

**MORTALIDADE E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS  
PROVOCADAS PELA AÇÃO INIBIDORA DO  
DIFLUBENZURON NA ECDISE DE LARVAS DE  
*Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE)**

Rosana Alves Borges,<sup>1</sup> Gláucia Maria Cavasin,<sup>1</sup> Ionizete Garcia da Silva,<sup>2</sup>  
Walquíria Arruda,<sup>1</sup> Ellen Synthia Fernandes de Oliveira,<sup>1</sup> Heloísa Helena  
Garcia da Silva<sup>2</sup> e Flávia Martins<sup>2</sup>

RESUMO

A mortalidade e as alterações morfológicas ocorridas em larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* foram estudadas sob o efeito do inibidor da ecdise, o diflubenzuron, nas concentrações de 0,1 e 1 ppm, com a finalidade de mostrar os seus mecanismos letais. As principais alterações com o uso da microscopia de luz incluíram a presença de vacúolos citoplasmáticos e grande quantidade de secreção na superfície apical das células do mesêntero, além do espessamento da cutícula e intensa atividade celular. Observaram-se alterações no corpo gorduroso da larva, além da presença de várias cutículas. Embora estas se soltassem, às vezes, da região cefálica, a muda não era finalizada, levando a larva à morte. Vários aspectos da ecdise foram evidenciados, dentre eles, o início da muda com espaço subcuticular bem definido e a presença da epicutícula e exocutícula velhas separadas por um espaço exuvial. O diflubenzuron inibiu a reabsorção da exocutícula e a formação da nova cutícula. As larvas morreram presas a essas camadas, em períodos de  $6,8 \pm 0,59$  e de  $6,5 \pm 0,99$  dias, respectivamente, às soluções de 0,1 e 1 ppm. Em condições de campo, apenas a dose de 1 ppm causou 100% de mortalidade, sendo que a morte não ocorre rapidamente como na intoxicação direta com inseticidas neurotóxicos.

DESCRITORES: *Aedes aegypti*. Diflubenzuron. Inibidor de crescimento. Controle.

INTRODUÇÃO

Uma nova geração de inseticidas é formada por reguladores de crescimento de inseto (IGR = Insect Grow Regulator). Os IGRs surgiram na década de 1970

1. Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.
2. Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

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

Recebido para publicação em 4/11/2003. Revisto em 6/4/2004. Aceito em 4/5/2004.

como um novo grupo de inseticidas de ação mais específica (1, 23, 27, 28, 32, 33, 41) e menor toxicidade para mamíferos e outros animais. Ao passo que outros inseticidas provocam intoxicação direta, esse grupo causa modificações fisiológicas e morfológicas interrompendo o ciclo larval, pela inibição da síntese de quitina durante o estágio imaturo do inseto (5, 6, 18, 32, 44).

O diflubenzuron tem sido comercializado em muitos países com o nome comercial de dimilin (12, 16, 21, 26, 32, 44), um inseticida usado na agricultura desde a década de 1990, contra formas imaturas de borboletas (26) e gafanhotos (2, 5). O inseticida pode ser usado também contra os insetos de interesse na área da saúde, como o *Aedes aegypti*, conforme atestam vários estudos (1, 9, 10, 12, 13, 14). *A. aegypti* é um mosquito urbano com antropofilia acentuada. A sua oviposição é feita na superfície interna do recipiente, imediatamente acima da superfície da água dos criadouros. Quando o volume de água aumenta, segue-se uma fase aquática com quatro estádios larvais e um estágio de pupa. Posteriormente, o mosquito atinge a fase adulta, fase de importância epidemiológica para os quatro sorotipos de dengue e para a febre amarela.

A reemergência das infecções causadas pelos vírus da dengue nas Américas (17, 37, 39), sob as várias formas clínicas de epidemias, coloca essa virose como um dos mais graves problemas de saúde pública (20, 30, 31, 34, 42, 45, 46). Cerca de 3,5 bilhões de pessoas no mundo estão atualmente expostas ao risco de se infectarem vivendo em áreas afetadas pela presença do *A. aegypti*, principalmente em países tropicais, onde a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do vetor (30, 31). Esse problema constitui um grande desafio para os serviços de saúde, pois não existe até o momento uma vacina eficaz para o uso preventivo contra a dengue (7, 47).

No Brasil o *A. aegypti*, erradicado várias vezes através das intensas campanhas de combate à febre amarela urbana (33, 34, 37), foi reintroduzido em 1976, aos poucos reinfestando todo o território brasileiro. Atualmente, esse mosquito encontra-se em todas as unidades federadas do Brasil infestando cerca de quatro mil municípios (31), o que torna crítico o controle da dengue.

Em Goiás, foi registrado, nos últimos dois anos, o maior número de casos de dengue desde 1994, quando se iniciou a transmissão nesse estado. Atualmente, 240 municípios estão infestados com a presença do *A. aegypti*; dentre eles 109 apresentam transmissão contínua da doença. No ano de 2001 foram notificados 6.263 casos de dengue em todo o estado, enquanto somente no primeiro semestre de 2002 foram notificados 25.344 casos (Superintendência de Ações Básicas de Saúde, 2002, dados não publicados).

O único meio disponível na prevenção da dengue é o combate ao *A. aegypti*, que se limita à eliminação dos seus criadouros e ao controle químico. Este último tem se tornado intensivo, induzindo o desenvolvimento de populações resistentes aos inseticidas utilizados (25, 42). É o caso do uso intensivo do temephos

para o controle larvário do *A. aegypti* no Brasil, uma situação que tem preocupado as ações antivetoriais. Em 12 das 27 unidades federadas, já se confirmou a resistência do *A. aegypti* ao temephos (30, 31), o que torna ineficazes os métodos de controle utilizados atualmente. Surge assim a necessidade de pesquisas de produtos novos e menos nocivos ao meio ambiente, como alternativa estratégica de controle vetorial. O diflubenzuron, por exemplo, poderá constituir uma importante alternativa.

Este trabalho teve a finalidade de avaliar a atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *A. aegypti*, através das alterações morfológicas que interrompem o processo, levando a larva à morte. O produto tem a vantagem de ser biodegradável, atóxico, não sistêmico e de baixo impacto ambiental.

## MATERIAL E MÉTODOS

A criação do *A. aegypti* se deu pela metodologia já estabelecida e em câmara biológica climatizada a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , com umidade de  $80 \pm 5\%$  e fotofase aproximada de doze horas (43).

O diflubenzuron utilizado neste estudo foi produzido pela empresa Champion Farmoquímico Ltda., tendo por nome químico 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-diflurobenzoil) uréia. A fórmula empírica utilizada foi  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ , nas concentrações 0,1 ppm ( $\text{CL}_{90}$ ) e 1 ppm ( $\text{CL}_{99}$ ). Usaram-se vinte larvas de terceiro estágio para cada concentração, repetição e controle.

As larvas foram fixadas em paraformaldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e pH 7,2 à temperatura ambiente, por um período de duas horas. Outra alternativa foi manter o paraformaldeído em período *overnight* a  $4^\circ\text{C}$ , em solução tampão nessa temperatura, por no mínimo 24 horas.

Após esse procedimento, o material foi lavado no mesmo tampão e submetido à desidratação em uma concentração crescente de etanol (de 50, 70, 80, 90 e 95%) por dez minutos cada concentração. O material desidratado foi embebido e incluído em historesina (Leica Historesin Embedding Kit) e deixado à temperatura ambiente por doze horas para a completa polimerização.

Os blocos de resina foram seccionados com navalha de vidro em micrótomos com espessura de 3mm. As secções foram distendidas em banho-maria à temperatura ambiente, colocadas sobre lâminas, secas à temperatura ambiente e coradas pela hematoxilina e eosina, pelo xylidine ponceau e pelo azul de bromofenol (8, 10, 15, 19, 22, 24, 29, 36, 38).

## RESULTADOS

O diflubenzuron é um larvicida que age na ecdise, durante a passagem de um estágio a outro. Mostrou eficácia de 100% na mortalidade das larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Período médio (em dias) de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* à ação inibidora do diflubenzuron na ecdise, com mortalidade de 100%, em laboratório

Concentrações (ppm)	1° teste	2° teste	3° teste	4° teste	média
0,1	5,9 ± 0,77 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,61 <sup>a</sup>	7,9 ± 1,92 <sup>b</sup>	8,0 ± 0,82 <sup>b</sup>	6,8 ± 0,59
1,0	6,0 ± 0,88 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,69 <sup>a</sup>	7,4 ± 1,49 <sup>b</sup>	7,0 ± 0,50 <sup>c</sup>	6,5 ± 0,99

Obs: As médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa entre si, pela análise de variância e pelo teste de Tukey a 5%.

As leituras de sobrevivência das larvas do *A. aegypti* foram feitas em intervalos de 24 horas após o início dos experimentos até elas atingirem o índice de 100% de mortalidade. Esta ocorria pela interferência do diflubenzuron na síntese e/ou reabsorção da quitina, no momento da muda; ou seja, esse produto não causa intoxicação direta nas larvas, como ocorre com os inseticidas neurotóxicos dos grupos clorados, fosforados, carbamatos e piretróides.

Com as concentrações 0,1 a 1 ppm, larvas de *A. aegypti* foram tratadas e, posteriormente, examinadas individualmente sob o estereomicroscópio. Ao se tornarem letárgicas, mostrando-se inertes mesmo quando tocadas com estilete, as larvas eram retiradas e fixadas.

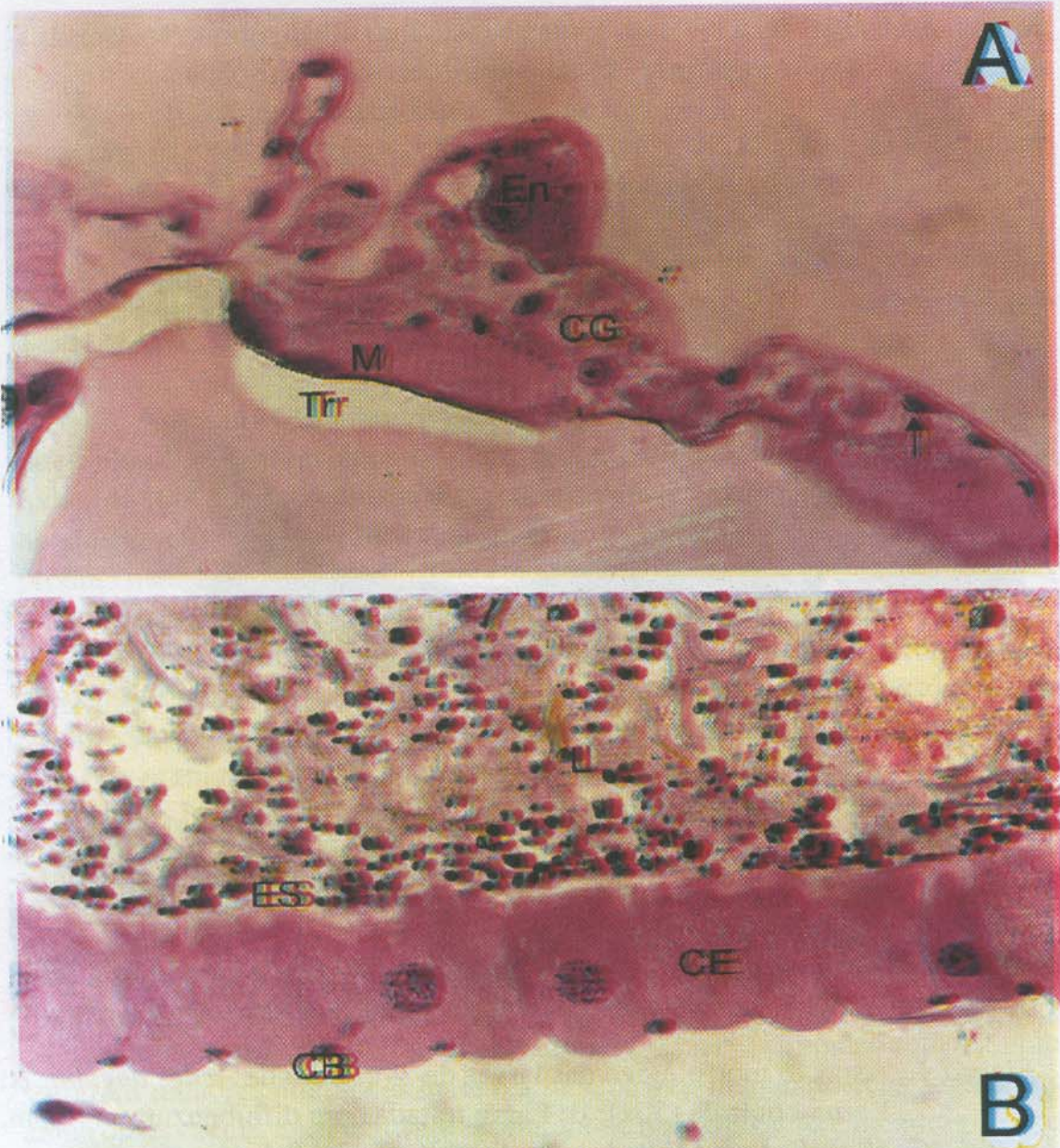
As larvas-controle de *A. aegypti* apresentaram um aspecto alongado e vermiforme, com sifão respiratório curto e tubular e com grande número de cerdas bem definidas na superfície do corpo, mostrando a morfologia robusta bem delimitada (Figura 1A). As larvas tratadas com 1 ppm de diflubenzuron evidenciaram uma morfologia alterada, superfície corporal destruída, aspecto franzino e baixo desenvolvimento, além do porte menor, aspectos mais escuros e segmentos corporais indefinidos (Figura 1B). As larvas tratadas com 0,1 ppm sofreram menores alterações quanto à morfologia, mantendo seus segmentos ainda observáveis, entretanto apresentaram-se mais delgadas e menores do que as do grupo-controle (Figura 1C). As larvas tratadas apresentaram também uma coloração esbranquiçada no tubo digestivo, o que lhes conferia um aspecto mais claro, quase que completamente branco.

Após seis horas do início do tratamento com o inibidor de crescimento, a maioria das larvas apresentava movimentos lentos que se intensificavam com o aumento do período de contato. A distinção foi feita sob estereomicroscópio e com o estímulo de um estilete, sendo apenas as larvas letárgicas fixadas e analisadas histologicamente. As mortas não foram utilizadas para análise, para evitar a interferência de alterações celulares pós-morte nos resultados de análise celular.



*Figura 1.* Aspecto morfológico das larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. A: Larva-controle (50x); B: Larva tratada com diflubenzuron (1 ppm, 50x); C: Larva tratada com diflubenzuron (0,1 ppm, 50x)

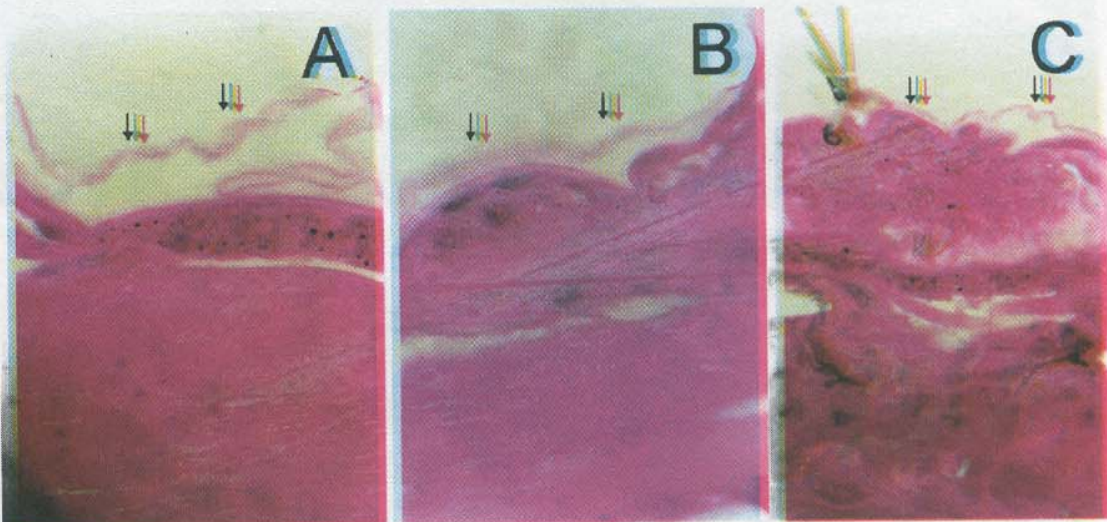
Os cortes histológicos do grupo-controle demonstraram aspectos celulares normais. Nesses cortes, a cutícula apresentou núcleos achatados na periferia, com a presença de células do corpo gorduroso arranjadas em cordões logo abaixo do tegumento e associadas aos enócitos (Figura 2A). Essas células, de origem ectodérmica, são grandes, ovóides e podem ser encontradas ao longo de todo o corpo da larva. Seu citoplasma é acidófilo, homogêneo e tem contorno nuclear bem nítido. Esse tipo celular secreta cutilina, cuja função é proteger as camadas recém-formadas da procutícula. São células características dos insetos, aparecendo frequentemente em íntima associação com as células do corpo gorduroso.



**Figura 2.** Fotomicrografias do tubo digestivo de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. A: Cutícula da larva controle (C) com núcleos periféricos (seta) achatados e logo abaixo a presença de células do corpo gorduroso e enócitos. Tr = Traquéia, EN = enócitos, M = Musculatura. 400x. B: Região mediana do mesêntero. Células epiteliais (CE) colunares com núcleo basal, nucléolo e bordo em escova (microvilosidades apicais). Espaço subperitrófico (ES) entre o ápice celular e a membrana peritrófica, revestindo o alimento. Núcleo das células basais indiferenciadas (CB). 500x.

A Figura 2B evidencia a região mediana do mesêntero das larvas de terceiro estágio do grupo-controle. Nessa região, as células epiteliais apresentaram-se cilíndricas, com núcleo basal e com nucléolo evidente, indicando alta atividade celular. Na superfície apical celular observou-se o bordo em escova, que corresponde às microvilosidades, cuja função é aumentar a superfície de absorção. Além disso, evidenciaram-se o delgado espaço subperitrófico e a luz do tubo digestivo repleto de alimentos (Figura 2B). Na superfície basal do epitélio notou-se a presença de pequenos núcleos celulares que correspondem aos núcleos das células basais.

As Figuras 3(A,B,C) mostram secções histológicas que evidenciam o processo de muda. Observa-se aí a presença da epicutícula fina mais externa e da procutícula, que pode ser diferenciada em exocutícula e endocutícula, esta última assentada sobre a epiderme. A procutícula apresenta-se recém-secretada, demonstrando o processo de muda.



**Figura 3.** Fotomicrografias da região mediana do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. A: Cutícula livre e dobrada (setas). 1000x. B: Células que secretam a procutícula logo abaixo da cutícula jovem destacadas (setas) no interior do tubo digestivo e o aspecto de destruição das células epiteliais cilíndricas (seta) 1000x. C: Ectocutícula com cerdas sensoriais, espaço intercuticular e endocutícula bem delimitada com epicutícula livre (setas). 1000x.

A Figura 4A mostra o aspecto geral do tubo digestivo das larvas tratadas com a solução a 1 ppm, evidenciando as células epiteliais altas com aspectos colunares, e a presença de vacúolos citoplasmáticos. A superfície apical dessas células apresentou-se mais basofílica e com maior quantidade de secreção (Figuras 4-A,B,C) do que a região basal, apesar da presença dos núcleos. A matriz

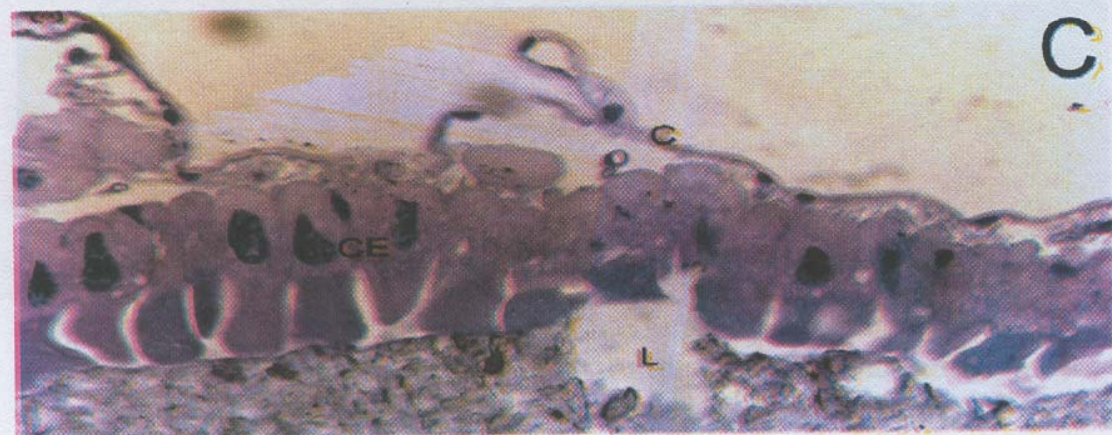
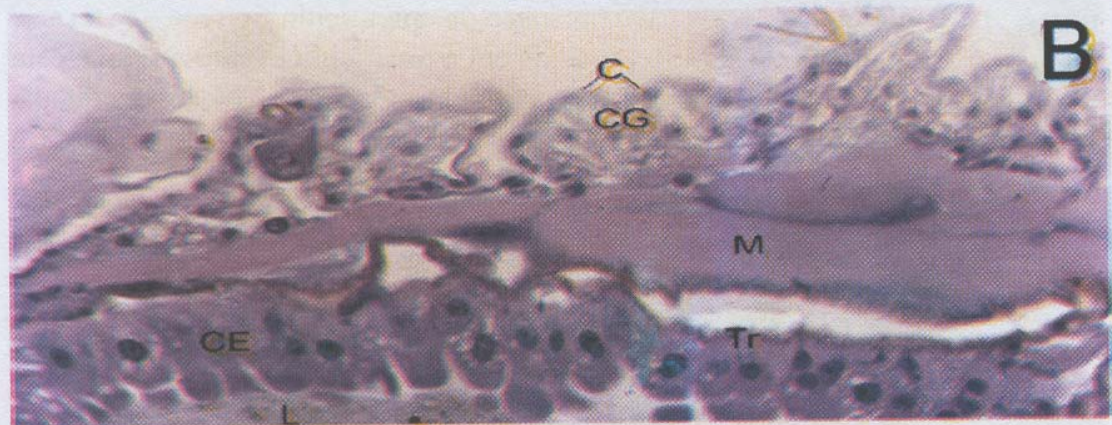
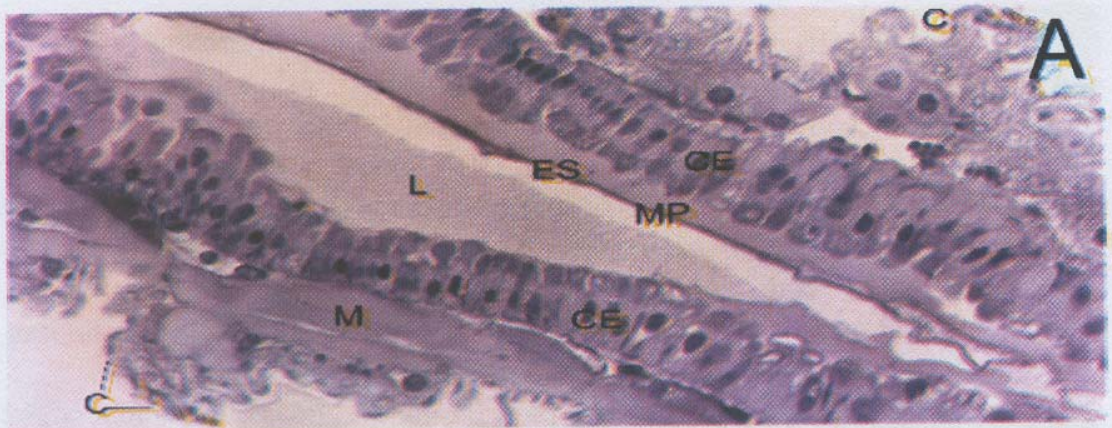


Figura 4. Fotomicrografias do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, submetidas a solução de diflubenzuron a 1 ppm, coradas pela hematoxilina eosina. A: (L) luz intestinal, (MP) matriz peritrófica, (ES) espaço subperitrófico, (CE) células epiteliais, (C) cutícula, (M) musculatura. 160X. B: Aspecto da cutícula (C) e logo abaixo as células do corpo gorduroso (CG), células epiteliais (CE), musculatura (M), traquéia (Tr), luz intestinal (L). 250X. C: Núcleo periférico e cutícula dobrada e pouco espessa (C), ápice das células epiteliais liberando sua secreção (CE), luz intestinal (L). 500X.



peritrófica apresentou-se como uma camada fina intensamente basofílica, separando as células epiteliais do alimento contido no tubo digestivo. O espaço subperitrófico das larvas tratadas foi maior do que no grupo-controle, em que esse espaço é ocupado por grande quantidade de substâncias acidófilas. A análise histológica de seções de larvas tratadas com 1 ppm revelou que as células dessas larvas iniciam um processo de desarranjo, com espessamento da cutícula e presença de vacúolos citoplasmáticos. Tais células, mostram ainda características não evidenciadas no grupo- controle, como a presença de um grande espaço subperitrófico e o espessamento da cutícula e de protusões basofílicas no ápice das células epiteliais do tubo digestivo (Figuras 4 A, B e C).

A Figura 5 é muito interessante por mostrar o alto grau de desarranjo celular e seu efeito gradativo no tubo digestivo, ao ser usado o diflubenzuron a 0,1 ppm. As células da região anterior do mesêntero apresentaram-se mais vacuolizadas e alteradas em comparação com as do grupo-controle. Essas alterações vão gradativamente atingindo as regiões mais posteriores, à medida que aumenta o seu tempo de contato com o diflubenzuron. A cutícula, mesmo em corte longitudinal, mostrou um aspecto retorcido, evidenciado também externamente na larva. Cada segmento larval parece apresentar-se mais fixo ao corpo, como se existissem pontos de maior fixação na ausência de células de corpo gorduroso nessas regiões (Figura 5).

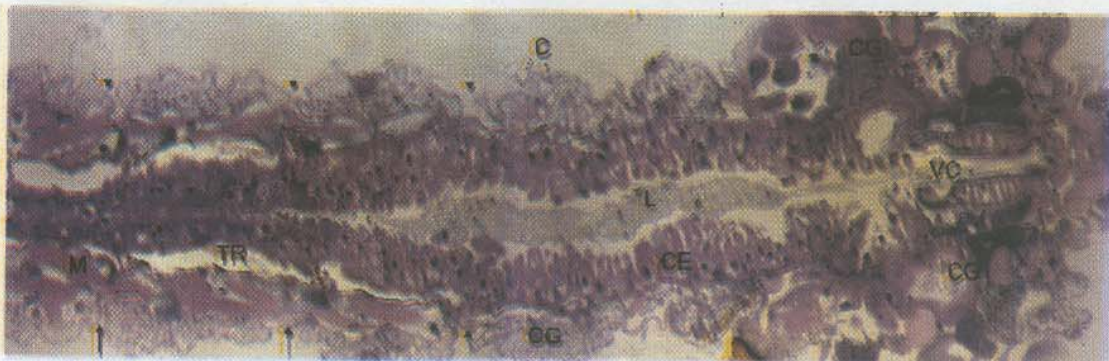
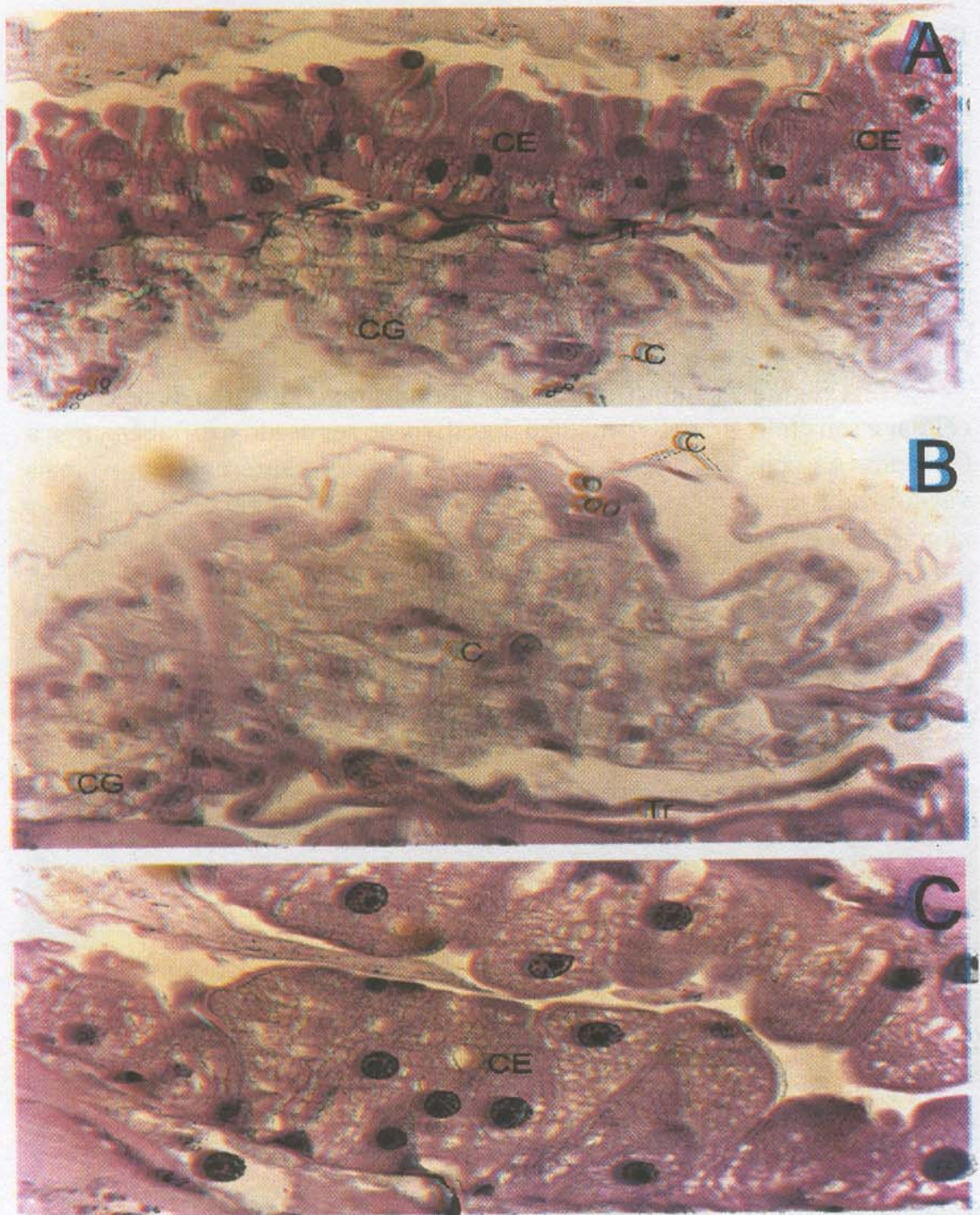


Figura 5. Fotomicrografias de seções longitudinais do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, submetidas ao diflubenzuron a 0,1 ppm, coradas pela hematoxilina eosina. Alterações das células epiteliais (CE), presença da válvula cardíaca (VC), cutícula redobrada com reentrâncias que reveste a superfície larval com pontos de maior fixação (setas), cecos gástricos (CG), enócitos (E), glândula salivar (GS), luz intestinal (L), musculatura (M), traquéia (Tr.) 100x.

As Figuras 6 (A,B,C) referem-se às larvas tratadas com 0,1 ppm. As células do tubo digestivo da região mediana apresentam alto grau de vacuolização do citoplasma e núcleos intensamente corados (Figura 6A), o



**Figura 6.** Fotomicrografias de secções longitudinais do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, submetidas ao diflubenzuron a 0,1 ppm, coradas pela hematoxilina eosina. A: Células epiteliais com alto grau de vacuolização, cutícula (C), corpo gorduroso (CG), luz intestinal (L), traquéia (Tr). 200x. B: Epicutícula e procutícula no início da ecdise, traquéia, corpo gorduroso (CG). 400x. C: Alto grau de vacuolização citoplasmática das células epiteliais (CE). 400x.

que indica grande atividade secretora. A Figura 6B mostra um detalhe da cutícula, que se apresenta bastante espessa e com intensa atividade celular. Ainda nessa figura, nota-se a presença do corpo gorduroso alterado pela ação do inibidor de crescimento. A Figura 6C evidencia detalhes das células epiteliais, que se apresentam bastante vacuolizadas e com núcleo definido.

## DISCUSSÃO

Com base em experimentos pilotos, este trabalho foi desenvolvido com um gradiente de concentração de diflubenzuron de 0,1 a 1 ppm, com o objetivo de mostrar seus efeitos letais sobre as larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Nessas concentrações a mortalidade foi total, porém com tempos diferentes. A opção pelas concentrações de 0,1 e 1 ppm deveu-se ao fato de se tratar de estudo de morfologia, em que é necessário tempo para verificação das alterações celulares.

Nas duas concentrações, após seis horas do início dos experimentos, as larvas começaram a perder a mobilidade, diminuindo os movimentos até a completa letargia. Esse foi o indicativo do início das alterações morfológicas, que não aconteceram simultaneamente com todas as larvas, variando de 6 a 24 horas.

As alterações morfológicas apresentadas pelas larvas de *A. aegypti* tratadas com o diflubenzuron foram similares às mudanças sofridas pelas larvas infectadas com o *Bacillus thuringiensis* (35). A grande alteração morfológica externa iniciada pelos aspectos comportamentais dessas larvas, após a exposição ao diflubenzuron, é um fator importante para assinalar a necessidade de estudos em campo.

A análise do comportamento larval perante o diflubenzuron mostrou que o produto interfere na fisiologia do processo de muda, no sistema nervoso da larva, tornando-a incapaz de movimentar-se. Essa inércia dificulta a respiração da larva e a liberação da exúvia. Resultados similares foram encontrados em outros estudos com a mesma espécie de mosquito (11). Num processo de muda normal, as enzimas digestivas atuam na membrana ecdisial, mas não têm nenhum efeito na exocutícula, nos músculos ou nas conexões nervosas para a velha cutícula. Essas conexões persistem até que o inseto deixe a exúvia. Assim, mesmo em processo de muda, a larva é capaz de se mover e receber estímulos ambientais, até a ruptura da cutícula, através de movimentos corporais.

Estudos de toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* sobre larvas de *A. aegypti* (3, 4) mostraram que o primeiro comportamento das larvas foi a extrusão da matriz peritrófica com o conteúdo intestinal, na tentativa de evitar a intoxicação. Com o diflubenzuron, entretanto, não ocorreu a extrusão da matriz (40), porque o produto tem ação mais incidente no processo ecdisial. O diflubenzuron, como tem sido demonstrado, interfere na síntese e reabsorção da quitina, sem causar a intoxicação direta da larva. Alguns estudos (21, 23, 27) mostram ainda que esse inseticida diminui a fecundidade e a fertilidade da larva, bem como a emergência de adultos.

Estudos histológicos com hematoxilina e eosina, estes evidenciaram que o inibidor de crescimento não impediu a formação de uma nova cutícula com macro e microdobras, deixando um espaço subcuticular entre a nova epicutícula e a velha exocutícula, aspecto concordante com outros autores (8, 22). Outra informação importante é a vacuolização das células do tubo digestivo no grupo tratado, o que não ocorreu no grupo-controle. Isso mostra que a substância atingiu também o tubo digestivo e as células do corpo gorduroso. Muitos dos espaços observados entre a epicutícula e a endocutícula ao microscópio de luz, na verdade, não existiriam ou estariam menos espessos se o cimento, a cera e os lipídios não houvessem sido retirados durante o processo de preparação de lâminas. A atividade do diflubenzuron foi observada na região anterior do mesêntero, e, com o aumento do tempo de exposição, estas células também apresentavam o mesmo aspecto de vacuolização das células epiteliais.

#### AGRADECIMENTOS

À Funape, pelo auxílio prestado através do Processo nº 272.

#### ABSTRACT

Mortality and morphological alterations of *Aedes aegypti* larvae exposed to diflubenzuron

The mortality and the effect of the growth inhibitor diflubenzuron as a possible agent of structural alterations of the cuticle and midgut cells of *Aedes aegypti* (3<sup>rd</sup> instar larvae) was studied by light microscopy. The following dosages were compared for their ability to induce alterations on cuticle and midgut of the larvae: minimal (0,1 ppm), and maximum (1 ppm) lethal dosage. The main alterations observed at light microscopy were the presence of cytoplasmatic vacuoles and increased concentration of secretion on apical surface of the midgut cells. Moreover, the cuticle thickness, with great amount of nucleus, provided evidence of the high cellular activity. Also, the fat body of the larvae showed alterations. Investigations demonstrated that the midgut epithelial cells presented highly vacuolated, spongy, and with secretory vesicles of several sizes. Observations showed aspects of the larval change process, as evidenced by formation of subcuticular space, which is a characteristic of the initial change stage, and by presence of epicuticle and exocuticle separated by an exuvial space.

**KEYWORDS:** *Aedes aegypti*. Diflubezuron. Grow regulator. Control.

## 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. Anderson SO. Cuticular sclerotization in larval and adult locusts, *Schistocerca gregaria*. *J Insect Physiol* 20:1537-52, 1974.
3. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:17-25, 2003.
4. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti*(Linnaeus, 1762) submetidas a ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St.Hil. *Entomol Vect* 10:47-60, 2003.
5. Bernays EA. Changes in the first instar cuticle of *Schistocerca gregaria* before and associated with hatching. *J Insect Physiol* 20:281-90, 1972.
6. Bridges AC, Cocke J, Olson JR, Mayer RT. Morphological effects of insect growth regulating compounds on *Aedes aegypti* (Diptera – Culicidae). *Mosq News* 37:22-233, 1977.
7. Cardosa MJ. Dengue vaccine design: issues and challenges. *British Med Bull* 54:395-405, 1998.
8. Chapman RF. The Insects: Structure and Function. American Elsevier Publishing Company Inc., 1998. 770p.
9. Chau-Mei HO, Shy-Huey WU, Chin-Chen WU. Evaluation of the control of mosquitoes with insect growth regulators. *Kaohsiung J Med Science* 6:366-374,1990.
10. Chen AC, Mayer RT. Insecticides: effects on the cuticle. *Insect Phys Bioch Pharm.*12:57-77, 1985.
11. Cocke J, Bridges AC, Mayer RT, Olson JK. Morphological effects of insect growth regulating compounds on *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) larvae. *Life Sciences.* 24:817-832, 1979.
12. Dorta AM, Chiong RT, Ortega AN, Quinones FAG. Estudio de la sensibilidad al Dimilin (Diflubenzuron) en una cepa de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1972 y de *Culex quinquefasciatus* say, 1823 criadas en el laboratorio. *Rev Cub Med Trop* 41:56-63, 1989.
13. 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* 9:426-430, 1993.
14. Fournet F, Sannier C, Monteny N. Effeccets of two insect growth regulators on the susceptibility of of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). *J Am Mosq Control Assoc* 13: 40-42, 1997.
15. Gabe M. *Histological Techniques*. Paris. Masson, 1976. 1106p.
16. Graf JF. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol Today* 9: 471-474, 1993.
17. Guzman MGT, Kouri GF, Bravo JRG. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. Reemergence of dengue. *Rev Cub Med Trop* 51:5-13, 1999.
18. Kelada NL, Gaaboub FA, Kawash J. The effect in reproduction and morphometries of females of *Cules pipiens* L. of treatment with six insect growth regulators. *J Agric Sci Comb* 96:611-618.
19. Kerhut GA & Gilbert LI. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, 1985. Integument. p. 415-450.
20. Kitamura T. A rapporteurs summary: research on dengue vaccine. *Trop Med* 35:325-330, 1993.
21. 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.
22. Locke, M. The structure of epidermal fect during the development. *Tissu & Cell.* 17:901-21, 1985.
23. Lyra JRM, Ferraz JMG, Silva APP. Acción de inhibidores de la síntesis de la quitina en la reproducción de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *An Soc Ent Bras* 27:569-576, 1998.

24. Luna, I. G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
25. Marcoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da Suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao Temephos. *Rev Patol Trop* 24:31-40, 1995.
26. Martins ML. Eficácia de Diflubenzuron 25% no controle de crustáceos parasitos de *Leporinus macrocephalus*. Garavelo & Bristsky- Relatório da Champion, 1999.
27. Martin PJs, Clark JM, Edman JD. Preliminary study of synergism of acid rain and diflubenzuron. *Bull Environ Cont Tox* 54: 833-836, 1995.
28. Martínez AF. Inibidores de síntesis de quitina: Control de poblaciones de mosquitos con productos biorracionales. *Rev Soc Entomol Argentina* 58:232-237, 1999.
29. Mello MLS, Vidal BC. *Práticas de Biologia da Célula*. Campinas-SP: Ed. Edgar Blucher Ltda, 1980. 71 p.
30. Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico. <http://www.funasa.gov.br>. 2001.
31. Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico. <http://www.funasa.gov.br>. 2002.
32. Mscasland CS, Cooper RJ, Barnum DA. Implications for the use diflubenzuron to reduce arthropod populations inhabiting evaporation ponds of the San Joaquin Valley, Califórnia. *Bull Environ Cont Tox* 60:702-708, 1998.
33. Mulla MS, Darwazeh HA, Schreiber ET. Impact of new insect growth regulators and their formulations on mosquito larval development in impoundment and floodwater habitats. *J Am Mosq Control Assoc* 5:15-20, 1989.
34. Nobre A, Antezana D, Tauil PL. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 27:59-66, 1994.
35. Panbangred W, Pantuwatana S, Bhumiratana A. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* toward *Aedes aegypti* larvae. *J Invertebr Pathol* 33:340-347, 1979.
36. Pearse AGE. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. London, J & Churchill Ltda., 1961. 998p.
37. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Statq* 50:161-169, 1997.
38. Prophet EB, Millis B, Arrington JB, Sabin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, DC: *Am Reg Pathol*, 1992. 275p.
39. Rawlins SC, Wan JOH. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Am Mosquito Control Ass* 11:59-65, 1995.
40. Richards AG, Richards PA. Origin and composition of the peritrophic membrane of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 17:2253-2275, 1995.
41. Schaefer CH. A practical evaluation of TH-6040 (Dimilin) as a mosquito control agent in California. *J Econ Entomol* 28:183-185, 1975.
42. Schoof HF. Insecticides for use against *Aedes aegypti*. *Bull Wld Hlth Org* 36:618-622, 1967.
43. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1752) em laboratório. *Rev Patol Trop* 27:51-63, 1998.
44. Silva JJ, Mendes J. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:679-682, 2002.
45. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúd Públ* 17:99-102, 2001.
46. Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúd Púb* 18:867-871, 2002.
47. Yasui K. Strategies of dengue vaccine development by WHO using new biotechnology. *Trop Med* 35:233-241, 1993.