



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
MESTRADO DE SAÚDE PÚBLICA**

**EFEITO RESIDUAL DO *Diflubenzuron* SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO, NO LABORATÓRIO**

**FORTALEZA – CEARÁ  
2011**

LEVINDO JOSE GARCIA NETO

EFEITO RESIDUAL DO *Diflubenzuron* SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* EM  
CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO, NO LABORATÓRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Políticas e Serviços de Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Wellington de Oliveira Lima.

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti.

FORTALEZA – CEARÁ  
2011

G216e Garcia Neto, Levindo Jose  
Efeito residual do *Diflubenzuron* sobre larvas de *Aedes aegypti* em condições simuladas de campo, no laboratório / Levindo Jose Garcia Neto. — Fortaleza, 2011.  
107 p. ; il.  
Orientador: Prof. Dr. José Wellington de Oliveira Lima.  
Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti  
Dissertação (Programa de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde. Área de Concentração: Políticas e Serviços de Saúde.  
1. Dengue. 2. *Aedes aegypti*. 3. *Diflubenzuron*. 4. Renovação. 5. Larvas. 6. Pupas. I. Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

CDD: 616.921

**LEVINDO JOSE GARCIA NETO**

**EFEITO RESIDUAL DO *Diflubenzuron* SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* EM  
CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO, NO LABORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Políticas e Serviços de Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Wellington de Oliveira Lima (Orientador)  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Ricardo José Soares Pontes  
Universidade Federal do Ceará – UFC

## **AGRADECIMENTOS**

Nunca será demais elogiar o PROF. DR. JOSÉ WELLINGTON DE OLIVEIRA, meu orientador nesta dissertação, com quem tive a honra e o privilégio de conviver e aprender durante todo o período do mestrado.

Estendo os meus agradecimentos ao também PROF. DR. LUCIANO PAMPLONA, meu co-orientador que muito me ajudou e influenciou com seu entusiasmo, particularmente nos momentos difíceis em que o desespero parece tomar conta das nossas ações.

Foi uma grande vantagem ter como parceira de laboratório a MSC CLÁUDIA REGAZZI, que proveu com seus conhecimentos entomológicos o processo de pesquisa e análise de larvas e mosquitos do experimento.

Estou particularmente grato ao meu amigo, companheiro e chefe MSC PROF. FRANCISCO AUGUSTO ANDRADE MAIA, que não só apoiou como também foi sempre um grande incentivador dos estudos do mestrado. Devo a ele a compreensão pela disponibilidade e os conselhos que me proporcionou nestes dois anos.

Desejo agradecer também ao Dr. Eugênio Bessa, coordenador administrativo e financeiro da SESA, por sua sensibilidade e apoio prestado à nossa participação em eventos relacionados à saúde pública, que muito contribuíram para este mestrado e para os efetivos conhecimentos adquiridos sobre o assunto.

Quero expressar minha gratidão ao PROF. DR. RICARDO PONTES, por ter gentilmente cedido o espaço do laboratório de entomologia da UFC para que pudéssemos conduzir a nossa pesquisa.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos do laboratório sem os quais eu não teria obtido êxito: VIEIRA, HUGO, JEAN MICHEL, SARA SUEDEN, DEBORA E ROQUELINA.

Desejo dedicar um agradecimento especial à minha família que com muita paciência suportou os maus momentos e os maus humores nestes dois anos e pouco.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

**Cora Coralina**

Envelhecer é inevitável, mas crescer é opcional.

**Autor desconhecido**

## RESUMO

A dengue continua sendo um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. No Nordeste brasileiro, onde a captação e a reserva de água para consumo humano é uma necessidade vital, o problema se agrava. Os depósitos que servem para armazenagem desta água, na maioria das vezes ficam vulneráveis e apresentam as condições necessárias e suficientes para se tornarem um criadouro de *Aedes aegypti*, o principal vetor da dengue nos países tropicais e subtropicais. Incentivos às formas complementares de combate ao mosquito da dengue estão sendo apoiados por todos os países do mundo. A disponibilização de uma vacina seria o grande passo; porém, enquanto não acontecer, o controle do vetor continuará sendo o grande aliado neste combate. O uso de larvicidas químicos que sejam específicos, eficazes e eficientes, que ofendam pouco ou nada o meio ambiente, talvez seja um dos caminhos para que se consiga chegar a alguma coisa parecida com uma vitória neste sentido. Neste processo, muitos larvicidas já foram tentados, e por motivos diversos, tantos já foram da mesma forma descartados. Uns pela resistência adquirida pelos insetos, outros por falta de eficiência, outros pela ineficácia, outros pela falta de especificidade e outros ainda por agredirem de forma exagerada o meio ambiente. Este trabalho busca através da pesquisa em laboratório, com renovação de água dos depósitos, documentar a eficácia do larvicida *Diflubenzuron*, hoje utilizado no município e na região metropolitana de Fortaleza, capital do Ceará, Brasil. Foram utilizados 24 depósitos de água especialmente construídos para a pesquisa. O material usado foi concreto e alvenaria, exatamente o mesmo material que de forma muito comum se usa nas residências de Fortaleza. Dos 24 depósitos 6 eram controles (não tratados com o larvicida) e 18 testes (tratados com o larvicida). A capacidade d'água de cada um deles é de 30 litros, sendo que foram abastecidos durante o experimento com 20 litros cada, com renovação diária de 20% (4 litros). A forma de avaliação utilizada foi a emergência para pupas (quantidade de pupas ocorridas em cada depósito), vez que esta, segundo muitos autores, é a mais eficaz forma de avaliação de um criadouro de mosquitos. A dosagem de larvicida por depósito teste foi efetuada de acordo com a tabela usada pelo programa de controle da dengue em Fortaleza, ou seja, 2,5 ml para 20 lts d'água. A pesquisa teve a duração de 71 dias, e pôde-se constatar que o *Diflubenzuron* é eficaz até os 46 primeiros dias do experimento, quando a quantidade de pupas ocorrida nos depósitos teste, praticamente se igualou às dos depósitos controle. Deve-se ressaltar que o período de retratamento de caixas d'água em Fortaleza pelos agentes de endemias é superior a 60 dias, portanto maior que o tempo considerado eficaz, observado nesta pesquisa.

**Palavras-chave:** Dengue. *Aedes aegypti*. *Diflubenzuron*. Renovação. Larvas. Pupas.

## ABSTRACT

Dengue fever remains a major public health problem in Brazil and worldwide. In northeast Brazil, where the capture and reserve drinking water is a vital need, the problem worsens. The deposits which serve for storage of water, most often are vulnerable and present the necessary and sufficient conditions for becoming a breeding *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue in tropical and subtropical countries. Incentives for additional ways to combat the dengue are being supported by all countries in the world. The availability of a vaccine would be the big step, but until it happens, vector control will continue to be a great ally in this fight. The use of chemical larvicides which are specific, effective and efficient, little or nothing to offend the environment, perhaps one of the ways for one to arrive at anything like a victory in this sense. In this process, many larvicides have been tried, and for various reasons, many have been similarly disposed. Some acquired resistance by insects, others for lack of efficiency, others ineffective, others for lack of specificity and others for attacking an exaggerated the environment. This paper seeks through laboratory research, renewal of water deposits, documenting the effectiveness of the larvicide *Diflubenzuron*, now used in the city and the metropolitan region of Fortaleza, capital of Ceara, Brazil. We used 24 water tanks specially constructed for the research. The material used is concrete and masonry, exactly the same material that is very common use in the homes of Fortaleza. 6 of 24 deposits were controls (not treated with larvicide) and 18 tests (treated with the larvicide). The water capacity of each is 30 liters and were supplied during the experiment to 20 liters each, with daily renewal of 20% (4 liters). The evaluation form used was the emergence for pupae (number of pupae occurred in each tank), since this, according to many authors, is the most effective way of evaluating a breeding of mosquitoes. The dose of larvicide deposit test was conducted in accordance with the table used by the control program of dengue in Fortaleza, ie 2.5 ml to 20 liters of water. The search lasted 71 days, and could be seen that the *Diflubenzuron* is effective until the first 46 days of the experiment, when the amount of test pupae occurred in deposits, nearly equaled the supervision of the deposits. It should be noted that the period of retreatment of water tanks in Fortaleza agents of endemics is superior than 60 days, so longer than the time considered effective, observed in this study.

**Key words:** Dengue. *Aedes aegypti*. *Diflubenzuron*. Renewal. Larvae. Pupae.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Casos e Incidência de dengue no Ceará entre 1986 e 2009.....	15
<b>Figura 02:</b> Casos de dengue entre 2001 e 2009 por município no Ceará.....	16
<b>Figura 03:</b> Incidência de dengue no Ceará por município entre 2001 e 2009.....	17
<b>Figura 04:</b> Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> . Brasil, 2006 .....	20
<b>Figura 05:</b> Incidência da dengue por município no Brasil , em 2002 e 2005.....	21
<b>Figura 06:</b> Estágios do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	23
<b>Figura 07:</b> Modo de transmissão do vírus.....	24
<b>Figura 08:</b> Exemplo de vaporização .....	50
<b>Figura 09:</b> Mapeamento da 1ª LIA de Fortaleza em 2009.....	51
<b>Figura 10:</b> Ambiência da pesquisa .....	61
<b>Figura 11:</b> Graf. 1- Tempo decorrido até emerg. pupas nos controles - 1º ciclo .....	76
<b>Figura 12:</b> Graf. 2- Tempo decorrido até emerg. pupas nos controles - 2º ciclo .....	77
<b>Figura 13:</b> Graf. 3- Tempo decorrido até emerg. pupas nos controles - 3º ciclo .....	77
<b>Figura 14:</b> Graf. 4- Tempo decorrido até emerg. pupas nos controles - 4º ciclo.....	78
<b>Figura 15:</b> Graf. 5- Tempo decorrido até emerg. pupas nos controles - 5º ciclo.....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Emergência de pupas do 1º ao 5º dia (1º ciclo), e do 6º ao 19º dia (2º ciclo) depósito teste	065
<b>Tabela 2</b> Emergência de pupas do 1º ao 5º dia (1º ciclo) depósito controle	066
<b>Tabela 3</b> Emergência de pupas do 6º ao 19º dia (2º ciclo) depósito controle	067
<b>Tabela 4</b> Emergência de pupas do 20º ao 30º dia (3º ciclo) depósito teste	068
<b>Tabela 5</b> Emergência de pupas do 20º ao 30º dia (3º ciclo) depósito controle	069
<b>Tabela 6</b> Emergência de pupas do 31º ao 46º dia (4º ciclo) depósito teste	070
<b>Tabela 7</b> Emergência de pupas do 31º ao 46º dia (4º ciclo) depósito controle	071
<b>Tabela 8</b> Emergência de pupas do 47º ao 71º dia (5º ciclo) depósito teste	072
<b>Tabela 9</b> Emergência de pupas do 47º ao 71º dia (5º ciclo) depósito controle	073
<b>Tabela 10</b> Emergência de pupas em todos os períodos depósito controle	074
<b>Tabela 11</b> Evolução temporal da concentração de Diflubenzuron	075
<b>Tabela 12</b> Evolução temporal da concentração de Diflubenzuron	075

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 Dengue .....	13
2.2 <i>Aedes aegypti</i> .....	18
2.3 Transmissão .....	22
2.4 Inseticidas .....	24
2.4.1 Adulticidas.....	24
2.4.2 Larvicidas .....	25
2.4.3 Organoclorados.....	26
2.4.4 Organofosforados .....	26
2.4.5 Piretróides .....	28
2.4.6 Biolarvicidas.....	28
2.4.7 IGR - Reguladores de crescimento de insetos .....	31
2.4.7.1 IGR – Análogos do hormônio juvenil – Juvenóides.....	33
2.4.7.2 IGR – Inibidores da síntese da quitina - Benzoilfeniluréia.....	35
2.4.7.2.1 Diflubenzuron .....	38
2.5 RESISTÊNCIA.....	48
2.6 CONTROLE.....	50
2.6.1 Controle de adultos.....	51
2.6.2 Controle da forma larvária.....	54
2.7 CRIADOUROS .....	54
<b>3 OBJETIVO</b> .....	<b>59</b>
3.1 Geral .....	59
3.2 Específicos .....	59
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>
4.1 Aspectos Gerais.....	60
4.2 Tipo de estudo .....	61
4.3 Ambiente da pesquisa.....	62
4.4 Procedimentos e Técnicas .....	64
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>90</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>91</b>
<b>9 ANEXOS</b> .....	<b>106</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A saúde pública mundial tem no controle da dengue um grande desafio. A doença se espalhou pelo planeta com o desenvolvimento da indústria náutica nos séculos XVIII e XIX (Gubler, 1997), e hoje ameaça mais de 2 bilhões de habitantes na Terra. Ela, juntamente com a Febre Amarela, causou epidemias desastrosas em cidades portuárias tendo como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti* da família *Culicidae* e gênero *Aedes* (Gubler, 1997).

Temporariamente, a Febre da Dengue deixou de ser um grande problema de saúde pública nos países tropicais americanos com o advento e utilização de higiene ambiental e novos inseticidas para o controle do mosquito vetor. Isto aconteceu também nas ilhas do Pacífico por conta do isolamento nos anos que se seguiram após a segunda guerra mundial (Gubler, 1997).

No sudeste da Ásia, no entanto, as perturbações ambientais causadas pela guerra, e o rápido desenvolvimento econômico, com o aumento do comércio e do tráfego de pessoas nos anos 50, resultou num aumento da transmissão naquela área (Gubler, 1997).

Uma pandemia global da Febre da Dengue foi iniciada na Ásia e levou ao surgimento de uma nova e severa forma da doença conhecida como Febre Hemorrágica da Dengue. A pandemia da Dengue foi intensificada nos últimos 34 anos com a expansão e distribuição geográfica tanto do mosquito como do vírus, aumentando tanto a transmissão epidêmica como a febre hemorrágica da dengue (Gubler, 1997).

A origem do vírus da Dengue tem sido motivo de discussão. Alguns autores defendem que teve origem na África e espalhou-se pelo mundo com o tráfico de escravos nos navios negreiros (Hirsch, 1883; Smith, 1956; Ehrenkranz et al. 1971; apud Gubler, 1997). Outra hipótese propõe que o vírus pode ter sido originado num ciclo florestal envolvendo primatas e mosquitos da península Malaia (Smith, 1956; Rudnick and Lim, 1986; Halstead, 1992; apud Gubler, 1997).

Independentemente da origem geográfica, o vírus da dengue provavelmente evoluiu como vírus de mosquitos antes de se tornarem adaptados a primatas e

humanos. Biologicamente, o vírus da dengue está altamente adaptado aos mosquitos vetores sendo mantida por uma transmissão vertical nas espécies de mosquitos responsáveis pelos ciclos florestais, com amplificação periódica nos primatas (Gubler, 1997).

A Dengue é uma doença global e uma das mais importantes doenças dos trópicos afetando perto da metade da população mundial (Gubler, 1997).

Há grandes evidências de que as condições atuais e as perspectivas futuras das Américas, e particularmente o Brasil, favorecem a expansão e o agravamento dos eventos relacionados com a dengue. Isto é resultado de uma situação de hiperendemicidade, associada à circulação de vários sorotipos, aumentando a probabilidade de imunoamplificação (WHO, 2002).

Até o momento, o único elo vulnerável da cadeia de transmissão da dengue é o vetor. Portanto, todas as formas de combate à doença estão direcionadas ao controle do mosquito, principalmente via redução dos potenciais criadouros das formas larvárias e do controle químico do mosquito adulto (PAHO, 1994).

O uso de inseticidas químicos tem sido o principal método de controle do *Aedes aegypti*, porém o meio ambiente vem sofrendo conseqüências nocivas com essa utilização descontrolada que poderão se manifestar nas próximas décadas (PAHO, 1984).

As estratégias de controle mudaram várias vezes desde a primeira campanha de redução dos vetores. Hoje, controle de vetores remete a controle integrado de vetores (Ima, 2007), ou seja, a associação do controle de mosquito alado (adulto), juntamente com o controle das formas larvais (imaturos), e o acompanhamento e monitoramento pela sociedade como um todo, no combate ao mosquito e à doença.

Este experimento envolve uma pesquisa acerca de um larvicida da classe IGR – Reguladores de crescimento de insetos, chamado *Diflubenzuron*, que hoje está sendo aplicado no município e na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará, Brasil.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Dengue

A dengue é uma doença transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo incriminadas várias espécies do subgênero *Stegomyia* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis*), nas quais o vírus foi encontrado na natureza. Experimentos em laboratório também mostraram a susceptibilidade de outras espécies de *Aedes* ao vírus da dengue. O mais importante vetor de dengue, entretanto, é o *Aedes aegypti* (Braga et al, 2007).

A Dengue é uma doença infecciosa febril aguda, cujo agente etiológico é o vírus de genoma RNA, do qual são reconhecidos quatro sorotipos (DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4). Pode ser de curso benigno ou grave, a depender de sua forma de apresentação: formas inaparentes, dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD), podendo evoluir para o óbito. Considera-se a dengue um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, especialmente nos países tropicais, cujas condições sócio-ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação de seu principal vetor o *Aedes aegypti*. A dengue é, hoje, uma das doenças mais frequentes no Brasil, atingindo a população em todos os estados, independente da classe social (MS, 2008). Até o ano de 2007, somente o estado de Santa Catarina não apresentou transmissão autóctone. Apesar da proporção relativamente baixa de casos graves (FHD/SCD) em termo de números absolutos, quando comparados aos casos de dengue clássico, esses devem ser vistos de forma especial, considerando suas altas taxas de letalidade e cuidados que essas formas demandam em relação aos pacientes (MS, 2008).

O isolamento do vírus ocorreu na década de 1940 por Kimura (1943) e Hotta (1944). Esta cepa recebeu a denominação de Mochizuki. Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa Havai – sorotipo 1. No mesmo ano, Sabin, identificou outro vírus em Nova Guiné – o sorotipo 2. Em 1956 foram isolados os vírus 3 e 4 (MS, FUNASA, 1998).

Todos os sorotipos da doença podem conduzir aos diversos tipos de dengue, passando do tipo mais simples, Dengue clássico, à Febre Hemorrágica da Dengue (Gubler & Kuno, 1997).

Infecções arbovirais (causadas por artrópodes) são responsáveis por milhões de casos de doenças todos os anos, sendo a maioria deles causados pela Dengue e suas severas e fatais síndromes da febre hemorrágica e síndrome do choque (DHF/DSS) (WHO, 1996).

A Dengue e a febre hemorrágica da Dengue, são duas das mais importantes doenças epidêmicas e afetam mais de 100 milhões de pessoas no Globo, especialmente nos países tropicais (Gubler & Kuno, 1997). Esta infecção é problema em mais de 100 países e é responsável pela hospitalização de mais de 500.000 pessoas por ano com taxa de mortalidade em torno de 5% causando a morte de dezenas de milhares de pessoas (WHO, 1996).

Quanto aos aspectos clínicos, as manifestações são variáveis, sendo as mais comuns: febre alta (39° a 40°) de início súbito, seguido de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retroorbital, náuseas, vômitos, exantema, prurido cutâneo (Regazzi, 2003).

Geralmente, a ocorrência de epidemias de dengue está diretamente relacionada com a presença e a densidade de seus vetores, como o *Aedes aegypti* e o *Aedes Albopicus* (Braga, 2007).

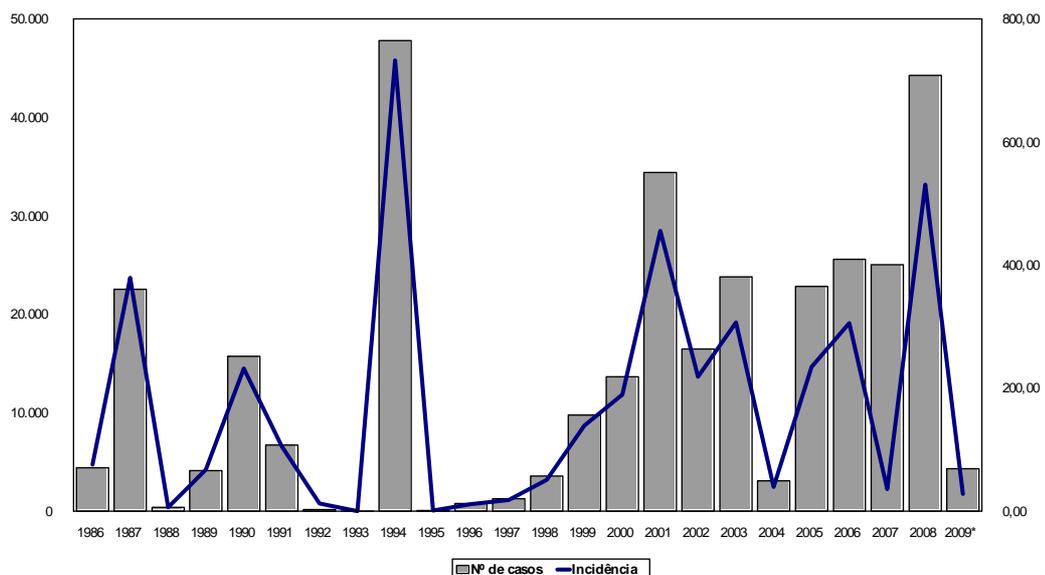
Segundo o Ministério da Saúde e Fundação Nacional da Saúde (1996), os primeiros relatos históricos sobre a Dengue foram mencionados na ilha de Java, em 1779. Também na Filadélfia, nos Estados Unidos, em 1780 ocorreram surtos da doença. Alguns autores citam que a primeira epidemia de Dengue ocorreu em 1784, nas cidades de Cádiz e Sevilha, na Europa. Outros citam que a primeira epidemia ocorreu em Cuba no ano de 1782. No século XIX, existem referências de três epidemias envolvendo o Caribe e a Austrália. No século XX, ocorreram várias epidemias na Austrália, Panamá, África do Sul, África Oriental e Grécia. No Brasil, existem evidências que apontam epidemias de Dengue desde 1846, nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro.

O Ceará figura como um dos mais importantes Estados do Brasil quanto ao número de casos reportados de dengue (Cunha, 1988).

Apesar do crescimento dos esforços de controle do vetor no Estado, a dengue continua se manifestando de forma endêmica com freqüentes surtos epidêmicos (Caprara, 2009). Sua primeira epidemia teve início em agosto de 1986, estendendo-se até novembro de 1987. Nesse período foram notificados cerca de 27.000 casos, com o pico de transmissão em abril de 1987 (Oliveira, 1996, apud Pontes et al, 2005).

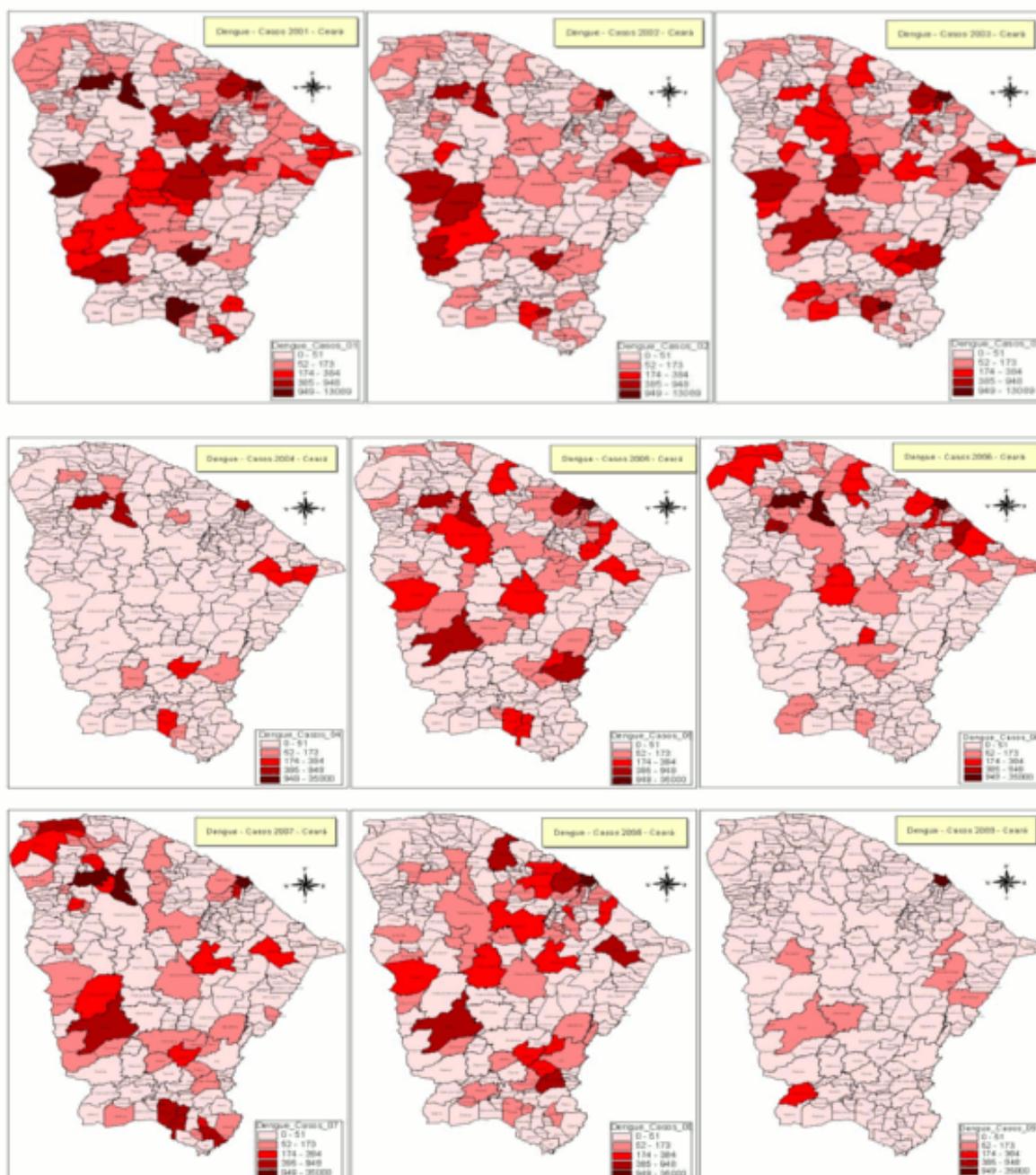
Desde 1986 nenhum ano se passou sem a confirmação de casos de dengue tendo, em 1994, a maior epidemia registrada nesse estado. A série histórica de dengue no Ceará (figura 3), apresenta alguns picos epidêmicos e, mesmo com todas as ações de controle desenvolvidas nos últimos anos, 2008 se apresentou como o segundo ano com o maior número de casos confirmados e o primeiro em número de casos hemorrágicos (Boletim SESA, 2009).

Abaixo, o gráfico da série histórica mostrando o número de casos e a incidência de dengue no Ceará entre os anos de 1986 e 2009 e os mapas espacializados por município também apresentando os casos e incidência da dengue entre os anos de 2001 e 2009.



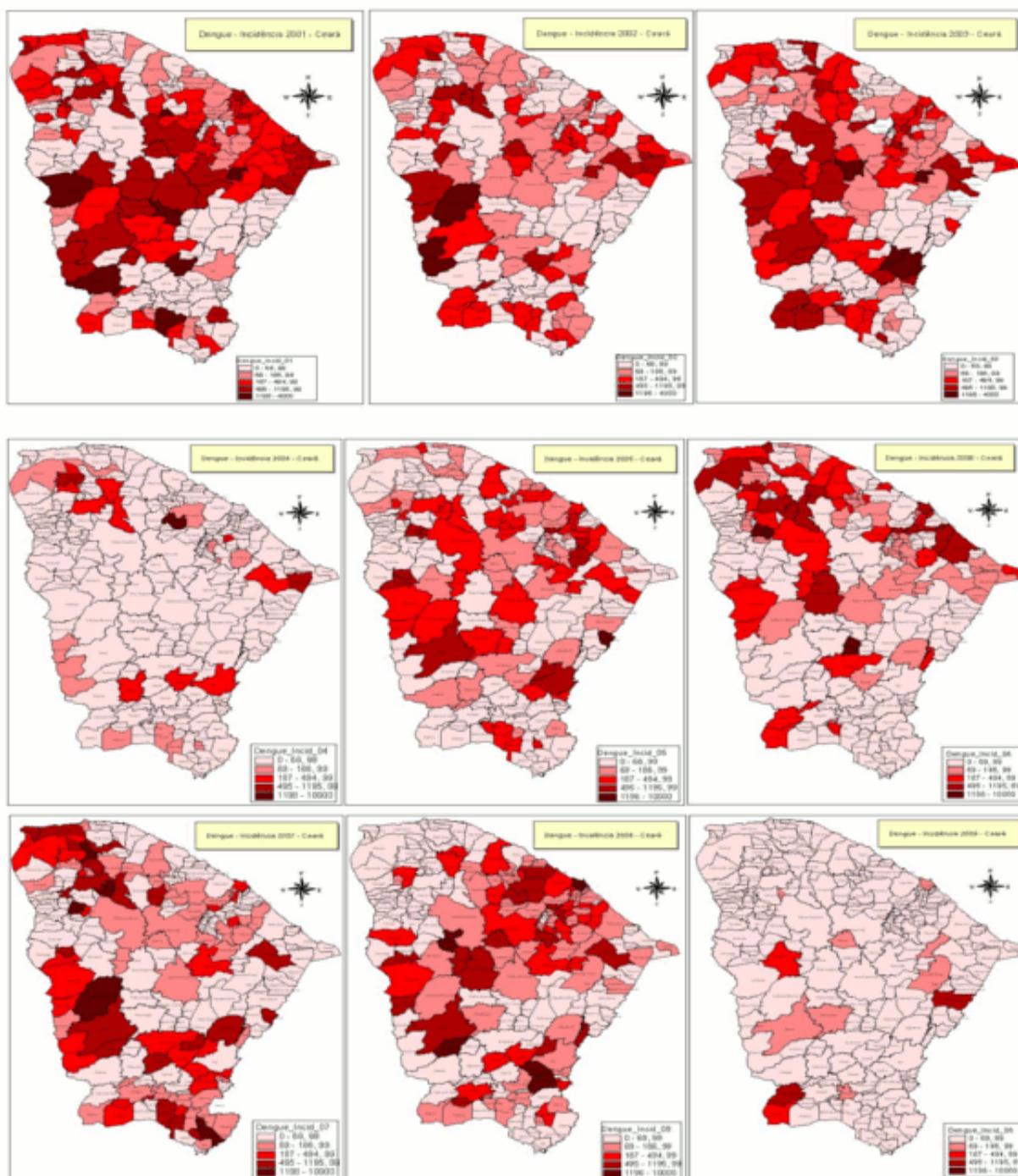
**Figura 1:** Casos e Incidência de dengue no Ceará entre 1986 e 2009.

Fonte: SESA - CE



**Figura 2:** Casos de Dengue no Ceará por município entre 2001 e 2009

Fonte: SESA - CE



**Figura 3:** Incidência de dengue no Ceará por município entre 2001 e 2009

Fonte: SESA - CE

Desde que ficou evidenciada a transmissão da Dengue por mosquitos adultos, iniciou-se o controle desta fase da vida do inseto (Forattini, 1962, apud Costa, 2007).

No Brasil, a dengue é uma doença de notificação compulsória, devendo todo caso suspeito ou confirmado ser notificado ao Serviço de Vigilância Epidemiológica, por meio do Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) do Ministério da Saúde.

## **2.2 *Aedes aegypti***

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) foi reconhecido como transmissor da febre amarela em 1881, por Carlos J. Finlay. Em 1906, Bancroft publicou as primeiras evidências de que o mosquito também era o vetor de dengue, fato posteriormente confirmado por Agramonte, em 1906, e por Simmons, em 1931. Provavelmente, esse vetor foi introduzido nas Américas a bordo de barcos vindos da Europa, que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações européias ao Novo Mundo. Os primeiros registros de sua identificação em terras do Brasil foram em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas. Atualmente, o vetor é encontrado em uma larga faixa do continente americano, que se estende do Uruguai até o sul dos Estados Unidos da América (EUA), com a ocorrência de surtos importantes de dengue em vários países, como Venezuela, Cuba, Brasil e, recentemente, Paraguai. No Brasil, o *Aedes aegypti* está presente nos 26 Estados e no Distrito Federal (Ima Braga, Denise Valle, 2007).

O *Aedes aegypti* apresenta duas fases evolutivas: fase larvária ou imatura (fase aquática) e fase adulta ou alada (fase aérea). O *Aedes aegypti* é uma espécie holometabólica (metamorfose completa) que passa por quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto. O estágio de larva acontece em quatro estádios (1º ao 4º), e o estágio de pupa é o último do ciclo aquático do inseto (Regazzi, 2003). Sua proliferação é sinantrópica em vilas e cidades onde existam alterações antrópicas do meio ambiente (Marcondes, 2001).

O *Aedes aegypti* é originário da África, possui a cor escura, rajado de branco nas patas e corpo, em tamanho é um pouco menor que um pernilongo comum. O

mosquito adulto vive, em média, de 30 a 35 dias. A sua fêmea põe ovos de 4 a 6 vezes durante sua vida e, em cada vez, cerca de 100 ovos, em locais com água limpa e parada. Um ovo do *Aedes aegypti* pode sobreviver por até 450 dias (aproximadamente 1 ano e 2 meses), mesmo que o local onde ele foi depositado fique seco. Se esse recipiente receber água novamente, o ovo volta a ficar ativo, podendo se transformar em larva, posteriormente em pupa e atingir a fase adulta depois de, aproximadamente, dois ou três dias. Quando não encontra recipientes apropriados (criadouros), a fêmea do *Aedes aegypti*, em casos excepcionais, pode voar a grandes distâncias em busca de outros locais para depositar seus ovos (MS, 2008).

A fêmea do *Aedes aegypti* é antropofílica, isto é, necessita de sangue preferencialmente humano para maturação dos ovos (Carrera, 1991).

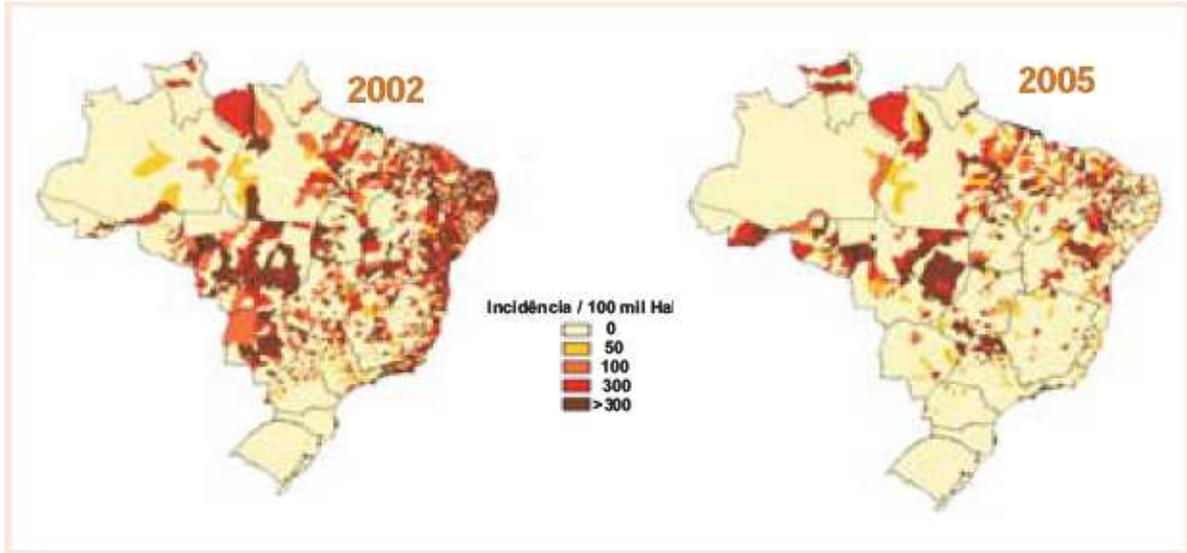
Nas Américas, o *Aedes aegypti* é o vetor urbano da Febre Amarela, da Febre da Dengue (DF), da Febre Hemorrágica da Dengue (DHF) e da Síndrome do Choque da Dengue (DSS), distribuindo-se desde o Norte dos Estados Unidos até o Sul da Argentina, ficando de fora apenas as ilhas Caymans. No Brasil como nas Américas, a principal espécie vetora da dengue é o *Aedes aegypti*, havendo também o *Aedes albopictus*, o qual não se tem até o momento comprovação de sua importância como transmissor dessa doença no Brasil. (PAHO, 1994).

Os mapas abaixo mostram a distribuição espacial do *Aedes aegypti* no Brasil em 2006, segundo o Programa Nacional de Controle da Dengue do Ministério da Saúde, e a incidência de dengue por município no Brasil em 2002 e 2005, também segundo o Ministério da Saúde.



**Figura 4:** Distribuição do *Aedes aegypti*. Brasil, 2006

**Fonte:** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão, Programa Nacional de Controle da Dengue.



**Figura 5:** Incidência da dengue por município no Brasil , em 2002 e 2005

**Fonte:** Ministério da Saúde

Na década de 1950, o *Aedes aegypti* foi considerado erradicado do território brasileiro. Em 1984 porém, o mosquito foi novamente identificado em Fortaleza, Ceará, provocando a primeira epidemia de dengue no estado. (Pontes *et al.* 2005).

Os primeiros registros do *Aedes aegypti* no Ceará demonstram sua presença no ano de 1851, devido a uma grande epidemia de febre amarela urbana onde foram relatados cerca de 28.500 casos dessa patologia, atingindo mais da metade da população da época (Franco, 1976, apud Cavalcanti, 2009). Em 1932 a Fundação Rockefeller realizou no Estado os primeiros levantamentos de índices em alguns municípios. No período de 1931 a 1949 o *Aedes. aegypti* foi encontrado em todos os municípios do Estado (Franco, 1976, apud Cavalcanti, 2009). Os focos do *Aedes aegypti* foram totalmente erradicados do Ceará até o ano de 1950, em virtude de um amplo programa de erradicação da dengue nas Américas e, até 1983, a literatura dos órgãos oficiais não relata nenhum foco do mosquito. No ano de 1984 foi detectado novamente foco no município de Aquiráz e, desde este período não foi mais possível erradicá-lo do território cearense (Franco, 1976, apud Cavalcanti, 2009).

Segundo Lima *et al.* (2005), o mosquito *Aedes aegypti* é o maior vetor de transmissão da febre de dengue e dengue hemorrágica e representa um significativo problema de saúde pública, além do que, existem 2 bilhões de pessoas nos trópicos suscetíveis à infecção do vírus. Esta espécie de mosquito é muito difundida no mundo, incluindo as regiões tropicais, subtropicais e temperadas.

### 2.3 Transmissão

A transmissão ocorre pela picada da fêmea do mosquito vetor.

A fêmea do *Aedes aegypti* costuma picar as pessoas durante o dia, para viabilizar a maturação dos ovos. Não há transmissão pelo contato de um doente ou suas secreções com uma pessoa sadia, nem em fontes de água ou alimento. O período de incubação do vírus varia de 3 a 15 dias, sendo em média de 5 a 6 dias. O período de transmissibilidade da doença compreende dois ciclos: um intrínseco, que ocorre no ser humano, e outro extrínseco, que ocorre no vetor. O intrínseco, que ocorre no organismo humano durante a viremia, vai de um dia antes do aparecimento da febre até o sexto dia da doença, e o extrínseco (no mosquito) quando o vírus se multiplica, por período de oito a doze dias e, a seguir, migra para as glândulas salivares. A partir de então, o vetor torna-se competente para transmitir a doença, até o final da vida, que é de seis a oito semanas para o *Aedes Aegypti* (MS., 1996).

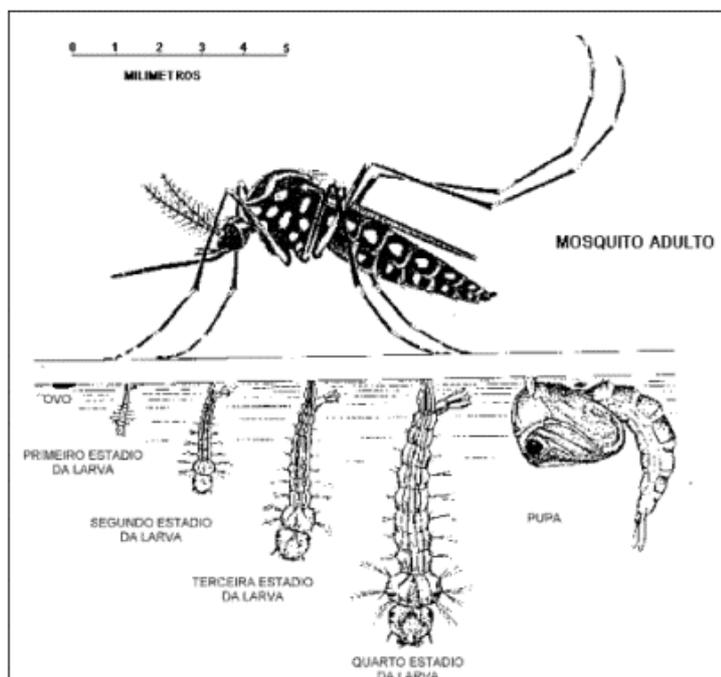
A transmissão do ser humano para o mosquito ocorre enquanto houver presença de vírus no sangue do ser humano, chamado período de viremia. O homem está apto a infectar o mosquito a partir de 1º dia antes do aparecimento dos sintomas até o 6º dia da doença (MS, 2008).

Existem alguns estudos que mencionam também a transmissão sexual do vírus da dengue. Foi demonstrado que machos de *Aedes Albopicus* infectados podem transmitir o vírus sexualmente para fêmeas da mesma espécie (Rosen, 1987; apud Gubler, 1997). Fêmeas de *Aedes Albopicus* infectadas experimentalmente, não transmitiram sexualmente o vírus para os machos. A capacidade dos mosquitos de transmitirem arboviroses sexualmente tem muito interesse por duas razões: primeiro, o isolamento de vírus em machos na natureza, é considerado evidência de

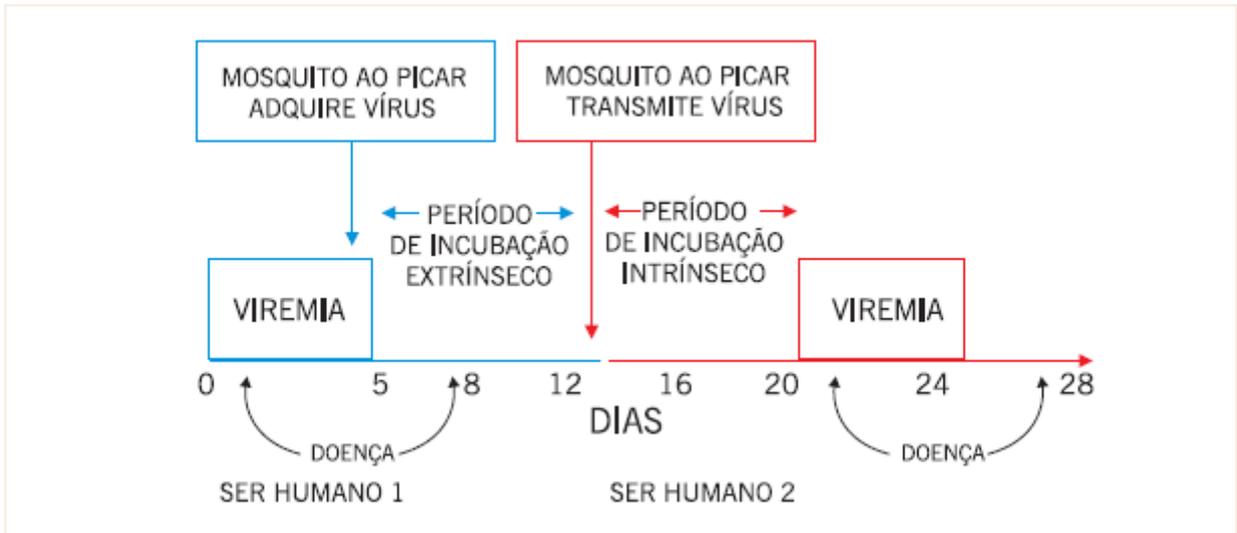
transmissão vertical, entretanto, se fêmeas de mosquitos puderem transmitir horizontalmente os arbovírus para os machos, sexualmente ou de outra forma, a origem do vírus advindo dos machos seria uma questão em aberto. Segundo, se os machos são infectados na natureza pela transmissão vertical, eles poderiam contribuir com a persistência viral, transmitindo vírus sexualmente para as fêmeas e indiretamente para as próximas gerações (F.Rodhain and Rosen, 1997; apud Gubler, 1997).

Outra forma de transmissão também estudada, é a transmissão transovariana. Foi observada uma alta taxa de infecção do vírus tipo 1 em *Aedes albopictus* e uma baixa taxa do vírus tipo 3. Em *Aedes aegypti* a transmissão transovariana foi observada com o sorotipo 1 (Rosen et al, 1983, apud Regazzi, 2003).

Abaixo, o ciclo evolutivo do *Aedes aegypti* e a representação gráfica do modo de transmissão do vírus segundo o Ministério da Saúde.



**Figura 6:** Estágios do mosquito *Aedes aegypti*



**Figura 7:** Modo de transmissão do vírus

Fonte: Ministério da Saúde

## 2.4 Inseticidas

O uso de inseticidas de amplo espectro causa forte impacto ao meio ambiente, uma vez que coloca em risco outras espécies de animais, incluindo os seres humanos (Williams, 1967).

Muitos materiais de origem natural já foram utilizados contra os insetos ao longo dos tempos: mercúrio, nicotina, arsênico e tabaco são alguns exemplos (Williams, 1967).

A necessidade de se criar produtos menos tóxicos, fez com que fossem desenvolvidos novos inseticidas. O DDT surgiu como primeira alternativa de produto com menor toxicidade se comparado aos anteriores que usavam arsênico em sua composição (Lima *et al.*, 2005).

### 2.4.1 Adulticidas

Os adulticidas são inseticidas utilizados no combate aos insetos adultos.

Os adulticidas mais utilizados foram os piretróides Aletrina, os derivados halogenados BHC e o Dieldrin, o fosforado Malation e o organoclorado DDT (Forattini, 1962, apud Costa, 2007).

O baixo custo e o alto poder residual do adulticida DDT (WHO, 2005B), fizeram com que este organoclorado tivesse sido usado de forma extensiva em todo o mundo. No Brasil ele foi amplamente usado no Norte e Nordeste estendendo-se depois para todas as áreas do país. As diferenças regionais e a seleção de populações de mosquitos diferentes, no entanto, dificultaram a continuação do uso do DDT (Costa 2007).

Os piretróides, outra categoria de adulticidas, 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).

#### **2.4.2 Larvicidas**

O combate às formas imaturas dos insetos, é executado com o uso de larvicidas aplicados em possíveis criadouros.

O acetoarsenito de cobre, conhecido como Verde-paris, foi bastante utilizado em campanhas de controle de imaturos, principalmente na campanha de erradicação do *Anopheles gambiae* no Nordeste brasileiro. A ação deste 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, apud Costa, 2007).

Larvicidas químicos e biológicos contendo uma variedade de ingredientes ativos como o Temefós, o BTI e os Reguladores de crescimento de insetos – IGR, têm sido desenvolvidos e recomendados para o controle da larva de *Aedes aegypti* (Mulla et al , 2004; Thavara et al, 2004).

### **2.4.3 Organoclorados**

Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono, hidrogênio e cloro. São classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos; hexaclorociclohexanos; ciclodienos; e policloroterpenos. O grupo de organoclorados difenil-alifáticos é o mais antigo. Ele inclui o DDT, provavelmente a substância química mais notória do século passado. Em 1948, o entomologista suíço Paul Muller foi premiado com o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da utilidade do DDT no controle dos vetores de malária, febre amarela e muitas outras doenças. Embora o modo de ação do inseticida nunca tenha sido claramente estabelecido, sabe-se que ele atua no canal de sódio, provavelmente mantendo-o aberto e destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios, impedindo, assim, a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos. Seu efeito é inversamente proporcional à temperatura: quanto mais baixa a temperatura, mais tóxico é o DDT para os insetos (Ware G.W., 2003; apud Braga, 2007).

Os organoclorados, embora tenham sido largamente adotados pelos programas de controle de insetos, tiveram seu uso descontinuado e chegaram, inclusive, as serem proibidos em vários países devido a sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecidos do organismo de animais e humanos (Braga, 2007).

### **2.4.4 Organofosforados**

O termo genérico 'organofosforado' (OP), atualmente usado, inclui todos os inseticidas que contêm fósforo. São amplamente utilizados em Saúde Pública por apresentarem muitas vantagens sobre os organoclorados, como serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos. Apresentam, porém, como principal desvantagem, a instabilidade química, o que torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação. Além disso, são mais tóxicos para os vertebrados que os organoclorados, mesmo em doses relativamente baixas (Ware G.W., 2003; apud Braga, 2007).

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) (Funasa, 2001).

A Superintendência de Campanhas de Saúde Pública do Ministério da Saúde – SUCAM e a Fundação Nacional da Saúde – FUNASA, usaram amplamente o larvicidas organofosforados. O Temefós (ABATE) foi um destes larvicidas, e como consequência deste amplo uso, instalou-se um processo seletivo que resultou na resistência dos insetos alvo.

Soares e colaboradores (1996), no Rio de Janeiro, realizaram um estudo comparativo com o larvicida organofosforado Abate<sup>®</sup> e o IGR análogo ao hormônio juvenil, Altosid<sup>®</sup> (Methoprene) no controle de *Aedes aegypti*. Os autores observaram menor efeito residual de Altosid quando comparado com o Abate e, segundo eles, como consequência disso haveria a necessidade de ciclos de tratamento menores que o utilizado até então pela FUNASA (intervalos de três meses), caso viessem a utilizar o IGR no controle de *Aedes aegypti*. Entretanto, deve-se salientar que o efeito residual de um inseticida pode sofrer variação de acordo com a formulação e maneira de aplicação (MULLA, 1995). Além do efeito residual, há vários outros aspectos que devem ser analisados para definição do uso de um inseticida como, seu espectro de ação, estabilidade sob condições externas, compatibilidade com outras estratégias de controle e sua toxicidade para humanos e outros animais (Hoffmann; Lorenz, 1998).

Depois da detecção da resistência do *aedes egypti* aos organofosforados – Temefos – no Brasil, as formulações corncob – CG e water-dispersible granule – WDG do *Bacillus thuringiensis israelenses* – Bti, foram introduzidas no tratamento de rotina no país (Vilarinhos, 2004).

Em 2002, o organofosforado Temefós foi substituído pelo *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) que foi utilizado até 2008 pelo programa, quando se passou a usar o larvicida IGR *Diflubenzuron*.

Trabalho realizado no Ceará em 2006 mostrou que todas as populações de mosquitos experimentados apresentaram resistência ao temefós, com razões de resistência variando entre 8 e 16. Esses achados reforçam as evidências anteriores

sobre a disseminação de resistência ao temefós em diferentes localidades do Estado submetidas a grande pressão de controle nas últimas décadas (Lima, 2006).

#### **2.4.5 Piretróides**

Os piretróides sintéticos, atualmente bastante estáveis, são produzidos em laboratório, a partir de uma substância natural, o piretro, extraído de crisântemos. São biodegradáveis, não cumulativos e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos, embora possam causar hipersensibilização e irritação das mucosas nesses animais. Para os animais aquáticos, entretanto, são extremamente tóxicos. Os piretróides contam, ainda, com as vantagens de serem muito ativos (atuam em pequenas doses) e desalojantes. Sua única desvantagem consiste no custo elevado (Braga et al, 2007).

Os piretróides apresentam modo de ação similar ao do DDT. Atuam, aparentemente, mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios. Alguns exemplos são: ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, flucitrinato, fluvalinato, praletrina, taufluvalinato, teflutrina e tralometrina (Braga et al, 2007).

#### **2.4.6 Biolarvicidas**

O rápido aumento da resistência aos vários inseticidas químicos e a maior consciência da população para a preservação do meio ambiente, conduziram à pesquisa e conseqüentemente ao uso de larvicidas biológicos como o *Bacillus thuringiensis israelensis* – *Bti*. Este tipo de larvicida causa uma ação entomopatogênica nas larvas de insetos suscetíveis após a ingestão de esporos do complexo cristalino protéico do inseticida. No intestino, os esporos deste complexo são dissociados por proteases do intestino, provocando a privação de alimentação até a morte das larvas (LIMA et al., 2005).

Produtos a base de *Bacillus thuringiensis* são comercializados há mais de 50 anos, com um mercado estimado em mais de 80 milhões de dólares ao ano (WHO, 1998). Previa-se que esta utilização poderia aumentar, seguindo à tendência

mundial de diminuição do uso de inseticidas químicos; na medida em que legislações de proteção ambientais mais rigorosas fossem adotadas e produtos mais eficientes e baratos fossem sendo lançados e aprovados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1988).

Dentre os agentes de controle biológico em utilização em todo o mundo, os bacilos entomopatogênicos apresentam especial importância. A primeira menção à doenças em insetos causadas por este tipo de bactéria entomopatogênica data de 1902, quando Ishiwata, no Japão, descreveu uma bactéria esporulante que causava mortalidade em bicho da seda (*Bombix mori*).

Em 1911 na Alemanha, Berliner descreveu o mesmo tipo de bactéria atuando sobre as traças da farinha (*Anagasta kuhniella*) e, em 1915 a denominou de *Bacillus thuringiensis*. Em 1977 e em 1983 ocorreram descobertas marcantes, que ampliaram o espectro de utilização dos bacilos entomopatogênicos. No primeiro caso, Golbert e Margalit (1977) trabalhando com solos de Israel, encontraram uma estirpe de *Bacillus thuringiensis*, efetiva contra dípteros (culicídeos e simúlídeos) que logo chamou a atenção por sua elevada potência larvicida e que foi batizada como *Bacillus thuringiensis subesp.israelensis* (Dias, 1992).

Segundo Dias (1992), existiriam pelo menos três causas que poderiam ser imediatamente apontadas como fortes limitantes para a utilização dos inseticidas bacterianos em grande escala. A primeira diz respeito aos custos, ainda elevados de produção, que se reflete em custos de utilização. Outra causa aparente para a baixa utilização é a sua especificidade, o que para a preservação do ambiente é uma grande vantagem. E um terceiro aspecto, também importante, é a baixa persistência do efeito larvicida dos produtos quando usados em campo, devido a influências ambientais, tais como temperatura, exposição ao sol, excessiva renovação de água, dentre outras.

Segundo Thiéry *et al* (1999), o BTI e o *Bacillus sphaericus* (Neide), são os únicos larvicidas biológicos a serem utilizados nos programas de controle do mosquito da dengue. Várias publicações dão conta de resistência ao *Bacillus sphaericus* em diversos países (Silva-Filha *et al.* 1995). Em 19 anos de tratamento

não foram registrados casos de resistência ao *Bti*, e isto ocorre porque o *Bti* produz 4 toxinas que agem sinergicamente (Thierry *et al.*, 1999).

Em 2002, pesquisadores da Universidade Federal do Ceará em parceria com a Fundação Nacional de Saúde iniciaram experimentos, em condições de laboratório, com o objetivo de determinar o efeito residual de cada uma das diferentes formas comerciais dos larvicidas Temephós e *Bacillus Thuringiensis Israelensis* (Pontes *et al.* 2005). Foram usados nos experimentos béqueres de 1.000 ml que eram esvaziados diariamente através de mangueiras plásticas, deixando um volume residual de 200 ml. Após o esvaziamento, era acrescida nova água até atingir o volume de 1.000 ml. O número de larvas mortas era então aferido, indicando o efeito residual dos respectivos larvicidas. Eram então repostas 25 novas larvas diariamente nos béqueres durante os 102 dias em que durou o experimento. O efeito residual foi definido como a capacidade de um larvicida de manter dosagens letais para um organismo alvo por um determinado período de tempo, naquele caso, aferido através das incidências de mortalidade diárias de larvas (Pontes *et al.* 2005).

Polanczyk (2003) acredita que o *Bti* pode ser uma alternativa eficiente de controle devido a vantagens como segurança humana e baixo potencial de seleção de resistência.

Experimento de Vilarinhos (2004), sobre o efeito residual do BTI em condições experimentais, em sistemas sem renovação da água, com depósitos colocados fora de casa à sombra, e com alocação de 40 larvas por semana, mostra que menos de 5% das larvas evoluíram para pupas durante 11 semanas.

Segundo Lima *et al.*(2005), embora o *Bti* seja reconhecido como um eficiente bioinseticida, formulações adequadas que apresentem uma alta persistência em campo ainda não foram avaliadas. Testes de laboratório mostram que a persistência do *Bti* pode chegar a 100 dias, entretanto, testes de campo mostram que o efeito residual das formulações de *Bti* chega a duas ou três semanas apenas. Isto pode levar à reflexão de que os intervalos de aplicação do larvicida devem ser repensados no sentido de observar a persistência ou efeito residual do mesmo. Além disso, outros vieses de observação é que o efeito residual do *Bti* varia de acordo com o tipo de depósito, temperatura ambiente e também exposição ou não à luz solar.

Diferentes estudos foram conduzidos com outros tipos de larvicidas biológicos, como o estudo da “*Atividade residual do Bacillus thuringiensis MEDELLIN e JEGATHESAN no Culex Pipiens e Aedes aegypti*” pelos pesquisadores Isabelle Thiéry, Florense Fouque, B. Gaven e C. Lagneau em 1999. Neste estudo, entretanto, em condições de laboratório, verificou-se que ambos os larvicidas, eram 10 vezes menos tóxicos para as larvas do mosquito que o *Bti*.

Trabalho de Pontes et al (2005) mostrou a maior eficácia de duas apresentações de temefós sobre outras apresentações comerciais do *Bacillus thuringiensis israelensis*, mesmo em uma situação epidemiológica de longa exposição ao produto e com renovação de água dos recipientes. No mesmo ensaio, é mostrado também a perda do efeito residual do *Bti* em recipientes com renovação d’água.

#### **2.4.7 IGR - Reguladores de crescimento de insetos**

O entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos de muda dos insetos e a descoberta de que aplicação do hormônio juvenil e de seus análogos poderia interferir no desenvolvimento dos insetos e até eliminá-los, acabou resultando no surgimento dos Reguladores de Crescimento de Insetos (*IGR*) (Wilson, 2004), pertencentes a uma classe de agentes controladores que diferem amplamente dos inseticidas convencionais por atuarem provocando mudanças morfofisiológicas durante o processo de desenvolvimento e metamorfose do inseto, além de induzirem efeitos morfogênicos que podem resultar em completa inibição da emergência de adultos (Graf, 1993).

Mulla e Darwazeh (1989) demonstraram a efetividade de outros *IGR* no controle de mosquitos em laboratório e em campo, em baixas concentrações (0,01, 0,05 e 0,025 ppm) inibindo o desenvolvimento de larvas e a emergência de adultos de *Aedes nigromaculis* Ludlow, 1906, *C. tarsalis* e *P. columbiae*.

Os *IGR* têm se tornado importante ferramenta para o controle de mosquitos desde a década de 1970 nos Estados Unidos, quando o juvenóide Methoprene começou a ser empregado para este fim e dez anos depois, também com a utilização de *Diflubenzuron* (Estrada e Mulla, 1986, apud Thavara, 2007).

Os *IGR* 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 da quitina (Graf, 1993).

Os *IGR* são considerados, segundo alguns autores, a “terceira geração de inseticidas” (Graf, 1993) e podem ser divididos em três categorias de acordo com seu modo de ação: os análogos ao hormônio juvenil, os inibidores da síntese e/ou deposição de quitina e os derivados do composto orgânico triazina que também interferem na muda e pupação (Graf, 1993).

Os *IGR* têm como alvo outros órgãos que não os do sistema neural e, devido a sua atuação em sistemas específicos dos insetos, são caracterizados como produtos seletivos, apresentando-se como alternativa em programas de controle de vetores e no manejo de resistência a inseticidas convencionais (Graf, 1993).

De acordo com Mulla (1995), muitos *IGR* induzem a anormalidades e efeitos retardados em imagos que estejam aptos a uma emergência de sucesso. Os efeitos incluem aberrações morfogenéticas, declínio na reprodução e fertilidade e falhas na reprodução.

Os *IGR* têm uma habilidade específica para interromper o ciclo de vida de insetos inibindo sua maturidade e mantendo-os fora do alcance da idade adulta crítica. Os compostos que têm as propriedades de regulação de crescimento de insetos pertencem às classes de benzamidas, benzoylureas, carbamatos, terpenóides, triazinas, e outras classes de produtos químicos (Mulla, 1995).

Algumas de suas vantagens são: espectro de ação mais restrito, ausência ou baixa toxicidade para a maioria dos organismos não alvos como insetos benéficos e vertebrados, incluindo o homem e animais domésticos (Chen et al., 2005).

Os *IGR* podem de um modo geral afetar a fauna não alvo, uma vez que existem no ambiente aquático diversos artrópodes e outros organismos formadores de quitina. Entre eles podem-se citar insetos, crustáceos, copépodes, ácaros aquáticos entre outros (Costa, 2007).

Segundo Floore (2006), os *IGR* só devem ser usados em habitats limitados e que não são ambientalmente sensíveis por afetar adversamente a fauna de artrópodes.

#### **2.4.7.1 IGR – Análogos do hormônio juvenil – Juvenóides**

Na década de 30, com estudos básicos da fisiologia dos insetos, começaram os estudos que viriam subsidiar o conhecimento para uma alternativa de controle de insetos com o uso de larvicidas do tipo *IGR* (Chamberlain, 1975). Em 1936, Wigglesworth, estudando diferentes estágios de *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae), descobriu que o hormônio juvenil possui duas funções principais na fisiologia e ciclo de vida de insetos: controlar a metamorfose e regular a reprodução em adultos (Noriega, 2004). No entanto, somente em 1956 foi isolado o hormônio juvenil do extrato cru do abdome de machos da mariposa *Hyalophora cecropia* (L.) (Lepidoptera: Saturniidae) e observado que sua aplicação tópica impedia a metamorfose e a reprodução do inseto. Contudo, a possibilidade do emprego deste hormônio como controlador do desenvolvimento de insetos foi estudada apenas em 1965 (Tunaz; Uygun, 2004).

Dentre as diversas classes de *IGR*, os análogos ao hormônio juvenil ou juvenóides, principalmente o Methoprene, está entre os mais amplamente estudados visando o controle de mosquitos (Soares et al., 1996). Uma característica comum destes compostos é não provocarem mortalidade rápida nas larvas. Embora consigam sobreviver nesta fase, morrem no estágio de pupa ou durante o processo de emergência do imago (Mulla, 1995).

Os principais hormônios envolvidos no desenvolvimento, metamorfose e reprodução em insetos são os neuro-hormônios ou neuro-peptídeos, ecdisteróides ou hormônios de muda e os hormônios juvenis (Hoffmann; Lorenz, 1998).

O termo hormônio juvenil (juvenóides) refere-se a uma classe de hormônios reguladores da muda e reprodução pertencente ao grupo dos sesquiterpenóides, sintetizados e liberados por um par de glândulas endócrinas conectadas ao cérebro, os corpos alados (Noriega, 2004).

A atuação dos juvenóides em mosquitos se dá principalmente durante um período de maior susceptibilidade larval, chamado janela de susceptibilidade, que ocorre geralmente durante o quarto estágio (Mulla, 1995).

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 *IGR*.

Em um experimento com o Piryproxifen, em 2003 no Cambodja, Seng e colaboradores, mostraram que este *IGR* é bastante efetivo no controle de larvas de *Aedes aegypti*. Num intervalo de 8 meses na dosagem de 26 ppb e 36 ppb com a formulação de 4,8% de ingrediente ativo do larvicida, alcançou-se um índice de inibição de emergência de adulto > 87%. Neste experimento, foram usados 20 depósitos de concreto de 200 lts com 150 lts de água da torneira em cada um, sendo feita a reposição de 2/3 (dois terços) dessa água mensalmente, além da recolocação de 100 larvas de 1º e 2º estádios. A observação dos depósitos era feita diariamente, e as pupas encontradas eram contadas e transportadas para os beckeres correspondentes de 500 ml, com água do próprio depósito, afim de que eclodissem em gaiolas apropriadas.

Braga e colaboradores (2005) analisaram o efeito do juvenóide Methoprene sobre *A. aegypti* em laboratório e registraram grande mortalidade, principalmente em pupas, além de diferentes graus de alterações morfológicas.

Em outro estudo realizado na Malásia em 2005 por Indra Wythilingam et al. com o *IGR* análogo do hormônio juvenil Piryproxifen no controle de *Aedes aegypti*, usando depósitos com 50 litros de água com 100 larvas de 3º estágio, mostrou que em depósitos com renovação de água de 20% a cada 15 dias, a eficácia do *IGR* Piryproxifen, avaliada pelo percentual de inibição de emergência de adultos, ajustando pela mortalidade de larvas e pupas nos controles correspondentes segundo a fórmula de Mulla et al. (1974), 100% de inibição de emergência foi conseguido nos primeiros 4 meses com a dosagem de 0,02 mg/l do ingrediente ativo. No quinto e sexto mês, os percentuais de emergência caíram para 20% e 12% respectivamente.

No Japão foi desenvolvido um instrumento denominado EcoBio Block para uso em larga escala na despoluição de rios. O EcoBio Block é um bloco formado por rocha vulcânica porosa e moldado com cimento, impregnado por uma bactéria aeróbica do grupo *bacillus subtilis natto*, para servir como decompositora de matéria orgânica. A liberação do produto é lenta e de acordo com a situação do que deve ser tratado. Kawada e colaboradores (2006) tiveram a idéia de juntamente com a bactéria, impregnar também o bloco com 0,5% de formulação granular de piriproxifen. Criou-se então o EcoBio Block S, que além de se prestar ao antigo objetivo, servia agora como liberador lento de larvicida para inibição do crescimento de larvas de mosquitos. Constatou-se que após 14 dias havia grande concentração do larvicida na água tratada pelo instrumento, e após recálculo dos percentuais ideais do piriproxifen, atingiu-se uma liberação de até 150 dias.

#### **2.4.7.2 IGR – Inibidores da síntese da quitina - Benzoilfeniluréia**

O controle químico com os Reguladores de Crescimento de Insetos (*IGR*), constitui-se da 3ª geração de inseticidas sintéticos e foram desenvolvidos inicialmente na década de 1970 (Consoli e Oliveira, 1993, apud Regazzi, 2003).

Atualmente, são descritos e comercializados os seguintes *IGR* derivados da benzoilfeniluréia: Bisterifluron, Chlorfluazuron, Flucycloxuron, Flufenoxuron, Hexaflumuron, Lufenuron, Novaluron, Noviflumuron, Penfluron, Teflubenzuron, Triflumuron e o *Diflubenzuron*. No Brasil, estes dois últimos já são comercializados por empresas especializadas.

A quitina é um dos principais componentes da cutícula dos insetos. É um polímero de N-acetilglucosamina e glucosamina que serve de matriz para a deposição de escleroproteínas e também faz parte da membrana peritrófica destes artrópodes (CHEN et al., 2005).

Merzendorfer e Zimoch (2003), em uma revisão sobre o metabolismo da quitina em insetos, destacam a importância deste aminopolissacarídeo para a sua sobrevivência. A cutícula dos insetos forma um exoesqueleto com estrutura mais ou menos rígida devido à presença de escleroproteínas, limitando o crescimento do inseto. Desta forma, para crescer e se desenvolver, os insetos devem substituir

periodicamente sua cutícula velha por uma nova que, antes de se esclerotizar, é suficientemente flexível para permitir alguma expansão (Merzendorfer e Zimoch, 2003). Para que isso ocorra, eles devem perder a cutícula velha durante a muda, iniciada por uma multiplicação celular na epiderme seguida pela apólise, processo que separa as células epidermais da cutícula precedente pela secreção do fluido de muda e formação da membrana de ecdise (Merzendorfer e Zimoch, 2003). O fluido de muda contém proteases e quitinases que digerem a endocutícula velha cujos componentes são reciclados. A formação da nova cutícula começa após o espaço de ecdise se abrir como resultado da secreção das proteínas da cutícula e fibras de quitina pelas membranas apicais das células epidermais. Há a formação de uma cutícula quitinosa não esclerotizada, a procutícula e da epicutícula externa. Esta fecha a epiderme e a protege contra as enzimas digestivas do fluido de muda. Finalmente, ocorre a ecdise, saída do farado da cutícula antiga. No final da ecdise ou imediatamente após este processo, o inseto expande a nova cutícula antes de seu enrijecimento por esclerotização (Merzendorfer e Zimoch, 2003). Dessa forma, o crescimento e o desenvolvimento são totalmente dependentes da capacidade dos insetos de remodelar estruturas quitinosas. Eles sintetizam e degradam a quitina de forma altamente controlada para permitir não somente a ecdise, mas também a regeneração da membrana peritrófica presente no epitélio do intestino médio e importante para o processo de digestão de alimentos e proteção contra patógenos (Merzendorfer e Zimoch, 2003).

Portanto, qualquer interferência na ação dos hormônios envolvidos nos processos de muda e desenvolvimento, seja por fontes exógenas de hormônios ou de seus análogos sintéticos, poderia resultar na interrupção ou até mesmo, anormalidade no desenvolvimento e reprodução de insetos (Lorenz, 1998). Da mesma forma que os análogos ao hormônio juvenil, o desenvolvimento e aplicação de compostos químicos que interferem no metabolismo da quitina têm tido especial interesse para o controle de pragas (Chen et al., 2005).

Informe da Organização Mundial de Saúde (1983), diz que o modo de ação dos derivados da benzoilfeniluréia 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.

Diferentemente dos análogos ao hormônio juvenil, os inibidores de síntese de quitina agem nas larvas durante o processo de muda. Estas, em processo de muda, não conseguem se libertar completamente da cutícula precedente, possivelmente devido à inibição na deposição de quitina, não conferindo a estabilidade necessária para que as mesmas se livrem da cutícula (Mulla, 1995).

Ainda segundo a Organização Mundial da Saúde (1983), o controle de simulídeos (Diptera, Simuliidae) apresenta muitas dificuldades, porém os programas de controle de larvas de mosquitos com IGR, principalmente com *Diflubenzuron*, tem 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.

Miura e Takahashi (1976, apud Vasuki, 1992) demonstraram a atividade ovicida do SIR 8514, derivado da benzoilfeniluréia, que resultou em diminuição na taxa de eclosão de ovos, assinalando anormalidades no momento da eclosão e má formação de embriões *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 dos seus ovos.

Experiência realizada por Vasuki e Rajavel na Índia em 1992, com o IGR inibidor da síntese da quitina Hexaflumuron, mostrou que larvas de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* tiveram completa inibição de emergência com dosagem de 0,001 a 0,1 mg/l, e 75% de inibição de emergência com dosagem de 0,0001 mg/l para os mesmos tempos de exposição. O experimento consistia em expor larvas de 4º estágio por tempos variando entre 10 e 60 minutos em água tratada com o larvicida, depois “lavá-las” em água corrente e recolocadas em depósitos com água não tratada com o larvicida.

Outro derivado da benzoilfeniluréia, o *Alsysin*, 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 potencial regulador de quitina (Rehimi e Soltani, 1999; apud Costa, 2007).

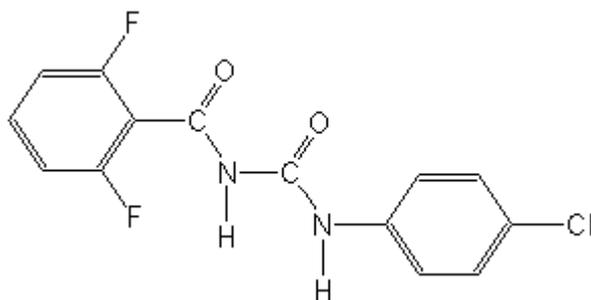
*Diflubenzuron* é um dos IGR pertencentes ao grupo das chamadas benzoilfenilureias, descobertos na década de 70 (Chen et al., 2005). Este IGR tem a capacidade de inibir a síntese de quitina, possuindo atividade ovicida e larvicida (Graf, 1993). Como no caso de Methoprene, vem sendo estudado como alternativa em programas de controle de mosquitos (Silva, 2004).

#### 2.4.7.2.1 Diflubenzuron

O *Diflubenzuron* foi o primeiro derivado da benzoilfeniluréia sintetizado e utilizado no controle efetivo de várias espécies de insetos. Inicialmente foi desenvolvido para controle de ervas daninhas, porém exibiu pobre atividade herbicida. Observou-se, entretanto, dificuldade na muda em insetos que se alimentaram de folhas tratadas pelo *Diflubenzuron*. Passou-se então a intensificar as pesquisas para o controle de insetos-praga na agricultura (MS.,2008).

O *Diflubenzuron* é um potente inibidor da síntese da quitina provocando morte do inseto em conseqüência da má formação da cutícula, diferente dos outros inseticidas que agem por intoxicação direta. Os estádios mais susceptíveis à ação desse inseticida são os jovens em virtude de suas sucessivas ecdises (Eisler, 1992, apud Costa, 2007).

A nomenclatura oficial e as fórmulas molecular e estrutural do *Diflubenzuron* são respectivamente: 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoil) uréia,  $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$  e



Com o *Diflubenzuron*, ocorre uma interferência na formação da quitina, um dos principais componentes da cutícula dos insetos. Depois de ingerir o inseticida, as larvas têm dificuldades na mudança periódica de pele, conhecida como ecdise. A consequência disso é que a cutícula mal formada pode não suportar a pressão interna durante a ecdise, ou não conseguir dar suficiente suporte aos músculos envolvidos, resultando na incapacidade de liberar os restos deixados pelo inseto (exúvia) e na morte das larvas, cortando o ciclo das doenças na fonte (MS.,2008).

O produto deve ser aplicado nos estádios iniciais do desenvolvimento larvário, nos locais onde é mais comum a postura de ovos como áreas com elevado teor de material orgânico e onde há umidade. É recomendável que, em épocas de seca, o tratamento seja repetido de 20 a 30 dias e, em épocas de chuva, a cada 10 ou 15 dias. Esses intervalos podem variar dependendo das condições específicas do local onde o produto está sendo aplicado (MS.,2008).

O *Diflubenzuron* simula o hormônio regulador do mosquito, o que provoca a morte do inseto-alvo, preservando seus inimigos naturais pertencentes ao grupo. Devido a sua especificidade, ainda não se notificaram danos ambientais, nem se registrou resistência dos insetos. Os inseticidas convencionais, contra a dengue, estão em desuso, por causa da resistência desenvolvida pelos insetos. O *Diflubenzuron* age sobre a formação do exoesqueleto dos insetos por ser uma substância não-hormonal. A vantagem desse composto é ser praticamente atóxico para os mamíferos, pássaros e peixes. Por não ter havido casos de intoxicação nos estudos realizados em diversas partes do mundo, o inseticida tem grande potencialidade de uso em águas de consumo humano. O *Diflubenzuron* pode provocar efeitos tóxicos apenas em concentrações acima de 4500 ppm (MS.,2008).

Larvas de insetos tratadas com *Diflubenzuron* desenvolvem cutículas que são incapazes de resistir ao aumento do turgor ocorrido durante a ecdise e assim falha para sustentar os músculos durante a muda (Eisler, 1992, apud Costa, 2007). 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 também relatado por 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 (Post et al., 1974; apud Braga, 2007)). Neste mecanismo os últimos passos da deposição da quitina no tegumento são prejudicados (Hajjar e Casida, 1978, apud Braga, 2007).

O principal modo de ação do *Diflubenzuron* é por ingestão, no entanto, já foram relatados casos de ação por contato direto com o tegumento (Groscourt e Jongsma, 1984).

Desde 1982 a OMS preconiza o uso do *Diflubenzuron* para o controle de mosquitos (MS.,2008).

Um relatório da Secretaria de Vigilância em Saúde do MS em 2005, coordenado pela Dra. Ima Braga, efetivado em Volta Redonda RJ, e outros 3 municípios do Brasil, mostra que a mortalidade de larvas de 3º estágio tratadas com *Diflubenzuron* a 25% ia, permanece alta até 13 semanas em caixas d'água, até 10 semanas em tambores internos e até 5 semanas em tambores externos. No mesmo experimento realizado em Arapiraca, Al, a mortalidade permaneceu alta até 16 semanas em caixas d'água, até 12 semanas em tambores internos e até 8 semanas em tambores externos. Estes experimentos mostraram ainda que, a mortalidade de pupas foi baixa, ocorrendo apenas após a 3ª semana, provavelmente porque a concentração do larvicida tenha diminuído.

Segundo Juliana Junqueira (2006), em trabalho realizado em Uberlândia-MG, as maiores concentrações de *Diflubenzuron* causaram mortalidade nas larvas de 4º estágio expostas ao produto, principalmente nas primeiras 48 horas de exposição. As menores concentrações do produto ( 2 e 3 ppb), promoveram menor mortalidade e de forma mais lenta.

Ainda segundo Juliana Junqueira (2006), a concentração letal próxima a 95% de *Diflubenzuron*, 10 ppb, promoveu alta mortalidade sobre larvas de todas as idades e estádios. Quase todas as larvas acima de 72 horas de idade (início de 4º

estádio) expostas a este IGR, morreram num período de 48 h. Sua ação em larvas de 4º estágio mais velhas (acima de 72h) promoveu mortalidade principalmente durante a forma intermediária entre larva e pupa.

Pesquisas com o larvicida *Diflubenzuron* na Tailândia, mostram que a eficácia do produto em condições de campo, com aplicações em depósitos de armazenamento de água sem renovação do volume d'água, foi determinada uma persistência (inibição da emergência de aproximadamente 100%) de até 22 semanas na dose de 0,02mg de i.a./litro. Nos depósitos com renovação de água (50% do volume repostado semanalmente), a inibição da emergência foi observada por até 15 semanas na dose de 0,1 mg de i.a./litro (U. Thavara, 2007).

Em 2007, Thavara et al, procederam a dois experimentos paralelos com duas formulações (Tablet 40 mg ie/tablet e granulado 2% ie) de Diflubenzuron para avaliarem a eficácia do larvicida. No primeiro experimento, foram usadas 25 larvas de 3º estágio em jarras de 200 lts de água, tratada cada uma com uma dosagem de uma das formulações do larvicida. Neste experimento foram usadas 5 dosagens diferentes (0,02; 0,05; 0,1 0,5 e 1 mg/l) do larvicida, e a água das jarras não foi renovada. No outro experimento, foram usadas as mesmas quantidades de pupas, o mesmo volume de água, porém 3 dosagens diferentes com renovação de água semanal de 50% do volume. Em ambos os experimentos, a eficácia do Diflubenzuron foi a mesma (96-100 %) dependendo da dosagem aplicada, durante as 23 semanas seguintes ao início dos tratamentos.

Um trabalho realizado no estado do Amazonas por Fabio Costa em 2007, relativo ao mosquito *Anopheles Darling*, vetor primário da Malária, mostra que o *Diflubenzuron* foi bastante efetivo em larvas de 3º estágio, promovendo mortalidade de 100% em todas as concentrações verificadas.

Ainda segundo Costa (2007), as concentrações testadas de *Diflubenzuron*, mostrou que o larvicida é altamente efetivo contra as larvas de 4º estágio de *Anopheles Darliing*. Das doze 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%.

Em relação à suscetibilidade de pupas, segundo o mesmo trabalho, o *Diflubenzuron* apresentou alta atividade pupicida na concentração avaliada tanto para pupas jovens quanto para as de 1 dia, com uma inibição de emergência mediana de 60 a 100%.

Nos testes de exposição de 24 e 48 horas das larvas de 4<sup>o</sup> estágio, na concentração de 0,006 ppm, neste mesmo experimento, o *Diflubenzuron* produziu 100% de mortalidade em algumas replicas, e houve diferença entre os períodos apenas nos controles.

Ainda na mesma pesquisa, o *Diflubenzuron* foi bastante efetivo na concentração de 0,006 ppm para as larvas de 3<sup>o</sup> estágio com mortalidade média de 77%.

A média de Inibição de Emergência (IE) para larvas de 4<sup>o</sup> estágio foi de 72%, segundo o mesmo estudo.

Miller *et al.* (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*.

Mulla *et al.* (1975) aplicaram em lagos o *Diflubenzuron* nas concentrações de 0,08 e 0,016 ppm obtendo controle satisfatório de larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios de *Culex tarsalis* Coquillet, 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.

Ali e Mulla (1977, apud Costa, 2007) 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 IGR 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, apud Mulla, 1995).

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 de 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.

Haijar (1979) demonstrou por meio de experimentos em laboratório que o *Diflubenzuron* em baixa concentração – 9 ppb, 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 larvicida.

Axtell *et al.* (1979, apud Costa, 2007) 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 0,01 ppm.

Aguilera *et al.* (2001) trabalharam com ninfas de 1º estágio de *Batella germânica* 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.

Borges *et al.* (2004) mostraram alterações morfológicas internas e externas em lavas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mortas pela ação do *Diflubenzuron* nas concentrações 0,1 e 1 ppm. Descreveram estas 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. Também foram encontradas alterações no corpo gorduroso das larvas.

Martins e Silva (2004) avaliaram a atividade inibidora da síntese da quintina do *Diflubenzuron* na ecdise das larvas de *A. egypti* e constataram que este IGR apresentou atividade larvicida em todos os estádios, tanto em laboratório quanto em campo, sendo a concentração 1 ppm (uma parte por milhão) letal para 100% das larvas.

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).

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, apud Costa, 2007).

Segundo Martins e Silva (2004), todos os estágios larvais de *Aedes aegyti*, tanto em campo como em laboratório, tiveram a ecdise inibida, sem grandes diferenças entre tipos de criadouros. Os autores assinalaram ainda a grande importância deste larvicida no controle desta espécie.

A atividade ovicida dos derivados da benzoilfeniluréia foi demonstrada para simúlídeos *Simulium sp* (Diptera, Simuliidae), no controle de coleópteros da família Curculionidae principalmente o gênero *Anthonomus* e mosquitos como *quinquefasciatus* (WHO, 1983).

Segundo Saxena e Koushik (1986, apud Mulla, 1995) em estudos sobre os efeitos do *Diflubenzuron* na viabilidade e fecundidade de ovos de *Aedes stephensi*, foi detectado que machos oriundos de larvas de 4º 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.

Alem da atividade larvicida o *Diflubenzuron* e outros derivados da benzoilfeniluréia são compostos que provocam interrupções nos processos reprodutivos (Saxena e Koushik, 1986, apud Mulla, 1995).

Khebbed 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, apud Mulla, 1995), 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 empregado também no controle de pragas agrícolas de armazenagem de grãos e desfoliadores de florestas (Julin e Sanders, 1978), sendo relatados casos de controle de pragas de 99 a 100% em sorgo armazenado (Daglish e Wallbank, 2005, apud Costa, 2007).

Delgado et al. (1999) detectaram em Mali, na Africa, reduções de 29,4% em populações de gafanhotos praga (Orthoptera) que receberam aplicações de *Diflubenzuron* e a redução de até 55,6% quando este composto foi aplicado junto ao *Beauveria bassiana (balsamo)* Vuillemin, 1912, um importante fungo entomopatogênico. Em lagartas, pragas de batatas, a eficácia do *Diflubenzuron* foi de 65% em relação a outros inseticidas (Kroschel Koch, 1996).

Os IGR têm sido utilizados ainda no controle de outros insetos de importância médica que são vetores biológicos e mecânicos de agentes infecciosos como baratas, moscas, simulídeos, quironomídeos além de outros. O *Diflubenzuron* vem ganhando destaque também na pecuária, no controle da mosca-de-chifres e ácaros, pragas causadoras de graves lesões e transmissão de patógenos, causando excessivo estresse nos animais, concorrendo para consideráveis perdas econômicas (Costa, 2007).

Silva e Mendes (2002), inibiram em 100% a emergência de adultos de *Hematobia irritans* Linnaeus, 1758 (mosca-de-chifres) com aplicação de *Diflubenzuron* nas concentrações de 300, 100 e 50 ppb. As pupas também mostraram serem afetadas, porém em menor intensidade, sugerindo a ação também por contato direto.

Luz (2001) aponta que existem diferenças significativas na duração do efeito residual quando comparadas formulações aquosas e granuladas e principalmente de marcas comerciais diferentes. Além disso, a ação da luz interfere significativamente para reduzir este efeito larvicida. A eficácia dos larvicidas constitui-se em um importante indicador para a determinação do intervalo de tempo entre os ciclos de tratamento dos depósitos no controle do *Aedes aegypti*. Após 16 anos de uso continuado do inseticida contra as diversas formas evolutivas do *Aedes aegypti*, surgiram em Fortaleza os primeiros indicativos de resistência das larvas ao temefós (Luz, 2001; Regazzi, 2005).

Os reguladores de crescimento têm, como observado, grande potencial inseticida, principalmente aqueles do grupo da benzoilfeniluréia como é o caso do *Diflubenzuron*, que já há muito vem mostrando sua excelente capacidade de supressão de populações de insetos praga tanto agrícola quanto de importância médica, apresentando alta especificidade e toxicidade para a população alvo, além de oferecer segurança ambiental para os vertebrados.

Estudos realizados no Brasil com o *Diflubenzuron*, com reposição diária de um terço do volume de água (caixa d'água) e um quinto do volume de água (tonéis) verificaram uma inibição de emergência por no mínimo 8 semanas (MS/SVS, 2005).

Após alguns anos de uso do *BTI* no Ceará, o Ministério da Saúde com o objetivo de evitar um eventual surgimento de populações resistentes de *Aedes aegypti* e provavelmente por conveniência econômica-operacional, orientou que fosse utilizado um novo larvicida no controle de larvas deste mosquito. Este novo larvicida é o *IGR* (*Insect Growth Regulator – Regulador do crescimento de insetos*) *Diflubenzuron*, que teve os estudos aprofundados sobre seus efeitos, iniciados em 1930.

O ciclo de aplicação do *Diflubenzuron* em Fortaleza é de aproximadamente 2 meses (6 vezes ao ano), período pré-suposto de efeito residual do larvicida.

Em Fortaleza, Ceará, como já mencionado, o larvicida utilizado pelo Programa de Controle da dengue entre 2002 e 2008 foi o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Atualmente, por orientação do Ministério da Saúde, no sentido também de evitar a resistência dos insetos ao larvicida, o município de Fortaleza bem como a região metropolitana da capital está utilizando o *Diflubenzuron*. O *Diflubenzuron* como já esclarecido, é um controlador de crescimento de insetos (IGR), de baixa toxicidade. Trata-se de um inseticida regulador, que inibe a formação da cutícula, a "pele", das larvas, impedindo seu desenvolvimento. Derivado da uréia, o *Diflubenzuron* é biodegradável, não é metabolizado por plantas, não é tóxico e não causa qualquer dano ao meio ambiente.

Neste sentido, o *Diflubenzuron*, como inseticida substituto dos anteriores Temefós e Bti em Fortaleza, e cujo efeito inseticida mostra-se restrito à população alvo (larvas de *Aedes aegypti*), terá seu efeito residual pesquisado e analisado neste trabalho que, longe de ser definitivo, pretende tão somente avaliar a eficácia do larvicida em depósitos que sofram renovação diária de água, o que é comum nas comunidades urbanas. O percentual de renovação diário da água trabalhado foi 20%, como será mostrado adiante na metodologia. O que se propõe é a identificação do tempo necessário para que depósitos tratados pelo larvicida *Diflubenzuron*, tenham renovados seus volumes d'água e o risco que correm de infestação pelo *Aedes aegypti*.

Outros trabalhos avaliam e comparam diversos larvicidas e inseticidas em diferentes situações tanto com renovação, como sem renovação de água. No entanto, avaliação do efeito do *Diflubenzuron* em condições de laboratório com renovação de água diária de 20%, simulando depósitos domésticos, ao que se sabe, não foi ainda efetuada. Esta é a proposta básica desta investigação.

## 2.5 RESISTÊNCIA

A resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando direta e profundamente a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (Braga, Denise, 2007). O gerenciamento efetivo da resistência a pesticidas depende da detecção o mais cedo possível da população de insetos resistentes, para que se possa fazer uma escolha racional do inseticida substituto (WHO, 1998).

A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte.

A resistência a inseticidas pode ser pensada como um processo de evolução acelerada de uma população que responde a uma intensa pressão seletiva, com a conseqüente sobrevivência dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência (Braga, Denise, 2007).

A Organização Mundial de Saúde em relatório de 1992, documenta que a resistência a pesticidas tem grandes impactos socioeconômicos incluindo entre eles:

- Implicações Administrativas: quando a opção por um determinado pesticida é tomada, deve ser feita de forma criteriosa, técnica e administrativa, visto que os orçamentos normalmente são arduamente negociados pelos governos e suplementações nem sempre são ágeis e fáceis de serem implementadas, causando dificuldades na reversão de decisões tomadas;
- Implicações Operacionais: mudanças na freqüência e no tempo da aplicação; mudanças na logística de pessoal, compra e transporte do inseticida; capacitação de pessoal; ajustes nas precauções de segurança das pessoas e meio ambiente; adequação de equipamentos para aplicação do inseticida; ajustes das técnicas de monitoramento e avaliação, são implicações impactantes quando da mudança do composto usado;

- Implicações Financeiras: o uso de inseticidas alternativos deve ter o menor custo-efetividade possível, e isto sempre acarreta dificuldades operacionais financeiras;
- Implicações Sociais: a incapacidade de controlar a resistência tanto da meta ou resistência de insetos, levará o incômodo, desilusão e conseqüente não cooperação pública; ou ainda, caso o inseticida de alguma forma interfira nos hábitos da população seja com o odor ou manchas nas paredes das casas ou ainda em toxicidade, poderá haver sérios problemas sociais causando incômodo à população;
- Implicações na Agricultura: 506 espécies de insetos e ácaros desenvolveram resistência a um ou mais pesticidas e 46% deles são relacionados à agricultura, 40% têm importância médica ou veterinária e 4% são parasitas ou predadores de espécies benéficas.

Segundo Ima Braga (2007) em relatório do Ministério da Saúde, a resistência pode ser de ordem fisiológica, resistência à penetração do inseticida ou resistência metabólica.

A resistência fisiológica é uma característica genética, como por exemplo, a cor dos olhos. Desse modo, populações de insetos podem, naturalmente, apresentar uma proporção de indivíduos que tenham alelos que lhes confirmam resistência a um determinado produto químico. Cepas resistentes podem surgir como resultado do uso persistente de pesticidas que matam indivíduos com alelos suscetíveis e não matam aqueles que possuam alelos resistentes (MS, 2007).

A resistência à penetração de inseticidas é considerada de importância secundária, por conferir tão somente, um baixo nível de resistência. Aparentemente, a redução na taxa de penetração de inseticida está relacionada à composição protéica do tegumento (MS, 2007).

A resistência metabólica é decorrente do aumento da capacidade de metabolização de inseticidas, que leva à formação de produtos menos tóxicos (MS, 2007).

Assim, deve-se buscar desenvolver e empregar inseticidas menos perigosos à saúde humana e ao meio ambiente, mais específicos e que não induzam resistência nas espécies alvos (Chamberlain, 1975).

## 2.6 CONTROLE

Práticas para controle de insetos são muito antigas. Há registro de seu uso na China há mais de 2.000 anos. Basicamente, eram práticas de controle biológico direcionadas ao enfrentamento das pragas agrícolas. No final do século XIX, descobriu-se que certas espécies de insetos e outros artrópodos eram responsáveis pela transmissão de algumas das mais importantes doenças. Vacinas ou medicamentos efetivos contra a maioria delas ainda não estavam disponíveis e o controle da transmissão era, todavia, fortemente centralizado no combate ao vetor (Braga e Denise, 2007).

Até que uma vacina, cura clínica, ou estratégia genética de controle estejam disponíveis, o controle da dengue continuará a depender da supressão das populações do *Aedes aegypti* ou da interferência do mosquito na interação humana. Nas últimas décadas, a ênfase no controle da dengue mudou o controle químico para uma abordagem de redução de riscos na fonte com o apoio da comunidade. O objetivo desta abordagem é reduzir a população do vetor a um nível onde a transmissão seja interrompida, ou seja, menor "Limiar de transmissão", ou menor "Limite de transmissão" (Gubler, 2002).

Um fator significativo no controle do vetor e da epidemiologia da Dengue é o estabelecimento de limites para a transmissão da doença. Estudos recentes têm sugerido que os índices críticos limítrofes para a transmissão da Dengue são o Índice de infestação domiciliar (IID)  $\geq 1\%$  ou o Índice de Breteau (IB)  $\geq 5\%$  que foram propostos para a transmissão da Febre Amarela e que foram aplicados também para a transmissão da Dengue (Macdonald, 1956).

Focks *et al.* (2000) desenvolveram modelos de simulação que podem ser usados para estimar limites de transmissão da dengue como uma função do número de pupas de *Aedes aegypti* por pessoa, temperatura ambiente, imunidade do

rebanho humano e número de introduções virais. Embora o modelo entomológico mantenha o controle de variáveis-chave, ele não deixa clara a forma como, na prática, um senso entomológico possa ser medido e quanto os limites teóricos são válidos em condições de campo (Scott & Morrison, 2003). Uma questão prática e importante que se coloca é que tipos de recipientes precisam ser adequados para reduzir a produção de mosquitos adultos abaixo dos níveis do limite em uma forma rentável (custo-efetividade).

Em todo o planeta, os programas de controle do *Aedes aegypti* são baseados na redução do número de criadouros com a participação da sociedade. Quando esta estratégia falha, o controle químico ou biológico das formas imaturas do *Aedes aegypti* e o controle químico das formas adultas são implementados (PAHO, 1994).

O Ministério da Saúde iniciou em 1986, o programa de controle vetorial da dengue. O programa de controle do *Aedes aegypti* previa várias ações para controle e redução dos criadouros em potencial do mosquito, além de ações para o controle químico do vetor (inseticidas organofosforados - o temefos para o controle de larvas; o malathion para o controle perifocal das formas adultas; e o malathion ou fenitrothion, na forma de aerosol ultra baixo volume, também para o controle das formas adultas) (PAHO,1994). Através de aplicações continuadas desta classe de inseticidas, puderam-se manter em níveis bastantes baixos a infestação vetorial, apesar da ocorrência de várias epidemias entre 1986 e 2000. No município de Fortaleza, fazia-se em geral 3 a 4 aplicações anuais de temefós que correspondiam a ciclos de tratamento focal de 3 ou 4 meses respectivamente (Pontes *et al.* 2005). Segundo Mulla (1995), não há previsão de programas de controle de pragas e vetores sem a inclusão e utilização de produtos químicos seguros e ambientalmente amigáveis. Os *IGR*, um dos grupos de compostos químicos mais relativamente seguros e livres de riscos, alcançarão os requisitos estabelecidos e necessários para o desenvolvimento e o uso da tecnologia do uso seguro dos controles químicos.

### **2.6.1 Controle de adultos**

Em 2006 a recomendação da Organização Mundial da Saúde (WHO 2006) para o controle de mosquitos adultos eram os inseticidas organofosforados

Fenitrothion e Malathion, e os piretróides Deltametrina, Lambdacionotrina, Cypermetrina, Alfacypermetrina, Betacypermetrina e Cyflutina.

Existem duas formas de se fazer a aplicação dos organofosforados e piretróides para mosquitos adultos: a borrifação intradomiciliar, que consiste na impregnação das paredes com o inseticida e a 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 são o aerosol térmico, chamado termonebulização e o Ultra Baixo Volume (UBV) (Regazzi, 2003).

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).

Abaixo, um exemplo de aplicação de inseticida no controle de adultos.

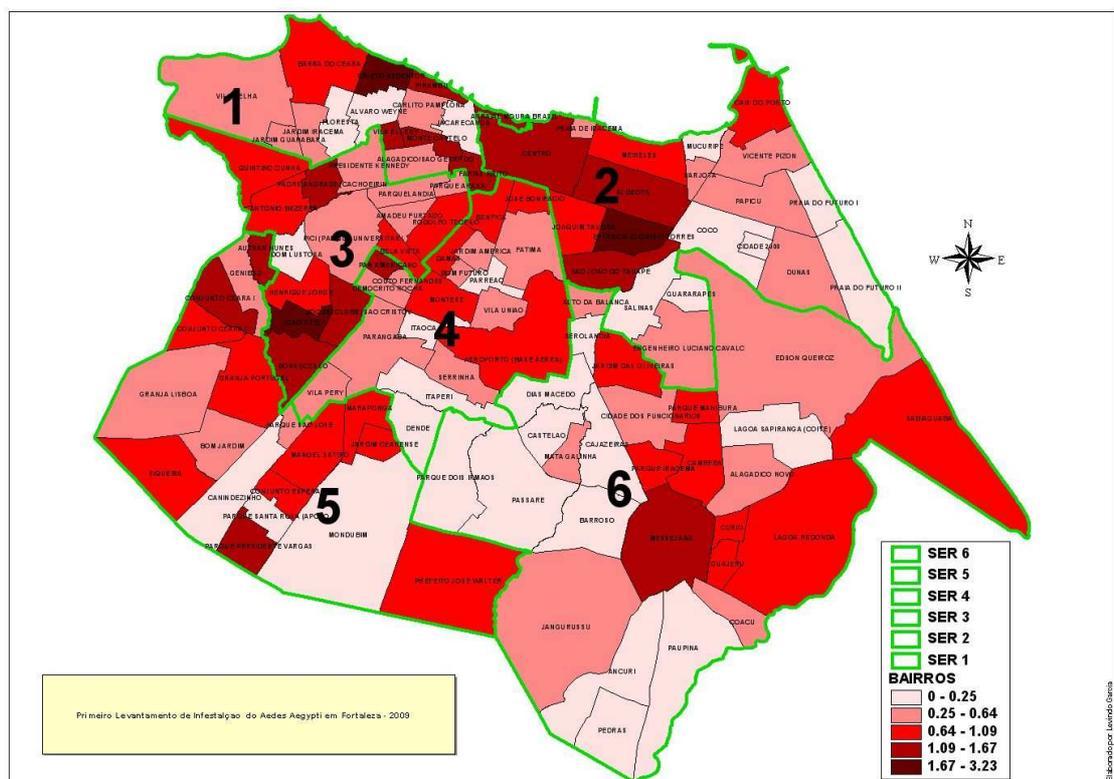


**Figura 8:** Exemplo de vaporização

Fonte: FUNASA

Ima Aparecida Braga e Denise Vale (Epidemiol. Serv. Saúde, 2007), destacam que o papel do controle de vetores em Saúde Pública é prevenir a infecção mediante o bloqueio ou redução da transmissão, sendo seus principais objetivos: manejar os problemas existentes, como surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade; prevenir epidemias ou a re-introdução de doenças; reduzir os fatores de risco ambiental da transmissão. Para que esses três objetivos sejam alcançados, é necessário contar com informações sobre o hospedeiro humano, a doença, o vetor e o ambiente; e dispor dos recursos necessários para aplicação oportuna (Braga e Denise, 2007).

No 1º Levantamento de Infestação do *Aedes aegypti* em 2009 por bairro e SER de Fortaleza (abaixo), percebe-se a distribuição da alta infestação do *aedes aegypti* no município.



**Figura 9:** Mapeamento da 1ª LIA de Fortaleza em 2009 –

Fonte: Depto. De Epidemiologia da SMS – Fortaleza

O controle do vetor é imprescindível para prevenir diversas doenças, entre as quais a dengue é o melhor exemplo; parte integrante de muitos programas de saúde, como os dirigidos à prevenção e controle da malária e das leishmanioses (Braga e Denise, 2007).

### **2.6.2 Controle da forma larvária**

O controle da forma larvária complementa o controle do mosquito adulto, na manutenção da baixa quantidade de *Aedes aegypti* e redução do risco de epidemias. Neste contexto, larvicidas são importantes para tratamento dos locais de reprodução quando a eliminação física do mosquito é inviável (PAHO 1994).

Um dos métodos bastante empregados no controle das formas imaturas dos mosquitos 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, apud Costa, 2007). No entanto não oferecia segurança devido à falta de especificidade, contaminação da cadeia trófica e do meio ambiente (Costa, 2007).

O uso de larvicidas é hoje a forma complementar ao controle de alados mais usada e recomenda pela OMS.

## **2.7 CRIADOUROS**

Com o propósito de orientar a atividade de redução do número de criadouros, é necessário conhecer os tipos de criadouros que produzem a maioria dos adultos do *Aedes aegypti* e as características desses reprodutores que influenciaram a produção. O método mais viável e confiável para estimar a produção de um criadouro é através do número de pupas presentes nele (Focks & Chadee, 1997).

No Rio de Janeiro, a relação entre as características dos locais de reprodução e potencial de infestação por formas imaturas do *Aedes aegypti* foi avaliada (Medronho et al.; 2009). Os dez criadouros mais produtivos foram pneus, cisternas, tanques de cimento no solo, barris, tambores, pratos, canecas, baldes, tanques de água e vasos de plantas aquáticas. No entanto, os criadouros com a maior média de pupas foram tanques de cimento no solo, drenos de água, barris, piscinas, tanques de água, pneus, baldes, vasos de flores, cisternas e tambores. Dependendo do uso da água, os depósitos mais frequentemente infestados com pupas de *Aedes aegypti* foram aqueles relacionados com o abastecimento de água e coleta de lixo. Além disso, a proporção dos depósitos infestados foi positivamente correlacionada com o volume do depósito.

Um levantamento realizado em Puerto Triunfo, na margem do rio Magdalena, na Colômbia, mostrou que os tanques elevados, os tanques ao nível do solo, tambores e pneus tiveram a maior média de pupas de *Aedes aegypti* (Romero-Vivas et al.; 1990).

Uma investigação realizada em Salinas, Porto Rico, estima a produtividade de fêmeas de pupas de *Aedes aegypti* na água contida fora de casa, tendo em conta algumas características de recipientes (tipo de recipiente, função do recipiente, temperatura da água, grau de exposição ao sol, presença de copa de árvores) (Barrea, Amador & Clark; 2006). Dos 18 tipos de embalagens, 8 deles produziram 73% a 88% de todas as pupas fêmeas. Os mais produtivos foram grandes baldes, tampas, recipientes descartados, implementos descartados, pequenos baldes, tambores, pneus e painéis de consumo animal. De acordo com a utilidade do recipiente, quatro tipos de recipientes, embalagens descartadas, folhas de plástico, embalagens decorativas e brinquedos, foram responsáveis por 80% de todas as pupas da amostra. Além disso, os recipientes mais produtivos foram aqueles preenchidos com água de chuva e água com temperatura mais baixa, sob a sombra de árvores.

Pesquisa realizada em Barranquilla, Colômbia, em 2006, por Romero Vivas et al procurou identificar usando a contagem de pupas em depósitos d'água, qual seria o tipo de reservatório mais apropriado para a proliferação do *Aedes aegypti*. Neste estudo foram investigados 3.433 depósitos na estação chuvosa e 3563 na

estação seca. Apesar da existência de água encanada no município, ainda existiam depósitos para armazenamento d'água nos domicílios. Embora estes depósitos representassem apenas 1,8% a 16,3% do total de containeres observados, eles contribuíam com 72% a 78,2% e 65% a 95,8% da população de pupas do *Aedes aegypti* nas estações seca e chuvosa respectivamente. As garrafas representaram 23% a 88,9% do número total de depósitos de água, respectivamente na estação seca e chuvosa e produziram não mais que 0,1% da população de pupas da área de estudo. Outros depósitos como pneus, vasos e outros produziram em geral baixo número de pupas.

O *Aedes aegypti* deposita seus ovos em uma gama variada de micro-habitats e numa também variada classificação de água, desde a limpa até a altamente contaminada. Ovos são colocados em águas relativamente limpas de piscinas e em depósitos domésticos urbanos, além das axilas de folhas e buracos de árvores e papéis podres (BOORMAN, 1961). Com temperatura e umidade relativa do ar mantidas constantes e a luz solar flutuando normalmente, o *Aedes aegypti* mostrou um ciclo regular de oviposição, tendo à tarde um pico em virtude do menor efeito da luz solar (Haddow, Gillett, 1957).

Em 1998, Chadee *et al* fizeram uma pesquisa na região do Caribe com o objetivo de verificar quais seriam os habitats naturais do *Aedes aegypti* naquela área. Neste trabalho em Trindade, Porto Rico e nas Ilhas Virgin, foram identificados os seguintes habitats naturais para o mosquito: buracos em rochas (9,7%), cabaças (2,4%), buracos em árvores (19,5%), axilas das folhas (4,8%), articulações de bambu (14,9%), tocos de mamão (7,3%), casca de côco (4,8%), bromélias (7,3%), piscinas de chão (14,9%), buracos em rochas de coral (9,7%), buracos de caranguejos (2,4%), e conchas (7,3%). O habitat natural mais importante do *Aedes aegypti* é o buraco de árvores (Kellett e Omardeen 1957), bromélias (Moore 1983), tocos de mamão (Parker *et al.* 1983). O uso tanto de habitats naturais como artificiais sugerem que o *Aedes aegypti* é submentido a mudanças comportamentais devido a pressão do uso de inseticidas (Tinker 1974) e a remoção generalizada de contêineres no ambiente doméstico e peridomiciliar (Moore 1983).

Um estudo publicado por Harrington *et al.* em 2008 na Tailândia, sobre a influencia do tamanho e localização dos depósitos d'água, bem como do horário do

dia na ovoposição do *Aedes aegypti*, verificou que existe uma relação forte entre o diâmetro, volume e superfície d'água do depósito no número de ovos depositados. Uma vez controlados a estação (chuvosa ou seca), o tempo e a data, o mais importante fator é o volume de água do reservatório, respondendo por 88% das variações, seguido pela área da superfície da água e pelo diâmetro de abertura do depósito que respondem respectivamente por 85% e 83% das variações.

Em outro estudo na Tailândia, Strikman & Kittayapong (2003), investigaram a relação entre tipo de recipiente, fonte de água, presença de cobertura e abundância de pupas de *Aedes aegypti* e o estado nutricional dos adultos de *Aedes aegypti* que emergiram das pupas coletadas em recipientes de água para uso doméstico. O estado nutricional do adulto foi avaliado por meio do comprimento de asa (Briegel, 1990). Pequenos jarros de água abrigaram maior número de pupas que jarros de água tamanho padrão. Depósitos com água da chuva não intencional, tiveram maior número de pupas do que aqueles com água da chuva intencional ou água de poço. Depósitos descobertos abrigaram maior número de pupas do que aqueles com qualquer tipo de cobertura. Os *Aedes aegypti* adultos com maior envergadura de asa estão positivamente associados a recipientes com água para uso animal (em comparação ao uso doméstico), com recipientes descobertos, com água de poço/água de chuva (em comparação com água de uma lagoa ou canal), baixa abundância de larvas, recipientes localizados em banheiros ou fora da casa (em comparação com os recipientes localizados no interior das casas).

Os depósitos d'água para consumo são, a nível domiciliar, locais de bastante suscetibilidade para repositório de ovos de mosquitos, assim como também o são, outros tipos de recipientes que de uma forma ou outra armazenam grandes ou pequenos volumes de água.

O armazenamento de água é essencial para muitas comunidades no Brasil, principalmente pela ausência de água encanada em 25% dos domicílios brasileiros e 35% dos domicílios da região nordeste do Brasil (IBGE 2004).

Vários trabalhos já descreveram os tipos de criadouros domiciliares nos quais a fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* preferem depositar seu ovos. Na Ásia, estes criadouros são depósitos de argila (Kittayapong & Strickman, 1993); na América

Central, são tambores e depósitos de alvenaria (Chadee *et al.* 1998); e em Fortaleza, Ceará, são caixas d'água (Bezerra, 1999). Foi também descrito que em Fortaleza, caixas d'água de maior volume, localizadas dentro de casa, e numa posição mais elevada são mais frequentemente encontradas infestadas com larvas de *Aedes aegypti* (Bezerra, 1999).

No anexo 2 é mostrado uma revisão de literatura sobre experimentos com e sem renovação d'água, e com e sem reposição de larvas.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Geral

- Estimar a mortalidade de larvas e pupas de *Aedes aegypti* em depósitos com água tratada pelo *Diflubenzuron* e com renovação diária de água de 20%.

#### 3.2 Específicos

- Estabelecer uma fórmula para cálculo do percentual de renovação diária de água;
- Medir o efeito residual do Diflubenzuron em depósitos com 20% de renovação diária de água.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Gerais**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Departamento de Saúde Comunitária da UFC, e ocorreu em três etapas: um pré-teste, um teste piloto e o experimento em si.

O pré-teste foi executado com o objetivo exclusivo de avaliar-se as condições dos depósitos recém construídos e das condições de sobrevivência das larvas sem alimentação. Este pré-teste teve a duração de 8 dias, tempo necessário para que 90% das larvas dos depósitos controle tivessem feito a metamorfose para pupas. Não houve metamorfose para pupas nos depósitos teste.

O teste piloto foi executado nas condições que se projetava para o experimento em si e teve duração de 10 dias, tempo em que 100% das larvas tivessem feito a metamorfose para pupas nos depósitos controle.

Após o pré-teste e o teste piloto, todos os depósitos foram criteriosamente lavados com água corrente, afim de serem retirados os resquícios de larvicida que porventura ainda existissem.

### **4.2. Estimativa do percentual de renovação diária de água**

Utilizamos os seguintes parâmetros para calcular o percentual de renovação diária, na cidade de Fortaleza:

- i) consumo de água\habitante\dia da área de menor consumo;
- ii) média de habitante por domicílio;
- iii) percentil 75 da distribuição do volume de uma amostra de caixas de água.

O consumo per capita de água da cidade de Fortaleza varia de 130 a 355 litros/habitante/dia (CAGECE, 2010). Segundo o Censo Demográfico de 2010, em Fortaleza, a média de habitantes por domicílio é 3,14 (IBGE, 2010). Com relação ao

volume de caixas de água, numa amostra aleatória de 3.460 caixas de água da cidade de Fortaleza, observou-se que 25% das caixas têm volume igual ou superior a 2.100 litros (LP, comunicação pessoal).

#### **4.3. Larvicida utilizado**

O *Diflubenzuron* usado neste estudo foi produzido pela Champion Farmoquímica Ltda, Anápolis, Goiás. O produto é um pó que apresenta 25% de princípio ativo e 75% de Silica Hidratada (Diluyente excipiente), Alfa-p-nonilfenol-omega hidroxipolioxietileno (Emulsificante), Lignosufonato de sódio(Emulsificante) e Caulim (Diluyente excipiente).

Segundo instruções do Ministério da Saúde, inicialmente é preparada um solução concentrada do larvicida (Solução Mãe), dissolvendo-se 92 gramas do produto em 10 litros de água, obtendo-se então uma solução com uma concentração de 2,3 gramas de *Diflubenzuron*/Litro da Solução Mãe ou 0,0023 gramas de *Diflubenzuron*/Mililitro da Solução Mãe.

Ao tratar os depósitos, foram colocados 2,5 ml da solução mãe em cada depósito de 20 litros, ou 0,00575 gramas de *Diflubenzuro*/20 litros de água, ou 0,0002875 gramas de *Diflubenzuron*/Litro de água. Então a concentração inicial da água dos depósitos tratados foi  $2,875 \times 10^{-4}$  gramas de *Diflubenzuron*/Litro de água.

A temperatura média durante o dia no laboratório onde permaneceram os depósitos foi de 30,04 graus centígrados e a umidade relativa do ar teve a média de 63,22. Tanto temperatura como umidade foram medidas pelo equipamento “DIGITAL TERMO HYGRO METER – MINIDA – MTH – 1362 W”. Larvas, pupas e alados permaneceram dentro do espaço de pesquisa respeitando-se as normas de segurança do Laboratório de Entomologia da UFC.

#### **4.4. Tipo de estudo**

Este é um estudo experimental, com depósitos de água povoados por larvas de *aedes aegypti* e tratados com *Diflubenzuron* (testes), e depósitos também

povoados por larvas de *Aedes aegypti*, porém não tratados pelo *Diflubenzuron* (controles), com renovação de água (água de poço sem tratamento) de 20%, média estimada de renovação de água dos depósitos de armazenamento de água em Fortaleza (CAGECE, 2010).

Foram construídos 24 depósitos cilíndricos de cimento de 50 cm de altura por 30 cm de diâmetro para realização do experimento. O material do qual foram feitos os depósitos foram semelhantes aos dos depósitos domiciliares da maioria dos domicílios do município de Fortaleza (cimento armado). Os depósitos foram telados para evitar a fuga eventual de alados e a oviposição de alados externos (figura 12). Na parte inferior do depósito encontra-se uma torneira para a extração de água para fins de renovação. O orifício por onde escoar a água para a torneira se situa a 3 cm de altura do piso do depósito e é vedado com tela a fim de evitar a saída de larvas durante a renovação de água. Existe um “fecho-eclair” nas telas de proteção externas acima dos depósitos para que se pudesse prender e capturar alados que viessem a emergir. Esta captura foi efetuada com capturadores de borracha e bocais adaptados para a sucção bucal.

Os depósitos tratados foram 18, com 20 lts d'água cada um e contendo aproximadamente 50 larvas de 3º estágio alimentadas com ração para gato moída e tratadas pelo *Diflubenzuron*. Os depósitos não tratados foram 6, contendo a mesma quantidade de água e larvas alimentadas, porém não tratados com o larvicida.

#### **4.5. Ambiente da pesquisa**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, em ambiente especialmente preparado para a acomodação dos depósitos e acesso a água não tratada com cloro ou outra substância qualquer.

A água usada no experimento é oriunda de um poço artesiano com água que não sofre nenhum tratamento ou interferência de nenhum produto químico, tipo cloro ou outro qualquer.

As larvas usadas na pesquisa foram produzidas em laboratório de cepas já existentes. As aproximadamente 1200 larvas de cada ciclo foram produzidas em laboratório e todas são de 3º estágio. As larvas foram retiradas das bandejas de eclosão com alimento, onde se encontravam tamponadas com cobertas de segurança, e de onde foram para outra bandeja limpa, a fim de serem selecionadas dentro do estágio definido e colocadas de aproximadamente 50 em 50 em beckeres para serem transportadas aos depósitos testes e controles. Todos os depósitos foram mantidos à sombra com temperatura e umidade monitoradas.

Abaixo, fotos iniciais dos preparativos para a pesquisa, exemplificando a montagem dos depósitos, a cobertura de nylon protetora dos mesmos e a mangueira para reabastecimento diário de água de poço artesiano. Em seguida, análise de cadáveres de larvas no microscópio.





**Figura 10:** Ambiência da pesquisa

#### 4.6. Procedimentos e Técnicas

Todas as larvas foram produzidas em laboratório a partir de matrizes do próprio laboratório de entomologia da UFC. Estas matrizes eram mantidas em gaiolas onde as fêmeas eram alimentadas com repasto em codornas cativas e os machos através de alimento açucarado colocado nas laterais e pendurado na parte superior das gaiolas. No interior das mesmas, existiam ainda os depósitos com fitas para captura dos ovos durante a oviposição, que eram diariamente monitoradas e retiradas para bandejas secas e mantidas em local adequado a espera da necessidade de eclosão. Ocorrendo a necessidade de mais larvas para o experimento, as fitas com ovos eram colocadas em bandejas com água a fim de que os ovos se soltassem na água, eclodissem e passassem a larvas. Assim, após aproximadamente 2 dias, as larvas de 3º estágio eram separadas uma a uma para comporem o experimento. As pupas que existiam na bandeja eram levadas para

pequenos depósitos dentro das gaiolas afim de que se efetivassem as emergências a alados. As bandejas com as larvas recém eclodidas eram mantidas fora das gaiolas, cobertas com tecido com elástico lateral para manter uma pressão adequada ao não escape eventual de alados e eventual oviposição de alados externos. Diariamente estas bandejas eram monitoradas para a separação das pupas existentes, e como foi mencionado, conduzidas a pequenos depósitos dentro das gaiolas. A alimentação dos adultos nas gaiolas era feita com codornas imobilizadas em sacos adequados penduradas dentro das mesmas. As larvas eram alimentadas com ração para gato moída e colocadas nas bandejas de eclosão.

A observação das ocorrências começou no momento em que as larvas foram colocadas nos depósitos testes e controles, alimentadas e os depósitos testes tratados com o larvicida *Diflubenzuron*. A rotina de monitoramento e observação dos depósitos/larvas foi diária, iniciando-se pela pesquisa depósito a depósito das larvas mortas, pupas e eventuais alados, tanto nos depósitos controle como nos teste. As larvas mortas eram contadas, registradas e descartadas. As informações eram registradas em planilha previamente formatada para tal (anexo 1). As pupas existentes eram contadas e remanejadas para beckers respectivos em gaiolas controle e ou gaiolas teste, conforme a procedência, afim de que emergissem para alados. Esta emergência para alado foi observada porem não registrada, uma vez que não fazia parte do escopo do experimento. Esta observação diária, no entanto, aponta para uma emergência igual de alados nos depósitos teste e controle em torno dos 100%. Não ocorreu emergência de alados nos depósitos, uma vez que todas as pupas eram retiradas diariamente para as gaiolas de emergência. O ciclo experimental se encerrava, dando início a outro, em duas situações: se nos depósitos controle não existissem mais nenhuma larva, ou se não restassem mais nenhuma larva nos depósitos teste, ou seja, não existissem mais larvas em nenhum depósito (ou teste ou controle). No momento em que não existiam mais larvas nos depósitos controle ou nos depósitos teste, todas as larvas restantes dos depósitos teste ou controle eram retiradas e todas os depósitos eram repovoadas com aproximadamente 50 novas larvas de 3º estágio, mantendo a renovação de 20% da água em todas os depósitos e sem nova adição do larvicida.

Assim, foram realizados cinco ciclos, sendo encerradas as observações quando o percentual médio de emergência para pupas dos depósitos teste foi igual ou superior a 20%.

As proporções de diluição do larvada seguem a orientação das regionais de saúde do município de Fortaleza. De acordo com a tabela usada no município de Fortaleza, coloca-se 2,5 ml da solução mãe para 20 litros d'água (para cada depósito tratado). As larvas eram alimentadas com 2g de ração para gato triturada, a cada ciclo.

A retirada de larvas e pupas dos depósitos foi feita usando-se uma lanterna e pipetas tipo Pasteur. As pupas, depois de contadas, eram retiradas dos depósitos e colocadas em gaiolas para emergência de alados. As larvas mortas eram descartadas. Verificou-se perto de 100% de emergência das pupas originadas tanto dos depósitos controle como dos depósitos teste. Apesar de não ter sido o foco do estudo, através de análise em microscópio de insetos emergentes oriundos dos depósitos teste, não foi observada nenhuma aberração morfológica nos mesmos, entretanto, nada se pode afirmar a respeito de eventuais danos reprodutivos nos alados emergentes, uma vez que não foi feita nenhuma investigação sobre o fato.

## 5. RESULTADOS

Considerando-se os parâmetros do município de Fortaleza estimou-se que um domicílio situado na área de menor consumo gasta por dia 408,2 (130 x 3,14) litros de água. Se aquele domicílio tem uma caixa de água de 2.100 litros, então a cada dia é consumido aproximadamente 20% ( $408,2/2100=0,19$ ) do volume da água contida na caixa, e a cada dia 20% da água da caixa é renovada. Desta forma, utilizamos esse percentual de renovação diária para os experimentos de efeito residual.

O experimento total teve a duração de 71 dias corridos e ininterruptos, sendo executado em 5 ciclos, cada ciclo com reposição de aproximadamente 50 larvas por depósito e recolocação de alimento para as larvas.

De forma natural, houve um decréscimo na mortalidade média com conseqüente aumento da emergência para pupas na média nos depósitos teste à medida que os ciclos foram acontecendo, ou seja, houve menor mortalidade no 5º ciclo do que no 4º e assim retrospectivamente até o 1º.

Nos depósitos controle, entretanto, ocorreu acréscimo na mortalidade de larvas com conseqüente decréscimo na emergência para pupas conforme o tempo passou. Este fenômeno aconteceu provavelmente por conta da toxicidade produzida pelas próprias larvas (Moore and Fischer, 1969; Ikeshoji and Mulla, 1970; Whittaker and Fenny, 1971; Reisen, 1975). A tabela 10 mostra esta variação nos depósitos controle.

É importante observar também que até o 19º dia, não aconteceu nenhuma emergência para pupas nos depósitos teste. Começaram a aparecer pupas entre o 20º e o 30º dia, ainda com um percentual baixo de 1,8% em média.

Os resultados obtidos durante os 5 ciclos com os 18 depósitos tratados são apresentados nas Tabelas 1 a 4.

No primeiro ciclo (1º ao 5º dia) e no segundo ciclo (6º ao 19º dia) nos depósitos tratados, não houve emergência de nenhuma pupa e 100% das larvas expostas ao Diflubenzuron morreram (Tabela 1).

**Tabela 1.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos tratados com *Diflubenzuron*, com renovação diária de 20% da água, do 1º ao 5º dia, e do 6º ao 19º dia do experimento.

Numero do depósito	Do 1º ao 5º dia		Do 6º ao 19º dia	
	Nº Larvas expostas	Nº Pupas	Nº Larvas expostas	Nº Pupas
1	49	0	45	0
2	42	0	40	0
3	47	0	47	0
4	40	0	45	0
5	49	0	45	0
6	50	0	50	0
7	48	0	50	0
8	47	0	50	0
9	47	0	50	0
10	49	0	32	0
11	46	0	52	0
12	44	0	49	0
13	48	0	49	0
14	46	0	42	0
15	46	0	46	0
16	45	0	50	0
17	47	0	44	0
18	34	0	40	0
<b>TOTAL</b>	<b>824</b>	<b>0</b>	<b>826</b>	<b>0</b>

O 1º ciclo teve a duração de 5 dias, e foi encerrado por ter havido 100% de evolução para pupas nos depósitos controle. Neste ciclo foram expostas 824 larvas distribuídas nos 18 depósitos teste conforme tabela 1, e 299 larvas distribuídas nos 6 depósitos controle, conforme tabela 5. Não aconteceu neste ciclo, evolução para pupas nos depósitos teste, ocorrendo mortalidade de 100% das larvas. Nos

depósitos controle, houve 2% (6 larvas) de larvas mortas (média dos depósitos) e 98% (293 pupas) evoluíram para pupas (média dos depósitos). A variação desta proporção foi pequena entre os 6 depósitos controle (Tabela 2). Estes números mostram excelente eficácia do larvicida nos 5 primeiros dias do experimento.

**Tabela 2.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos não tratados, com renovação diária de 20% da água, do 1º ao 5º dia do experimento.

Numero do depósito	Total de larvas expostas	Qtde. de larvas mortas	Taxa de mortalidade	Evolução p/ pupas	Percentual de pupas
		Nº	%	Nº	%
1	50	1	2,0	49	98,0
2	49	0	0,0	49	100,0
3	50	0	0,0	50	100,0
4	50	2	4,0	48	96,0
5	51	2	3,9	49	96,1
6	49	1	2,0	48	98,0
<b>TOTAL</b>	<b>299</b>	<b>6</b>	<b>2,0</b>	<b>293</b>	<b>98,0</b>

O 2º ciclo teve duração de 14 dias (do 6º ao 19º dia), e seu encerramento se deu por conta de ter havido 100% de mortalidade nos depósitos teste. Nestes, foram colocadas 826 larvas nos 18 depósitos e 301 larvas nos 6 depósitos controle conforme tabelas 1 e 6 respectivamente. Nos depósitos controle, houve mortalidade de 3,6% (11 larvas) e evolução para pupas de 96,4% das larvas (290 pupas), até o final do ciclo. A variação desta proporção entre os diversos depósitos controle também foi pequena (Tabela 3).

**Tabela 3.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos não tratados, com renovação diária de 20% da água, do 6º ao 19º dia do experimento.

Número do depósito	Total de larvas expostas	Qtde. de larvas mortas	Taxa de mortalidade	Evolução p/ pupas	Percentual de pupas
		Nº	%	Nº	%
1	50	1	2,0	49	98,0
2	50	1	2,0	49	98,0
3	50	0	0,0	50	100,0
4	51	3	5,9	48	94,1
5	52	5	9,6	47	90,4
6	48	1	2,1	47	97,9
<b>TOTAL</b>	<b>301</b>	<b>11</b>	<b>3,6</b>	<b>290</b>	<b>96,4</b>

Durante o terceiro ciclo (do 20º ao 30º dia), evoluíram as primeiras pupas nos depósitos teste. De um total de 886 larvas expostas, 1,8% evoluíram até pupa. Este percentual variou de 0% a 8,9% nos diferentes depósitos teste (Tabela 4).

**Tabela 4.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos tratados com *Diflubenzuron*, com renovação diária de 20% da água, do 20º ao 30º dia do experimento.

Número do depósito	Total de larvas expostas	Qtde. de larvas mortas	Taxa de mortalidade	Evolução p/ pupas	Percentual de pupas
		N	%	N	%
1	50	46	92,0	4	8,0
2	53	53	100,0	0	0,0
3	42	42	100,0	0	0,0
4	50	50	100,0	0	0,0
5	50	50	100,0	0	0,0
6	50	50	100,0	0	0,0
7	50	50	100,0	0	0,0
8	50	50	100,0	0	0,0
9	50	50	100,0	0	0,0
10	50	50	100,0	0	0,0
11	46	44	95,7	2	4,3
12	48	48	100,0	0	0,0
13	50	50	100,0	0	0,0
14	50	50	100,0	0	0,0
15	45	41	91,1	4	8,9
16	51	50	98,0	1	2,0
17	50	49	98,0	1	2,0
18	51	47	92,2	4	7,8
<b>TOTAL</b>	<b>886</b>	<b>870</b>	<b>98,2</b>	<b>16</b>	<b>1,8</b>

Neste 3º ciclo, dos 18 depósitos teste, 6 não tiveram 100% de mortalidade. Este ciclo durou 11 dias e teve reposição de 886 larvas nos depósitos teste e 284 larvas nos depósitos controle conforme mostram as tabelas 2 e 7 respectivamente. O encerramento deste ciclo se deu por não existirem mais larvas nos depósitos teste. Nos depósitos teste, houve mortalidade média de 98,2% (870 larvas), e emergência para pupas na média de 1,8% (16 larvas), enquanto nos depósitos

controle, a mortalidade média foi de 12,7% (36 larvas) e emergência para pupas na média de 87,3% (248 pupas). As proporções de pupas dos diferentes depósitos controle variaram entre 69,6% e 98% (Tabela 5).

**Tabela 5.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos não tratados, com renovação diária de 20% da água, do 20º ao 30º dia do experimento.

<b>Numero do depósito</b>	<b>Total de larvas expostas</b>	<b>Qtde. de larvas mortas</b>	<b>Taxa de mortalidade</b>	<b>Evolução p/ pupas</b>	<b>Percentual de pupas</b>
	Nº	Nº	%	Nº	%
1	50	1	2,0	49	98,0
2	48	6	12,5	42	87,5
3	47	7	14,9	40	85,1
4	44	4	9,1	40	90,9
5	49	4	8,2	45	91,8
6	46	14	30,4	32	69,6
<b>TOTAL</b>	<b>284</b>	<b>36</b>	<b>12,7</b>	<b>248</b>	<b>87,3</b>

Durante o quarto ciclo (do 31º ao 46º dia), 14,1% das 787 larvas evoluíram para pupa nos depósitos teste. A variação da proporção de larvas que evoluíram para pupas foi muito elevada durante este experimento nos depósitos teste. Embora nenhuma pupa tenha emergido em 12 (67%) depósitos, em 3 depósitos, mais que 50% das larvas evoluíram para pupa (Tabela 6).

**Tabela 6.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos tratados com *Diflubenzuron*, com renovação diária de 20% da água, do 31º ao 46º dia do experimento.

Número do depósito	Total de larvas expostas	Qtde. de larvas mortas	Taxa de mortalidade	Evolução p/ pupas	Percentual de pupas
			%	Nº	%
1	44	21	47,7	23	52,3
2	40	40	100,0	0	0,0
3	42	42	100,0	0	0,0
4	45	19	42,2	26	57,8
5	46	28	60,9	18	39,1
6	42	42	100,0	0	0,0
7	39	39	100,0	0	0,0
8	38	22	57,9	16	42,1
9	46	46	100,0	0	0,0
10	42	42	100,0	0	0,0
11	42	42	100,0	0	0,0
12	44	41	93,2	3	6,8
13	50	50	100,0	0	0,0
14	50	50	100,0	0	0,0
15	45	20	44,4	25	55,6
16	48	48	100,0	0	0,0
17	42	42	100,0	0	0,0
18	42	42	100,0	0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>787</b>	<b>676</b>	<b>85,9</b>	<b>111</b>	<b>14,1</b>

Neste 4º ciclo, que durou 16 dias com reposição de 787 larvas nos depósitos teste e 259 larvas nos depósitos controle, distribuídos nos 18 depósitos teste e 6 depósitos controle, conforme as tabelas 3 e 8 respectivamente, a mortalidade média nos depósitos teste foi de 85,9% (676 larvas), com evolução para pupas de 14,1% (111 pupas), e nos depósitos controle a mortalidade média foi de 29,7% (77 larvas) com emergência para pupas de 70,3% (182 pupas) de acordo com as mesmas

tabelas já referidas para o ciclo. As proporções de pupas dos diferentes depósitos controle variaram de 58,1% até 84,2% (Tabela 7). Este ciclo foi encerrado assim como o 3º, por não existirem mais larvas nos depósitos teste.

**Tabela 7.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos não tratados, com renovação diária de 20% da água, do 31º ao 46º dia do experimento.

Número do depósito	Total de larvas expostas	Qtde. de larvas mortas	Taxa de mortalidade	Evolução p/ pupas	Percentual de pupas
	Nº	Nº	%	Nº	%
1	44	11	25,0	33	75,0
2	43	18	41,9	25	58,1
3	40	12	30,0	28	70,0
4	38	6	15,8	32	84,2
5	45	14	31,1	31	68,9
6	49	16	32,6	33	67,4
<b>TOTAL</b>	<b>259</b>	<b>77</b>	<b>29,7</b>	<b>182</b>	<b>70,3</b>

No 5º ciclo (do 47º ao 71º dia) com os depósitos tratados foi observado que 33,9% das 737 larvas expostas evoluíram para pupa (Tabela 8). A proporção de pupas variou de 4,6% a 80,8% entre os 18 depósitos teste. Adicionalmente, em 25% dos depósitos a proporção de pupas foi igual ou menor que 12%, em 50% deles foi igual ou maior que 23% e em 75% foi igual ou maior que 56% (Tabela 8).

**Tabela 8.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos tratados com Diflubenzuron, com renovação diária de 20% da água, do 47º ao 71º dia do experimento.

Número do depósito	Total de Larvas Expostas	Qtde. de larvas mortas	Taxa de mortalidade	Evolução p/ pupas	Percentual de pupas
			%	Nº	%
1	48	13	27,1	35	72,9
2	47	37	78,7	10	21,3
3	38	32	84,2	6	15,8
4	41	36	87,8	5	12,2
5	41	27	65,9	14	34,1
6	43	41	95,4	2	4,6
7	42	38	90,5	4	9,5
8	47	9	19,2	38	80,8
9	43	39	90,7	4	9,3
10	41	37	90,2	4	9,8
11	36	27	75,0	9	25,0
12	44	12	27,3	32	72,7
13	46	25	54,4	21	45,6
14	42	18	42,9	24	57,1
15	26	23	88,5	3	11,5
16	44	30	68,2	14	31,8
17	36	16	44,4	20	55,6
18	32	27	84,4	5	15,6
<b>TOTAL</b>	<b>737</b>	<b>487</b>	<b>66,1</b>	<b>250</b>	<b>33,9</b>

Neste 5º e último ciclo do experimento, com duração de 25 dias, os depósitos teste foram repovoados com 737 larvas e os controles com 275 larvas distribuídas nos depósitos conforme as tabelas 4 e 9 respectivamente. A mortalidade média nos depósitos teste foi de 66,1 (497 larvas) e a emergência para pupas foi de 33,9% (250 pupas). Nos depósitos controle, a mortalidade média foi de 46,5 (128 larvas) e evolução para pupas de 53,5% das alvas (147 pupas). A proporção dos diferentes

depósitos variou de 21,75% a 87,5% (Tabela 9). O encerramento deste ciclo se deu por não existirem mais larvas nos depósitos controle.

**Tabela 9.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos não tratados, com renovação diária de 20% da água, do 47º ao 71º dia do experimento.

Número do depósito	Total de larvas expostas	Qtde. de larvas mortas	Taxa de mortalidade	Evolução p/ pupas	Percentual pupas
	Nº	Nº	%	Nº	%
1	48	6	12,5	42	87,5
2	46	36	78,3	10	21,7
3	48	30	62,5	18	37,5
4	45	20	44,4	25	55,6
5	46	17	37,0	29	63,0
6	42	19	45,2	23	54,8
<b>TOTAL</b>	<b>275</b>	<b>128</b>	<b>46,5</b>	<b>147</b>	<b>53,5</b>

Foram comparadas as proporções de larvas que evoluíram para pupas nos depósitos tratados e nos depósitos controles, e a tendência de aumento ou diminuição da proporção de larvas dos diferentes ciclos dos dois grupos (Tabela 10). Em todos os momentos, a proporção de pupas que emergiu do grupo tratado foi significativamente mais baixa do que a proporção que emergiu do grupo controle (Valores-p  $\leq 0,0009$ ). Por outro lado, houve um aumento significativo da proporção de pupas ao longo do tempo, nos ciclos do Grupo Tratado (Valores-p  $\leq 0,0009$ ), e uma diminuição significativa da proporção de pupas ao longo tempo, nos ciclos do Grupo Controle (Valores-p  $\leq 0,0009$ ).

**Tabela 10.** Evolução para pupas de *Aedes aegypti* em depósitos não tratados e tratados com Diflubenzuron, com renovação diária de 20% da água, em cinco diferentes períodos.

Período Grupo	Total	Qtde. larvas	Taxa de	Evolução	Percentual de
		mortas	mortalidade	p/ pupas	pupas
		Nº	%	Nº	%
Do 1º a 5º dia					
-Grupo tratado	824	824	100,0	0	0,0
-Grupo não tratado	299	6	2,0	293	98,0
Do 6º a 19º dia					
-Grupo tratado	826	826	100,0	0	0,0
-Grupo não tratado	301	11	3,6	290	96,4
Do 20º a 30º dia					
-Grupo tratado	886	870	98,2	16	1,8
-Grupo não tratado	284	36	12,7	248	87,3
Do 31º a 46º dia					
-Grupo tratado	787	676	85,9	111	14,1
-Grupo não tratado	259	77	29,7	182	70,3
Do 47º a 71º dia					
-Grupo tratado	737	487	66,1	250	33,9
-Grupo não tratado	275	128	46,5	147	53,5

A tabela 11 mostra evolução temporal da concentração de *Diflubenzuron* nos depósitos tratados com *Diflubenzuron*.

**Tabela 11** Evolução temporal da concentração(Mg/Litro) de Diflubenzuron nos depósitos tratados, com renovação diária de 20% da água, em cinco diferentes períodos.

Período	Distribuição da concentração(PPM) de Diflubenzuron			
	Minima	Media	Mediana	Máxima
Do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia	0,11776	0,19329	0,18400	0,28750
Do 6 <sup>o</sup> ao 19 <sup>o</sup> dia	0,00518	0,03217	0,02223	0,09421
Do 20 <sup>o</sup> ao 30 <sup>o</sup> dia	0,00045	0,00172	0,00136	0,00414
Do 31 <sup>o</sup> ao 46 <sup>o</sup> dia	0,00002	0,00011	0,00007	0,00036
Do 47 <sup>o</sup> ao 71 <sup>o</sup> dia	0,00002	0,00002	0,00002	0,00002

A tabela 16 apresenta o controle obtido em cinco diferentes períodos nos depósitos tratados com o *Diflubenzuron*, pelo método de Abbott .

**Tabela 12** Controle obtido em cinco diferentes períodos em depósitos tratados com Diflubenzuron e com renovação diária de 20% da água.

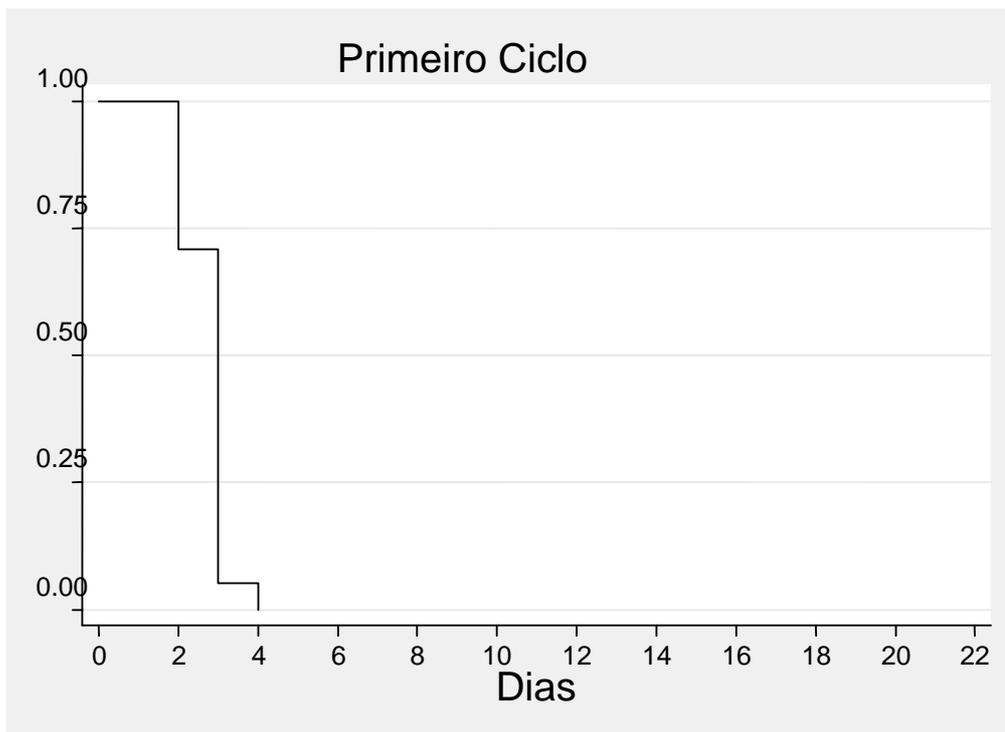
Período	Concentração Media do Período (PPM)	Percentagem de		% Controle Obtido <sup>‡</sup>
		Pupas nos depósitos		
		Controles	Tratado	
Do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia	0,19329	98,0	0,0	100,0
Do 6 <sup>o</sup> ao 19 <sup>o</sup> dia	0,03217	96,4	0,0	100,0
Do 20 <sup>o</sup> ao 30 <sup>o</sup> dia	0,00172	87,3	1,8	97,9
Do 31 <sup>o</sup> ao 46 <sup>o</sup> dia	0,00011	70,3	14,1	79,9
Do 47 <sup>o</sup> ao 71 <sup>o</sup> dia	0,00002	53,5	33,9	36,6

<sup>‡</sup>Estimado pelo método de Abbott

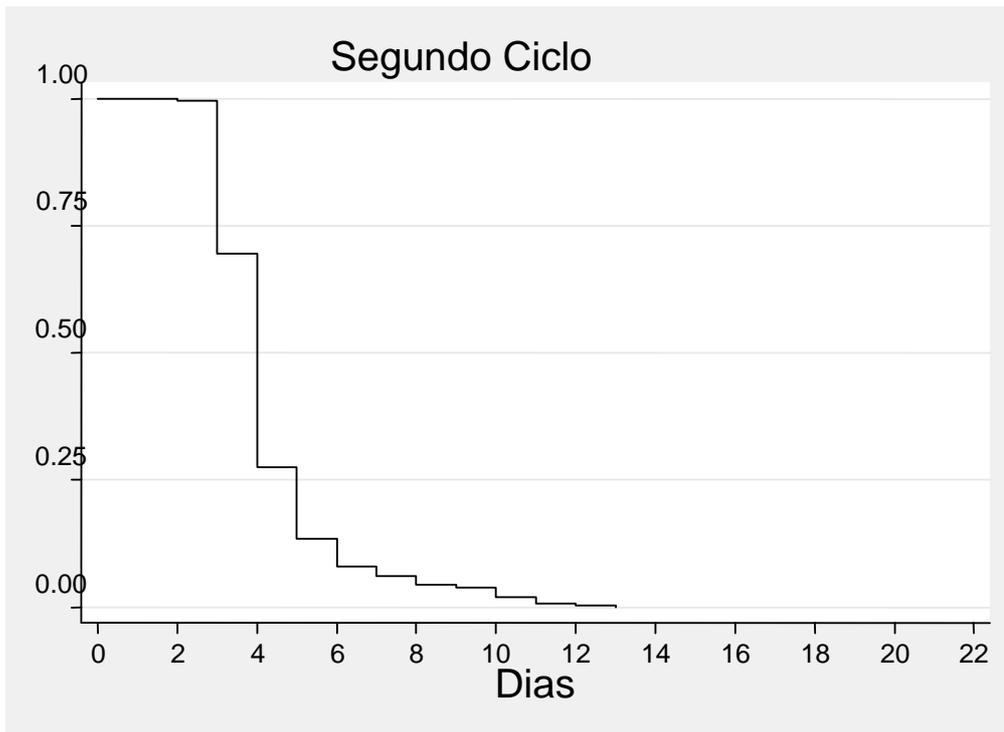
O tempo decorrido entre a colocação das larvas nos depósitos controles e o aparecimento de pupas é apresentando em gráficos de sobrevivência de Kaplan-Meier (Gráficos 1 a 5). Neste tipo de gráfico, o aparecimento de pupas é indicado por uma linha vertical cujo comprimento é proporcional ao numero de pupas que emergem. Observou-se que a duração do tempo decorrido até o aparecimento das

pupas aumentou um pouco, mas de forma significativa (Valores-p  $\leq 0,0009$ ), ao longo dos experimentos.

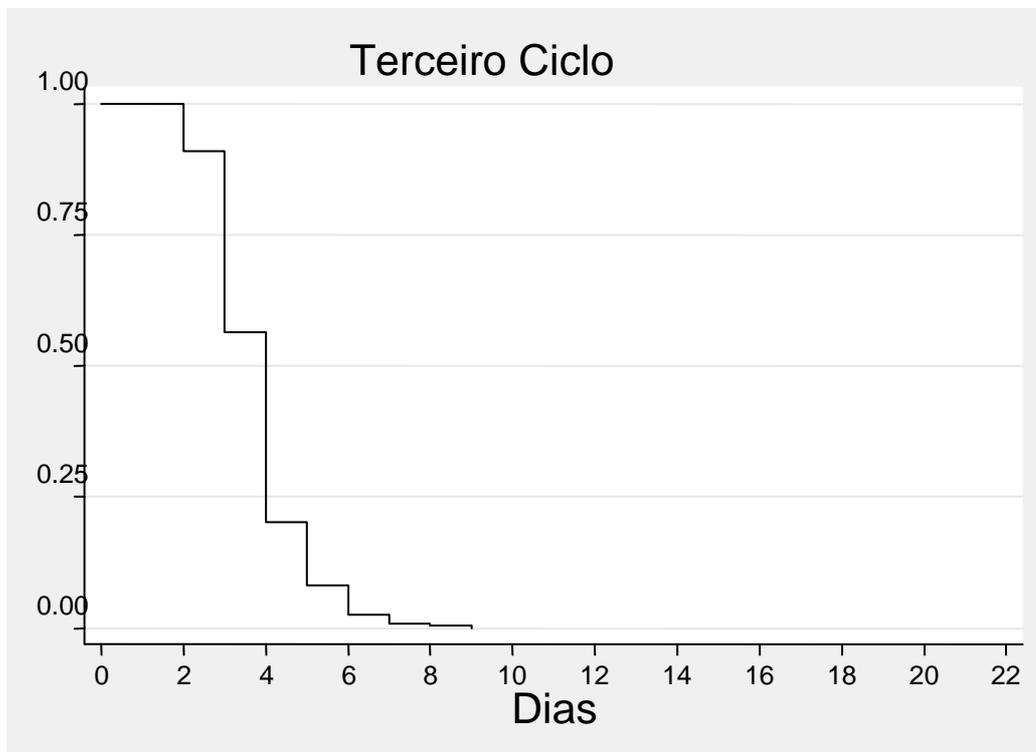
### TEMPO DECORRIDO ATÉ EVOLUÇÃO PARA PUPAS NOS DEPÓSITOS CONTROLES



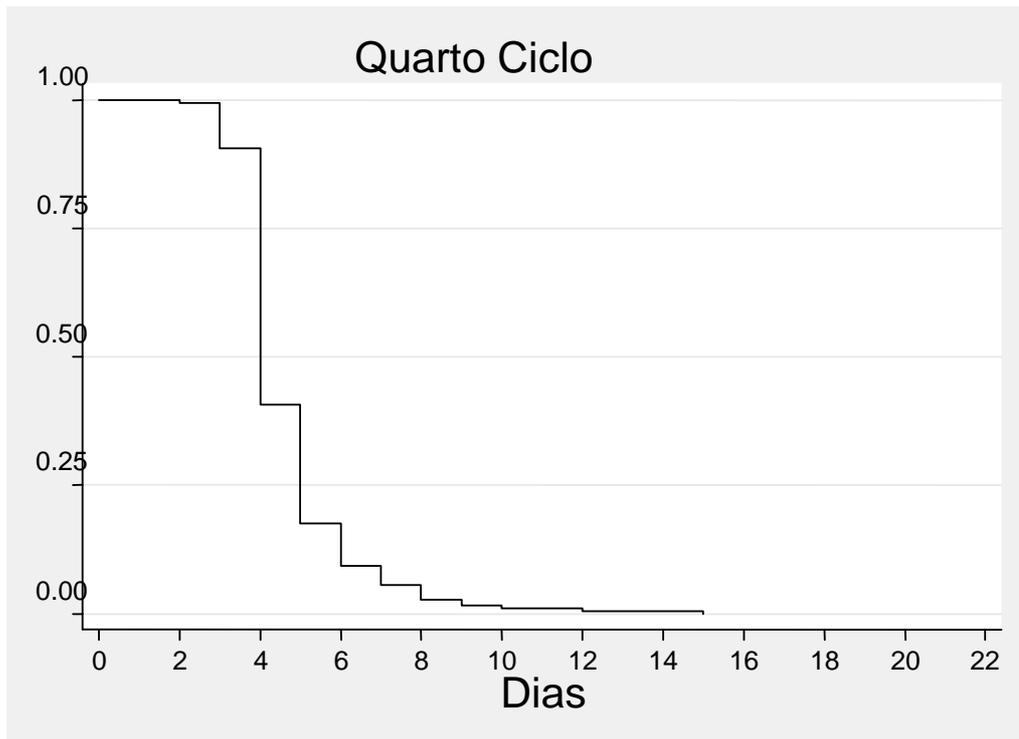
**Figura 11:** Graf. 1- Tempo decorrido até emergência de pupas nos controles - 1º ciclo



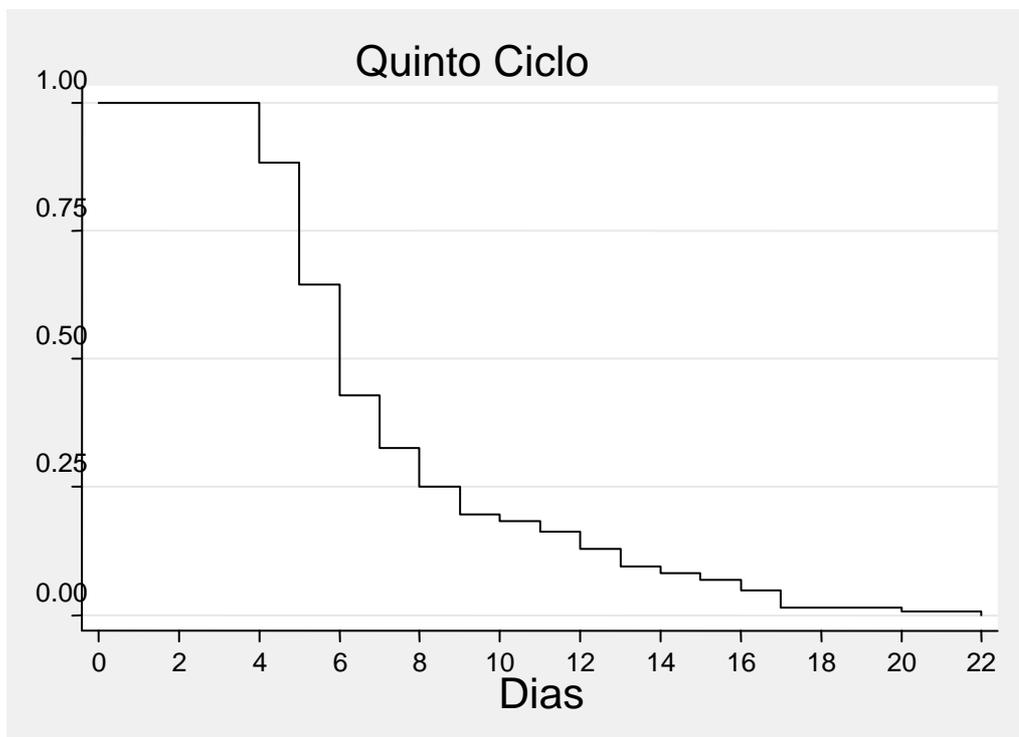
**Figura 12:** Graf. 2- Tempo decorrido até emergência de pupas nos controles - 2º ciclo



**Figura 13:** Graf. 3- Tempo decorrido até emergência de pupas nos controles - 3º ciclo



**Figura 14:** Graf. 4- Tempo decorrido até emergência de pupas nos controles - 4º ciclo



**Figura 15:** Graf. 5- Tempo decorrido até emergência de pupas nos controles - 5º ciclo

Teste Log Rank: Valor-p<0,0009

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que com uma renovação diária da água de 20% obtêm-se um controle de pelo menos 98% até o trigésimo dia, e de pelo menos 80% até o quadragésimo sexto dia. Controle é o percentual de larvas e pupas que morreram e não evoluíram para adultos, corrigindo para o controle observado nos depósitos controles.

Para se obter uma estimativa do efeito residual do *diflubenzuron* em condições naturais, faz-se necessário um ajuste decorrente da estimativa de velocidade de renovação da água usada nos experimentos. A renovação diária de água deste estudo foi baseada numa estimativa de renovação diária da água de uma amostra de caixas de água da cidade de Fortaleza. O cálculo partiu de um grande volume (percentil 75 da distribuição dos volumes da amostra de caixas de água=2.100 litros) e do menor consumo per capita diário (130 litros), obtendo-se desta forma, uma estimativa conservadora da velocidade de renovação da água dos depósitos de grandes volumes. Baseado nestes parâmetros foi estimado que pelo menos 75% das caixas de água têm uma velocidade de renovação diária igual ou superior a 20%. Por estes resultados, em condições naturais 98% e 80% de controle são os valores máximos esperados em pelo menos 75% das caixas de água e outros depósitos de grandes volumes.

Entre os larvicidas usados na atualidade no controle do *Aedes aegypti*, o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), além de apresentar um alto poder larvicida, é o que induz resistência com menor frequência (Mittal, 2003). Quando comparado com o Bti, a principal vantagem do *Diflubenzuron* seria um maior poder residual. Vamos examinar esta vantagem, partindo da estimativa, obtida neste estudo, que pelo menos 80% das larvas não evoluem até adultos até o quadragésimo sexto dia. Com relação ao efeito residual do Bti, em depósitos de vidro, com renovação diária de 50% da água, obteve-se uma mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, de pelo menos 81,7% até o trigésimo quinto dia, caindo logo em seguida para 63% (Pontes et al., 2005). Em depósitos de barro, com renovação diária de 15% da água, observou-se uma mortalidade de *Aedes aegypti* maior que 82,5% até o quadragésimo segundo dia, seguindo-se de diminuição para 55,83% (Lee & Zahiri, 2005). Outro estudo observou uma mortalidade de *Aedes albopictus* de 99,7% no

sexagésimo sexto dia, em depósitos de barro com renovação diária de 50% da água (Benjamin et al., 2005).

Na medida em que o controle químico das formas imaturas do *Aedes aegypti* seja um componente importante do controle do vetor, depois do efeito letal ou inibidor do desenvolvimento, o efeito residual é o atributo mais importante de um larvicida, no que diz respeito ao custo, e possivelmente, aceitação da população. Com relação ao custo, no momento, na cidade de Fortaleza, uma visita domiciliar de um agente de saúde do programa de controle da dengue custa R\$ 3,67 (Secretaria de Saúde de Fortaleza) e o custo do tratamento de um depósito de 200 litros com *Diflubenzuron* é R\$ 6,36 (SVS). Considerando que 50% dos depósitos de Fortaleza tem mais que 1.000 litros, então, o programa de controle gasta R\$ 3,67 de mão de obra e pelo menos R\$ 31,80 com *Diflubenzuron* em 50% dos domicílios de Fortaleza. Por outro lado, o custo de tratamento de um depósito de 200 litros com Bti WDG é R\$ 0,01. Portanto, com o Bti, o custo do controle é mais dependente da mão de obra do que o custo do controle com o *Diflubenzuron*. Em condições de campo, com renovação da água, o Bti WDG tem uma ação letal sobre larvas e pupas de *Aedes aegypti* de pelo menos 35 dias (Pontes et al., 2005) e o difluenzuron 46 dias. Para se obter uma duração de controle semelhante ao obtido com o *Diflubenzuron*, serão necessários 1.3 tratamentos com o Bti WDG.

Numa simulação de cálculo de custo de uma visita, considerando depósitos com volume variando de 500 a 3.000 litros, o custo com o *Diflubenzuron* varia de R\$ 19,58 a R\$ 99,14; com o Bti WDG varia de R\$ 4,78 até R\$ 4,97. Em situações específicas, como durante um surto de dengue, talvez seja pertinente considerar o controle de formas imaturas do *Aedes aegypti* com Bti WDG, mesmo tendo que aumentar a frequência das visitas domiciliares. Há necessidade de se avaliar as consequências que um aumento da frequência de visitas domiciliares possa ter na credibilidade e aceitação do programa pela população, e na tolerância da população, pela presença do agente de saúde do controle no domicílio. É possível que estas atitudes da população dependam do fato da mesma ter conhecimento que esteja ocorrendo ou não transmissão de dengue.

Este experimento foi desenhado para simular as condições naturais de uma caixa de água. Em Fortaleza, a caixa de água é um depósito de grande volume

(maior que 200 litros), cujas superfícies internas são revestidas de cimento, que fica situado acima do nível do solo e que é esvaziado pela parte inferior. A caixa de água pode ser um criadouro de grande importância epidemiológica para a transmissão da dengue, pela frequência com a qual o mesmo é observado infestado por larvas e pupas de *Aedes aegypti* (Romero-Vivas et al., 2002; Medronho et al., 2009), e pela proporção de domicílios com caixa de água. Na cidade de Fortaleza, existem 779.782 domicílios, destes, 377.726 possuem caixas d'água (IBGE Censo 2010), perfazendo uma prevalência de 48% dos domicílios com caixa d'água.

Nos experimentos foram usados depósitos de concreto de 30 litros, situados de 25 a 60 cm acima do solo e que foram esvaziados pelo plano inferior dos depósitos. No primeiro dia do experimento, foram colocados 20 litros de água; diariamente 4 litros de água eram retirados de cada depósito e após eram colocados 4 litros de água nova. A água foi obtida de um poço profundo existente no laboratório sem que tenha sido realizado estudo de suas características físico-químicas e biológicas antes do uso da mesma nos experimentos. A taxa de renovação da água de 20%, usada em todos os experimentos, deve se situar próxima ao limite inferior da distribuição da renovação diária de água das caixas de água de Fortaleza.

Um resultado importante deste estudo foi a alta mortalidade das larvas e aumento do tempo necessário para o aparecimento das pupas nos depósitos não tratados. Uma possível explicação para esta ocorrência seria a qualidade da água usada nos experimentos. Mas, a mortalidade de larvas observada nos dois primeiros experimentos (do 1º ao 5º dia, e do 6º ao 19º dia, respectivamente) variou de zero a 9,6%, e esta variação está dentro dos limites encontrados em outros estudos (Mulla et al, 2003; Thavara et al, 2007). No entanto, a partir do terceiro experimento (a partir do 20º dia) a proporção de larvas mortas dos depósitos não tratados aumentou rapidamente e de forma significativa (Tabela 4). Este aumento pode ser uma consequência do desenho do experimento.

Em estudos sobre competição de larvas de culicídeos e anofelinos por espaço e alimento, foi observado que, em criadouros com altas concentrações de larvas, são produzidas substâncias que aumentam a mortalidade das larvas e retardam o desenvolvimento das larvas em pupas. Também foi demonstrado que estas substâncias são filtráveis e que o efeito sobre larvas e pupas pode ser observado no

líquido filtrado de um criadouro. Uma destas substâncias é solúvel em éter e foi chamada de Growth Retardant Factor (GRF) por Moore & Fisher(1969). Estudos posteriores confirmaram o efeito do GRF sobre larvas e pupas, e descreveram outras características biológicas e químicas da mesma, entre elas, a solubilidade do GRF em éter(Ikeshoji & Mulla, 1970a; Ikeshoji & Mulla, 1970b; Moore & Whitacre, 1972)

Os experimentos que mostraram o efeito do GRF foram muito diferentes deste aqui discutido, nos seguintes aspectos: i) a concentração de larvas necessária para o efeito do GRF se manifestar era muito mais elevada do que as concentrações usadas neste estudo; ii) naqueles experimentos apenas um lote de larva foi exposto a um volume fixo de água sem renovação, durante períodos menores; neste experimento, 5 lotes de larvas foram expostos a um volume fixo de água com renovação diária de 20% do volume de água contida nos depósitos, durante um longo período, 71 dias.

Em quatro estudos que se propuseram a estudar o efeito residual do *Diflubenzuron* em condições simuladas de campo, a mortalidade entre os controles foi menor que 10%. Em nenhum dos estudos que houve renovação de água, foi registrado que a drenagem da água tivesse sido feita pelo plano inferior dos depósitos: 1) Mulla et al, (2004), usaram depósitos de barro de 200 litros com renovação de 100 litros a cada semana. Embora não exista nenhuma menção sobre a via de retirada e substituição da água, presume-se que a água era retirada pela parte superior do depósito. Neste estudo, a duração das coortes foi fixa (1 semana), enquanto no nosso estudo, as coortes tiveram durações diferentes. 2) Seng et al, (2004), usaram volume de 150 litros, 100 larvas de primeiro e segundo estágio, a cada 30 dias, durante 9 meses. Dois depósitos com renovação de 100 litros a cada 30 dias. Em 2 depósitos controles, a proporção de larvas que não evoluíram para adultos variou de 6,5% a 25,5%, mas não foi observada tendência crescente com o passar do tempo. 3) Vythilingam et al, (2005), avaliou o Pyriproxyfen contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Foram usados potes de barro de 60 litros. Com relação à renovação da água, foram desenvolvidos 3 experimentos diferentes: i) com renovação de 20% da água a cada 15 dias; ii) com renovação de 20% da água diariamente; iii) com renovação de 50% da água a cada 15 dias. A mortalidade de larvas e pupas nos depósitos controles foi insignificante. 4) Thavara et al, (2007),

testou o efeito residual de duas formulações de *Diflubenzuron*, usando a metodologia usada por Mulla et al, 2004. Naquele estudo, a proporção de larvas que não evoluíram para adultos (Inibição de Emergência) ficou abaixo de 10%, e em apenas 1 momento chegou a 20%.

Neste estudo, a mortalidade de larvas e o tempo necessário para as larvas se transformarem em pupas aumentou ao longo do tempo. Se este efeito foi determinado por substâncias, como o GRF, presentes na água dos criadouros, o aumento do efeito com o decorrer do tempo pode ter sido determinado pelo aumento da concentração das referidas substâncias com o passar do tempo. Este aumento pode ter sido consequência do método de retirar água dos depósitos, que foram drenados pela parte inferior, por uma pequena torneira com uma tela para evitar a saída de larvas, de forma que durante a drenagem não ocorria turbulência da água contida no depósito. Se a densidade do GRF e de outras substâncias de efeitos semelhantes for menor que a densidade da água, estas substâncias não teriam sido retiradas dos depósitos durante a drenagem diária dos mesmos e tenderiam a se acumular, aumentando então a concentração com o decorrer do tempo. Esta explicação baseada na densidade é coerente com a observação que o GRF pode ser uma substância lipídica.

A explicação da ocorrência da alta mortalidade de larvas e pupas observada neste estudo é uma hipótese que deve ser testada. Se esta hipótese for confirmada, será necessário verificar as implicações destes achados nos métodos de estimativa do efeito residual em condições simuladas de campo, e até mesmo verificar se existe este efeito em condições naturais.

Este estudo, conduzido em laboratório, com renovação diária de 20% de água não tratada, indicou, comparativamente aos depósitos controle, que o efeito residual considerado eficaz do *Diflubenzuron* é de 46 dias. Após este período, o aparecimento de pupas é proporcional nos depósitos teste e controle.

Segundo Focks & Chadee (1997), a melhor forma de se avaliar um depósito com relação ao desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*, é sua avaliação quanto à concentração e produção de pupas.

Num sistema real, onde um depósito domiciliar é um sistema dinâmico com renovação percentual variada e/ou intermitente da água, o efeito residual dos larvicidas é provavelmente bem menor do que em condições onde não haja renovação, ou cuja renovação da água seja inferior. Então, a presença do larvicida num determinado depósito domiciliar, depende do percentual de renovação da água deste depósito. A hipótese na qual este estudo foi baseado, é que a eficácia do larvicida *Diflubenzuron* é menor num depósito d'água com uma alta renovação de água (esta afirmativa é fato), tendo como consequência, o aparecimento de *Aedes aegypti* mais cedo (dias depois do tratamento com *Diflubenzuron*) nas caixas com uma alto percentual de renovação de água do que nas caixas com baixo percentual de renovação (esta afirmativa era a hipótese). Em outras palavras, é fato que a eficácia do larvicida *Diflubenzuron* é inversamente proporcional ao percentual de renovação da água de um depósito. E era uma hipótese, que mosquitos *Aedes aegypti* aparecessem mais cedo em depósitos com alto percentual de renovação de água do que nas caixas com baixo percentual de renovação.

Como já mencionado, os resultados nos depósitos teste foram esperados e podem ser considerados normais, no sentido de que a mortalidade de larvas diminuiu com o tempo e o aparecimento de pupas aumentou. Isto é o que se esperava do efeito larvicida do *Diflubenzuron*. Nos depósitos controle, entretanto, aconteceu o fato da crescente mortalidade de larvas e consequente diminuição de pupas, fato este intrigante, uma vez que estes depósitos não continham larvicidas, e o comportamento das larvas deveria ser homogêneo com o passar do tempo.

A propósito deste fato, Moore e Fischer em 1969 (apud Mahmood F. et al, 1996) mostraram que compostos produzidos pelo *Aedes aegypti* e algumas espécies de mosquitos, retardam o desenvolvimento e aumentam a mortalidade das larvas que se encontram no mesmo recipiente.

Wittaker e Feeny em 1971 (apud Mahmood F. et al, 1996), também mostraram que as larvas do *Aedes aegypti* e *Culex Pipiens L.*, produzem autotoxinas que interferem no desenvolvimento e na sobrevivência de outras larvas da mesma espécie no mesmo criadouro.

Além de boa eficácia contra *Aedes aegypti*, o *Diflubenzuron* também tem um amplo espectro de atividade larvicida contra mosquitos de espécies diferentes, como *Anopheles quadrimaculatus* Say e *Culex tarsalis* Coquillett (Estrada e Mulla 1986, apud Thavara, 2007), *Anopheles culicifacies* Giles, *An. stephensi* Liston and *Cx. quinquefasciatus* Say (Ansari *et al.*, 2005). A OMS (2006) também recomenda o uso de *Diflubenzuron* nas formulações de 2% GR e 25% WP para controle de mosquitos em corpos de água abertos na dosagem de 25-100 g/ha ia. No entanto, doses mais altas são necessárias em habitats com vegetação e habitats poluídos, enquanto que dosagens mais baixas são provavelmente suficientes para o controle de mosquitos em águas de inundações. (WHO, 2006).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou o uso de duas formulações de *Diflubenzuron* (DT 2% e 2% GR) para o controle da reprodução de mosquitos como *Aedes aegypti*, em uma dosagem de 02-0,25 mg/l ia, com uma eficácia esperada residual de 2 a 4 meses (WHO, 2006). Além disso, altas taxas de aplicação também foram recomendadas para os recipientes com exposição ao sol ou com alto teor de matéria orgânica.

Mulla (1995), registra que muitos IGR induzem a anormalidades e efeitos retardados em imagos que estejam aptos a uma emergência de sucesso, incluindo aberrações morfogénicas e declínio na reprodução e fertilidade. Neste estudo, os alados foram examinados detalhadamente em microscópio e não foram comprovadas anormalidades nem aberrações morfogénicas nos adultos que emergiram dos depósitos teste. Nada se pode afirmar a partir deste experimento com relação a atividades e funções de reprodução, uma vez que não foi objeto do estudo avaliação desta natureza.

Observou-se, entretanto, que existe um retardo de crescimento visível nas larvas de 3º estágio submetidas ao tratamento com o *Diflubenzuron*. Algumas destas larvas chegaram a sobreviver mais de 18 dias em 4º estágio, sem que evoluíssem para pupas.

Inúmeros trabalhos já foram escritos no Brasil sugerindo a eficiência de produtos tanto à base de *Bacillus thuringiensis*, organofosforados e piretróides, para controle de larvas de culicídeos e outros insetos, nos mais variados habitats e nas

mais variadas formulações. Não se tem conhecimento, entretanto, de qualquer trabalho que tenha estudado a eficácia do larvicida *Diflubenzuron* com renovação diária de água não tratada em laboratório, simulando condições domiciliares, e o risco de infestação por *Aedes aegypti*.

O presente estudo documenta a boa eficácia larvicida do *Diflubenzuron* na dosagem preconizada pelo MS contra larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, em depósitos de armazenamento de água (volume 20 lts) em condições de laboratório, simulando depósitos de água domésticos. A renovação diária da água dos depósitos em 20% (CAGECE, 2010), mostrou que o produto tem eficácia por aproximadamente 46 dias após sua aplicação.

Foram usadas larvas de 3º estágio para que fosse avaliada a eficácia do produto na fase considerada a mais resistente do ciclo imaturo do inseto, segundo Thavara et al, (2007).

Foram executados 5 ciclos de pesquisas. O 1º ciclo teve duração de 5 dias, e foi encerrado por terem “zerados” os depósitos controle. Neste ciclo, houve retardo de desenvolvimento de 03 larvas nos depósitos teste, ou seja, “zerados os controles, ainda restaram vivas 03 larvas nos depósitos teste. No 2º ciclo, a duração foi de 14 dias e o encerramento se deu por terem “zerado” os depósitos teste. Neste ciclo, nem todas as larvas dos depósitos controle “puparam”, e apenas uma larva de depósito teste teve retardo de desenvolvimento de 14 dias. O 3º ciclo teve duração de 11 dias e já ocorreram “pupagens” nos depósitos teste, embora em quantidade bem menor que nos controles. O 3º ciclo foi encerrado por conta dos depósitos teste que “zeraram”. A duração do 4º ciclo foi de 16 dias e foi encerrado por conta dos depósitos teste que “zeraram”. Neste ciclo apenas 3 larvas dos depósitos controle não evoluíram para pupa. O quinto e último ciclo, teve duração de 25 dias e foi encerrado por ter os controles “zerados”. Ressalte-se que apenas 05 larvas dos depósitos teste permaneceram vivas (não morreram nem puparam).

Quanto à segurança para a saúde pública, a OMS classifica o *Diflubenzuron* como pouco provável que apresente um risco agudo em uso normal, uma vez que tem baixa toxicidade para os mamíferos, sem indicação de carcinogenicidade, mutagenicidade ou teratogenicidade (WHO, 2006).

## 7. CONCLUSÕES

Observou-se que até o 46º dia do experimento (5º ciclo), 80% das larvas (média/depósito) com ingestão de *Diflubenzuron* foi incapaz de completar a sua metamorfose e morreu. Este é um modo de ação completamente diferente de outros larvicidas químicos sintéticos e, portanto, fornece uma nova estratégia para o manejo da resistência, onde a resistência a larvicidas convencionais ocorre (Thavara et al, 2007). Convém apenas adequar-se a eficácia do larvicida com a rotina de tratamento pelos agentes de endemias.

Pontuando as conclusões, têm-se:

- 1- O larvicida *IGR Diflubenzuron*, teve eficácia comprovada neste experimento até os primeiros 46 dias;
- 2- Foi observado um desaceleramento significativo no desenvolvimento das larvas;
- 3- A mortalidade nos depósitos tratados com o larvicida ocorreu de forma esperada;
- 4- O uso de larvicidas do tipo IGR pode ser uma alternativa viável para o controle larvário em depósitos para abastecimento de água, uma vez que é eficaz, tem baixa toxicidade para a biota envolvente, para os mamíferos e pode ser ingerido com água na dosagem preconizada;
- 5- É possível estabelecer-se uma fórmula para cálculo de renovação de água em um município com os seguintes parâmetros : 1) consumo de água\habitante\dia da área de menor consumo; 2) média de habitante por domicílio; 3) percentil 75 da distribuição do volume de uma amostra de caixas de água.
- 6- É possível se obter com o BTI um período de efeito residual a um custo mais baixo do que com o *Diflubenzuron*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilera, L.; Marquetti, M.C., Navarro, A. Actividad biológica del *Diflubenzuron* sobre *Blattella germânica* (Dictioptera: Blattellidae). Revista Depósitona Medicina Tropical). 2001.
2. Ali, A. and J. Lord. Experimental insect growth regulators against some nuisance chironomid midges in central Florida. J. Econ. Entomol. 73:243-249. 1980.
3. Ali, A. Mulla, M.S., The *IGR Diflubenzuron* and organophosphorus insecticides against nuisance midge in man-made residencial recreation lakes. Journal of the Economy Entomology. 70(5): 571-577. 1977.
4. Axtell, R.C., Dukes, J.C., Edwards, T.D. Field tests of *Diflubenzuron*, Methoprene, Flit MLO and Chlorpyrifos for the control of *Aedes taeniorrhynchus* larvae in diked dredged spoil áreas. Mosquito news. 39(3): 520-527. 1979.
5. Axtell, R.C., Edwards T.D. Field tests of insectides and Insect Growth Regulators for the controlo f *Culex quinquefasciatus* in anaerobic animal waste lagoons. Mosquito News. 40(1): 36-42. 1980.
6. Barrera R. Amador M. Clark GG. Use of pupal survey techniqe for measuring *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in Puerto Rico. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 74: 290-302. 2006.
7. Baruah, I.; Das, S. C. Evaluation of Methoprene (Altosid) and *Diflubenzuron* (Dimilin) for control of mosquito breeding in Tezpur (Assam). Indian Journal of Malariology, New Delhi, v. 33, n. 2, p. 61-66, June 1996.
8. Berner L. Factors affecting the Oviposition of *Aedes aegypti*. Bull. Wrld. Halth Org. Ann. Ent. Soc.Am., 40, 528-529. 1967.
9. Bezerra, H.S.S. Determinantes da Infestação Domiciliar pelo *Aedes aegypti* na cidade de Fortaleza [Dissertação]. Fortaleza (CE): Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade

Federal do Ceará; 1999.

10. Benjamin S, Rath A, Fook CY, Lim LH. Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation VectorBac DT for control of dengue mosquito vectors in potable water container. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health* 2005; 36:879-892.
11. Borges, R.A., Cavasin, G.M., Silva, I.G., Arruda, W., Oliveira, E.S.; Silva, H.H.G.; Martins, F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do *Diflubenzuron* na ecdise de larvas de *Aedes aegypti*. *Revista de Patologia Tropical*. 33(1): 91-104. 2004.
12. Braga, I. A.; Mello, C. B.; Peixoto, A. A.; Valle, D. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 100, n. 4, p. 435-440, July 5<sup>a</sup>.
13. Braga, I. A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*,16(4):279-293, out-dez, 2007.
14. Briegel H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of insect Physiology*; 36:165-172. 1990.
15. CAGECE. Plano Diretor de Abastecimento de Água 2010.
16. Caprara, A., Oliveira-Lima J.W.; Marinho A.C.P; Calvasina P.G., Landin, L.P., Sommerfeld, J. Irregular water supply, household usage and dengue: a bio-social study in the Brazilian Northeast. *Cad. Saúde Pública*, v. 25, supl. 1, 2009.
17. Carrera, M. Insetos de interesse médico e veterinário. UFPR, 228p, 1991.
18. Cavalcanti, L.P.G., Eficácia de peixes larvófagos na redução de larvas de *Aedes aegypti* em depósitos domiciliares com água. Tese de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará., Fortaleza, CE, 2009.

19. Chadee, D. D. Seasonal incidence and vertical distribution patterns of oviposition by *Aedes aegypti* in an urban environment in Trinidad, W.L. J. Am. Mosq. Control. 1991.
20. Chadee DD, Ward RA, Novak RJ. Natural Habitats of *Aedes aegypti* in the Caribbean-A Review. Journal American Mosquito Control Association.; 14(1):5-11. 1998.
21. CHAMBERLAIN, W. F. Insect growth regulating agents for control of arthropods of medical and veterinary importance. Journal of Medical Entomology, Lanham, v. 12, n. 4, p. 395- 400, Oct. 1975.
22. Chapman, R. F. The insects: structure and function. 3rd ed. Cambridge, Massachusetts:Harvard University Press,. 919 p. 1982.
23. Chavasse, D. C.; Yap, H. H. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization. WHO/CTD/WHOPES/97.2. 1997.
24. Chen, L.; Wang, Q.; Huang, R.; Chunhui, M.; Shang, J.; BI, F. Synthesis and insecticidal evaluation of propesticides of benzoylphenylureas. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Davis, v. 53, p. 38-41, 2005.
25. Clare, H.L. Report of the Surgeon-General for the year 1914-1915. Trinidad and Tobago Council Paper. No. 154 Port of Spain, Trinidad, West Indies.
26. Consoli, R.A.G.B. & Oliveira, R.L. Principais mosquitos de importância Sanitária no Brasil. FIOCRUZ, 1 ed. 255p, 1994.
27. Cook, S. S. Mosquito control in Haiti, with especial reference to the use of Paris green. South. Med. J. 24:431-433. 1931.
28. Costa, F.M. Avaliação da atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos *Diflubenzuron* contra *Anopheles darling* Root, 1926 (Diptera, Culicidae), em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da

- Amazonia- INPA, Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Manaus, 2007.
29. Cunha, R.V., Miagostovich, Petrola, Z., Araújo E.S.M., Cotez, D.C., Pombo, V., Nogueira R.M.R., Schatzmayr, H.G. Retrospective study on dengue in Fortaleza, state of Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1988.
30. Daglish, G.J.; Wallbank, B.E. Efficacy of *Diflubenzuron* plus methoprene against *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* in sorted sorghum. *Journal of Stored Products Research* 41(1): 353-360. 2005.
31. Darriet, F.; Duchon S.; Hougard J.M. Spinosad: A new larvicide against insecticide-resistant mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4):495-496. 2005.
32. Dorta, D. M.; Chiong, R. T.; Ortega, A. N.; Garcia, F. A.; Quinones. Estudio de la sensibilidad al Dimilin (*Diflubenzuron*) en una cepa de *Aedes (S) aegypti* Linnaeus, 1762 y de *Culex (C) quinquefasciatus* Say, 1823 criadas en el laboratorio. *Revista Depósitona de Medicina Tropical, La Habana*, v. 41, n. 1, p. 56-63, enero/abr. 1989.
33. Eisler, R. *Diflubenzuron* Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A synoptic review. *Biological Report – Contaminant Hazard Review – Report* 25.4(1): 2-48. 1992.
34. Estrada JG. Mulla MS. Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc*: 2: 57-60. 1986.
35. FINCHER, G. T. Sustained-release bolus for horn fly (Diptera: Muscidae) control: effects of Methoprene and *Diflubenzuron* on some nontarget species. *Environmental Entomology, College Park*, v. 20, n. 1, p. 77-82, 1991.
36. Floore, T.G. Mosquito larval control practice: past and present. *Journal of the mosquito control association*. 22(3): 527-533. 2006.

37. Focks DA, Chadee DD. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 56:159-167. 1997.
38. Focks, D.A., Daniels, E., Haile, D.G., Keesling, J.E. A simulation of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation and samples of simulation results. Am. J. Trop. Med Hyg. 53:489-506, 1995. Journal of Medical Entomology. Classification of *Aedes aegypti* Sithiprassana, container habitats, 2007. J. Med. Entomol. 44(6): 938-944 (2007).
39. Focks, D. A., Brenner, R. J. , Hayes, J. , Daniels. E. Transmission thresholds for dengue in terms of pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. Am. J. Trop. Med Hyg 62: 11-18, 2000. Journal of Medical Entomology. Classification of *Aedes aegypti* Sithiprassana, container habitats, 2007. J. Med. Entomol. 44(6): 938-944 (2007).
40. Forattini, O.P. Entomologia Médica. Vol 1, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo, 1962.
41. Fournet, F.; Sannier, C.; Moniere, M.; Porcheron, P; Monteny, N. Effects of two insect growth regulators on ecdysteroid production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, Lanham, v. 32, n. 5, p. 588-593, 1995.
42. Fox. I.. A. H. Boike Boike and I. Garcia-Moil. Notes on rock hole breeding and resistance of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Am. J. Tiop. Med. Hyg. 9:425-429. 1960.
43. Franco, O. A história da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1976.
44. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas. Brasília: Funasa; 2001.

45. Ginarte, C.A.; Dorta, D.M. Influencia de inhibidores del desarrollo sobre la reproduction de *Musca domestica*. Revista Depósitona Medicina Tropical. 48(1): 40-47. 1996.
46. Gordon, R.; Buford, I. R. Effects of Methoprene, a juvenile hormone analogue, on the larval and pupal stages of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 30, n.4, p. 279-286, 1984.
47. Graf, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. Parasitology Today, Amsterdam, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.
48. Grosscurt, A. C. *Diflubenzuron*: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and an evaluation of its practical possibilities. Pesticide Science, Oxford, v. 9, p. 373 - 386, 1978.
49. Gubler D.J., Kuno, G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever; 1997.
50. Gubler, D.J. Epidemic Dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends Microbiol 10: 100-103, 2002; Journal of Medical Entomology. Classification of *Aedes aegypti* Sithiprassana, container habitats, 2007. J. Med. Entomol. 44(6): 938-944 (2007).
51. Hajjar N.P. & Casida, J.E. Insectidal benzoilphenyl-ureas structures-activity relationships as chitin syntesis inhibitors. Science, 200: 1499-1500. 1978.
52. Hartfelder, K. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 33 n. 2, p. 157-177, 2000.
53. Harrington L.C., Ponlawat A., Edman J.D., Scott T.W., Vermeylen F.-Vector Borne and Zoonotic Diseases- Volume 8, Number 3, 2008
54. Hoffmann, K. H.; Lorenz, M. W. Recent advances in hormones in pest control. Phytoparasitica, Bet Dagan, v. 26, n. 4, p. 1-8, 1998.
55. IBGE. Censo Brasileiro 2010.

56. Ikeshoji T, Mulla MS. Overcrowding factors of mosquito larvae. *Journal Economic Entomology* 1970; 63:90-96.
57. Ikeshoji T, Mulla MS. Overcrowding factors of mosquito larvae. 2. Growth-Retarding and bacteriostatic effects of the overcrowding factors of mosquito larvae. *Journal Economic Entomology* 1970; 63:1737-1743.
58. Kawada H, Susumo S, Kozue S, Maschika H, Masaiukil K, Toshiaki I, AND Masahiro T. Mosquito larvicidal effectiveness of eco-bioblock integrated water-purifying concrete block formulation containing insect growth regulator Piriproxifen. 2006.
59. Kellett, E R. S. and T. A. Omardeen, Tree hole breeding of *Aedes aegypti* (Linn.) in Arima, Tiinidad. *West Indian Med. J.*6:179-188. 1957.
60. Kebbeb, 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*. 1997.
61. Kittayapong P, Strickman D. Distribution of container-inhabiting *Aedes aegypti* larvae (Díptera: culicidae) et a dengue focus in Thailand. *Journal Medical Entomology*; 30:601-606. 1993.
62. Kroschel, J.; Koch, W. Studies on the use of chemicals, botanicals and *Bacillus thuringiensis* in the management of the potato tuber moth in potato stores. *Crop Protection*. 1996.
63. Laird, M. and J. Mokry. Larval *Aedes aegypti* from Tuvalu papaya trees. . *Mosq. News* 43:81-82. 1983.
64. Lima, J.B.P.; Melo N.V.; Valle D. Residual Effect of two *Bacillus thuringiensis* VAR. israelensis Products Assayed against *Aede aegypti* (díptera: culicidae) in Laboratory and Outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(3):125-130, May-June, 2005
65. Lee YW, Zairi J. Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. *Tropical Biomedicine* 2005; 22:5-10.
66. Macdonald, 1956. *Tropical Medicine and International Health*, volume 14 no

2 pp 220– 227 february 2009.

67. Mahmood, F., Crans, Wayne J., Savur, Nitin S. Larval competition in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae): Effects of density on size, growth, sex ratio, and survival. *Journal of vector ecology* 22(1), 90-94.
68. Marcondes CB. *Entomologia médica e veterinária*, Editora Atheneu, 436p, 2001.
69. Martins, F.; Silva, I. G. Avaliação da atividade inibidora do *Diflubenzuron* na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 135-138, mar./abr. 2004.
70. Medronho RA, Macrini L, Novellino DM, Lagrotta MTF, Camara VM, Pedreice CE. *Aedes aegypti* Immature forms Distribution According to Type of Breeding Site. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 80:401-404. 2009.
71. Merzendorfer, H.; Zimoch, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, Cambridge, v. 206, p. 4393-4412, 2003.
72. Miller, R.W.; Corley, C.; Hill, K. R. 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. 1975.
73. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Operações. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. *Manual de dengue: Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente*, 2ª edição, Brasília (DF); 1996.
74. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. *Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica*. 5 ed. 1998.

75. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Avaliação da eficácia de análogos do hormônio juvenil e inibidores da síntese da quitina, no controle do *Aedes aegypti*, 2005.
76. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica, Departamento de atenção Básica, série A. Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de atenção Básica nº 21. Brasília – DF, 2008.
77. Mittal PK. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *Journal Vector Borne Diseases* 2003; 40:20-32.
78. Miura, T., Scheafer C.H., Takahashi, R.M. & Mulligan, F.S.R. III,. Effects of the Insect Growth Regulator Dimilin on hatching of mosquitoes eggs. *J. Econ. Entomol.*, 69: 655-659. 1976.
79. Moore CG, Fisher BR, Competition in mosquitoes. Density and species ratio effects on growth, mortality, fecundity, and production of growth retardant. *Annals Entomological Society America* 1969; 62:1325-1331.
80. Moore, C. G.; Whitagre, D. M. Competition in mosquitoes. 2. Production of *Aedes aegypti* Larval Growth Retardant at Various Densities and Nutrition Levels, 1972..
81. Moore, C. G.. Habitat differences among containerbreeding mosquitoes in western Puerto Rico (Diptera: Culicidae). *Pan-Pac. Entomol.* 59:218-228. 1983.
82. Mulla MS; Darwazeh, H.A.; Norland, R.L. Insect Growth Regulator: Evaluation procedures and Activity against Mosquitoes. *Journal of the Economic Entomology.* 67(3): 329-332, 1974.
83. Mulla MS; Giancarlo, M.; Darwazeh, H.A. Effects of Insect Growth Regulator Dimilin or TH6040 on mosquitoes and some nontarget organisms. *Mosquito News.* 35(1): 211-216, 1975.
84. Mulla MS; Darwazeh, H.A.; The IGR Dimilin and its formulations against mosquitoes. *Journal of the Economic Entomology.* 69(3): 309-312, 1976.

85. Mulla, M. S.; Darwazeh, H. A.; Schreider, E. T. Impact of new insect growth regulators and their formulations on mosquito larval development in impoundment and floodwater habitats. *Journal of the American Mosquito Control Association*, Fresno, v. 5, n. 1, p. 15-20, Mar. 1989.
86. Mulla, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, Fresno, v.11, n. 2, p. 269-273, June 1995.
87. Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chomposri J, Zaim M, Su T. Laboratory and Field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal Vector Ecology* 2003; 28:241-254.
88. Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chomposri J. Procedures for evaluation of field efficacy of slow release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water storage containers. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20: 64-73. 2004.
89. Nathan, M. B. and M. E. C. Giglioli. Eradication of *Aedes aegypti* on Cayman Brac and Little Cayman, West Indies, with Abate (temephos) in 1970-1971. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 16:28-39. 1982.
90. Noriega, F. G. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford, v. 34, p. 687-693, 2004.
91. Oliveira, E.A. Dengue no Brasil. In: *Congresso Internacional de Medicina Tropical*, 1988, Havana, Depósito, 1988.
92. PAHO - Pan American Health Organization. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control*. Scientific Publication n° 548. Washington, DC, 1994.
93. Parker, A. G., M. E. C. Giglioli, S. Mussington, A. B. Knudsen, R. A. Ward and R. Aarons. Rock hole habitats of a feral population of *Aedes aegypti* on the island of Anguilla, West Indies. *Mosq. News* 43:79-81. 1983.

94. Pawar, P. V.; Pisale, S. P.; Sharma, R. N. Effect os some new insect growth regulators on metamorphosis and reproduction of *Aedes aegypti*. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, v. 101, p. 13-18, Jan. 1995.
95. Peters W. Factors affecting the Oviposition of *Aedes aegypti*. Bull. Ent. Res., 47, 525-551, 1957.
96. Pontes RJS, Regazzi ACF, Oliveira-Lima JW, Kerr-Pontes RS. Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas Temephós e bacillus thuringiensis israelensis sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical;38:316-321. 2005.
97. Post LC, Mulder R. Insecticidal properties and mode of action of 1-(2,6-dihagenzoyl)-3-phenylureas. Los Angeles, CA: American Chemical Society National Meeting; 1974.
98. Regazzi ACF. Avaliação do Efeito Residual e da Mortalidade de Larvas de *Aedes aegypti* Expostas ao *Bacillus thuringiensis var israelensis* e ao temefos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Saúde Comunitária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2003.
99. Regazzi ACF, Lima JWO, Pontes RJS. Avaliação comparativa do efeito residual de uma apresentação comercial do temefos com uma apresentação comercial do *Bacillus thuringiensis israelensis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36 (supl I): 253, 2003.
100. Rehimí, N.; Soltani, N. Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* : Effect of development and cuticle secretion. Journal of Applied Entomology. 1999.
101. Romero-Vivas CME, Wheeler JG, Falconar AKI. An inexpressive interventiion for the control of larval *Aedes aegypti* assessed by an improved method of surveillance and analysis. Journal of Insect Phisiology; 36:165-172. 1990.

102. Romero-Vivas C. M. E., Arango-Padilla P. , FALCONAR A.K. I. Pupal-productivity surveys to identify the key container habitats of *Aedes aegypti* in Barranquilla, the principal seaport of Colombia. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol. 100, Supplement No. 1, S87–S95 (2006).
103. Rosen L, Shroyer Da, Tesh RB, Freier JE, Lien JIHC. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop. Med. Hyg.*; 32(5): 1108-1119. 1983.
104. Saxena, S. C. and R. K. Kaushik. Suppression of reproductive potential of *Anopheles stephensi* using chitin synthesis inhibitors. *Sci* 55:421 – 422. 1986.
105. Scott, T. W., Morrison., A. C. *Aedes aegypti* density and risk of dengue-virus transmission, PP.18-206, 2003- Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, The Netherlands. *Journal of Medical Entomology*. Classification of *Aedes aegypti* Sithiprasasna Container Habitats, 2007. *J. Med. Entomol.* 44(6): 938-944 (2007).
106. Self, L.; Nelson M.J.; Pant, C.P.; Usman, S. Field trials with two insect Growth Regulator against *Culex quinquefasciatus*. *Mosquito News*. 38(1): 74-79. 1978.
107. Seng CM, Setha T, Chanta N, Socheat D, Guillet P, Nathan MB. Inhibition of adult emergence of *Aedes aegypti* in simulated domestic water-storage containers by using a controlled-release formulation of pyriproxyfen. *Journal American Mosquito Control Association* 2006; 22:152-4.
108. Soares, S. S.; Carvalho, R. W.; Galhardo-Mella, R. C.; Galardo, A. K. Comparação da efetividade dos inseticidas Abate® (Temephos - organofosforado granulado 1%) e Altosid® (Methoprene - regulador do crescimento 1,3% P/P), no controle do *Aedes(Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762. *Parasitologia al Dia*, Santiago de Chile, v. 20, p. 53-58, 1996.
109. Steelman, C.D.; Farlow, J.E.; Breaud, T.P.; Schiling, P.E. 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. 1975.

110. Strickman D, Kittayapong P. Dengue and its vectors in Thailand: Calculated transmission risk from total pupal counts of *Aedes aegypti* and association of winglength measurements with aspects of larval habitat. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*; 68:209-217. 2003.
111. Tadei WP. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (Inpa). *Revista Ciência Hoje*, 19/11/2001.
112. Thavara U, Tawatsn A. Kong Ngamsuk u M W. Mulla MS. Thavara U, Tawatsn A. Kong-Ngamsuk W. Mulla MS. Efficacy and longevity of a new formulation of temephos larvicide tested in trials against larval *Aedes aegypti* in water storage containers. *JAm Mosq Control ASSOC*: 20: 176-82. 2004.
113. Thavara U, Tawatsin Apiwat, Chitti Chansang, Asavadachanukorn Preecha, Morteza Mir ZaimGnd S Mulla. Simulated field evaluation of the efficacy of two formulations of *Diflubenzuron*, a chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes aegypti*. In water storage containers, 2007.
114. Thiéry, I., Florence Fouque, F., Gaven B., Lagneau C. Residual Activity of *Bacillus Thuringiensis* Serovars *Medellin* and *Jegathesan* on *Culex Pipiens* and *Aedes aegypti* Larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(3):371-379, 1999.
115. Tinker, M. E. *Aedes aegypti* larval habitats in Surinam. *Bull. Pan Am. Health Organ*. 8:293-301. 1974.
116. Tunaz, H.; Uygun, N. Insect Growth Regulators for Insect Pest Control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, Ankara, v. 28, p. 377-387, 2004.
117. Vasuki, V.; Rajavel, A. R. Influence of short time exposure to an insect growth regulator, Hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitoes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 275-283, Apr./June 1992.
118. Velloso, A. H. P. P.; Rigitano, R. L. O.; Carvalho, G. A.; Carvalho, C. F. Efeitos de compostos reguladores de crescimento de insetos sobre larvas e

- adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Ciência e Agrotecnia*, Lavras, v. 23, n. 1, p. 96-101, jan./mar. 1999.
119. Vilarinhos, P.T.R., Monerat R., Larvicidal. Persistence of Formulations of *Bacillus Thuringiensis* VAR israelensis to Control Larval *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20(3):311-314, 2004.
120. Vithiligam Indra, Belleza Maria Luz, Rochani Hanni, Tan Siew Beng, Tan Cheong Huat. Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator, pyritroxifen against dengue vectors. *Journal of the American Mosquitoes Control Association*, 21: 296-300, 2005.
121. Ware GW. An introduction to inseticides (Monografia na internet). University of Minnesota, 2000).Disponível em <http://ipmword.umn.edu/chapters/ware/htm>.
122. Williams, C. M. Third generation pesticides. *Scientific American*, New York, v. 217, n. 1, p. 13-17, July 1967.
123. Wilson, T. G. The molecular site of action of juvenile hormone and juvenile hormoneinsecticides during metamorphosis: how these compounds kill insects. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, v. 50, p. 111-121, 2004.
124. World Health Organization. Informal consultation of on insect growth regulator. Geneve, Switzerland. 1983.
125. Word Health Organization. Technical Report Series. Vector Resistance to Pesticides, 1992.
126. World Health Organization. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Chavasse DC, Yap HH, 1997.
127. Word Health Organization. Techniques to Detect Inseticide Resistance Mechanisms (Field and Laboratory Manual), 1998.
128. World Health Organization. Dengue [monography on the internet] Geneve: WHO; 2002. Disponível em: <HTTP://www.who.int/ctd/dengue/burdens.htm>

129. World Health Organization. Dengue Bulletin, Volume 27, December 2003.
130. World Health Organization. Frequently asked questions on DDT use for disease vector control. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland, 2005.
131. WHO. Report of the ninth WHOPES working group meeting, WHOHQ, Geneva, 5-9 December 2005. *WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2*. 2006

## 9 ANEXOS

### 1. Quadro para coleta e registro de informações diárias

DEPOSITO 01							
ESPÉCIMES MORTOS			ESPÉCIMES VIVOS (No.)				
<i>DIAS</i>	<i>Larvas</i>	<i>Pupas</i>	<i>Alados</i>	<i>Larvas</i>	<i>Pupas</i>	<i>Alados</i>	<i>OBS</i>
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							

20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							

## 2. Resumo de experimentos com ou sem renovação de água, com ou sem reposição de larvas:

### 1) Vasuki et al (1992) – **Influência de pouco tempo de exposição do IGR Hexaflumuron na mortalidade e emergência de adultos de mosquitos vetores.**

O experimento foi conduzido na Índia com várias concentrações do larvicida.

Vinte e cinco larvas de 4<sup>o</sup> estágio de três espécies de mosquitos foram expostas por 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos em 250 ml de água de torneira em várias concentrações do larvicida. As larvas após exposição no tempo determinado, eram lavadas em água corrente e em seguida transferidas para beckeres com água sem tratamento, alimentadas até a fase de pupa para monitoramentos e registros como: mortalidade de larvas, mortalidade de pupas, emergência de adultos etc...

Obteve-se um índice de inibição de emergência de adultos entre 98 e 100% nas concentrações 0,001 a 0,1 mg/l em 10 min de exposição (menor tempo de exposição experimentado).

### 2) Montada et al (1994) – **Uso do IGR Hexaflumuron no controle do aedes albopictus.**

Experimento feito na Índia em campo e em laboratório usando três concentrações do larvicida: 0,001, 0,01 e 0,1 mg/l.

Não houve renovação de água e também não aconteceu reposição de larvas. Os resultados foram computados para obter-se o índice de inibição de emergência de adultos EI50 e EI90 em larvas de 3<sup>o</sup> estágio ocorridas em seções de pneus e potes de barro estrategicamente localizados.

Concluiu-se que o Hexaflumuron é eficaz a 0,1 mg/l para controle de criadouros de aedes albopictus.

3) Becnel et al (1996) – **Efeito de três larvicidas na produção de Aedes Albopicus, baseado na remoção de exúvias de pupas.**

O experimento foi em campo na região centro norte da Flórida, durante 169 dias, com 20 pneus na sombra e 20 no sol.

Os três larvicidas foram: Langenidium giganteum, BTI e Methoprene.

Os registros eram feitos pela contagem das exúvias de pupas encontradas.

Não houve renovação de água.

Não houve reposição de larvas.

Tanto as larvas como as pupas existentes eram contadas semanalmente de um pneu escolhido aleatoriamente, e todo o conteúdo do pneu (água, larvas e pupas) era retornado no mesmo para campo.

Concluiu-se que o fungo Langenidium giganteum foi inefetivo, o Bacillus Thuringiensis Israelensis – BTI foi eficaz nos primeiros 47 dias e o IGR Methoprene teve eficácia de 116 dias.

4) Withilingam et al (2005) – **Avaliação de campo e laboratório do IGR Piriproxifen contra vetores da Dengue.**

Os experimentos ocorreram na Malásia, um em laboratório, outro simulando campo e um terceiro em campo.

No experimento em laboratório, foram usados 10 depósitos de barro com superfície interior vitrificada com 50 lts de água.

Cem larvas de 3º estágio foram colocadas em cada depósito que era analisado a cada 3 dias. A cada 15 dias eram colocadas novas larvas até que não existissem mais larvas ou pupas nos depósitos controle, quando foi encerrado o experimento.

Não houve renovação de água no experimento em laboratório.

No experimento simulando campo, os depósitos foram iguais aos anteriores, porém com renovação de 20% de água a cada 15 dias.

O experimento em campo foi conduzido com 8 depósitos idênticos aos anteriores e 8 depósitos de tubos de plástico com 50 litros de água cada. Três depósitos de barro e três de plástico, tiveram 20% de água renovada diariamente, e o restante 50% de água renovada semanalmente.

O monitoramento e colocação de larvas foram idênticos em todos.

Houve 100% de controle nos primeiros 4 meses do experimento.

5) Braga, I.(2005) – **Avaliação da eficácia de análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina no combate de aedes aegypti.**

Pesquisa acontecida em duas regiões do Brasil, sudeste e nordeste, tendo como área de pesquisa 4 municípios, sendo 2 no sudeste (Marília/Sp e Volta Redonda/Rj) e 2 no nordeste (Arapiraca/Al e Caicó/RN).

Quinze recipientes foram tratados com os larvicidas e três foram controles. Cada um continha 50 larvas de 3º estágio.

A água (proveniente da rede de abastecimento), era renovada três vezes por semana, sendo retirados de cada vez 10 litros e recolocados 10 litros.

As larvas eram renovadas a cada sete dias, sendo todas as larvas e pupas do teste anterior removidas e levadas para eclosão e/ou morte em recipientes à parte.

Nos casos em que a mortalidade nos grupos controle foi superior a 5%, foram corrigidos pela fórmula de Abbott. Nos casos em que a mortalidade nos grupos controle foi superior a 20%, eliminou-se uma réplica, e quando permaneceu superior a 20% eliminou-se o teste.

6) Seng et al (2006) – **Inibição da emergência de adultos de aedes aegypti, simulando depósitos de armazenamento de água doméstico usando Piriproxifen.**

O experimento foi realizado no Cambodja em depósitos com 150 lts de água em 3 concentrações, 18, 27 e 36 ppb de IA.

Nos depósitos com 27 ppb, a água foi renovada em 100 lts (2/3) duas semanas após a adição das larvas.

Os depósitos ficaram sem movimentação por novas duas semanas e então eram adicionadas novas larvas, e assim sucessivamente até o final do experimento.

Foram adicionadas 100 larvas de 1º e 2º estádios mensalmente durante 8 meses.

A eficácia do Piriproxifen foi comprovada até os 6 primeiros meses, e não houve diferença entre as concentrações com renovação de água e as sem renovação de água.

7) Junqueira, J. (2006) – **Potencial dos IGR Diflubenzuron e Metrophene no controle do aedes aegypti em Uberlândia, MG.**

Experimento acontecido na cidade de Uberlândia, Brasil, com o uso de 20 larvas de 4º estágio em frascos de plástico com capacidade de 1,5l.

Não houve renovação de água.

A recolocação de novas baterias de larvas acontecia quando todos os indivíduos dos grupos controle emergiam.

As larvas remanescentes da bateria anterior eram removidas dos recipientes, descartadas e consideradas como mortas.

Concluiu-se que ambos os IGR são alternativas para controle do aedes aegypti em Uberlândia.

8) Thavara et al (2007) – **Avaliação simulada de campo de duas formulações de Diflubenzuron em containers de armazenamento de água na Tailândia.**

No primeiro experimento não houve renovação de água, apenas era repostada a água que eventualmente evaporasse durante a semana.

No segundo experimento, houve reposição de 50% da água dos containers semanalmente.

Em ambos os experimentos eram colocadas 25 larvas de 3º estágio semanalmente em cada container.

O efeito residual do larvicida sem renovação de água beirou os 100% nas 24 semanas após o tratamento e com renovação da água de 20 a 22 semanas após tratamento.

9) Costa, F.M. (2007) – **Avaliação da atividade inseticida do IGR Diflubenzuron contra Anophelis Darlingi em condições de laboratório.**

Pesquisa ocorrida em Manaus, Brasil, com larvas e pupas do mosquito Anophelis Darlingi principal vetor da malária.

Não aconteceu renovação de água tanto nas pesquisas de larvas como nas de pupas.

Em ambas, os novos lotes de indivíduos (larvas ou pupas) eram colocados nos recipientes após a morte ou emergência de todos os indivíduos anteriores do depósito. Os recipientes eram de 50 ml de água e 20 larvas (para as pesquisa com larvas) e 10 pupas (para as pesquisas com pupas).

A pesquisa conclui entre outras coisas que o Diflubenzuron foi efetivo para as larvas de 3º e 4º estádios em todas as concentrações verificadas, e que as pupas jovens foram mais suscetíveis que as de 1 dia de idade.

10) Darriet et al (2008) – **Avaliação em laboratório do IGR Cyromazine contra suscetibilidade e resistência larvicida de larvas de mosquitos.**

Experimento realizado segundo as normas da Organização Mundial de Saúde quanto à caracterização de larvicida pelos índices IE50 e IE90. Foram avaliadas 3 espécies de mosquitos com 25 larvas de 3º estágio para cada espécie, acondicionadas em frascos contendo 99 ml de água e 1 ml de cyromazide.

Não houve renovação de água e nem reposição de larvas.

Concluiu-se que o Cyromazide é uma boa alternativa para controle de resistência a inseticidas, e que o resultado aproxima-se mais dos IGR que atuam na síntese da quitina, que dos análogos de hormônio juvenil