inibe a síntese de quitina durante o desenvolvimento dos estágios imaturos e, conseqüentemente, interrompe o ciclo larval e reduz a emergência de adultos. Pertence a um grupo de inseticidas de nova geração denominados reguladores de crescimento ou IGR (*insect growth regulator*), com ação mais específica para insetos (1, 17). Estes compostos são utilizados desde a década de 1970 para controlar populações de insetos que constituem praga da agricultura (16) e vários estudos relatam a suscetibilidade e os efeitos inseticidas sobre vetores de importância para a saúde pública, como *Aedes* e *Culex* (4, 10, 12, 20, 27). No entanto, poucos estudos relatam as alterações morfológicas ocorridas nos insetos pela ação deste composto (4, 10), por isso a finalidade deste trabalho foi avaliar as alterações morfológicas, em nível ultraestrutural, provocadas pela atividade inibidora do DFB em larvas de *Ae. aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* foram obtidas da colônia permanente iniciada em 1991 (época em que este mosquito foi introduzido em Goiânia), mantida a $28\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80\pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h (23).

Inseticida

O DFB utilizado neste estudo foi produzido pela empresa *Champion Fardoquímica Ltda*, tendo por nome químico 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia e fórmula empírica $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}_2$. Para os bioensaios foram preparadas soluções de DFB dissolvido em água destilada nas concentrações de 0,1 e $1\mu\text{g}/\text{mL}$.

Bioensaios

Os experimentos foram realizados com 20 recipientes de poliestireno para cada concentração, com quatro réplicas. Em cada recipiente colocou-se uma larva, imediatamente após a ecdise para o terceiro estágio, contendo 30 mL da solução de DFB. As larvas foram alimentadas como na criação (23). O tempo de exposição ao DFB foi de 24 horas. No grupo controle, as larvas foram colocadas em frascos contendo apenas água destilada, com o mesmo tipo e número de recipientes.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MET)

As larvas expostas e os controles foram fixados *overnight* em paraformaldeído -2%, glutaraldeído - 2% e sacarose - 3% em tampão cacodilato de

sódio 0,1M pH 7,2. Posteriormente, as larvas foram fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série gradual de acetona (30% - 100%), secas no ponto crítico, cobertas com uma película de ouro e analisadas no microscópio de varredura Jeol JSM 840 SEM, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro-SP.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As larvas foram dissecadas utilizando-se estereomicroscópio imediatamente após serem retiradas das soluções de tratamento e tiveram sua cutícula e tubos digestórios retirados e fixados *overnight* em paraformaldeído - 2%, glutaraldeído - 2% e sacarose - 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2. Em seguida, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 1%, contrastadas em bloco com acetato de uranila aquoso 0,5%, desidratadas em série crescente de acetona (30% - 100%), infiltradas e incluídas em resina *Epon-Araldite*. Os blocos preparados foram seccionados em ultramicrotomo e as secções ultrafinas, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas no microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro-SP.

RESULTADOS

O diflubenzuron (DFB) interferiu no processo da ecdise das larvas, impedindo a liberação da cutícula velha que se acumulava nos espaços intersegmentares, causando constrições e estrangulamentos das partes segmentares. Além disso, essas larvas, diferentemente do grupo controle (Figura 1A), apresentaram rompimento da cápsula cefálica (Figura 1B) com áreas de aderência.

As análises por MEV de larvas do grupo controle e das expostas a 0,1 e 1µg/mL de DFB forneceram uma visão geral das mudanças ocorridas na cutícula e estruturas externas da larva. Aquelas submetidas ao tratamento com DFB apresentaram um aumento do número das cerdas (Figura 1D). Essas cerdas se mostraram mais delgadas e mais longas do que as observadas no grupo controle (Figura 1C) e exibiram um aspecto muito característico, o de se enrolarem nos sulcos intersegmentares provocando constrição em cada região e contribuindo para o bloqueio do processo da ecdise (Figura 1D).

Larvas expostas ao DFB a 0,1µg/mL e que entraram em processo de ecdise, mas não efetuaram a muda, produziram diversas cutículas. A sobreposição dessas cutículas, associada ao aumento do número, tamanho e enrolamento das cerdas, atribuiu às larvas um aspecto “mumificado”, esbranquiçado e anormal quando observadas no estereomicroscópio (Figuras 1 B e D), o que não foi observado no grupo controle.

Secções ultrafinas de larvas do grupo controle mostraram a presença de uma cutícula madura bastante espessa, exibindo pontos de reforço que

unem a cutícula ao esqueleto celular (Figura 2A). Durante o processo de muda, evidenciou-se a formação do espaço exuvial para síntese da nova epicutícula (Figura 2B). Nessa fase, as células epidérmicas sofreram mitose, aumentando em número, e teve início a liberação do fluido de muda ainda inativo.

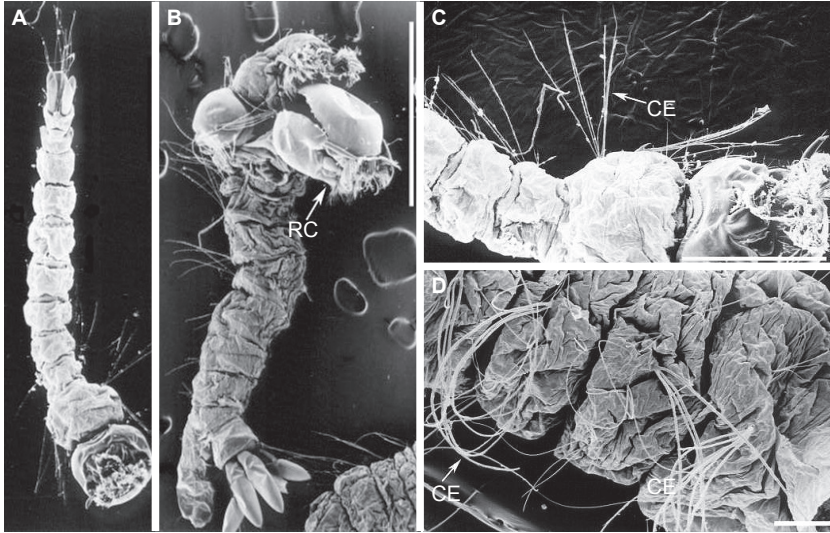


Figura 1. Eletromicrografias de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle (A e C) e expostas a diflubenzuron na concentração de 1 µg/mL (B e D). Notar em B o rompimento da região cefálica (rc) evidenciando um processo anormal de muda e em D que as cerdas (ce) tornam-se mais numerosas, delgadas e longas, enrolando-se nos sulcos intersegmentares. A e B: Bar=1mm. C: Bar=0,05mm. D: Bar=0,1mm.

Vários aspectos ultraestruturais foram observados na cutícula de larvas expostas ao DFB a 0,1 e 1 µg/mL. A Figura 2C mostra a larva preparando-se para entrar em processo de muda, apresentando o espaço subcuticular bem definido, com início da formação do espaço exuvial, mas sem a nova epicutícula. A Figura 2D, mostra pontos de reforço onde a nova epicutícula irá se formar e, finalmente, as Figuras 2E e 2F, mostram o final do processo de muda com presença da epicutícula e da exocutícula velhas, separadas por um espaço exuvial, e a presença de uma nova procutícula indiferenciada e ainda pouco esclerotizada. Esses eventos foram observados em dosagens de 0,1 e 1 µg/mL. Morfologia diferenciada da cutícula foi observada apenas em larvas expostas a 0,1 µg/mL de DFB (Figura 2G); neste caso, ocorreu a formação de uma nova epicutícula bem próxima à cutícula velha e a célula epidermal apresentou um aspecto alterado, vacuolizado e estruturas semelhantes a flocos.

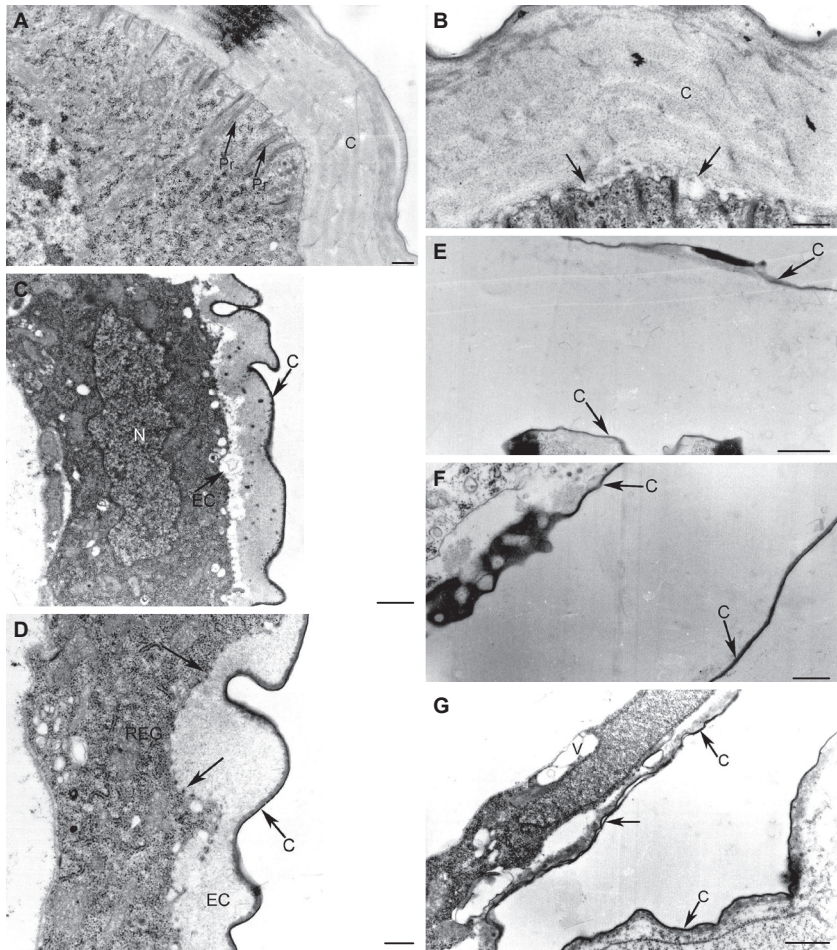


Figura 2. Eletromicrografias da cutícula de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle (A e B), expostas a diflubenzuron a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (C, D e E) e a 1 $\mu\text{g/mL}$ (F e G). Notar em A os detalhes da cutícula madura evidenciando os pontos de reforço (Pr) que unem a cutícula (C) ao citoesqueleto e em B, o início do processo de apólise com formação do espaço exuvial (setas). Em D notar a presença de pontos de reforço entre o espaço subcuticular (EC) e a célula. Em E e F observar a presença de duas cutículas ao final do processo de muda. Em G, observar as duas faces diferentes da epicutícula, mostrando células vacuolizadas e mais de uma cutícula em uma mesma face (seta). (REG) retículo endoplasmático granular. (N) núcleo. (V) vacúolo. A, D e F: Bar=0,5 μm . B: Bar=0,3 μm . C, E e G: Bar=1 μm .

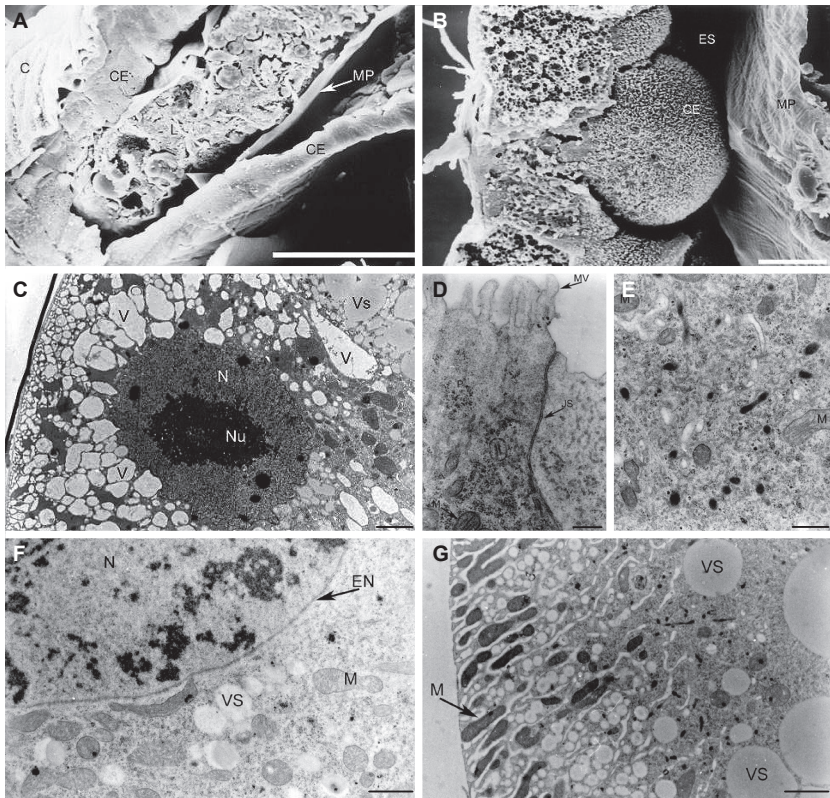


Figura 3. Ultraestrutura do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle (A, D e G) e expostas ao diflubenzuron (B e C). A e B: Microscopia eletrônica de varredura evidenciando o tubo digestório (A) e detalhe da célula do tubo digestório da larva exposta à solução de 1 µg/mL de diflubenzuron. C-G: Microscopia eletrônica de transmissão. Observar em C a vacuolização do citoplasma das células epiteliais do mesêntero após exposição a diflubenzuron a 0,1 µg/mL. Em D-G observar as características das células de larvas controle. D: região apical; E: região citoplasmática; F: região nuclear e G: região basal (M) mitocôndrias. (C) cutícula. (CE) células epiteliais. (MP) matriz peritrófica. (L) lúmem. (ES) espaço subperitrófico. (N) núcleo. (Nu) nucléolo. (VS) Vesícula de secreção. (V) vacúolo. (MV) microvilosidades. (JS) junções septadas. (P) polirribossomos. (EN) envelope nuclear. (VS) Vesículas de secreção. A: Bar=0,05mm. B: Bar=10 µm. C: Bar=2µm. D: Bar=0,3µm. E: Bar=0,5µm. F: Bar=1µm. G: Bar=2µm.

Além das alterações esperadas na cutícula das larvas expostas, observaram-se alterações na morfologia das células do mesêntero. Os resultados da análise do grupo controle, no microscópio eletrônico de varredura, revelaram o aspecto normal do mesêntero, com a preservação das células da parede do tubo digestório e da matriz peritrófica (Figura 3A). Ao contrário, nas larvas expostas ao DFB, tanto na concentração de 0,1 µg/mL quanto na de 1µg/mL, as células do mesêntero exibiram um aspecto vacuolizado e esponjoso (Figura 3B). No entanto, a matriz peritrófica permaneceu envolvendo todo o conteúdo do tubo digestório e sua espessura era similar à do grupo controle (Figuras 3A e 3B).

Nas secções ultrafinas do tubo digestório de larvas expostas ao DFB, as células do mesêntero apresentaram-se, de forma geral, muito danificadas e vacuolizadas, mas com a presença de vesículas de secreção e integridade mitocondrial (Figura 3C). Assim, diferenciavam-se do aspecto observado em larvas do grupo controle, nas quais as células do mesêntero apresentaram microvilosidades apicais, junções septadas entre células adjacentes, retículo endoplasmático granular desenvolvido e mitocôndrias, presença de labirinto da membrana plasmática basal e de vesículas de secreção (Figuras 3D, 3E, 3F e 3G).

DISCUSSÃO

A eficácia de alguns inibidores de crescimento, dentre eles o DFB, tem sido demonstrada ao logo dos anos (5, 13, 20, 27). Por interferirem na síntese de quitina, não causam uma direta intoxicação da larva. A mortalidade ocorre pela impossibilidade de se completar a ecdise e, quando isso acontece, também ocorre a diminuição de emergência de adultos e a redução da fecundidade e fertilidade em mosquitos (20). O aspecto negativo seria a sua ação em mudas de outros insetos que compartilham criadouros naturais. Com relação ao *Ae. aegypti*, esse aspecto é irrelevante, pois esse mosquito apresenta hábitos urbanos, desenvolvendo-se preferencialmente em criadouros artificiais, oriundos de embalagens e artefatos descartáveis e raramente compartilham esses criadouros com outros insetos. Com relação à água de consumo humano, proveniente de poços freáticos e armazenadas em caixas d'água e similares, o uso não oferece perigo, pois o DFB atua basicamente na síntese de quitina, durante o processo de muda e essa é uma substância restrita aos artrópodes. O inseticida testado em uma espécie de peixe, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), foi considerado de baixa toxicidade (30).

Poucos estudos relatam os efeitos morfológicos do DFB e outros inibidores de crescimento em larvas de culicíneos (4, 5, 10, 14). Estudos histológicos mostraram que um inibidor de crescimento atrasa a ecdise e reduz drasticamente a espessura da cutícula da larva e da pupa (5). Diferentemente, os efeitos histológicos relatados pelo DFB em larvas de *Ae. aegypti* (4) incluíram o

espessamento da cutícula e a vacuolização das células do mesêntero, revelando que o DFB atinge não só o processo de muda, mas também o tubo digestório, fato relatado pela primeira vez.

Os resultados dos efeitos do DFB, observados em estereomicroscópio e microscopia de varredura, incluíram o aumento do número das cerdas que se apresentaram mais delgadas e mais longas do que as larvas do grupo controle, exibindo um padrão de enrolamento nos sulcos intersegmentares, o que provocou maior constrição em cada região intersegmental. As epicutículas formadas não foram liberadas, acumulando-se nos espaços intersegmentares, fixadas internamente por reforços e externamente por longas e finas cerdas. Estas, além de impedirem a liberação da velha cutícula, estrangulam certas porções segmentares num processo sucessivo e acumulativo, bloqueando o processo da ecdise, e conseqüentemente, causando a morte da larva.

Chapman (6, 15) relata que, no processo de muda, as células normalmente desenvolvem processos lamelares de reforço formados por pontes proteicas que se fixam à cutícula velha e começam a formar as dobras ecdisiais de maneira que a superfície interna fique muito maior do que a externa. Em nossos experimentos, esse mesmo processo foi observado na cutícula de larvas do grupo controle, entretanto as larvas expostas ao DFB apresentaram um processo de muda diferente do descrito por Chapman (6). As análises feitas por meio de microscópio eletrônico revelaram que as epicutículas se desprendem quase que totalmente da nova epicutícula (ou endocutícula) e não possuem pontos de reforço normais. Esses pontos de reforço, que deveriam estar no ápice das microvilosidades, deslocam-se como pontos eletrodensos (provavelmente grânulos de cuticulina) distribuídos quase que aleatoriamente, mas não no ápice dessas microvilosidades onde se fixariam a epicutícula velha e a nova.

Assim como observado com o inibidor de crescimento methoprene (10), a exposição das larvas de *Ae. aegypti* ao DFB provocou alterações semelhantes na cutícula, como a separação incompleta da exocutícula para a nova camada de cuticulina e procuticulina, a deficiência de formação da endocutícula, que mostrou textura fina e homogênea sem pontos de reforço, e a presença de células epidermais com estruturas vesiculares.

A ultraestrutura das células do mesêntero de larvas de *Ae. aegypti* do grupo controle foram idênticas às observações encontradas na literatura sobre este assunto (2, 7, 10, 15, 28, 29). Foram encontradas células com microvilosidades apicais, junções septadas, grande quantidade de retículo endoplasmático granular, grande número de mitocôndrias e a presença de um labirinto membranoso na base sugerindo trocas iônicas. Diferentemente, células do mesêntero de larvas expostas ao DFB apresentaram um arcabouço esponjoso, como se apenas estruturas do citoesqueleto tivessem sido mantidas, enquanto todo o conteúdo celular foi gradativamente vacuolizado, ficando nítida a atuação desses larvicidas sobre as células do tubo digestório.

Os estudos encontrados na literatura relatam as alterações em nível ultraestrutural provocadas nas células do mesêntero por inibidores de crescimento (4, 5, 10). Nesses estudos, as larvas de *Ae. aegypti* submetidas à ação do methoprene apresentaram destruição de mitocôndrias até mesmo com perda de cristas. Essa mesma característica também foi observada em larvicidas naturais, como o tanino catéuico extraído da planta *Magonia pubescens* e o diterpeno labdano isolado de *Copaifera reticulata* (2, 28, 29). No entanto, esses resultados não foram observados neste trabalho, pois as mitocôndrias se apresentaram íntegras após o tratamento com o DFB, indicando que diferentes larvicidas causam diferentes danos em nível celular no epitélio do tubo digestório.

Para o uso do DFB, ressalta-se a necessidade de treinamento dos agentes de endemias e de conscientização da comunidade, uma vez que o produto não é um veneno e a morte da larva pela inibição da ecdise não é imediata, portanto sua ação necessita de um período aproximado de uma semana, bem diferente daquilo que ocorre com a intoxicação pelos inseticidas químicos sintéticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à professora Dra. Carminda da Cruz Landim, pelo grande auxílio e abertura do laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP/Rio Claro, e a Fundação de Apoio a Pesquisa (FUNAPE) pelo auxílio prestado através do processo nº 272.

REFERÊNCIAS

1. Ali A, Nayar JK, Xui RD. Comparative toxicity of selected larvicides and insect growth regulators to a Florida laboratory population of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 72-76, 1995.
2. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Estudo ultra-estrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (st. Hil.) no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Patol Trop* 37: 191-208, 2008.
3. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud av* 22: 53-71, 2008.
4. Borges RA, Cavin GM, Silva IG, Arruda W, Oliveira ESF, Silva HHG, Martins F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Patol Trop* 33: 91-105, 2004.
5. Bridges AC, Cocks J, Olson JR, Mayer RT. Morphological effects of insect growth regulating compounds on *Aedes aegypti* (Diptera – Culicidae). *Mosq News* 37: 227-233, 1977.
6. Chapman RF. *The Insects - Structure and Function*. American Elsevier Publishing Company Inc., 1998. p. 770.
7. Charles JF. Ultrastructural midgut events in culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spoke/crystal complex. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 138: 471-484, 1987.
8. Chaturvedi UC, Shrivastava R, Nagar R. Dengue vaccines: Problems & Prospects. *Indian J Med Res* 121: 639-652, 2005.
9. Chen CD, Seleena B, Chiang YF, Lee HL. Field evaluation of the bioefficacy of diflubenzuron (Dimilin®) against container-breeding *Aedes* sp. mosquitoes. *Trop Biomed* 25: 80-86, 2008.
10. Cocks J, Bridges AC, Mayer RT, Olson JK. Morphological effects of insect growth regulating compounds on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Life Sci* 24: 817-832, 1979.
11. Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444, 2005.

12. Dorta DM, Chiong RT, Ortega AN, Garcia FA, Quiñones FAG. Estudio de la sensibilidad al Dimilin (Diflubenzuron) en una cepa de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 y de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 criadas en el Laboratorio. *Rev Cubana Med Trop* 41: 56-63, 1989.
13. Fournet F, Sannier C, Monteny N. Effects of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). *J Am Mosq Control Assoc* 13: 40-42, 1997.
14. Kelada NL, Gaaboub FA, Kawash J. The effect in reproduction and morphometries of females of *Culex pipiens* L. of treatment with six insect growth regulators. *J Agric Sci* 96: 611-618, 1981.
15. Kerhut GA, Gilbert LI. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, 1985. Integument. p. 415-450.
16. Kunz SE, Harris RL, Hogan BF, Wright JE. Inhibition of Development in a Population of Horn Flies Treated with Diflubenzuron. *J Econ Entomol* 70: 298-301, 1977.
17. Lyra JRM, Ferraz JMG, Silva APP. Acción de inhibidores de la síntesis de la quitina en la reproducción de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepdoptera: Noctuidae). *An Soc Entomol Bras* 27: 569-576, 1998.
18. Marcoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708, 2003.
19. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Caldas Júnior AL, William G, Brogdon WG. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 895-900, 2007.
20. 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* 37: 135-138, 2004.
21. MS/SVS - Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências – 2011. Disponível em: <http://www.xpromocoes.com/diadia/informe-epidemiol%C3%B3gico-dengue-junho2011>. Acessado em: 23.03.2012.
22. Rawlins SC, Wan JOH. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 59-65, 1995.
23. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 53-63, 1998.
24. Silva JJ, Mendes J. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 612-616, 2007.
25. Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, Sun W, Putnak JR, Eckels KH, Hutagalung Y, Gibbons RV, Zhang C, De La Barrera R, Jarman RG, Chawachalasai W, Mammen MP Jr. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naive children. *Am J Trop Med Hyg* 78: 426-433, 2008.
26. Stephenson JR. The problem with dengue. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 99: 643-646, 2005.
27. Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Asavadachanukorn P, Zaim M, Mulla MS. Simulated field evaluation of the efficacy of two formulations of diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in water-storage containers. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 269-275, 2007.
28. Valotto CFB, Cavasin G, Silva HHG, Geris R, Silva IG. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causada pelo tanino catéiquico isolado da planta do Cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev Patol Trop* 39: 309-321, 2010.
29. Valotto CFB, Silva HHG, Cavasin G, Geris R, Rodrigues-Filho E, Silva IG. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e a uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 194-200, 2011.
30. Winkler EU, Medeiros LS, Souza JP, Duó DA, Machado Neto JG. Efeitos toxicológicos do diflubenzuron e teflubenzuron para duas espécies de peixes. In: X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2008, Bento Gonçalves. Anais do X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2008.
31. WHO - World Health Organization. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. 2009. Páginas:1-147. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/em/LinkFiles/DengueGuideline>. [acessado 22.03.2012].