

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia
Tropical e Recursos Naturais

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO REGULADOR DE
CRESCIMENTO DE INSETOS DIFLUBENZURON CONTRA
Anopheles darlingi ROOT, 1926 (DIPTERA, CULICIDAE), EM
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.**

Fábio Medeiros da Costa

Manaus – Amazonas

Abril, 2007

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia
Tropical e Recursos Naturais

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO REGULADOR DE
CRESCIMENTO DE INSETOS DIFLUBENZURON CONTRA
Anopheles darlingi ROOT, 1926 (DIPTERA, CULICIDAE), EM
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.**

Fábio Medeiros da Costa

Orientador: Wanderli Pedro Tadei

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Entomologia.

Manaus – Amazonas

Abril, 2007

C837 Costa, Fábio Medeiros da
Atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos diflubenzuron contra *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, culicidae), em condições de laboratório / Fábio Medeiros da Costa .--- Manaus : [s.n.], 2007.
61p. : il.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2007

Orientador : Tadei, Wanderli Pedro

Área de concentração : Entomologia

1. *Anopheles darlingi*.
 2. Controle químico.
 3. Diflubenzuron.
 4. Larvicida.
 5. Pupicida.
 6. Sintomatologia.
 7. Alterações morfológicas.
- I. Título.

CDD 19. ed. 595.77

SINOPSE

Avaliou-se a atividade inseticida contra as larvas e pupas de *Anopheles darlingi* expostas ao Regulador de Crescimento de Insetos Diflubenzuron em condições de laboratório. As larvas e pupas foram susceptíveis ao inseticida nas concentrações verificadas, apresentando sintomas característicos de intoxicação com alterações morfológicas.

Palavras-chave: Controle químico, Diflubenzuron, larvicida, pupicida, *Anopheles darlingi*, sintomatologia, alterações morfológicas.

Agradecimentos

A Deus que pela fé mostrou-me o caminho correto e proporcionou-me tantas oportunidades de superar as dificuldades de alcançar este sonho.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei pelos ensinamentos, oportunidades de crescimento, confiança e companheirismo ao longo desses dois anos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado possibilitando a manutenção pessoal e acadêmica.

Ao INPA, a DCEN e o Laboratório de Malária e Dengue pelo apoio logístico e financeiro para realização deste trabalho.

Aos professores vinculados a DCEN pelo conhecimento repassado e o comprometimento com o curso e os alunos.

A secretária Lenir pela atenção e o pronto atendimento frente às necessidades dos alunos.

A empresa Champion Farmoquímico Ltda pelo envio do ingrediente ativo do Diflubenzuron para os bioensaios deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Malária e Dengue: Dra. Joselita, Juraci, Ana Paula, Fábio, Paulo, Paula, Gerlândia, Cleonice, Dra. Raquel, Dra. Mirian, Letícia, Melina, Valfran, Gilson, Adelina, Zilá, Maria do Desterro, Bosco, Arcelino, Cristóvão, Henrique, Elias, Bastos, Geraldo, Carlos, Silvano, Gilvan, Glaubio, Gervilane, Roseli, Suse, Rejane, Débora, Ângela, Augusto, Simone, Rodrigo Fogaça, Rodrigo de Sá, Erasmo, Pedrão, Yure, Kely, Carol, Rachel, Waléria e Érika. A todos vocês muito obrigado pelo companheirismo, as ajudas nas coletas e a troca de experiências diárias.

A Dra. Iléa, pelo incentivo e contribuição significativa na parte espiritual.

Ao amigo e irmão Ricardo pelo especial companheirismo, excelentes lições de conhecimento e contribuições para a realização deste trabalho.

Aos motoristas Braz e Peu, pela condução com segurança e paciência aos pontos de coleta.

Ao Catita e sua equipe da FVS pela ajuda nas coletas.

Aos colegas de curso que juntos superamos todos os desafios impostos e pela amizade desenvolvida.

Aos demais colegas de outras turmas que também estiveram comigo nos momentos de discussão, trocas de experiências e descontração.

Aos amigos Juliana e Fabio Godoi e seus familiares pelo apoio, companheirismo e paciência para comigo quando “enchia o saco” e parasitava-os.

Aos companheiros dos “Empreendimentos Maia”, Lucécia, Vinicius, Pimpão, Daniela e Ronaldo, pela amizade e consideração.

A prima Bernadete e seu marido Marcos pela atenção que tiveram ao me receber nesta cidade e pela preocupação com o meu bem estar e crescimento.

Aos amigos na Paraíba que sempre torceram pelo meu crescimento e pela superação da realidade enfrentada naquele estado. A vocês toda a admiração e apreço.

A Prefeitura Municipal de Várzea, na pessoa de Demazinho pela contribuição na condução à Manaus.

Aos familiares (tios, avós e primos) espalhados por vários lugares deste país que estiveram me apoiando em todos os passos e decisões tomadas.

A tia e madrinha Verônica com o amor especial que tem por mim estando sempre rezando e pedindo a Deus pela minha felicidade.

A minha mãe Neraci (*in memorian*) pelo legado de dignidade, ética profissional e de amor.

Ao meu pai Chiquinho que esteve em sintonia constante comigo, apoiando-me e contribuindo para conclusão de mais uma etapa em minha vida acadêmica.

Aos irmãos Fabiano, Fabrício, Allani e Luiza que são meus fãs. Em especial a Fabiano o qual realiza tão bem o papel de primogênito, onde desde o primeiro momento que iniciei esta empreitada esteve me ajudando e impulsionando incondicionalmente para que eu fosse mais longe.

Resumo

Anopheles darlingi é o principal vetor de malária no Brasil e, portanto é a espécie alvo no controle dessa endemia. Para tanto, são necessários estudos com novas substâncias inseticidas que permitam o controle de vetor de forma segura e eficiente. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade larvicida e pupicida do regulador de crescimento de insetos Diflubenzuron para *Anopheles darlingi* em condições de laboratório. Diflubenzuron mostrou-se efetivo contra as larvas de 3° e 4° estádios. Para as larvas de 3° estágio provocou 100% de mortalidade em altas concentrações (0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1ppm) com significativa queda de sobrevivência ao longo dos dias. Foram determinadas as CL50 e CL90 para as larvas de 4° estágio, respectivamente 0,006 e 0,013 ppm. A atividade pupicida foi evidente mostrando que o inseticida também age por contato, sendo as pupas jovens mais susceptíveis que as de 1 dia de idade. Em relação ao período de exposição, as larvas expostas por 24 horas tiveram significativa mortalidade não diferindo daquelas expostas por 48 horas. Nas observações das larvas de 3° estágio foram perceptíveis a diminuição dos movimentos natatórios, das peças bucais e giratórios da cabeça. Além destes observou-se o alongamento da região do cérvix e no momento da ecdise foi observada a maior mortalidade com extravasamento de tecidos. Para as larvas de 4° estágio foram detectados também redução dos movimentos já citados, além de deformações nos estágios subseqüentes, tais como larvas presas a exúvia, pré-pupas e pupas com extravasamento de tecido, pupas com apêndices expostos e adultos em diferentes graus de emergência. Com esses resultados foi possível concluir que Diflubenzuron é altamente efetivo contra as formas imaturas de *A. darlingi*, provocando-lhes mortalidade e/ou alterações morfológicas que levam a redução na emergência dos adultos.

Abstract

Anopheles darlingi is the main malaria vector in Brazil and, therefore it is the species targets in the control of that endemy. Therefore, the researches are necessary with new insecticide substances that allow the control of vector in a safe and efficient way. This study aims to assess the larvicide and pupicide activity of Diflubenzuron, a insect growth regulator, on *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. Diflubenzuron showed to be effective against 3rd and 4th instar larvae. It provoked 100% mortality on 3rd instar larvae when used in high concentrations with a significant drop on the survival rate as time went by. CL50 and CL90 were determined for 4th instar larvae at 0.006 and 0.013 ppm, respectively. Pupicide activity was evident showing that the insecticide also works by, with young pupae being more susceptible than one day old ones. Regarding the period of exposure, larvae which were exposed for 24 h presented significant mortality not differing from those which had been exposed for 48 h. The 3rd instar larvae showed a gradual decrease on the swimming, mouth part, and head turning, movements. In addition to these, the lengthening of the cervix region, and higher mortality at the time of the ecdise with the overflowing of tissues were also observed. For the 4th instar larvae the decrease of the movements mentioned above, as well as, at the time of the ecdise production of deformations in the subsequent stages in which, larvae attached to exuvia, pre-pupae and pupae with overflowing of tissue, pupae with exposed appendages, and adults in different degrees of emergence, were also detected. With these findings it was possible to conclude that Diflubenzuron is highly effective against *A. darlingi* immature forms bringing about their mortality and/or morphological alterations that lead to the reduction on the emergence of adults.

Sumário

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução	1
1.1. Malária: aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica	1
1.2. Vetores de malária no Brasil.....	3
2. Objetivos	5
2.1. Geral.....	5
2.2. Específicos	5
3. Revisão bibliográfica	6
3.1. Controle químico de mosquitos vetores de malária no Brasil	6
3.2. Controle químico com Reguladores de Crescimento de Insetos	9
4. Materiais e Métodos	16
4.1. Coleta e manejo dos mosquitos.....	16
4.2. Preparo das soluções do inseticida Diflubenzuron	18
4.3. Bioensaios para avaliar a susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron.....	18
4.4. Bioensaios para obtenção das Concentrações Letais - CL50 e CL90 - de Diflubenzuron para <i>Anopheles darlingi</i>	19
4.5. Bioensaios de susceptibilidade de pupas ao Diflubenzuron	20
4.6. Testes de tempo de exposição de L4 a CL50 de Diflubenzuron.....	21
4.7. Sintomatologia e alterações morfológicas das larvas de 3 ^o e 4 ^o estágio expostas à CL50 do Diflubenzuron.....	21
5. Análise dos dados	22
5.1. Bioensaios para avaliar a susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron.....	22
5.2. Bioensaios para obtenção das Concentrações Letais - CL50 e CL90 - de Diflubenzuron para <i>Anopheles darlingi</i>	22
5.3. Bioensaios de susceptibilidade de pupas e de tempo de exposição de larvas ao Diflubenzuron.....	23
6. Resultados	24
6.1. Bioensaios de susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron	24
6.2. Bioensaios para obtenção das concentrações letais - CL50 e CL90 - de Diflubenzuron para <i>Anopheles darlingi</i>	25

6.3. Bioensaios de susceptibilidade de pupas ao Diflubenzuron	28
6.4. Bioensaios: tempo de exposição de larvas de 4 ^o estágio à CL50 de Diflubenzuron.....	30
6.5. Sintomatologia e alterações morfológicas das larvas de 3 ^o e 4 ^o estágio expostas à CL50 de Diflubenzuron.....	31
7. Discussão	44
7.1. Bioensaios de susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron	44
7.2. Bioensaios para obtenção das concentrações letais, CL50 e CL90 de Diflubenzuron para <i>Anopheles darlingi</i>	45
7.3. Bioensaios de susceptibilidade de pupas ao Diflubenzuron	46
7.4. Bioensaios: tempo de exposição de larvas de 4 ^o estágio à CL50 de Diflubenzuron.....	47
7.5. Sintomatologia e alterações morfológicas das larvas de 3 ^o e 4 ^o estágio expostas a CL50 do Diflubenzuron.....	48
8. Conclusões	51
9. Referências bibliográficas	52
10. Anexos	61

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fotografia de satélite destacando os dois pontos de coleta de *Anopheles darlingi* na estrada do Puraquequara (1) e no Brasileirinho (2), localizados na região periurbana de Manaus, Estado do Amazonas (Fonte: Embrapa)..... 17
- Figura 2.** Pote plástico, com suas dimensões, utilizado nos bioensaios para obtenção das concentrações letais, CL50 e CL90, do Diflubenzuron para *Anopheles darlingi*.20
- Figura 3.** Representação gráfica da sobrevivência de larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas a diferentes concentrações de Diflubenzuron, em condições de laboratório.25
- Figura 4.** Retas de regressão linear dos *probits* observados nos bioensaios com Diflubenzuron contra as larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi*, em condições de laboratório (---◇---: observado; —: esperado)27
- Figura 5.** Representações gráficas da mortalidade nos estágios de larva (A), pupa (B) e adulto (C) entre as concentrações de Diflubenzuron testadas nos bioensaios contra as larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* (KW-H: teste de Kruskal-Wallis ou teste H; ■: média de mortalidade; $\bar{x} \pm s$: \pm desvio padrão).29
- Figura 6.** Alterações morfológicas observadas em larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron. A: início da ecdise. Detalhe do sintoma de alongamento da região do cérvix; B: início da apólice da região cefálica; C: extravasamento de tecido da região cefálica. ce: cérvix; le: linha ecdicial; et: extravasamento de tecido.34
- Figura 7.** Alterações morfológicas na fase de pré-pupa de *Anopheles darlingi* provocadas pelo Diflubenzuron. A: início da ecdise com formação do cefalotórax; B: apólice da região cefálica com extravasamento de tecido; C: Detalhe do cefalotórax com dilatação e espessura do tegumento delgado; D: Visão dorsal mostrando detalhe do extravasamento de tecido e da linha ecdisial. dct: dilatação do cefalotórax; et: extravasamento de tecido; fct: formação do cefalotórax; le: linha ecdisial.40
- Figura 8.** Alterações morfológicas na fase de pupa de *Anopheles darlingi* oriundas de larvas de 4º estágio expostas ao Diflubenzuron. A: pupa não melanizada presa a exúvia da larva; B: Vista ventral da pupa destacando a exposição dos apêndices; C: Vista lateral da pupa destacando as fendas no tegumento e exposição das asas. eas: exposição das asas; ep: exposição das peças bucais; ep: exposição das pernas; exl: exúvia da larva; ft: fenda no tegumento.41
- Figura 9.** Alterações morfológicas observadas na emergência de adultos de *Anopheles darlingi* oriundos de larvas de 4º estágio expostas ao Diflubenzuron. A: início da emergência; B: adulto com pernas presas a exúvia da pupa; C: adulto emergido com perna quebrada e fixada a exúvia da pupa; D: adulto completamente

emergido com perda de patas posteriores. aba: abdome do adulto; exp: exúvia da pupa; pea: perna ausente; pef: perna fixada exúvia da pupa; peq: perna quebrada.42

Figura 10. Detalhes das estruturas observadas na emergência dos adultos de *Anopheles darlingi* presas na exúvia da pupa no momento da emergência. Os adultos são oriundos de larvas de 4^o estágio. A: abdome do adulto preso à exúvia; B: tarsos presos no interior da exúvia; C: pernas quebradas e presas à exúvia. abam: abdome do adulto macho; exp: exúvia da pupa; peq: perna quebrada; taf: tarso fixado na exúvia.43

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Percentuais de sobrevivência, em horas, das larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron, em condições de laboratório.....24
- Tabela 2.** Concentrações utilizadas nos bioensaios para obtenção das CL50 e CL90 de Diflubenzuron para larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* com os percentuais de Inibição de Emergência (IE) e correção pela fórmula de Aboot (1925).26
- Tabela 3.** Concentrações letais CL50 e CL90 de Diflubenzuron para larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* em condições de laboratório com Intervalo de Confiança (IC) de 95% ($g = 0,12$; $\chi^2 = 7.98$)26
- Tabela 4.** Susceptibilidade de pupas jovem e de 1 dia de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração 0,1 ppm, em condições de laboratório.30
- Tabela 5.** Susceptibilidade de larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* expostas por 24 e 48 horas ao Diflubenzuron na concentração 0,006 ppm (CL50), em condições de laboratório.30
- Tabela 6.** Mortalidade observada nos intervalos de leitura e Inibição de Emergência (IE) no experimento de sintomatologia com larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração de 0,006 ppm (CL50).33
- Tabela 7.** Freqüência de movimentos das larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração 0,006 ppm (CL50), em condições de laboratório.35
- Tabela 8.** Mortalidade observada nos intervalos de leitura e inibição de emergência (IE) no experimento e sintomatologia com larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração de 0,006 ppm (CL50).....36
- Tabela 9.** Freqüência de movimentos das larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração 0,006 ppm, em condições de laboratório.37

1. Introdução

1.1. Malária: aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica

A malária é uma doença infecciosa que assola a humanidade desde antes de Cristo. É considerada até hoje um dos mais importantes problemas de saúde pública em nível mundial devido ser a mais prevalente doença endêmica do mundo e, portanto um dos principais obstáculos ao desenvolvimento das comunidades e países (Ávila e Ferreira, 1996).

Esta doença apresenta ampla distribuição geográfica, fundamentalmente nas regiões tropicais do globo em países da África, Ásia e América (Passos e Fialho, 1998), atingindo até o fim de 2004, um total de 107 países e territórios. Essas regiões concentram a maior parte da população humana, segundo a World Health Organization (2005a) 3,2 bilhões de pessoas vivem em área de risco, ou seja, estão expostas à infecção pelos seus agentes etiológicos, cuja taxa de incidência varia de 350 a 500 milhões de casos por ano, levando a registros de 1,5 a 2,7 milhões de mortes.

A África registra 90% de todos os casos de malária do mundo com ocorrência em 49 países. Na Ásia, essa doença é registrada em pelo menos 35 países sendo que o número de casos reduziu consideravelmente – cerca de 28 vezes, entre 1995 e 2003 em virtude da retomada dos planos de tratamento e de controle dos vetores. Nas Américas a doença ocorre em 21 países sendo que desses, nove estão localizados na floresta Amazônica e os demais na América Central e Caribe (WHO, 2005a). Estima-se que 860 milhões de pessoas no continente americano estão expostas à malária sendo que no Brasil pelo menos 177 mil pessoas estejam expostas a infecção pelos parasitas da malária (PAHO, 2003).

No Brasil o inquérito da malária desde o início do século XX registra grandes epidemias em quase todo o país. A região da Amazônia Legal, que compreende os estados da região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) e ainda parte dos estados do Mato Grosso e Maranhão, concentra a maior parte do número de casos da doença (Batista, 1972; Marques e Gutierrez, 1994). Sendo assim considerada a primeira endemia a surgir na Amazônia (Tadei, 2001)

Até a década de 1940 a área de transmissão atingia total ou parcialmente todos os Estados brasileiros com exceção do Rio Grande do Sul (Loyola *et al.*, 2002). Grandes epidemias foram registradas em todo o estado de São Paulo, no Rio de Janeiro e em Minas Gerais (Hochman *et al.*, 2002). Na região Nordeste, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, em 1939 houve uma epidemia de malária onde em oito meses foram registradas 14 mil mortes. Nesta epidemia o vetor foi o *Anopheles gambiae* Gile, 1878, considerado o principal transmissor no continente africano e que fora introduzido no Brasil. Devido às ações de combate ao vetor desenvolvidas em conjunto pelo Serviço de Malária do Nordeste – SMN logo foi erradicada daquela região em 1940 (Marques e Gutierrez, 1994).

Atualmente, a malária no Brasil é endêmica da região Amazônica, porém há registros de casos esporádicos em áreas de Mata Atlântica, nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. A sua ocorrência na região Nordeste limita-se a área da Amazônia Maranhense. A existência dessa doença em outros estados brasileiros que não se encontram na área da Amazônia é devido o constante fluxo migratório das pessoas que vão às áreas endêmicas e se infectam com os parasitas e quando retornam às regiões de origem, desenvolvem a doença, sendo, portanto casos não autóctones (Loyola *et al.*, 2002).

Os agentes etiológicos da malária são os protozoários pertencentes à família Plamodiidae e ao gênero *Plasmodium*. As espécies que infectam o homem e provocam a doença são *Plasmodium vivax* Grassi e Feleti, 1890, *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, *Plasmodium malarie* Laveran, 1881, e *Plasmodium ovale* Stephens, 1822. Apenas este último não ocorre no Brasil, sendo encontrado somente na África devido a ausência do seu vetor. A forma mais grave da doença é provocada pelo *P. falciparum* e este é responsável pela maioria das mortes por malária.

No Brasil, atualmente, o índice de infecção humana por *P. vivax* está no nível de 78,5%, seguido de 21,4% para *P. falciparum* e mista, e 0,07% para *P. malarie* (PAHO, 2003). Semelhante proporção de infecção por plasmódios foi também observada em mosquitos, Tadei e Dutary-Thatcher (2000) detectaram 2,5 vezes a infecção por *P. vivax* sobre *P. falciparum* e quase 30 vezes a mais sobre *P. malarie*.

1.2. Vetores de malária no Brasil

Os vetores que transmitem os parasitos da malária no Brasil são os anofelinos dos sub-gêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. No sub-gênero *Nyssorhynchus* foi encontrado até o presente o maior número de espécies infectadas por plasmódios, onde o *Anopheles darlingi* Root, 1926 ocupa o papel de vetor primário nas transmissões de plasmódios na região do interior da Amazônia e o *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 nas regiões litorâneas dos estados do Pará, Amapá e Maranhão. Outras espécies desse sub-gênero como *Anopheles albitarsis* Arribáizaga, 1878, *Anopheles braziliensis* Chagas, 1907, *Anopheles nuneztovari* Gabaldon, 1940, *Anopheles oswaldoi* Peryassu, 1922, *Anopheles strodei* Root, 1926 e *Anopheles triannulatus* Neiva & Pinto, 1922, são considerados vetores ocasionais (Lourenço-de-Oliveira *et al.* 1987; Lourenço-de-Oliveira, *et al.* 1989; Tadei *et al.*, 1988; Tadei *et al.*, 1993). No sub-gênero *Kerteszia* são reconhecidos como principais vetores *Anopheles cruzi* Dyar & Knab, 1909 e *Anopheles bellator* Dyar & Knab como vetores primários e *Anopheles homunculus* Komp como vetor secundário (Tadei, 1993).

Anopheles darlingi é encontrado em todas as regiões da Amazônia onde a malária ocorre com exceção das zonas costeiras. É muito abundante superando todas as outras espécies anofélicas, apresentando taxas de infecções por esporozoítas altas, acentuada antropofilia e endofagia (Tadei *et al.*, 1993). Em áreas de influência da Hidrelétrica de Tucuruí, no estado do Pará, observou-se que os anofelinos capturados (n= 10.000) se distribuíram na seguinte proporção: 33% de *A. darlingi*, 22% de *A. nuneztovari*, 17% de *A. triannulatus* e 11% de *A. oswaldoi*. No mesmo estudo os autores concluíram que a presença de *A. darlingi* coincide com a ocorrência da malária (Tadei *et al.*, 1983).

Em áreas de intensas modificações ambientais e com altas epidemias de malária como nos municípios de Ariquemes e Porto Velho, estado de Rondônia, foi constatado que *A. darlingi* representava 77% dos anofelinos coletados. Praticamente era a única espécie encontrada no intradomicílio, embora sendo mais abundante no peridomicílio e picando pessoas principalmente no crepúsculo vespertino e nas primeiras horas da noite (Tadei, 1993). No mesmo estudo, por meio de provas imunoradiométricas com anticorpos monoclonais em mosquitos, foi

detectada a presença de esporozoítas de *P. falciparum* em 32 exemplares de *A. darlingi* e em um de *A. braziliensis*, e de *P. vivax* em cinco *A. darlingi* e cinco *A. triannulatus*. Tadei e Dutary-Thatcher (2000), utilizando o método ELISA, encontraram em Ariquemes, Rondônia, oito espécies de anofelinos infectadas naturalmente por plasmódios onde *A. darlingi* foi a mais predominante, seguida de *A. triannulatus* e *A. oswaldoi*. Neste estudo todas as espécies estavam infectadas por *P. vivax*, apenas *A. darlingi* por *P. falciparum*. Assinalaram, ainda, que o *A. darlingi* picava no intra e no peridomicílio até tarde da noite e as demais espécies no crepúsculo vespertino.

Tadei *et al.* (1993) concluíram que *A. darlingi* pode ser considerada a espécie anofélica do Brasil com maior capacidade vetorial, em virtude de suas características comportamentais como antropofilia, endofilia, exofilia e atividade de picar além da capacidade de desenvolver e transmitir plasmódios ao homem. Com estas características, embora seja encontrada infectada em muitas regiões amazônicas em baixas densidades, seria o suficiente para desencadear epidemias de malária principalmente em áreas com intensas atividades humanas, com modificações ambientais, tais como o processo de expansão de cidades, construção de usinas hidrelétricas, rodovias entre outras.

Assim, é evidenciado o importante papel que *A. darlingi* desempenha na transmissão da malária nas regiões endêmicas do Brasil. Sendo, portanto a espécie que merece maior atenção para estudos comportamentais, epidemiológicos, elaboração de planos para o seu controle e também estudos com prospecção de novas substâncias potencialmente ativas para promover supressão de suas populações visando contribuir para a diminuição dos casos de malária.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos Diflubenzuron contra *A. darlingi*, em condições de laboratório.

2.2. Específicos

- Avaliar a susceptibilidade de larvas de 3º estágio nas concentrações 0,1 , 0,2, 0,4 , 0,6 , 0,8 e 1 ppm do Diflubenzuron;
- Determinar as concentrações letais - CL50 e CL90 -, do Diflubenzuron para *A. darlingi*;
- Avaliar a susceptibilidade das pupas jovens e de um dia na concentração de 0,1 ppm de Diflubenzuron;
- Avaliar a susceptibilidade larval sob dois períodos de exposição: 24 e 48 horas à CL50 do Diflubenzuron;
- Descrever a sintomatologia e alterações morfológicas das larvas de 3º e 4º estágio expostas a CL50 do Diflubenzuron.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Controle químico de mosquitos vetores de malária no Brasil

3.1.1. Adulticidas

Desde que foi evidenciada a transmissão da malária por mosquitos adultos iniciou-se a maioria dos métodos de controle sobre esse estágio de vida.

Os adulticidas mais utilizados no controle anofélico foram os piretróides como aletrina, os derivados halogenados BHC ou gamexame (hexaclorobenzeno) e o dieldrin (hexacloro-epoxioctahidro-endo, exo-dimetanonaftaleno), o fosforado malation (0.0-dimetilditiofosfato de dietilmercaptosuccinato) e o organoclorado DDT (diclorodifeniltricloroetano) (Forattini, 1962).

O DDT teve especial atenção nas campanhas de saúde pública em todo o mundo devido o seu baixo custo e alto poder residual (WHO, 2005b). Este composto foi amplamente usado no Brasil no controle de anofelinos, sendo inicialmente aplicado nas regiões Norte e Nordeste e depois se estendeu por todas as áreas de transmissão do país interrompendo a transmissão de malária em áreas endêmicas (Figueiredo, 1996). Ao atingir a cobertura total das áreas de transmissão com aplicação do DDT permitiu-se uma mudança das primeiras áreas da fase de ataque para a fase de consolidação onde, em 1965, pelo menos 6,7 milhões de habitantes estavam livres da malária. Porém, em decorrência das diferenças regionais a eficácia do DDT enfrentou problemas que limitaram a sua eficiência especialmente pelo tipo de habitação na região amazônica onde a estrutura das casas não era própria à borrifação, pois as paredes eram inexistentes ou parciais (Tadei, 1993).

Outro grande entrave para o uso do DDT foi a seleção de populações de mosquitos resistentes. Segundo Rachou *et al.* (1960) *A. albitarsis* já apresentava sinais de tolerância ao DDT em regiões do Estado do Ceará e de resistência intermediária no Mato Grosso e, *A. aquasalis*, no Pará, apresentou resistência intermediária ao DDT e ao Dieldrin. No Estado de São Paulo foi registrada a resistência intermediária a este último inseticida em *Anopheles galvoii* Causey, Deane & Deane, 1943 e *Anopheles rondoni* Neiva & Pinto, 1922 (Brown, 1973; Brown, 1986; WHO, 1986).

Nos dias atuais, a World Health Organization (2006) recomenda para o controle de mosquitos adultos os inseticidas organofosforados Fenitrothion e Malathion e os piretróides Deltametrina, Lambdacyalotrina, Cypermetrina, Alfacypermetrina, Betacypermetrina e Cyflutrina.

Os organofosforados atuam por inibição da colinesterase no mecanismo da junção neuromuscular, provocando um estado de paralisia no inseto seguido de uma morte lenta (*low knockdown*). Já os piretróides agem sob a membrana dos neurônios afetando o mecanismo da bomba de sódio e potássio impedindo assim a transmissão dos impulsos nervosos levando o inseto a uma morte rápida (*rapid knockdown*) (Funasa, 2001).

A aplicação dos organofosforados e piretróides indicada para mosquitos adultos é realizada sob duas formas: borrifação intradomiciliar que consiste na impregnação das paredes com o inseticida e aplicação espacial indicada em áreas de grandes criadouros com alta densidade de mosquitos e de difícil acesso. As aplicações espaciais para dispersão das partículas do inseticida no controle de anofelinos são o aerosol térmico, chamado termonebulização e o Ultra Baixo Volume (UBV) (Tadei, 2001).

A termonebulização é feita mediante a mistura em óleo ou derivado do petróleo com o inseticida químico e em seguida injetado em um aquecedor com uma saída de bocal. A mistura é aquecida e então vaporizada pela alta temperatura. Uma corrente de ar conduz o vapor com inseticida para a parte externa do aquecedor que ao entrar em contato com o ar atmosférico se condensa formando gotículas de 0,5 a 1,5 micrômetros em uma névoa densa capaz de atingir os mosquitos. É uma aplicação bastante barata e, portanto a mais utilizada (Funasa, 2001).

O UBV consiste de um gerador de aerossóis a frio onde também são misturados óleos de petróleo com o inseticida concentrado e eliminado sob a forma de vapor através de bicos especiais que formam uma nuvem menos densa (WHO, 1997).

Atualmente o controle de anofelinos adultos nas áreas endêmicas de malária é realizado sob a aplicação intradomiciliar de Cypermetrina e Alfacypermetrina por impregnação nas superfícies das paredes das residências associada com a termonebulização no ambiente peridomiciliar.

3.2.2. Larvicidas

No início do século XX o conhecimento sobre o ciclo de vida dos anofelinos e suas relações com as águas estagnadas estava bastante difundido o que contribuiu para o entendimento da importância do combate às formas imaturas.

O acetoarsenito de cobre, comumente chamado de Verde-paris, foi bastante utilizado em campanhas de controle de imaturos de anofelinos principalmente na campanha de erradicação do *Anopheles gambiae* no Nordeste brasileiro. A ação desse composto embora fosse temporária apresentava resultados bastante satisfatórios, pois penetrava pela via intestinal das larvas aproveitando-se do fato delas se alimentarem sem discriminação (Forattini, 1962). A aplicação do Verde-paris era feita de uma mistura de pó inerte podendo ser espalhado diretamente sobre a lâmina do criadouro ou também na forma de suspensão em querosene.

Um dos métodos bastante empregados como larvicida nos criadouros foi o da petrolagem que consistia na aplicação do petróleo ou de seus subprodutos como o querosene, o óleo diesel ou o óleo combustível. Geralmente eram aplicados associados a agentes dispersantes como o cresol, vários detergentes e óleos vegetais. Este método promovia a formação de uma película na superfície da água impedindo a respiração das larvas provocando sua morte por sufocação ou anestesia (Forattini, 1962). No entanto não oferecia segurança devido à falta de especificidade, contaminação da cadeia trófica e do meio ambiente.

O larvicida amplamente usado nas ações de controle da malária pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública Ministério da Saúde – SUCAM e pela Fundação Nacional da Saúde - FUNASA foi o Temefós (ABATE), um inseticida organofosforado. Porém, devido o seu uso indiscriminado se instalou um processo seletivo que desencadeou a resistência dos insetos alvo (Tadei, 2001; Tadei e Rodrigues, 2002).

Atualmente, os larvicidas utilizados são os biolarvicidas obtidos de bactérias do solo que são altamente patogênicas para larvas de mosquitos como o *Bacillus sphaericus* Meyer & Neide, 1904 e o *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1909. As larvas de *Anopheles* spp são altamente susceptíveis ao *B. sphaericus* obtendo assim um controle de sucesso e ambientalmente seguro (Tadei e Rodrigues, 2002).

3.2. Controle químico com Reguladores de Crescimento de Insetos

Os reguladores de crescimento de insetos frequentemente chamados de IGRs em virtude do seu nome em inglês - *Insect Growth Regulators*, compõem a terceira geração de inseticidas sintéticos e que foram desenvolvidos inicialmente na década de 70 (Consoli e Oliveira, 1994). Estes compostos constituem um grupo bastante heterogêneo quimicamente incluindo os similares de hormônios juvenis ou hormônios antijuvenis análogos, hormônios de muda, precocenos e os inibidores da síntese de quitina (Graf, 1993).

Dentre os inibidores da síntese de quitina os derivados da benzoilfenil uréia destacam-se por sua ação inibidora na mudança de estágios em insetos por interferência na deposição de quitina (Cohen, 1987). Atualmente foram descritos e comercializados os seguintes derivados da benzoilfenil uréia: Bistrifluron, Chlorfluazuron, Flucycloxuron, Flufenoxuron, Hexaflumuron, Lufenuron, Novaluron, Noviflumuron, Penfluron, Teflubenzuron, Triflumuron e o Diflubenzuron. Estes dois últimos já são disponíveis e comercializados para empresas especializadas no Brasil para o controle de mosquitos. Triflumuron é fabricado e comercializado sob a marca Staricyde[®] pela empresa Bayer para o controle de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, sendo altamente efetivo contra suas larvas (ANVISA, 2006).

O 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)-uréia, comumente chamado de Diflubenzuron foi o primeiro derivado da benzoilfenil uréia sintetizado e utilizado no controle efetivo de várias espécies de insetos. Inicialmente foi desenvolvido para o controle de plantas daninhas, porém exibiu pobre atividade herbicida. Após serem observadas dificuldades na muda em insetos que alimentaram de folhas que receberam o tratamento com o Diflubenzuron passou-se a intensificar as pesquisas para o controle de insetos-praga na agricultura.

Desde 1982 a World Health Organization preconiza o uso de Diflubenzuron para o controle de mosquitos. No entanto o seu uso é restrito a algumas situações e ambientes. Podendo ser utilizado como um inseticida alternativo em situações onde o há indícios de resistência aos piretróides e organofosforados, e ou áreas ambientalmente não sensíveis (Floore, 2006; WHO, 2006a).

No Brasil este inseticida é comercializado na forma de pó molhável na marca Diflubenzuron 25%[®] pela empresa Champion Farmoquímico Ltda. sob o registro do

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Nº CAS 35367-38-5, na Classe / Categoria Agronômica de Acaricidas e Inseticidas, e na Anvisa no Emprego Domissanitário no controle de larvas de mosquitos, especificamente *A. aegypti*. Seu registro no Ministério da Saúde é sob o Nº 3.2025.0008.001-7. Este produto pertence a Classe Toxicológica IV (toxicidade baixa), faixa verde e Classe Ambiental III.

As características do Diflubenzuron fornecidas pela empresa detentora do registro, são: pó cristalino, de coloração branco a branco amarelado, teor de 97,2% de concentrado de princípio ativo com solubilidade em acetona e insolubilidade em água, e ponto de fusão 230-232°C. Segue em anexo quadro demonstrativo com os nomes comerciais do Diflubenzuron em todo o mundo.

O Diflubenzuron é um inseticida de baixa toxicidade para vertebrados provocando efeitos somente em altas concentrações – acima de 4.500 ppm, principalmente em aves. Porém afeta adversamente um grande número de invertebrados, como os artrópodes, por exemplo, além de fungos e todos os outros formadores de estruturas que levam em sua composição a quitina. Os insetos são especialmente sensíveis a este composto principalmente em seus estágios imaturos (Eisler, 1992).

Julin e Sanders (1978) relataram as primeiras aplicações deste inseticida com bastante sucesso na agricultura no controle de insetos pragas como lagartas de mariposas da espécie *Lymantria dispar* = *Porthetria dispar* Linnaeus, 1759 (Lepidoptera), bicudo do algodão (*Antonomus grandis* Boheman, 1843) (Coleoptera) e gafanhotos (*Hemileuca oliviae* Cockerell, 1898) (Orthoptera). Depois de detectada a sua alta atividade biológica para estes insetos, em seguida foi utilizado no controle de insetos de importância em saúde pública como mosquitos (Mulla *et al.*, 1975) e moscas (Miller *et al.*, 1975).

O Diflubenzuron é um potente inibidor da síntese de quitina provocando morte do inseto em consequência da má formação da cutícula diferente dos outros inseticidas que agem por intoxicação direta. Os estágios mais susceptíveis a ação desse inseticida são os jovens em virtude de suas sucessivas ecdises. Larvas de insetos tratados com Diflubenzuron desenvolvem cutículas que são incapazes de resistir o aumento do “turgor” ocorrido durante a ecdise e assim falha para sustentar os músculos durante a muda (Eisler, 1992). Estas larvas são, portanto, incapazes de

descartar sua própria exúvia, resultando em morte por inanição ou ruptura da nova, delicada e mal formada cutícula (Grosscurt *et al.*, 1988).

O mecanismo de ação do Diflubenzuron em insetos é relatado por este composto provocar aumento da atividade das enzimas cutícula quitinase e da cutícula fenoloxidase, produzindo uma endocutícula fraca através da redução do seu conteúdo de quitina, e uma exocutícula rígida como resultado da atividade da fenoloxidase. O Diflubenzuron ainda atua inibindo a serina protease, bloqueando assim a conversão do zimógeno quitina sintetase em uma enzima ativa (von-Eck, 1979; Post *et al.*, 1974). Neste mecanismo os últimos passos da deposição da quitina no tegumento são prejudicados (Hajjar e Casida, 1978).

Existem outras hipóteses ainda discutidas a respeito do mecanismo de ação dos derivados da benzoilfenil uréia. De um modo geral, atuam interferindo com os níveis hormonais, inibição da síntese de DNA, formação de metabólitos ativos e subsequente inibição da quitina sintetase, inibição da ligação de lipídeo-oligossacarídeo, inibição de zimógenos, ativação de quitina sintetase além de alteração crítica na sua organização espacial (Hajjar, 1985 *apud* Khebbeb *et al.*, 1997). O principal modo de ação do Diflubenzuron é por ingestão. No entanto, a ação por contato direto com o tegumento também já foi observada (Grosscurt e Jongsma, 1984).

Além da atividade larvicida o Diflubenzuron e outros derivados da benzoilfenil uréia são compostos que provocam interrupções nos processos reprodutivos. Khebbeb *et al.*, (1997) estudando a influência deste composto sobre o metabolismo lipídico de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1785 (Coleoptera) detectaram alterações quantitativas e qualitativas neste metabolismo durante a maturação sexual das fêmeas afetando diretamente na oviposição. Saxena e Koushik (1986) verificaram como efeito sub-letal a esterilidade em adultos de *Anopheles stephensi* Liston, 1901, quando as larvas foram tratadas com este composto em baixas concentrações.

Diflubenzuron é mais utilizado no controle de pragas agrícolas, de armazenagem de grãos e desfoliadoras de florestas (Julin e Sanders, 1978). Daghish e Wallbank (2005) obtiveram de 99-100% de controle das pragas de armazenagem de sorgo *Sitophilus oryzae* Linnaeus, 1763 e *Rhyzopertha dominica* Fabricius, 1792 (Coleoptera) aplicando baixas concentrações Diflubenzuron e Methoprene, um IGR similar ao do hormônio juvenil. Delgado *et al.* (1999) detectaram em Mali, na África, reduções de 29,4% em populações de gafanhotos praga (Orthoptera), que

receberam aplicações de Diflubenzuron e a redução de até 55,6% quanto este composto foi aplicado junto com *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, um importante fungo entomopatogênico. Em lagartas (*Phthorimaea operculella* Zeller, 1873) (Lepidoptera), pragas de batatas, a eficácia de Diflubenzuron foi de 65% em relação a outros inseticidas (Kroschel e Koch, 1996).

Na pecuária, o Diflubenzuron vem ganhando destaque no controle de moscas-de-chifres e ácaros pragas que causam sérias lesões, transmissão de patógenos e estresse dos animais levando a considerável perda econômica. Silva e Mendes (2002) inibiram em 100% a emergência de adultos de *Hematobia irritans* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae) com aplicação de Diflubenzuron nas concentrações de 300, 100 e 50 ppb. As pupas também mostraram serem afetadas, porém em menor intensidade sugerindo então o modo de ação por contato direto.

Em insetos de importância médica, como os vetores biológicos e mecânicos de agentes infecciosos, os IGRs tem sido utilizado no controle de baratas, simulídeos, moscas e mosquitos, além de outros insetos considerados incômodos como os quironomídeos em áreas de lagos nos Estados Unidos. Aguilera *et al.* (2001) trabalharam com ninfas de 1º estágio de *Blattella germanica* Linnaeus, 1767 (Blattodea) em condições de laboratório oferecendo iscas de alimento com Diflubenzuron e obtiveram processos de mudas deficientes nas ninfas, incapacidade de descartar a exúvia e de locomoção devido a formação de patas deficientes. Miller *et al.* (1975) e Ables (1975), em condições de laboratório, obtiveram excelente controle de moscas *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae) com redução de 98% na emergência de adultos quando trataram suas larvas com Diflubenzuron. Ginarte e Dorta (1996) trabalharam com dois hormônios juvenis análogos em moscas e concluíram que estes provocaram deformações no pupário e em asas de adultos além de diminuição da fertilidade de fêmeas oriundas de larvas tratadas com aqueles IGRs.

Segundo a WHO (1983) o controle de simulídeos (Diptera, Simuliidae) apresenta muitas dificuldades, porém os programas de controle de larvas de mosquitos com IGRs, principalmente com Diflubenzuron, têm trazido várias perspectivas em seu controle, pois através de técnicas desenvolvidas de aplicação em grandes criadouros naturais tem proporcionado uma diminuição das populações de vetor em muitas áreas do oeste da África, onde são transmissores das filárias que causam a oncocercose humana.

Ali e Mulla (1977) assinalaram redução de 96% nas populações de *Chironomus utahensis* Malloch, 1915 e de 91-100% para *Procladius* sp (Diptera, Chironomidae) quando o Diflubenzuron foi aplicado em grandes lagos artificiais da Flórida onde estas espécies são consideradas pragas por incomodarem as populações que residem ao redor daqueles lagos. Em bioensaios de laboratório com quatro IGRs realizados em larvas de *Glyptotendipes paripes* Edwards, 1929 e *Chironomus decorus* Johannsen, 1905 (Diptera, Chironomidae), o Diflubenzuron se mostrou como o mais efetivo para ambas as espécies. Experimentos em pequenos lagos artificiais também foram realizados e o Diflubenzuron controlou 80% do total de quironomídeos em 3 dias e após 6 dias obteve 98% de controle (Ali e Lord, 1980).

Mulla *et al.* (1975) aplicaram, em lagos, o Diflubenzuron nas concentrações de 0,08 0,016 ppm obtendo controle satisfatório de larvas de 3º e 4º estádios de *Culex tarsalis* Coquillett, 1896 (Diptera, Culicidae) em pelo menos 8 dias. Steelman *et al.* (1975) obtiveram controle eficaz, cerca de 100%, de *Psorophora columbiae* Dyar & Knab, 1906 (Diptera, Culicidae), um mosquito praga que se desenvolve em campos de cultura de arroz, aplicando Diflubenzuron na concentração de 0,025 ppm.

Diferentes formulações do Diflubenzuron também promovem efeito bastante satisfatório em larvas de culicídeos. As formulações pó molhável, fluido concentrado e granulado de Diflubenzuron na concentração de 0,025 ppm aplicadas em lagoas, promoveram redução em níveis consideráveis de larvas e pupas de *Anopheles franciscanus* McCracken, 1909 e *C. tarsalis* até 27 dias após o tratamento (Mulla e Darwazech, 1976).

Self *et al.* (1978) obtiveram controle altamente efetivo de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae) em tanques de drenagem em áreas residenciais de Jakarta, na África, aplicando Diflubenzuron a 1 ppm. A emergência dos adultos foi inibida em até cinco semanas, sendo que 10 dias após a aplicação foram observadas más formações nos tarsos de alguns adultos que emergiram.

Hajjar (1979) demonstrou por meio de experimentos em laboratório que o Diflubenzuron em baixa concentração - 9ppb, diminuiu o peso seco de larvas de *Culex pipiens* Linnaeus, 1768 (Diptera, Culicidae) em cerca de 27% em relação ao peso do grupo controle, atribuindo essa redução a inibição da formação da quitina provocada pelo inseticida.

A efetividade de outros IGRs no controle de mosquitos em laboratório e em campo foi demonstrada por Mulla e Darwazech (1979) em baixas concentrações (0,01, 0,05 e 0,025 ppm) inibindo o desenvolvimento larval e a emergência de adultos de *Aedes nigromaculis* Ludlow, 1906, *C. tarsalis* e *P. columbiae*. Axtell *et al.* (1979) obtiveram eficácia no controle de larvas de *Aedes taeniorhynchus* Wiedmann 1821, em tanques de armazenagem de água temporários em apenas 2 dias após tratamento com Diflubenzuron a 0,01ppm. Em lagoas de resíduos onde há intensa proliferação de *C. quinquefasciatus* a maior eficácia de controle demonstrada foi de Diflubenzuron e Methoprene nas concentrações de 0,1 e 0,2 ppm respectivamente, sendo que o Diflubenzuron foi mais efetivo por pelo menos duas semanas (Axtell e Edwards, 1980).

Martins e Silva (2004) concluíram que Diflubenzuron inibiu a ecdise em todos os estágios larvais de *A. aegypti* tanto em condições de laboratório como em campo. Os autores não encontraram diferenças significativas entre os diferentes tipos de criadouros deste mosquito em campo e assinalaram a grande importância deste inseticida no controle desta espécie.

A atividade ovicida dos derivados da benzoilfenil uréia foi demonstrada para simúlideos *Simulium* sp. (Diptera, Simuliidae), no controle de coleópteros da família Curculionidae principalmente o gênero *Anthonomus* e mosquitos como *C. quinquefasciatus* (WHO, 1983). Miura e Takahashi (1979) demonstraram a atividade ovicida do SIR 8514, também derivado da benzoilfenil uréia, que resultou em diminuição na taxa de eclosão de ovos, assinalando anormalidades no momento da eclosão e má formação de embriões de *C. quinquefasciatus*. A maior taxa de inviabilidade foi alcançada em ovos de embriões jovens do que naqueles onde a embriogênese já havia se completado. Adultos que se alimentaram com iscas açucaradas contendo o inseticida demonstraram ser afetados somente na viabilidade de seus ovos.

Saxena e Koushik (1986) estudando os efeitos do Diflubenzuron sobre a viabilidade e fecundidade de ovos de *A. stephensi* encontraram que machos oriundos de larvas de 4^o estágio tratados pelo inseticida e cruzados com fêmeas não tratadas, tiveram redução na taxa de ovos em 28% e que o composto afeta o potencial reprodutivo em fêmeas apenas em altas concentrações - 0,001 ppm e 0,005 ppm.

O modo de ação dos derivados da benzoilfenil uréia foi demonstrado por meio de observações histopatológicas em larvas onde estes compostos têm revelado sérios distúrbios na formação da cutícula em resposta ao potencial que estes compostos representam na atividade de inibição da quitinase (WHO, 1983).

Alsystin, um derivado da benzoilfenil uréia, afetou o desenvolvimento e secreção da cutícula em larvas de *C. pipiens pipiens*. Foi demonstrado por meio de cortes histológicos que larvas de 3º e 4º estádios mortas pelo tratamento com este inseticida tiveram significativa redução na espessura do tegumento em relação ao grupo controle, onde os autores destacaram este composto como um potencial regulador de quitina (Rehimi e Soltani, 1999).

Borges *et al.* (2004) apontaram alterações morfológicas internas e externas em larvas de 3º estágio de *A. aegypti* mortas pela ação do Diflubenzuron nas concentrações 0,1 e 1 ppm. Descreveram essas larvas como apresentando a superfície corporal destruída, com aspecto escurecido e segmentos corporais indefinidos. Identificaram por meio de técnicas histológicas o espessamento da cutícula e abaixo desta, alta atividade celular. No tubo digestório foi observada a presença de vacúolos citoplasmáticos e grande quantidade de secreção na superfície apical das células do mesêntero. Alterações no corpo gorduroso da larva também foram detectadas.

De um modo geral a fauna não alvo pode ser afetada pelos IGRs uma vez que existem no ambiente aquático diversos artrópodes também outros organismos formadores de quitina. Esses organismos são insetos, crustáceos, copépodes, ácaros aquáticos entre outros.

Desta forma, percebe-se o enorme potencial inseticida que os IGRs possuem, principalmente aqueles do grupo da benzoilfenil uréia a exemplo do Diflubenzuron que desde suas descrições mais primárias vem revelando excelente capacidade em suprimir populações de insetos praga tanto agrícola quanto de importância médica apresentando alta especificidade e toxicidade além de oferecer segurança ambiental e para vertebrados.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta e manejo dos mosquitos

As coletas foram realizadas na Zona Leste do município de Manaus, Estado do Amazonas. Foram selecionadas duas áreas no distrito do Zumbi, são elas: 1) Madeireira Portela situada na estrada do Puraquequara (3°3'8,63''S e 59°53'37,52''W) e 2) Sítio do Sr. Rayfran situado no ramal do Brasileirinho (3°2'10,47''S e 59°52'17,22''W) (Fig.1). Essas áreas foram escolhidas porque apresentavam alta densidade populacional da espécie *A. darlingi*. São áreas caracteristicamente rurais, apresentando vegetação secundária e algumas plantações frutíferas, as residências ficam localizadas próximas aos igarapés que sofrem influência dos pulsos de seca e cheia do rio Amazonas. Tais igarapés se encontram parcialmente represados com finalidade de tanques de crescimento e engorda de peixes, possuindo vegetação nas margens, presença de macrófitas, águas límpidas o que torna um ambiente favorável para criadouro de formas imaturas de anofelinos.

Foram coletadas fêmeas adultas de *A. darlingi* entre os horários de 18 e 21 horas nos ambientes peri e intradomiciar, utilizando-se o método de atração humana com proteção estando o capturador devidamente protegido para prevenir a hematofagia. Esta metodologia é a mais eficaz em relação ao tempo de coleta, obtendo-se exemplares vivos em perfeito estado para obtenção de desovas e alta densidade de mosquito, uma vez que esta espécie apresenta acentuada antropofilia. Os mosquitos capturados em campo foram armazenados em copos parafinados e acondicionados em caixas de poliestireno com papel umedecido com água a fim de manter a umidade suficiente até a chegada no insetário do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

No laboratório, os mosquitos foram submetidos à alimentação sanguínea em patos domésticos (*Cainara moschata*) e em seguida transferidos individualmente para copos plásticos contendo papel de filtro umedecido que serve com substrato para oviposição. Os copos plásticos contendo as fêmeas foram mantidos em caixas de poliestireno e após esse período foram retiradas as desovas que foram transferidas para outro copo plástico com proteção lateral de papel de filtro para

aguardar a eclosão das larvas. A identificação das espécies foi realizada com o auxílio de chaves dicotômicas de Gorhan *et al.* (1967), Fahran (1980) e Consoli e Oliveira (1994).

Após a eclosão as larvas foram transferidas para cubas esmaltadas e mantidas para o desenvolvimento. As larvas foram criadas em água de poço artesiano, previamente armazenada em frascos plásticos no insetário para equilíbrio da temperatura. Foi adicionado alimento líquido de acordo com Santos *et al.* (1981) e Scarpassa e Tadei (1990), cuja composição consiste de um grama de pó de fígado para 8 gramas de farinha de peixe diluídos em 500 ml de água. Em cada cuba foi adicionado 2 ml desse alimento e a água foi trocada a cada dois dias. As formas imaturas foram criadas até os estádios necessários para cada tipo de teste realizado neste trabalho.

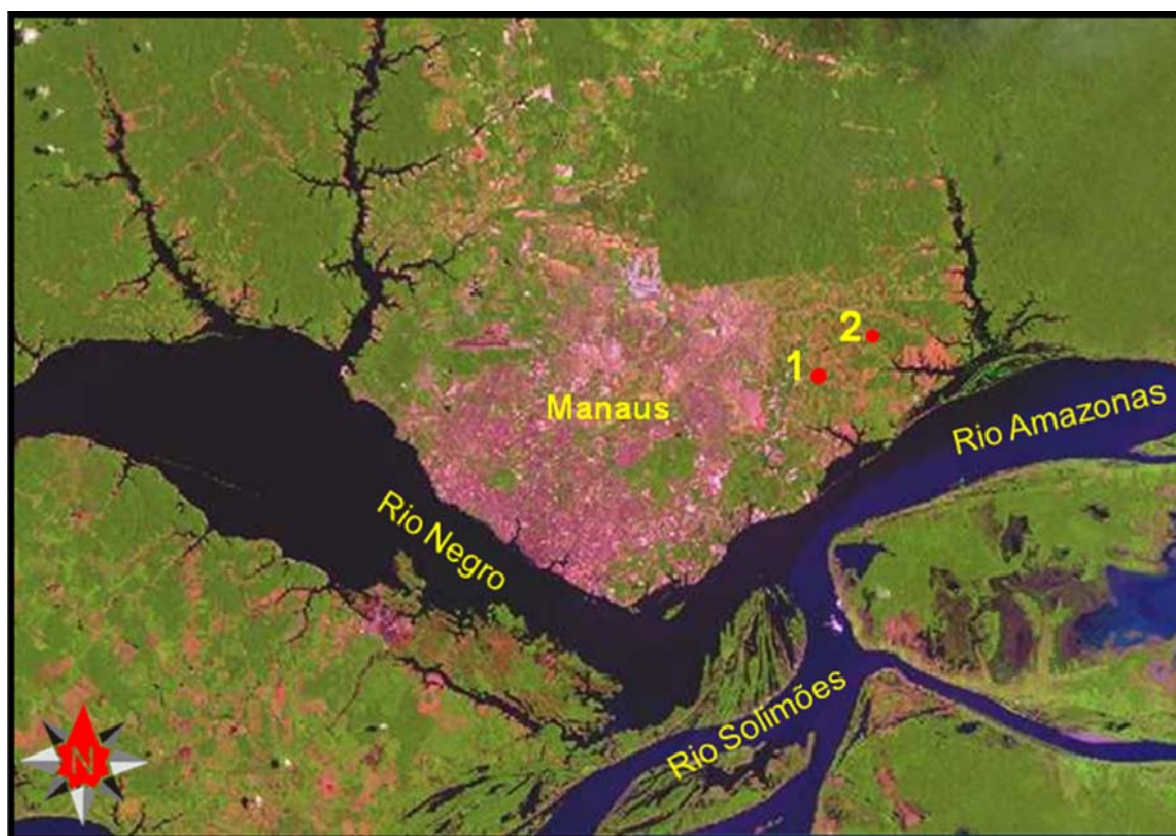


Figura 1. Fotografia de satélite destacando os dois pontos de coleta de *Anopheles darlingi* na estrada do Puraquequara (1) e no Brásilerinho (2), localizados na região periurbana de Manaus, Estado do Amazonas (Fonte: Embrapa).

Todo o processo de manejo e manutenção dos mosquitos no insetário e a realização dos bioensaios foram feitos em temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa de aproximadamente 85% e fotofase de 12 horas.

4.2. Preparo das soluções do inseticida Diflubenzuron

Inicialmente foi feita uma solução estoque do inseticida Diflubenzuron a ser utilizada em todos os testes para além de facilitar as sucessivas diluições também evitar o contato direto do manipulador com o princípio ativo e o solvente que são tóxicos. O ingrediente ativo do Diflubenzuron - (1-[4-clorofenil]-3-[2,6-difluorobenzoil]-uréia) - foi obtido pela empresa Champion Farmoquímico LTDA.

Pesou-se 50 mg do princípio ativo em balança analítica de precisão e diluídos em 10 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). Esta solução estoque a 5.000 ppm (partes por milhão) foi armazenada em frasco âmbar e mantida à temperatura ambiente, em torno de 25°C . A partir desta solução foram feitas diluições sucessivas até alcançar as concentrações desejadas em cada etapa do trabalho.

4.3. Bioensaios para avaliar a susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron

Para avaliação de susceptibilidade da ação inibidora do Diflubenzuron foram utilizadas larvas no início do 3^o estágio. Foram estabelecidas as seguintes concentrações fixas: 0,1 , 0,2 , 0,4 , 0,6 , 0,8 e 1,0 ppm e o controle que recebeu apenas o DMSO, sendo as larvas acompanhadas diariamente até atingir a mortalidade total. Os bioensaios seguiram os critérios de Dulmage *et al.* (1990). Cada concentração foi preparada em cinco réplicas em copos descartáveis contendo 50 ml de água destilada mais 20 larvas e o alimento, e o experimento foi repetido em três momentos diferentes.

Diariamente foram removidas as exúvias e larvas mortas e foram registrados os estádios em que as larvas se encontravam. O critério estabelecido para definir as mudanças de estágio foi a presença da exúvia que na maioria das vezes se encontrava aderida à larva morta.

4.4. Bioensaios para obtenção das Concentrações Letais - CL50 e CL90 - de Diflubenzuron para *Anopheles darlingi*

A partir dos resultados dos bioensaios de susceptibilidade das larvas de 3º estágio, uma outra série de bioensaios foi conduzida para obtenção das concentrações letais de Diflubenzuron para *A. darlingi*. O método utilizado para se obter as concentrações foi aquele descrito por Mulla *et al.* (1974) com algumas modificações.

No decorrer destes bioensaios foram utilizados potes plásticos medindo 11,4 x 15,58 x 11,0 cm com a superfície interior lixada para permitir um pouso com aderência para os adultos após emergência e com espaço suficiente para realizar vôo. Os potes plásticos foram fechados com tecido filó e presos com auxílio de uma liga de borracha. No centro da cobertura de filó foi feita uma abertura para a entrada do capturador entomológico no momento da leitura e para remoção dos adultos emergidos. A abertura era fechada com um chumaço de algodão (Fig.2).

Em cada concentração foram utilizadas 200 ml de água destilada, 40 larvas jovens de 4º estágio, alimento para larvas e a dose de inseticida para a respectiva concentração. No controle os procedimentos foram da mesma forma, porém foi adicionado apenas o DMSO. Os bioensaios foram repetidos em três momentos distintos.

Diariamente foram realizadas as leituras onde foram removidas larvas, pupas e adultos mortos e os adultos vivos. Foram considerados adultos vivos apenas aqueles que conseguiram apólice total da exúvia. Para os indivíduos mortos na fase de pré-pupa foi quantificada como pupa, e para os indivíduos mortos no momento em que se inicia a emergência do adulto foi quantificado como adulto.

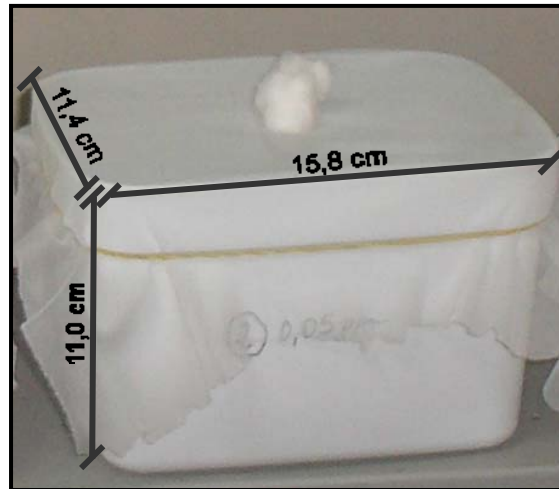


Figura 2. Pote plástico, com suas dimensões, utilizado nos bioensaios para obtenção das concentrações letais, CL50 e CL90, do Diflubenzuron para *Anopheles darlingi*.

4.5. Bioensaios de susceptibilidade de pupas ao Diflubenzuron

Os testes de susceptibilidade das pupas foram realizados apenas com uma concentração, a 0,1 ppm que foi escolhida em virtude dos resultados obtidos em bioensaios preliminares com concentrações menores.

As pupas foram divididas em dois grupos: 1) pupas jovens, com até 20 minutos após a ecdise e 2) pupas de 1 dia, com 24 horas após o mesmo fenômeno. O experimento foi realizado em copos contendo 50 ml de água destilada, a correspondente dose de inseticida para atingir a concentração fixa e 10 pupas da mesma idade com três réplicas e o grupo controle da mesma idade que recebeu apenas o DMSO. Neste experimento os copos receberam uma cobertura de tecido filó para evitar a dispersão quando da emergência dos adultos. O experimento foi repetido em três momentos diferentes.

Diariamente foram observados os eventos decorrentes sendo removidas pupas e adultos mortos e os adultos vivos. Foram quantificados como vivos apenas os adultos que estavam completamente liberados da exúvia. O experimento foi conduzido até a última pupa ou adulto morrer ou o último adulto emergir completamente.

4.6. Testes de tempo de exposição de L4 a CL50 de Diflubenzuron

Foram avaliados dois períodos de exposição, 24 e 48 horas, das larvas de 4º estágio jovem a CL50 de Diflubenzuron, 0,006ppm.

O experimento, por horário, foi conduzido em copos plásticos contendo 50 ml de água destilada, alimento, 10 larvas e a dose correspondente do inseticida para a concentração referida, em cinco réplicas. Cada réplica teve um controle que recebeu os mesmos tratamentos com exceção do inseticida, recebendo apenas o DMSO. Os experimentos foram repetidos em três diferentes momentos.

As larvas permaneceram somente o período respectivo de exposição, em seguida foram transferidas individualmente para lâminas escavadas onde foram lavadas três vezes em água destilada e finalmente transferidas para copos com 50 ml de água destilada e alimento. Os copos foram cobertos com tecido filó e diariamente foram removidos e quantificados os indivíduos mortos e adultos emergidos até atingir o número total de indivíduos expostos.

4.7. Sintomatologia e alterações morfológicas das larvas de 3º e 4º estágio expostas à CL50 do Diflubenzuron

A sintomatologia foi definida neste trabalho como a observação e descrição dos sintomas e alterações morfológicas externas que as larvas e subseqüentes estágios de *A. darlingi* apresentaram em resposta à ação inibidora do Diflubenzuron.

Foram realizados dois experimentos, sendo um com larvas velhas de 3º estágio e o outro com larvas velhas de 4º estágio. Cada experimento consistiu de três réplicas sendo cada uma contendo 20 larvas em copos com 50 ml de água destilada alimento e a CL50 do Diflubenzuron 0,006 ppm. No experimento com larvas de 4º estágio os copos receberam uma cobertura com tecido filó para manter os possíveis adultos que emergissem.

A sintomatologia em cada experimento foi observada a olho nu e em microscópio estereoscópico nos seguintes intervalos de leitura: 01, 05, 10 e 15

minutos e 01, 02, 04, 10, 15, 20, 24, 30, 35, 40, 45, 48, 55, 60, 65 e 72 horas, após o início do experimento.

As características comportamentais observadas nas larvas foram movimentos natatórios antes, durante e depois da ecdise, movimentos giratórios da cabeça e das peças bucais, a alimentação e a resposta a estímulos como toque com estilete. As alterações morfológicas externas foram observadas nas regiões do corpo cabeça, tórax e seus apêndices (adultos) e abdome.

5. Análise dos dados

5.1. Bioensaios para avaliar a susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron

Os valores de mortalidade foram normalizados pela transformação do $\arcsen \sqrt{x}$ onde x é a proporção entre os indivíduos pelo total de indivíduos ao início do experimento. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância – ANOVA – de um fator (concentração do Diflubenzuron) com medidas repetidas no tempo (intervalos de 24 horas).

5.2. Bioensaios para obtenção das Concentrações Letais - CL50 e CL90 - de Diflubenzuron para *Anopheles darlingi*

Os dados de mortalidade nos grupos tratamentos foram corrigidos quando a mortalidade no controle foi $\geq 5\%$ e $\leq 20\%$ pela fórmula de Abbot (1925), conforme Mulla *et al.* (1974).

$$\text{Mortalidade corrigida \%} = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100$$

Onde: T = número de indivíduos vivos no tratamento após bioensaio;
C = número de indivíduos vivos no controle após bioensaio.

O cálculo das concentrações letais para matar 50% (CL50) e 90 % (CL90) das larvas foi realizado por meio da análise de *probit* com o auxílio do programa Polo PC (LeOra Software, 1987), a partir dos dados de mortalidade obtidos nos bioensaios, considerando a estimativa da potência: $g \leq 0,5$. Os dados foram plotados no programa seguindo as recomendações do guia do usuário no qual preconiza uma classificação de doses, portanto não sendo utilizadas todas as concentrações testadas para a análise.

A partir dos dados obtidos pelo programa foi montado um gráfico comparativo entre a mortalidade esperada e obtida das concentrações e os *probits* gerados pela equação de regressão:

$$y = (\alpha + 5) + \beta \cdot \log x$$

Onde: $y = probit$;
 α = coeficiente linear (*parameter* dose ppm);
 β = coeficiente angular (*slope*);
 x = concentração.

Os valores percentuais de mortalidade de larvas, pupas e adultos entre as diferentes concentrações de Diflubenzuron foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis em nível de 95% de confiabilidade.

5.3. Bioensaios de susceptibilidade de pupas e de tempo de exposição de larvas ao Diflubenzuron

Os valores de mortalidade nos testes de susceptibilidade de pupas e de tempo de exposição das larvas foram transformados por $\arcsen \sqrt{x}$ e em seguida submetidos a ANOVA de uma entrada, posteriormente aplicou-se um teste de contraste de medidas de HSD para números diferentes de amostras.

6. Resultados

6.1. Bioensaios de susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron

Os valores percentuais da sobrevivência de larvas nas concentrações de Diflubenzuron em relação aos intervalos observados estão representados na Tabela 1. Diflubenzuron foi bastante efetivo para as larvas de 3º estágio promovendo mortalidade de 100% em todas as concentrações verificadas. Houve diferença entre os tratamentos e o controle ($P < 0,001$). Não houve diferenças entre as demais concentrações ($F_5 = 23,5234$; $P > 0,05$). Todos os intervalos observados foram diferentes ($F_9 = 335,219$; $P < 0,001$) com exceção dos intervalos 144 e 168 horas. As retas da queda de sobrevivência nas concentrações e no controle em relação aos intervalos observados podem ser visualizadas no gráfico da Figura 3.

Entre 24 e 48 horas iniciais houve mortalidade de larvas no 3º estágio sendo que estas não apresentavam sinais de início da ecdise. A partir das 72 horas começou a ser observado a mortalidade das larvas no momento da ecdise as quais, em sua maioria, morreram presas à exúvia.

Tabela 1. Percentuais de sobrevivência, em horas, das larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron, em condições de laboratório.

Concentração	Intervalos Observados (horas)										
	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
Controle	100,00	99,33	98,33	91,67	88,00	84,33	83,00	83,00	83,00	83,00	83,00
0,1 ppm	100,00	86,00	72,67	59,00	46,67	35,33	22,67	16,67	06,33	00,67	00,00
0,2 ppm	100,00	89,67	79,67	63,00	54,00	37,67	19,00	12,67	05,67	00,67	00,00
0,4 ppm	100,00	92,00	77,33	64,33	48,00	38,67	16,00	11,00	04,33	00,67	00,00
0,8 ppm	100,00	87,33	67,33	52,00	39,00	30,33	14,33	07,00	02,33	00,33	00,00
1,0 ppm	100,00	91,67	70,33	52,67	38,00	22,67	10,33	05,67	02,33	01,33	00,00

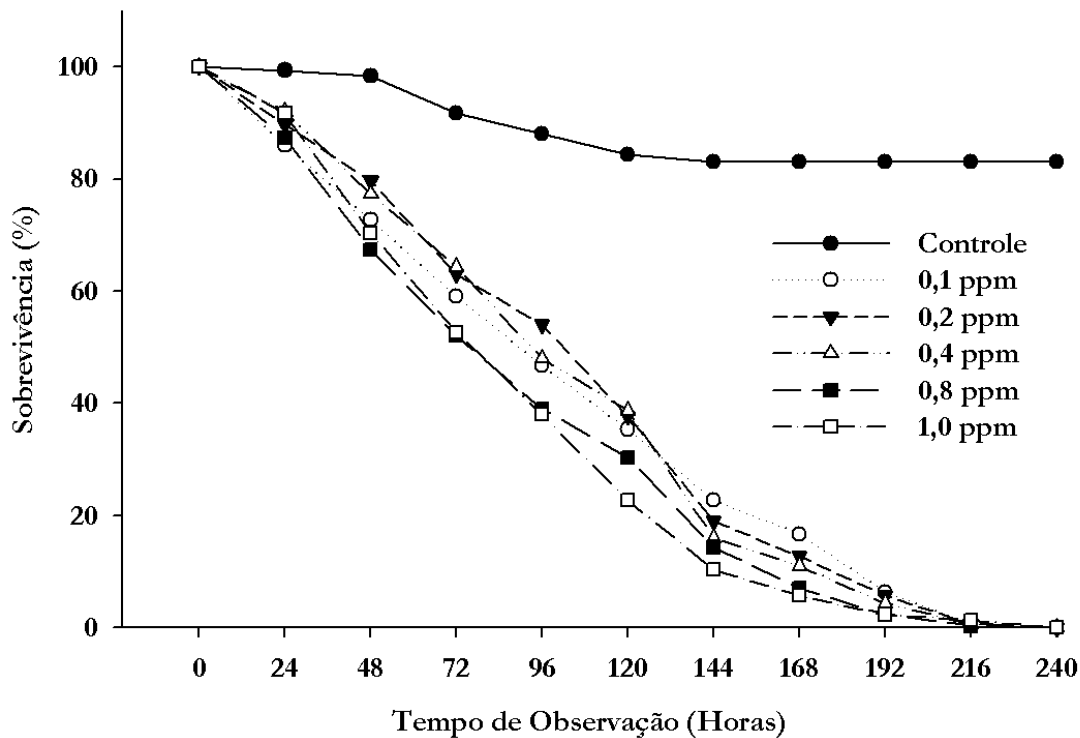


Figura 3. Representação gráfica da sobrevivência de larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas a diferentes concentrações de Diflubenzuron, em condições de laboratório.

6.2. Bioensaios para obtenção das concentrações letais - CL50 e CL90 - de Diflubenzuron para *Anopheles darlingi*

As concentrações testadas de Diflubenzuron nos bioensaios estão representadas na Tabela 2 e mostrou-se altamente efetivo contra as larvas de 4º estágio de *A. darlingi*. Das onze concentrações verificadas, as seis mais altas - 0,01 a 0,1 ppm – inibiram 100% de emergência de adultos. As demais, em ordem decrescente, inibiram cada vez menos, porém com valores de inibição satisfatórios (81,2% a 33,3%), sendo a concentração de 0,001 ppm a que apresentou a menor inibição de emergência, cerca de 21,5%.

O valor da concentração letal mediana de Diflubenzuron para as larvas de *A. darlingi* e os intervalos de confiança ao nível de 5% de probabilidade estão expostos na Tabela 3. As concentrações letais CL50 e CL90 obtidas nos bioensaios foram respectivamente 0,006 e 0,013 ppm. Esse resultado mostra a alta efetividade da ação do Diflubenzuron sobre as larvas do anofelino. Nos valores próximos à CL50 - 0,005 e 0,007 ppm - vislumbraram-se diversos eventos de mortalidade tanto em larvas, como em pupas e adultos, o que permitiu que ocorressem eventos de ecdise

na população exposta, porém no final culminando com a morte significativa de indivíduos.

Os resultados apresentaram normalidade em relação aos índices utilizados pelo Polo PC com significativo intervalo de confiança ($g = 0,12$ e qui-quadrado (χ^2) = 7.98, indicando assim que os dados se ajustaram ao modelo do *probit*. A reta de regressão linear representada na Figura 4 mostra que as diferenças dos dados obtidos em relação aos esperados estão muito próximos, indicando assim o ponto da CL50 entre o valor mediano dos *probits* no eixo y, ou seja, entre as concentrações mais baixas.

Tabela 2. Concentrações utilizadas nos bioensaios para obtenção das CL50 e CL90 de Diflubenzuron para larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* com os percentuais de Inibição de Emergência (IE) e correção pela fórmula de Abot (1925).

Concentrações (ppm)	n	IE (%)	Correção Abbot (%)
0,1	120	100,0	100,0
0,09	120	100,0	100,0
0,07	120	100,0	100,0
0,05	120	100,0	100,0
0,03	120	100,0	100,0
0,01	120	100,0	100,0
0,009	120	85,0	81,2
0,007	120	70,0	67,5
0,005	120	46,6	38,0
0,003	120	40,0	33,3
0,001	120	33,3	21,5

Tabela 3. Concentrações letais CL50 e CL90 de Diflubenzuron para larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* em condições de laboratório com Intervalo de Confiança (IC) de 95% ($g = 0,12$; $\chi^2 = 7.98$)

CL	Concentração letal	
	ppm	IC 95%
50	0,006	0,005 - 0,007
90	0,013	0,010 - 0,019
Equação de regressão		$y = 8,46 + 5 + 3,79 * \log x$

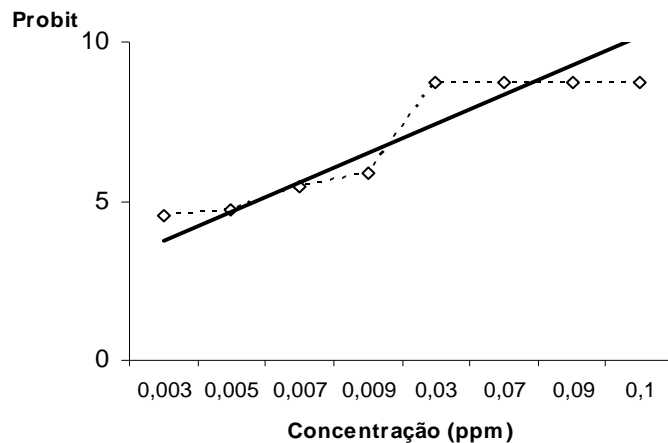


Figura 4. Retas de regressão linear dos *probits* observados nos bioensaios com Diflubenzuron contra as larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi*, em condições de laboratório (---◇---: observado; —: esperado)

A mortalidade de larvas, pupas e adultos em todas as concentrações testadas nos bioensaios estão dispostos nos gráficos da Figura 5 A, B e C, respectivamente. Houve diferenças significativas entre as concentrações verificadas e a mortalidade de larvas, pupas e de adultos. Observou-se que o aumento de mortalidade das larvas foi proporcional ao aumento das concentrações. Esse dado indica a alta susceptibilidade das larvas ao inseticida. Entre as concentrações de 0,001 e 0,009 ppm a mortalidade variou de 1 a 35% do total de indivíduos expostos, permitindo assim que significativa quantidade de indivíduos conseguisse atingir o estágio seguinte de pupa. Na concentração 0,01 ppm a mortalidade foi de 64%, nas demais concentrações, a mortalidade foi alta, entre 84 e 97%.

Analisando a mortalidade pupal (Fig. 5B) percebe-se claramente que os poucos indivíduos que conseguiram sobreviver a fase de larva entre as concentrações 0,03 a 0,1 ppm, morreram (mortalidade entre 3 a 16%). Comparando-se a concentração 0,09 ppm dentre estes intervalos, no gráfico anterior (Fig. 5A) percebe-se que embora tenha obtido a menor mortalidade larval, na fase de pupa (Fig. 5B) a mortalidade foi maior, atingindo o total de 100% na fase adulta (Fig.5C). A maioria desses indivíduos morreu na fase de pré-pupa, mas houve indivíduos que morreram com a pupa completamente formada, porém sem completar apólice da exúvia. Entre as concentrações 0,001 e 0,01 ppm a mortalidade variou de 17 a 38%, reduzindo assim as chances de haver emergência de adultos. Entre 0,001 e 0,009 ppm houve mais mortalidade em pupas completamente formadas, mas presas a exúvia. Pupas mortas que completaram a apólice também foram observadas.

A mortalidade de adultos somente foi observada entre as concentrações 0,001 e 0,009 ppm (Fig. 5C), ou seja, aquelas concentrações que estão próximas à

CL50 e à CL90, que naturalmente permitiriam a sobrevivência de indivíduos na população. Entre essas concentrações a mortalidade foi de 3 a 15% apresentando uma relativa tendência de aumento em resposta ao aumento da concentração. Esses dados mostram que mesmo o fato da larva apresentar menor susceptibilidade em concentrações mais baixas, existe a possibilidade de haver mortalidade em estágios subseqüentes, pupa ou adulto.

6.3. Bioensaios de susceptibilidade de pupas ao Diflubenzuron

Os resultados referentes aos testes de susceptibilidade de pupas encontram-se na Tabela 4. Diflubenzuron apresentou alta atividade pupicida na concentração avaliada tanto para as pupas jovens quanto para as de 1 dia, com uma inibição de emergência mediana de 60 a 100%. Houve diferenças significativas entre os percentuais de inibição de emergência das pupas jovens e das de 1 dia e em relação aos seus controles ($P \leq 0,05$).

As pupas jovens foram mais susceptíveis à ação inibitória do inseticida o qual produziu inibição de emergência acima de 50% em todas as réplicas. Observou-se neste tratamento que houve mais mortalidade pupal do que de adultos, ocorrendo esta mortalidade após 24 horas de exposição até aproximadamente 55 horas após o início do experimento. Já as pupas com idade de 1 dia foram mais resistentes com inibição de emergência de 20% a 100%, no entanto com significativa mortalidade. A mortalidade neste tratamento ocorreu, principalmente, quando iniciou o processo da ecdise onde foram observados adultos mortos, em diferentes graus de emergência, realizando a apólice da exúvia da pupa até aqueles que ficaram presos somente pelos tarsos posteriores e acabaram morrendo.

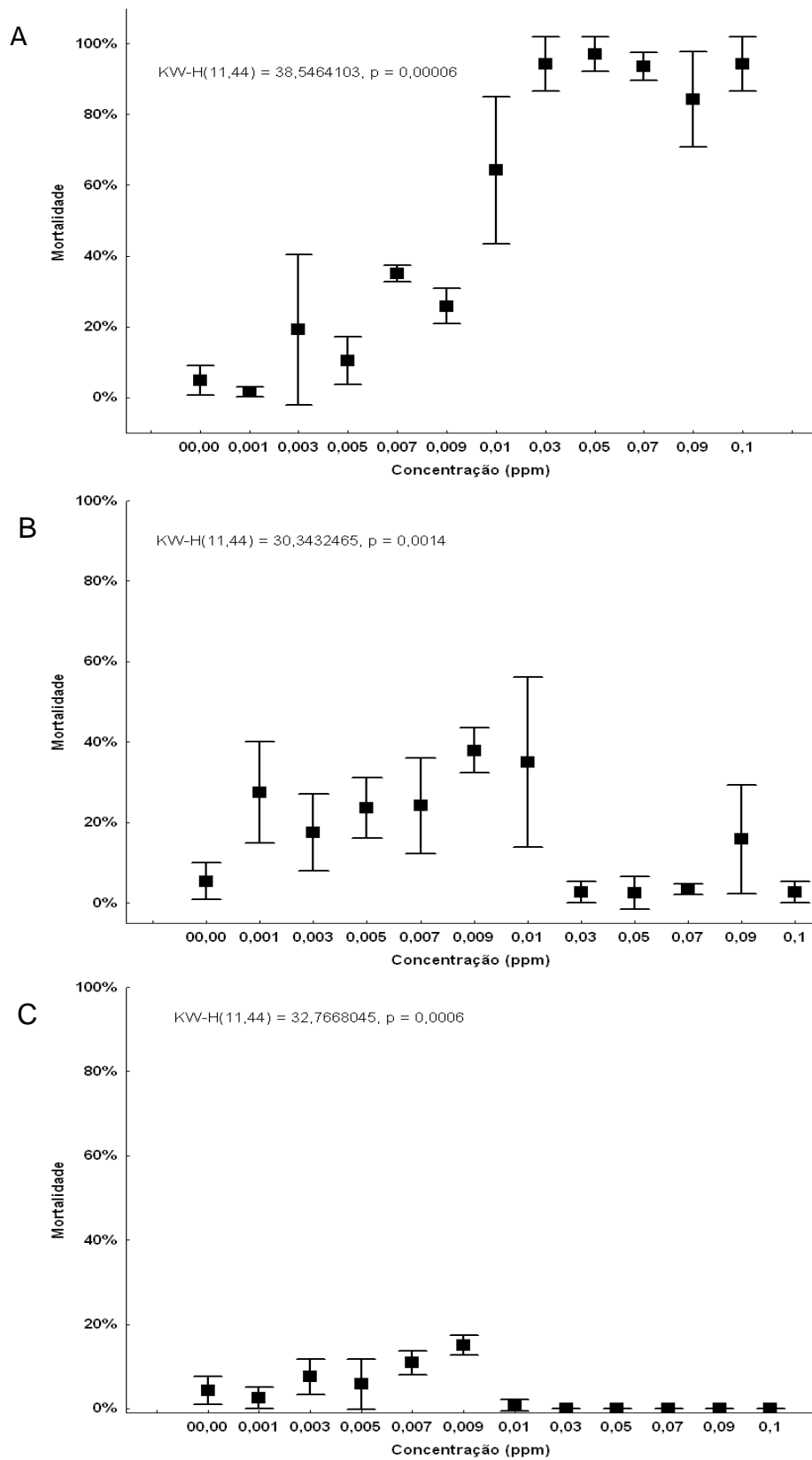


Figura 5. Representações gráficas da mortalidade nos estágios de larva (A), pupa (B) e adulto (C) entre as concentrações de Diflubenzuron testadas nos bioensaios contra as larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* (KW-H: teste de Kruskal-Wallis ou teste H; ■: média de mortalidade; $\bar{\pm}$: \pm desvio padrão).

Tabela 4. Susceptibilidade de pupas jovem e de 1 dia de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração 0,1 ppm, em condições de laboratório.

Pupas	Inibição de emergência (%)		
	Mediana*	Mínimo	Máximo
Jovem	100,0a	60,0	100,0
Controle	20,0bc	10,0	20,0
1 dia	60,0b	20,0	100,0
Controle	00,0d	00,0	10,0

*letras iguais não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade.

6.4. Bioensaios: tempo de exposição de larvas de 4º estágio à CL50 de Diflubenzuron

Os dados referentes aos testes de exposição de 24 e 48 horas das larvas de 4º estágio ao Diflubenzuron estão dispostos na Tabela 5. Apesar da concentração 0,006 ser a concentração mediana para as larvas de *A. darlingi*, produziu 100% de mortalidade em algumas réplicas. Não houve diferenças ($P > 0,005$) entre os dois períodos de exposição, apenas em relação aos controles. Os dois períodos tiveram inibição de emergência mediana de 90%. Nos indivíduos expostos pelo período de 24 horas a inibição de emergência variou de 50 a 100%. Já naqueles expostos por 48 horas, a inibição de emergência foi de 70 a 100%. A mortalidade ocorrida em ambos os tratamentos foi, em sua maioria, na muda de larva para pupa, porém, mortalidade na muda de pupa para adulto também foi observada.

Tabela 5. Susceptibilidade de larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* expostas por 24 e 48 horas ao Diflubenzuron na concentração 0,006 ppm (CL50), em condições de laboratório.

Tempo de exposição (horas)	Inibição de emergência (%)		
	Mediana	Minimo	Máximo
24	90,0a	50,0	100,0
Controle	01,0b	00,0	10,0
48	90,0a	70,0	100,0
Controle	20,0b	20,0	20,0

*letras iguais não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade.

6.5. Sintomatologia e alterações morfológicas das larvas de 3º e 4º estágio expostas à CL50 de Diflubenzuron

6.5.1. Larvas de 3º estágio

A mortalidade nos intervalos de leitura e os percentuais de inibição de emergência para as larvas de 3º estádios estão dispostos na Tabela 6. As larvas de 3º estágio foram altamente susceptíveis ao Diflubenzuron na concentração 0,006 ppm com média de inibição de emergência de 77%. A frequência dos movimentos do corpo e estruturas está disponível na Tabela 7, onde se podem observar os resultados obtidos sobre a evolução dos movimentos natatórios, giratórios da cabeça, peças bucais e de resposta a estímulo, que foram definidos no item 1 como normal e 2 como lento.

Os movimentos giratórios da cabeça mantiveram-se em todo o curso do experimento com exceção apenas quando a larva inicia o processo de ecdise. No entanto, houve uma certa diminuição gradual nestes movimentos a partir das 20 horas. Nas primeiras 18 a 20 horas após o início do experimento foi observado o alongamento na região do cérvix (Figuras 6A e B), que é o conectivo da região cefálica com o tórax. Com este alongamento havia maior dificuldade dos músculos de sustentar o peso da região cefálica que se apresenta bastante esclerotizada. Por esse lado a larva permanecia com o tórax e abdome na posição natural (paralela à coluna da água), mas com dificuldade de manter a cabeça nesta posição, permanecendo com ela voltada para o fundo do recipiente. Os movimentos das peças bucais não foram interrompidos durante este fenômeno, observou-se apenas diminuição nesta atividade a partir da leitura de 20 horas. As larvas continuaram se alimentando naturalmente, porém com menor intensidade do que no controle onde praticamente não foi observado restos do alimento. Os movimentos natatórios foram alterados, mas em menor intensidade, mesmo quando estas foram tocadas com estiletos ou leves toques no copo do experimento. Não foram observadas alterações na placa espiracular tão pouco mudanças da coloração antes ou durante a morte.

Aproximadamente 40 horas desde a exposição ao inseticida (Tabela 7) algumas larvas iniciaram o processo de ecdise. Neste momento, a abertura da linha ecdisial (Figuras 6B e C) na cabeça foi normal em todos os indivíduos que morreram

neste processo. Houve gradação na tentativa de realizar a apólice da exúvia. Algumas larvas tiveram mortalidade logo no início do processo com obstrução do novo tegumento e extravasamento de tecido não conseguindo escapar da exúvia da cabeça. Um segundo momento foi possível conseguir realizar o escape da cabeça, porém morreram com extravasamento dos tecidos na região torácica. Nestes últimos, a região torácica apresentava um tegumento bastante delgado e com acentuada dilatação. Finalmente, um terceiro momento no qual algumas larvas conseguiram completar a apólice, mas os dois últimos seguimentos abdominais permaneceram presos à exúvia. As larvas tentaram realizar os movimentos natatórios, mas com lentidão, para completar a total separação da exúvia executando os movimentos entre a superfície e o fundo do copo, por fim morriam no fundo do recipiente presas a exúvia

Tabela 6. Mortalidade observada nos intervalos de leitura e Inibição de Emergência (IE) no experimento de sintomatologia com larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração de 0,006 ppm (CL50).

Intervalos de leitura	Mortalidade observada			
	Copo 1	Copo 2	Copo 3	Controle
01 min	0	0	0	0
05 min	0	0	0	0
10 min	0	0	0	0
15 min	0	0	0	0
01 h	0	0	0	0
02 h	0	0	0	0
04 h	0	0	0	0
10 h	0	0	0	0
15 h	0	0	0	1
20 h	0	0	0	0
24 h	1	0	1	0
30 h	0	1	0	0
35 h	0	0	0	0
40 h	0	0	0	0
45 h	3	6	5	0
48 h	5	4	5	1
55 h	0	1	3	0
60 h	1	0	2	0
65 h	3	3	0	0
72 h	1	0	1	0
Total	14	15	17	2
IE (%)	70	75	85	10

min = minuto; h = hora

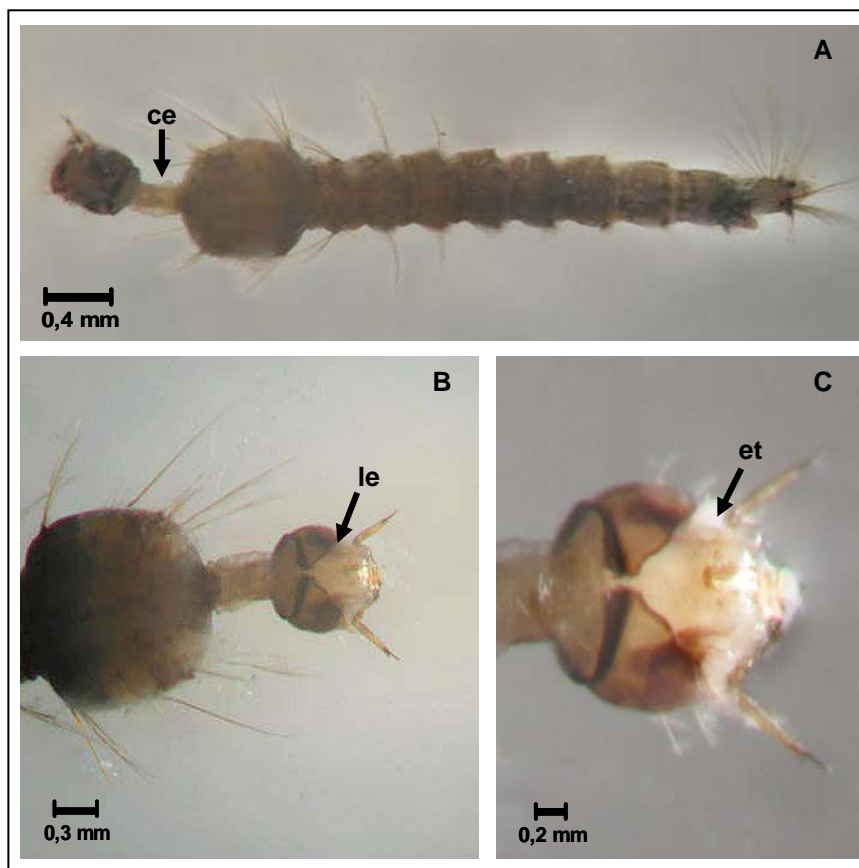


Figura 6. Alterações morfológicas observadas em larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron. A: início da ecdise. Detalhe do sintoma de alongamento da região do cervix; B: início da apólice da região cefálica; C: extravasamento de tecido da região cefálica. ce: cervix; le: linha ecdicial; et: extravasamento de tecido.

Tabela 7. Frequência de movimentos das larvas de 3º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração 0,006 ppm (CL50), em condições de laboratório.

Intervalos de leitura	Larvas observadas		Movimentos			
	Vivas	Mortas	Natatórios	Giratórios da cabeça	Peças bucais	Resposta a estímulos
01 min	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
05 min	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
10 min	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
15 min	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
01 h	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
02 h	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
04 h	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
10 h	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
15 h	60	0	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
20 h	60	0	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
24 h	58	2	2(96%)	2(96%)	2(96%)	2(95%)
30 h	57	1	2(96%)	2(96%)	2(96%)	2(95%)
35 h	57	1	2(96%)	2(96%)	2(96%)	2(95%)
40 h*	57	1	2(96%)	2(96%)	2(96%)	2(95%)
45 h*	43	14	2(95%)	2(95%)	2(95%)	2(77%)
48 h*	29	14	2(93%)	2(93%)	2(93%)	2(53%)
55 h	25	4	2(92%)	2(92%)	2(92%)	2(92%)
60 h	22	3	2(90%)	2(90%)	2(90%)	2(90%)
65 h	16	6	2(87%)	2(87%)	2(87%)	2(87%)
72 h**	14	2	2(86%)	2(86%)	2(86%)	2(86%)

min = minuto; h = hora / 1. normal; 2. lento/ * início da ecdise para 4º estágio; ** início da ecdise para pupa.

6.5.2. Larvas de 4º estágio

Os resultados de mortalidade e inibição de emergência do Diflubenzuron para as larvas de 4º estágio nos intervalos de leitura podem ser visualizados na Tabela 8. A frequência dos movimentos do corpo e estruturas estão disponíveis na Tabela 9. A média de inibição de emergência foi de 72%. Os movimentos giratórios da cabeça não foram alterados, porém foi observado redução na atividade de alimentação. A partir das 10 horas após o início do experimento os movimentos natatórios tiveram diminuição como também a resposta a estímulos.

Tabela 8. Mortalidade observada nos intervalos de leitura e inibição de emergência (IE) no experimento e sintomatologia com larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração de 0,006 ppm (CL50).

Intervalos de leitura	Mortalidade observada			
	Copo 1	Copo 2	Copo 3	Controle
01 min	0	0	0	0
05 min	0	0	0	0
10 min	0	0	0	0
15 min	0	0	0	0
01 h	0	0	0	0
02 h	0	0	0	0
04 h	0	0	0	0
10 h	1	0	0	0
15 h	0	0	0	0
20 h	0	0	3	0
24 h	1	0	2	0
30 h	0	2	0	1
35 h	1	1	1	1
40 h	0	1	1	0
45 h	3	1	1	0
48 h	4	1	0	0
55 h	1	3	3	0
60 h	1	1	2	0
65 h	2	1	1	0
72 h	2	1	1	0
Total	16	12	15	2
IE (%)	80	60	75	10

min = minuto; h = hora.

Tabela 9. Freqüência de movimentos das larvas de 4º estágio de *Anopheles darlingi* expostas ao Diflubenzuron na concentração 0,006 ppm, em condições de laboratório.

Intervalos de leitura	Larvas observadas		Movimentos				
	Vivas	Mortas	Natatórios	Espasmos	Giratórios da cabeça	Peças bucais	Resposta a estímulos
01 min	60	0	1(100%)	(00%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
05 min	60	0	1(100%)	(00%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
10 min	60	0	1(100%)	(00%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
15 min	60	0	1(100%)	(00%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
01 h	60	0	1(100%)	(00%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
02 h	60	0	1(100%)	(00%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
04 h	60	0	1(100%)	(00%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
10 h	59	1	2(98%)	(00%)	2(98%)	2(98%)	2(98%)
15 h	59	0	2(100%)	(00%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
20 h	56	3	2(96%)	(01%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
24 h	53	3	2(100%)	(02%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
30 h	51	2	2(100%)	(02%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
35 h	48	3	2(100%)	(02%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
40 h	46	2	2(100%)	(02%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
45 h	41	5	2(100%)	(12%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
48 h	36	5	2(100%)	(14%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
55 h*	29	7	2(100%)	(19%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
60 h*	25	4	2(100%)	(17%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
65 h	21	4	2(100%)	(15%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
72 h	17	4	2(100%)	(21%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)

min = minuto; h = hora / 1. normal; 2. lento/ * início da ecdise para pupa.

Algumas larvas apresentaram espasmos a partir do intervalo de leitura de 20 horas permanecendo na superfície da água e quando tocadas, pouco respondiam ao estímulo. Esses espasmos ocorreram em baixa frequência nas 20 horas (01%) e se intensificaram com o decorrer do bioensaio chegando até 21% frequência entre os indivíduos expostos. As larvas apresentaram padrões de alterações morfológicas em resposta a ação inibitória do Diflubenzuron. Essas alterações são aqui descritas de acordo com a fase em que se sucederam os seus eventos de muda até a mortalidade ou emergência de adultos:

- A. Larvas sem alterações morfológicas externas aparentes. Larvas que morreram provavelmente de causas naturais sem apresentar nenhuma característica morfológica que caracterizasse algum momento na muda. De um modo geral o tempo de mortalidade com estas características ocorria em torno das primeiras 24 horas até aproximadamente 40 horas.

- B. Larvas com alterações morfológicas na fase de pré-pupa. Larvas que iniciaram o processo de ecdise com a formação inicial da pupa (Figura 7A), porém apenas com apólice da cabeça. A mortalidade aconteceu entre um período de 50 a 60 horas após o início do experimento. A linha ecdisial (Figuras 7B e D) apresentou abertura normal e a região cefálica em alguns casos completou a apólice, no entanto, o restante do corpo, tais como o tórax e o abdome permaneceram dentro da exúvia da larva. Nesta fase foi observada acentuada dilatação do cefalotórax (Figura 7C) e extravasamento de tecido em vários graus desde pouco até destruição total do cefalotórax.

- C. Pupas incompletamente formadas. Pupas de coloração clara, caracterizando pouca melanização, com formação incompleta sem a capacidade de completar a apólice da exúvia, a qual permanecia presa nos últimos segmentos abdominais da pupa (Figura 8A). Neste estágio foi observado que as pupas apresentavam descontinuidade na formação do tegumento na região do cefalotórax que recobria os olhos, peças bucais e locomotoras. Desta forma, os apêndices como peças bucais, patas, asas, antenas e praticamente toda a parte ventral do

cefalotórax ficaram expostos em contato direto com a água (Figura 8B). Foram observadas fendas no tegumento (Figura 8C) dessas regiões o que, provavelmente, favoreceu o influxo de água para a pupa ocasionando a morte. Estas alterações foram observadas entre as 55 e 60 horas após o início do experimento.

- D. Pupas completamente formadas e presas à exúvia da larva. Pupas sem alterações morfológicas, porém com os últimos segmentos ainda presos na exúvia da larva. Essas pupas apresentavam movimentos característicos tentando escapar da exúvia, subindo ou permanecendo na superfície para respirar, no entanto após sucessivas tentativas acabavam morrendo no fundo do recipiente.
- E. Pupas completamente formadas. Pupas que morreram sem nenhuma alteração morfológica nem mesmo na coloração.
- F. Adultos presos na exúvia. Adultos que não completaram a apólice total da exúvia permanecendo presos nesta última, em diferentes graus de emergência, variando desde aqueles apenas com a região cefálica exposta até aqueles completamente emergidos (Figuras 9A, B e C), mas com tarsos posteriores presos à exúvia (Figuras 9B e 10B). Observou-se ainda nos adultos sobreviventes, ou seja, totalmente emergidos a perda das pernas posteriores (Figura 9D) ou parte delas que ficaram aderidas à exúvia da pupa (Figuras 9C e 10C). No processo de emergência final desses adultos observou-se claramente o esforço físico na tentativa de completar a apólice que durou, em média, 15 horas até ocorrer sua morte ou emergência.
- G. Adultos normais. Adultos que completaram a emergência sem apresentar alterações morfológicas, pelo menos externamente. Esses adultos apresentavam excelente aptidão ao voar no interior do recipiente.

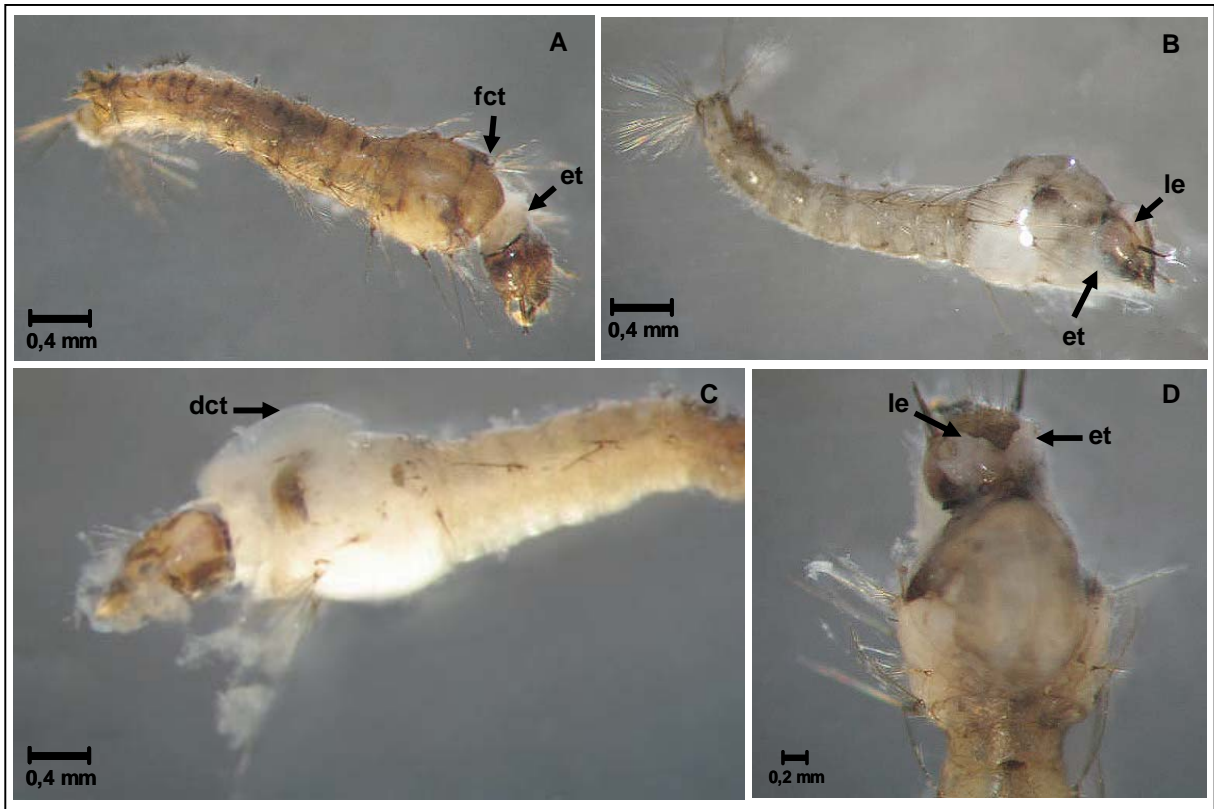


Figura 7. Alterações morfológicas na fase de pré-pupa de *Anopheles darlingi* provocadas pelo Diflubenzuron. A: início da ecdise com formação do cefalotórax; B: apólice da região cefálica com extravasamento de tecido; C: Detalhe do cefalotórax com dilatação e espessura do tegumento delgado; D: Visão dorsal mostrando detalhe do extravasamento de tecido e da linha ecdisial. dct: dilatação do cefalotórax; et: extravasamento de tecido; fct: formação do cefalotórax; le: linha ecdisial.

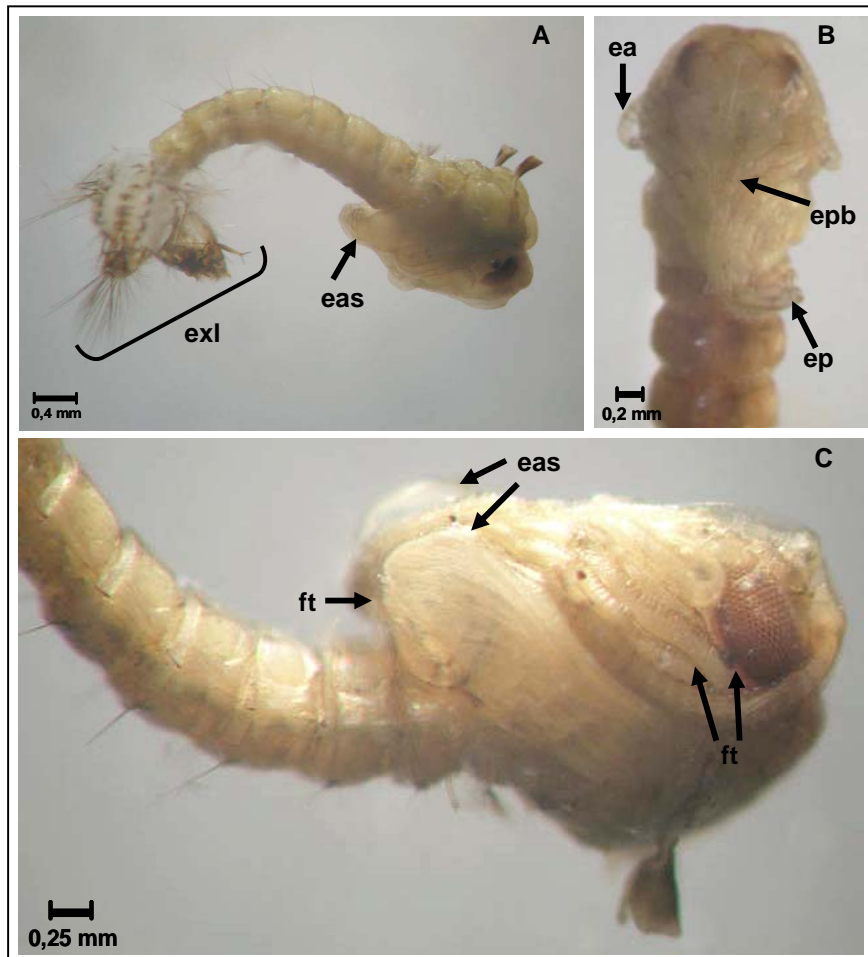


Figura 8. Alterações morfológicas na fase de pupa de *Anopheles darlingi* oriundas de larvas de 4^o estágio expostas ao Diflubenzuron. A: pupa não melanizada presa a exúvia da larva; B: Vista ventral da pupa destacando a exposição dos apêndices; C: Vista lateral da pupa destacando as fendas no tegumento e exposição das asas. eas: exposição das asas; epb: exposição das peças bucais; ep: exposição das pernas; exl: exúvia da larva; ft: fenda no tegumento.

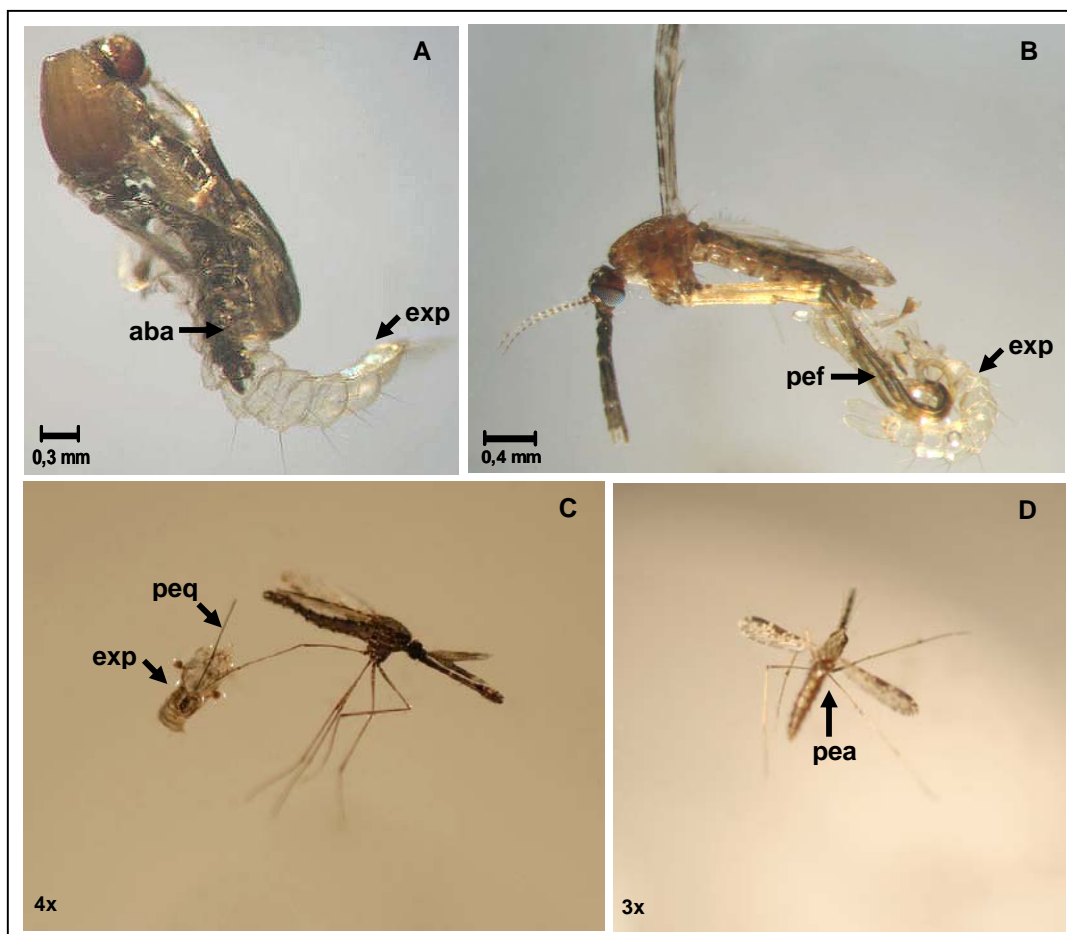


Figura 9. Alterações morfológicas observadas na emergência de adultos de *Anopheles darlingi* oriundos de larvas de 4^o estágio expostas ao Diflubenzuron. A: início da emergência; B: adulto com pernas presas a exúvia da pupa; C: adulto emergido com perna quebrada e fixada a exúvia da pupa; D: adulto completamente emergido com perda de patas posteriores. aba: abdome do adulto; exp: exúvia da pupa; pea: perna ausente; pef: perna fixada exúvia da pupa; peq: perna quebrada.

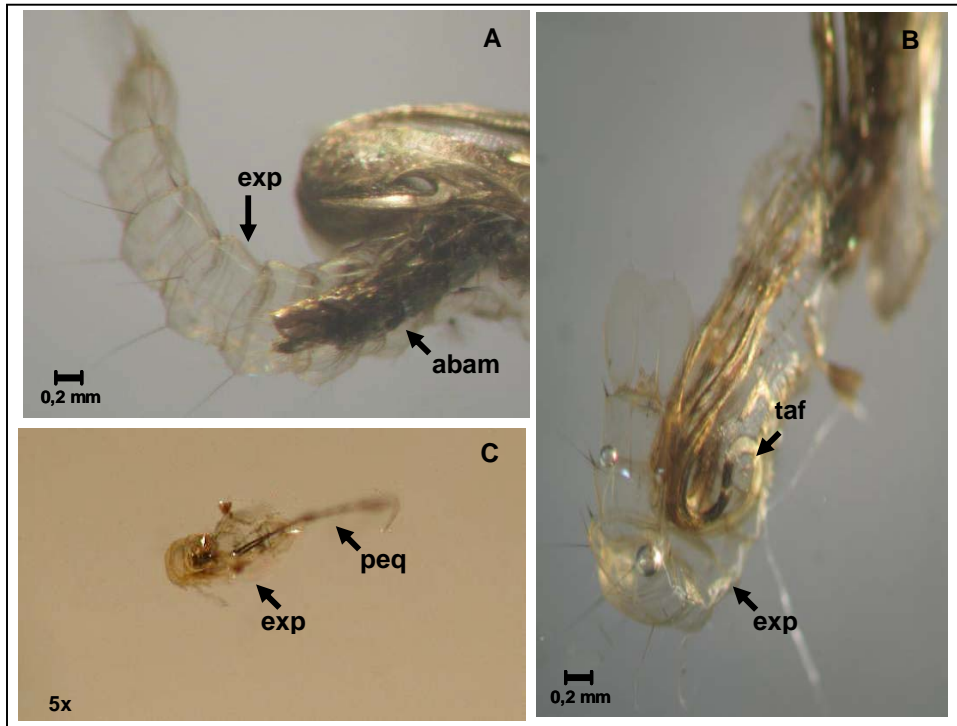


Figura 10. Detalhes das estruturas observadas na emergência dos adultos de *Anopheles darlingi* presos na exúvia da pupa no momento da emergência. Os adultos são oriundos de larvas de 4^o estágio. A: abdome do adulto preso à exúvia; B: tarsos presos no interior da exúvia; C: pernas quebradas e presas à exúvia. abam: abdome do adulto macho; exp: exúvia da pupa; peq: perna quebrada; taf: tarso fixado na exúvia.

7. Discussão

Atualmente tem-se dado muita ênfase aos inseticidas com baixa toxicidade, alto efeito residual e elevada especificidade. Um produto com essas características assegura o controle efetivo de populações de insetos pragas, principalmente aqueles de importância médica como os culicídeos, além de oferecer proteção ambiental (Resende e Gama, 2006). Assim, são os IGRs a exemplo do Diflubenzuron que vêm sendo avaliados em muitos países e também no Brasil para o controle de mosquitos. No entanto esses inseticidas só devem ser usados em habitats limitados e que não são ambientalmente sensíveis por afetar adversamente a fauna de artrópodes (Floore, 2006).

7.1. Bioensaios de susceptibilidade de larvas ao Diflubenzuron

Os dados de susceptibilidade das larvas de 3^o estágio mostraram que o Diflubenzuron provocou retardo na mortalidade das larvas, revelando, assim, a principal característica desse inseticida de não causar intoxicação direta aos indivíduos, levando-os à morte de um modo geral, no momento da muda. Esse retardo de mortalidade foi observado por Mulla *et al.* (1974), em larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann 1820 e em larvas de *C. quinquefasciatus*, expostas ao mesmo inseticida. Os dados desse trabalho estão de acordo com os de Silva e Garcia (2004) que trabalharam com as mesmas concentrações, em todos os estágios larvais de *A. aegypti*, e também obtiveram 100% de inibição de emergência, tanto nas condições de campo como de laboratório. Os autores obtiveram sobrevivência das larvas de 3^o estágio em laboratório de 7 a 8 dias, sem diferenças significativas entre as concentrações. Desta forma, é possível perceber que, embora em altas concentrações, ainda assim o produto mantém sua característica de não provocar intoxicação direta, promovendo elevada mortalidade.

7.2. Bioensaios para obtenção das concentrações letais, CL50 e CL90 de Diflubenzuron para *Anopheles darlingi*

Diflubenzuron mostrou ser altamente tóxico para larvas de 4^o estágio de *A. darlingi* produzindo inibição de emergência, em baixas concentrações. Os dados de CL50 e CL90 obtidos neste trabalho estão próximos daqueles já obtidos para outros anofelinos, sob semelhantes condições. Jakob (1973) descreveu a CL95 para *A. albimanus* e *A. stephensi* de 0,001 ppm e 0,0025 ppm, respectivamente. Mulla *et al.* (1974) obtiveram CL90 para *A. albimanus*, de 0,001 ppm. Lowe *et al.* (1975) para a mesma espécie obtiveram CL90 = 0,0098 ppm, e para *Anopheles quadrimaculatus* Say, 1912 descreveram a concentração de 0,004 ppm. Nestes trabalhos não foram expressos os valores da CL50. Ali e Nayar (1987) determinaram para *A. albimanus* e *A. quadrimaculatus* a CL50 de 1,42 ppb e 1,40 ppb, respectivamente. Dame *et al.* (1976) trabalharam com cepas de *A. quadrimaculatus* susceptíveis e resistentes ao DDT nas quais verificaram CL50 e CL90, respectivamente, entre 0,002 ppm e 0,004 ppm para as duas cepas.

Os valores das concentrações obtidos neste trabalho apontam que *A. darlingi* mostrou ser menos susceptível ao inseticida quando comparado com os outros anofelinos já estudados. Isto provavelmente pode estar relacionado à alta heterogeneidade dos indivíduos F₁ utilizados nos bioensaios. Nestes trabalhos já citados com outras espécies anofélicas, foram utilizadas cepas que estavam sendo mantidas sob condições de laboratório, por alguns anos, o que resulta em indivíduos cada vez mais susceptíveis, principalmente a um novo inseticida, como o Diflubenzuron com diferentes modos de ação.

De acordo com Habbib (1986), a realização de bioensaios com insetos deveria utilizar populações mais homogêneas geneticamente, ou seja, cepas de laboratório resultantes de endogâmias e adaptadas as condições de laboratório que promoveriam dados com intervalo de confiabilidade mais alta. No entanto, *A. darlingi* caracteriza-se por ser uma espécie silvestre e sua criação em laboratório até o presente não teve sucesso. Embora se tenha aqui trabalhado com uma geração F₁, os resultados

apontaram um excelente intervalo de confiança (95%) para concentrações calculadas pelo programa.

Em relação à mortalidade de larvas, pupas e adultos no experimento, os dados corroboram os obtidos por Mulla *et al.* (1974), que observaram altas concentrações do inseticida causaram alta mortalidade em *A. albimanus* na fase de larva. As concentrações mais baixas provocaram mortalidades nas fases de pupa e de adulto. Desta forma, percebe-se que o Diflubenzuron, em baixas concentrações, retarda a mortalidade dos indivíduos. A observação do modo como as larvas morreram, principalmente na fase de pré-pupa e de emergência de adultos, ou seja, durante a muda, revela o potencial de atuação que o inseticida possui de interferir em processos fisiológicos que atuam na deposição da quitina na cutícula. Borges *et al.* (2004) descreveram, em larvas de *A. aegypti*, sérios distúrbios na cutícula e nas células epidérmicas, no momento da muda e que levaram a morte destas larvas.

7.3. Bioensaios de susceptibilidade de pupas ao Diflubenzuron

A concentração de 0,1 ppm de Diflubenzuron promoveu inibição de emergência em pupas jovens e em pupas de 1 dia. De acordo com Mulla *et al.* (1974), pupas de *C. quinquefasciatus* expostas à concentração de 0,3 ppm tiveram inibição de emergência em torno de 90%. Arredondo-Jiménez e Valdez-Delgado (2006) trabalhando com Novaluron, também derivado benzoilfenil uréia, obtiveram inibição de emergência de 50% para pupas de *A. albimanus* e *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald 1901, nas concentrações de 2,92 µg e 6,64 µg de ingrediente ativo por litro.

Com esses resultados é permitido vislumbrar que o modo de ação do Diflubenzuron por contato tem significativa importância para controle de mosquitos nesse estágio. Wright (1984) assinalou que aplicações tópicas que permitem a difusão do Diflubenzuron pelo tegumento são, em geral, dez vezes menos efetivas do que por ingestão. Em testes preliminares realizados com menores concentrações não houve inibição de emergência e por esse motivo foi definida a concentração de 0,1 ppm, que é vinte vezes maior do que a CL50. Esses dados mostraram que a atividade pupicida do Diflubenzuron depende dos fatores: concentração utilizada, idade da pupa e o tempo de

exposição. Como o inseticida demonstrou ação por contato, o tempo de exposição deve ser avaliado para se ter a real noção do tempo mínimo necessário para se obter uma inibição de emergência satisfatória.

Um larvicida que também desempenhe atividade pupicida representa um excelente agente para o controle, uma vez que em condições de campo, ou seja, nos criadouros são encontrados imaturos em diversas idades. As pupas jovens e pupas de um dia foram diferentemente susceptíveis ao Diflubenzuron, sendo as primeiras mais susceptíveis. Isso provavelmente decorre do fato de que em pupas mais velhas os eventos fisiológicos que envolvem a deposição de quitina no tegumento estão mais consolidados, sofrendo menos interferência do inseticida (Eisler, 1992).

7.4. Bioensaios: tempo de exposição de larvas de 4º estágio à CL50 de Diflubenzuron

Um ponto bastante importante da ação de um larvicida é saber qual o tempo mínimo necessário para que este possa agir, com a mesma proporção de mortalidade dos testes, em que ficam submetidos ao inseticida até mortalidade total ou emergência dos adultos, em condições de laboratório. Estas informações reforçam a elaboração de planejamento de controle de larvas, em criadouros naturais, para que seja alcançada a eficiência do inseticida a ser utilizado se este pode ser afetado por condições ambientais como chuvas, insolação e outros fatores (WHO, 2006b).

Os dados deste trabalho também mostram que Diflubenzuron é efetivo nos dois períodos de exposição analisados. As diferenças não foram significativas entre os intervalos de 24 e 48 horas de exposição das larvas, apenas em relação aos controles, demonstrando que ação de estresse de remoção e lavagem desses indivíduos teve pouca ou nenhuma influência na mortalidade. De acordo com esses dados fica evidente que o contato mínimo de 24 horas de exposição das larvas já é suficiente para promover inibição de emergência. Os resultados obtidos neste trabalho apontam que Diflubenzuron, no mínimo 24 horas agindo sobre as larvas de *A. darlingi*, foi altamente efetivo na inibição de emergência. Sacher (1971) demonstrou em larvas de 4º estágio de *A. aegypti*, na CL 90 de 0,1 ppm do IGR MON-0585, a inibição de emergência de

95%. Neste mesmo trabalho, também foram observadas significativas reduções na emergência de adultos, quando os indivíduos foram expostos somente por 3 horas ao inseticida.

O fato das larvas de *A. darlingi* já sofrerem interferência no desenvolvimento que refletiram na emergência de adultos em 24 horas revela a capacidade de penetração do inseticida no corpo da larva e a rapidez na inserção em mecanismos bioquímicos do metabolismo da quitina. Contudo, embora se tenha demonstrado aqui a eficiência do Diflubenzuron em 24 horas de exposição, serão necessários outros estudos para melhor equacionem o tempo mínimo para que este inseticida tenha interferência em larvas de *A. darlingi*.

7.5. Sintomatologia e alterações morfológicas das larvas de 3º e 4º estágio expostas a CL50 do Diflubenzuron

As informações de alterações morfológicas e sintomas têm relevante importância não só para compreensão dos eventos anatomopatológicos nas larvas, mas em atividades de controle em criadouros naturais. Os diferentes modos de atuação permitem verificar a efetividade do produto, em diversos momentos após a aplicação, tendo maior segurança na distinção de mortalidade natural e provocada pelo inseticida.

7.5.1. Larvas de 3º estágio

A observação da sintomatologia de larvas tratadas com inseticidas não tem sido uma prioridade em estudos de alterações morfológicas provocadas por inseticidas, de um modo geral. No entanto estes estudos contribuem significativamente para o conhecimento do modo de ação de inseticidas e as respostas dos organismos a esses compostos. Na literatura poucas descrições de alterações morfológicas foram realizadas com larvas de culicídeos expostos a IGRs, como também o modo como estas larvas morrem.

Neste estudo as larvas de 3º estágio foram bastante susceptíveis a concentração verificada de Diflubenzuron. Jakobs (1973) descreveu para larvas de mesmo estágio de

C. quinquefasciatus, na concentração 0,0025 ppm, mortalidade em torno de 95% nas quais as larvas apresentavam descarte parcial da exúvia, no momento da muda ocasionando em seguida à sua morte. Borges *et al.* (2004) relataram para larvas de mesma idade de *A. aegypti*, expostas a 1,0 ppm destruição da superfície corporal com segmentos abdominais indefinidos. Ainda, segundo os autores, na concentração 0,1 ppm as alterações foram menores, com mais definições nos segmentos corporais, porém, apresentando-se com estrutura corporal delgada e menor. Foram relatados também redução dos movimentos em resposta a estímulos, a partir de seis horas, após o início do experimento que se intensificaram com o aumento do tempo de exposição. Estes mesmos comportamentos foram observados neste trabalho, conforme mostram os dados das tabelas 7 e 9.

As regiões mais afetadas pelo inseticida no decorrer do experimento deste trabalho foram a cabeça e o tórax da larva que constituem as partes do corpo por onde inicia-se o processo de apólise da larva da exúvia. Essas regiões sofrem intensa pressão da hemolinfa e dos músculos do corpo para romper a exúvia e forçar o escape da larva, durante a ecdise. Nesta situação, a larva devido ter a formação do seu novo tegumento prejudicada pelo inseticida, é incapaz de sustentar a pressão exercida pelos músculos e a hemolinfa. Estas observações foram também confirmadas por Eisler (1992).

7.5.2. Larvas de 4º estágio

As alterações morfológicas descritas para as larvas de *A. darlingi* são corroboradas com as obtidas por Arias e Mulla (1975) e Bridges *et al.* (1977). No primeiro trabalho os autores resumem sete categorias de alterações morfológicas provocadas em larvas de 4º estágio de *Culex tarsalis* quando tratadas com Altosid, também inseticida do grupo benzoilfenil uréia. Os autores descreveram mortalidade entre todos os estágios com maior destaque para a fase de pré-pupa e pupa, denominando as pupas de coloração clara como pupas “albinas”. As pupas que apresentavam as peças bucais expostas foram chamadas de “elefantóides”. No segundo trabalho, os autores verificaram as alterações morfológicas em larvas de 3º e

4º estádios de *A. aegypti* com o IGR 5[[[55-(dimethyl-amino)-1-naphthalenyl]amino]-1,3-benzodioxole, adicionado a um composto fluorescente que foi denominado de FIGR. Foram descritas deformações semelhantes do FIGR com as produzidas pelo methoprene. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos neste trabalho em que foram observados nos adultos exposição das peças bucais e apêndices locomotores com pernas e asas, além de adultos mortos emergindo em vários graus e presos na exúvia da pupa.

As alterações morfológicas produzidas pelo Diflubenzuron nas larvas de *A. darlingi* foram bastante variáveis, tanto nas observações dos testes de sintomatologia, como em todos os bioensaios realizados neste trabalho. Buscou-se agrupar essas deformações e eventos sucedidos como uma forma de facilitar a sua compreensão. Porém, este agrupamento nada mais é do que um artifício didático, já que os indivíduos da população podem apresentar diferentes respostas em diferentes graus e períodos. Estas alterações poderão ser mais claramente conhecidas se forem utilizadas ferramentas que viabilizem a observação, em nível de tecido, bem como alterações morfológicas internas.

8. Conclusões

Os resultados dos tópicos enfocados neste trabalho, em relação à ação inibidora de emergência do Diflubenzuron para as larvas e pupas de *A. darlingi*, possibilitaram as seguintes conclusões:

1. Diflubenzuron foi efetivo para as larvas de 3° e 4° estádios em todas as concentrações verificadas.
2. As larvas de 3° estágio tiveram retardo na mortalidade quando expostas as concentrações de 1,0 , 0,8 , 0,4 , 0,2 e 0,1 ppm de Diflubenzuron.
3. As concentrações letais – CL50 e CL90 – de Diflubenzuron para *A. darlingi* foram 0,006 ppm e 0,013, respectivamente.
4. Nas concentrações de 0,01 ppm a 0,1ppm a inibição de emergência foi de 100%. Sendo observada mortalidade de adultos apenas na 0,01ppm.
5. Entre as concentrações de 0,001 ppm e 0,006 ppm a mortalidade foi mais baixa, ocorrendo mortalidade em todos os estágios: larva, pupa e adulto.
6. Diflubenzuron mostrou atividade pupicida na concentração de 0,1 ppm nas duas idades das pupas.
7. As pupas jovens foram mais susceptíveis ao inseticida do que as de um dia de idade.
8. No período de 24 horas de exposição, as larvas de 4° estágio já foram susceptíveis.
9. Na concentração de 0,006 ppm de Diflubenzuron foram observadas alterações morfológicas no cérvix, no toráx e na cabeça das larvas de 3° estágio, ocorrendo mortalidade no momento da ecdise.
10. Nas larvas de 4° estágio expostas à concentração de 0,006 ppm foram observadas alterações morfológicas em larvas, pré-pupa, pupa e adultos.

9. Referências bibliográficas

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.
- Ables, J. R. 1975. Response of the house fly and its parasitoids to Dimilin (TH-6040). *Journal of the Economic Entomology*. 68(1): 622-624.
- Aguilera, L.; Marquetti, M. C.; Navarro, A. 2001. Actividad biológica del diflubenzuron sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Revista Cubana Medicina Tropical*. 53(1): 48-52.
- Ali, A.; Mulla, M. S. 1977. The IGR Diflubenzuron and Organophosphorus Insecticidas against nuisance midge in man-made residencial recreational lakes. *Journal of the Economic Entomology*. 70(5): 571-577.
- Ali, A.; Lord, J. 1980. Experimental Insect Growth Regulators against some nuisance chironomid midges of Central Florida. *Journal of the Economic Entomology*. 73(2): 243-249.
- Ali, A.; Nayar, J. K. 1987. Laboratory toxicity of a new benzoylphenylurea Insect Growth Regulator (UC-84572) against mosquitoes and chironomid midges. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 3 (2): 309-311.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2006. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 03 mar. 2007.
- Arias, J. R.; Mulla, M. S. 1973. Morphogenetic aberrations induced by a Juvenile Homone Analogue in the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera, Culicidae). *Journal of the Medical Entomology*. 12 (3): 309-316.
- Arredondo-Jiménez, J. I.; Valdez-Delgado, K. M. 2006. Effect of Novaluron (Rimon[®]) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes*

- aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*. 20: 377-387.
- Ávila, S. L. M.; Ferreira, A. W. 1996. Malaria diagnosis: a review. *Brazilian Journal of the Medical and Biological Research* 29 (1): 431-443.
- Axtell, R. C.; Dukes, J. C.; Edwards, T. D. 1979. Field tests of Diflubenzuron, Methoprene, Flit MLO[®] and Chlorpyrifos for the control of *Aedes taeniorrhynchus* larvae in diked dredged spoil areas. *Mosquito News*. 39(3): 520-527.
- Axtell, R. C.; Edwards, T. D. 1980. Field tests of insecticides and Insect Growth Regulators for the control of *Culex quinquefasciatus* in anaerobic animal waste lagoons. *Mosquito News*. 40(1): 36-42.
- Batista, D. C. 1972. *Sobre o saneamento da Amazônia*. Editora Philippe Daon S/A, Manaus, Amazonas, Brasil. 110pp.
- Borges, R. A.; Cavasin, G. M.; Silva, I. G.; Arruda, W.; Oliveira, E. S. F.; Silva, H. H. G.; Martins, F. 2004. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do Diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista de Patologia Tropical*. 33(1): 91-104.
- Bridges, A. C.; Cocke, J.; Olson, J. K.; Mayer, R. T. Effects of a new Fluorescent Insect Growth Regulators on the larval instars of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*. 37 (2): 227-233.
- Cohen, E. 1987. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Annual Review Entomology*. 32 (1): 71-93.
- Consoli, R. A. G. B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p.
- Dame, A. D.; Lowe, R. E.; Wichterman, G. J.; Cameron, A. L.; Baldwin, K. F.; Miller, T. W. 1976. Laboratory and field assessment of Insect Growth Regulators for mosquito control. *Mosquito News*. 36 (4): 462-472.

- Daglish, G. J.; Wallbank, B. E. 2005. Efficacy of diflubenzuron plus methoprene against *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* in stored sorghum. *Journal of Stored Products Research* 41(1): 353–360.
- Deane, L. M. 1989. A cronologia dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 84 (Suplemento IV): 149-156.
- Delgado, F. X.; Britton, J. H.; Onsager, J. A.; Swearingen, W. 1999. Field Assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and Potential Synergism with Diflubenzuron for Control of Savanna Grasshopper Complex (Orthoptera) in Mali. *Journal of Invertebrate Pathology* 73(1): 34–39.
- Dulmage, H. T.; Yousten, A. A.; Singer, S.; Lacey, L. A. 1990. Guidelines for productions of *Bacillus thuringiensis* H -14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, Geneva. 59p.
- Eisler, R. 1992. Diflubenzuron Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. *Biological Report – Contaminant Hazard Review – Report 25. 4 (1): 2-48.*
- Fahran, M. E. 1980. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXXIV. A revision of the albimanus section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contribution of the American Entomology Institute*. 15: 1-215.
- Figueiredo, R. M. P. 1996. *Controle da malária: poder residual da deltametrina observado em diferentes tipos de parede*. Master's Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 104pp.
- Floore, T. G. 2006. Mosquito larval control practice: past and present. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 22 (3): 527-533.
- Forattini, O. P. 1962. *Entomologia Médica*. Vol. 2. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo. 662pp.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. 2001. *Controle de Vetores – Procedimento de Segurança*. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 208p.

- Ginarte, C. A.; Dorta, D. M. 1996. Influencia de inhibidores del desarrollo sobre la reproducción de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Revista Cubana Medicina Tropical*. 48(1): 40-47.
- Goghran, J. R.; Stojanovich, C. J.; Scott, H. G. 1967. Clave ilustrada para los anofelinos de Sudamerica Oriental. Department of Health, Education and Welfare Public Health Service, 64pp.
- Graf, J. F. 1993. The role of Insect Growth Regulators in arthropod control. *Parasitology Today*. 9 (1): 471-474.
- Grosscurt, A. C.; Haar, M. T.; Jongsman, B.; Stocker, A. 1988. PH 70-23: a new acaricide and insecticide interfering with chitin deposition. *Pesticide Science*. 22: 51-59.
- Habib, M. E. M. 1986. Padronização de inseticidas microbianos. In Alves, S. B. (Eds). *Controle Microbiano de Insetos*. Editora Manole, São Paulo. p. 289-296.
- Hajjar, N. P.; Casida, J. E. 1978. Insecticidal Benzoylphenyl Ureas: structure-activity relationships as chitin synthesis inhibitors. *Science*. 200 (30): 1499-1500.
- Hajjar, N. P. 1979. Diflubenzuron inhibits chitin synthesis in *Culex pipiens* L. larvae. *Mosquito News*. 39(2): 381-384.
- Hochman, G.; Mello, M. T. B.; Santos, P. R. E. 2002. A malária em foto: imagens de campanhas e ações no Brasil da primeira metade do século XX. *História, Ciências, Saúde – Manquinhas, Rio de Janeiro*. 9 (suplemento): 233-273.
- Jakob, W. L. 1973. Developmental inhibition of mosquitoes and the house fly by urea analogues. *Journal of the Medical Entomology*. 10 (5): 452-455.
- Julin, A. M.; Sanders, H. O. 1978. Toxicity of the IGR, Diflubenzuron, to freshwater invertebrates and fishes. *Mosquito News*. 38 (2): 256-259.

- Khebbeb, M. E. H.; Delachambre J.; Soltani N. 1997. Lipid Metabolism during the Sexual Maturation of the Mealworm (*Tenebrio molitor*): Effect of Ingested Diflubenzuron. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 58 (1), 209–217.
- Kroschel, J.; Koch, W. 1996. Studies on the use of chemicals, botanicals and *Bacillus thuringiensis* in the management of the potato tuber moth in potato stores. *Crop Protection*. 15 (2): 197-203.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC a user's guide to Probit or Log analysis. 1119 Shattuck Ave, Berkeley, CA, 94707, 22pp.
- Loiola, C. C. P.; Mangabeira da Silva, C. J.; Tauil, P. L. 2002. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Pan American Journal of Public Health*. 11 (1): 235-44.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Oliveira-Ferreira, J.; Guimarães, A. E. G.; Castro, M. G.; Motta, M. A.; 1987. Studies in progress on malaria transmission in Rondônia State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82(suplemento I): 29.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Guimarães, A. E. G.; Arlé, M.; Silva, T. F.; Castro, M. G.; Motta, M. A.; Deane, L. M. 1989. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic áreas of Rondônia State, Amazon regions of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 84(4): 501-514.
- Lowe, R. E.; Schwarz, M.; Cameron, A. L.; Dame, D. A. 1975. Evaluation of newly synthesized Insect Growth Regulators against *Anopheles quadrimaculatus*, *Anopheles albimanus*, and *Aedes taeniorhynchus*. *Mosquito News*. 35 (4): 561-563.
- Marques, A. C.; Gutierrez, H. C. 1994. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 27(Suplemento III): 91-108.
- Martins, F.; Silva, I. G. 2004. Avaliação da atividade inibidora do Diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37(2): 135-138.

- Miller, R. W.; Corley, C.; Hill, K. R. 1975. Feeding TH6040 to chickens: effects on larval house flies in manure and determination of residues in eggs. *Journal of the Economic Entomology*. 68(1): 181-182.
- Miura, T.; Takahashi, R. M. 1979. Effects of the Insect Growth Inhibitor SIR 8514 on hatching of Southern house mosquito eggs. *Journal of the Economic Entomology*. 72(5): 692-694.
- Mulla, M. S.; Darwazeh, H. A.; Norland, R. L. 1974. Insect Growth Regulators: Evaluation Procedures and Activity against Mosquitoes. *Journal of the Economic Entomology*. 67 (3): 329-332.
- Mulla, M. S.; Giancarlo, M.; Darwazeh, H. A. 1975. Effects of the insect growth regulator Dimilin or TH6040 on mosquitoes and some nontarget organisms. *Mosquito News*. 35(1): 211-216.
- Mulla, M. S.; Darwazeh, H. A. 1976. The IGR Dimilin[®] and its formulations against mosquitoes. *Journal of the Economic Entomology*. 69(3): 309-312.
- Mulla, M. S.; Darwazeh, H. A. 1979. New Insect Growth Regulators against flood and stagnant water mosquitoes-Effects on nontarget organisms. *Mosquito News*. 39(4): 746-755.
- PAHO – Panamerican Health Organization. 2003. *Malaria data - 2003*. (www.paho.org/).
Acesso: 10/01/2006.
- Passos, A. D. C.; Fialho, R. R. 1998. Malária: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31(Suplemento II): 93-105.
- Post, L. C.; de-Jong, B. J.; Vincent, W. R. 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 4 (4): 473-483.
- Rehimi, N.; Soltani, N. 1999. Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* L. (Dip., Culicidae): Effects on development and cuticle secretion. *Journal of the Applied Entomology*. 123(1): 437-441.

- Resende, M. C.; Gama, R. A. 2006. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxifen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39(1):72-75.
- Sacher, R. M. 1971. A mosquito larvicide with favorable environmental properties. *Mosquito News*. 31 (4): 513-516.
- Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Kerr, W.E. 1981. Biologia de Anofelinos Amazônicos I – Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus/Boa Vista. *Acta Amazonica*., 11(4): 789-797.
- Scarpassa, V.M. & Tadei, W.P. 1990. Biologia de anofelinos amazônicos. XIII. Estudos do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, 20: 95-118 p.
- Saxena, S. C.; Kaushik, R. K. 1986. Effects of a chitin inhibitor compound on fecundity and egg viability in *Anopheles stephensi*. *Current Science* 55(16): 807-808.
- Self, L. S.; Nelson, M. J.; Pant, C. P.; Usman, S. 1978. Field trials with two Insect Growth Regulators against *Culex quinquefasciatus*. *Mosquito news*. 38(1): 74-79.
- Silva, J. J.; Mendes, J. 2002. Effect of Diflubenzuron on Immature Stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(5): 679-682.
- Steelman, C. D.; Farlow, J. E.; Breud, T. P.; Schilling, P. E. 1975. Effects of Growth Regulators on *Psophora columbiae* (Dyar and Knab) and non-target aquatic insect species in rice fields. *Mosquito news*. 35(1): 67-75.
- Tadei, W. P.; Santos, J. M. M.; Scarpassa, V. M.; Costa, W. L. S.; Scardana, V. M. 1988. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes, Rondônia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, 30 (1): 221-251.

- Tadei, W. P. 1993. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XVIII. Considerações sobre as espécies de *Anopheles* (Culicidae), transmissão e controle da malária na Amazônia. Revista da Universidade do Amazonas. Série: Ciências da Saúde. 2 (1): 1-34.
- Tadei, W. P.; Santos, J. M. M.; Scarpassa, V. M.; Rodrigues, I. B. 1993. Incidência, Distribuição e Aspectos Ecológicos de Espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em Regiões Naturais e Sob Impacto Ambiental da Amazônia Brasileira. In: Ferreira, E. J. G.; Santos, G. M.; Leão, E. L. M.; Oliveira, L. A. (Eds). *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Vol.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 166-196.
- Tadei, W. P.; Dutary-Thatcher, D. B. 2000. Malaria vectors in the brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*. 42 (2): 87-94.
- Tadei, W. P. 2001. Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia. *Anais da VII Reunião Especial de Manaus da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*. Manaus, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC. 6p.
- Tadei, W. P.; Rodrigues, I. B. 2002. O controle Biológico para Anofelinos na Amazônia. *Anais do XIX Congresso Brasileiro de Entomologia*. Manaus: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2002. 1 (1): 1-6p.
- van-Eck, W. H. 1979. Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. 9 (3): 295-300.
- WHO – World Health Organization. 1983. *Informal consultation on insect growth regulators*. Geneva, Switzerland. 12p.
- WHO – World Health Organization, 1997. *International Programme on Chemical Safety. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 1996-1997*, Geneva, Switzerland. 114p.
- WHO – World Health Organization. 2005a. *World Malaria Report 2005*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland. 294pp.

- WHO – World Health Organization. 2005b. *Frequently asked questions on DDT use for disease vector control*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland, 10pp.
- WHO – World Health Organization. 2006a. *Report of the ninth WHOPES working group meeting*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland, 96pp.
- WHO – World Health Organization. 2006b. *Pesticides and their application for the control vectors and pests of public health importance*. Ed. 6. WHO/WHOPES Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland, 114pp.
- Wright, J. E. 1984. Chitin and Benzoylphenyl ureas. Benzoylphenyl ureas Congresses / Chitin Congresses. Hamburgo, Germany. Series entomologica, v. 38. 632p.

10. Anexos

Anexo 1. Nomes comerciais de Diflubenzuron em todo o mundo.

Nomes comerciais	
1	Benzamide, N-[[<i>e</i> -chlorophenyl]amino]carbonyl]-2,6-difluoro-(9Cl)
2	Benzamide, 2,6-difluoro-N-[(4-chlorophenyl)aminocarbonyl]-
3	Deflubenzon
4	Diflubenuron
5	Diflubenzon
6	Diflubenzuron 25%
7	Difluron
8	Dimilin
9	Duphar PH 60-40
10	DU 19111
11	DU 112307
12	ENT 29054
13	ENT-29054
14	Largon
15	N-[[<i>p</i> -Chlorophenyl]amino]carbonyl]-2,6-difluorobenzamide
16	N-[[[4-Chlorophenyl]amino]carbonyl]-2,6-difluorobenzamide
17	OMS 1804
18	Ph 6040
19	PDD 6040I
20	Ph 60-40
21	Thompson-Hayward 6040
22	TH 60 40
23	TH 6040
24	Urea, 1-(<i>p</i> -chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)-
25	1-(4-Chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea

Fonte: Milne, G.W.A., 1995. Handbook of Pesticides. New York: CRC Press,410p.