



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

DANIELA BRAZ DOS SANTOS

**Atividade larvívica da *Copaífera langsdorffii* (Leguminosae),
evidenciada pelas alterações morfohistológicas em *Aedes
aegypti* (Diptera, Culicidae)**

**Goiânia
2015**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):		Daniela Braz dos Santos	
E-mail:		danielabrazdossantos@gmail.com	
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		[x] Sim	[] Não
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:			Sigla:
País:		UF:	CNPJ:
Título:	Atividade larvícida da <i>Copaifera langsdorffii</i> (Leguminosae), evidenciada pelas alterações morfohistológicas em <i>Aedes aegypti</i> (Diptera, Culicidae)		
Palavras-chave:	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Copaifera langsdorffii</i> , Atividade larvícida, alteração morfohistológica		
Título em outra língua:	Larvicidal activity <i>Copaifera langsdorffii</i> (Fabaceae), evidenced by morphological histological changes in <i>Aedes aegypti</i> (Diptera, Culicidae)		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Copaifera langsdorffii</i> , larvicidal activity, morpho-histological		
Área de concentração:			
Data defesa:		30/06/2015	
Programa de Pós-Graduação:		Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro	
Orientador (a):	Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva		
E-mail:	profionizete@yahoo.com.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: / /

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

DANIELA BRAZ DOS SANTOS

**Atividade larvívica da *Copaífera langsdorffii* (Leguminosae),
evidenciada pelas alterações morfohistológicas em *Aedes
aegypti* (Diptera, Culicidae)**

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia da Relação
Parasito-Hospedeiro da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ionizete Garcia
da Silva

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Braz dos Santos, Daniela

Atividade larvívora da *Copaífera langsdorffii* (Leguminosae),
evidenciada pelas alterações morfohistológicas em *Aedes aegypti*
(Diptera, Culicidae) [manuscrito] / Daniela Braz dos Santos. - 2015.
xiii, 57 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2015.
Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Copaífera langsdorffii*. 3. Atividade larvívora. 4.
Alteração morfohistológica. I. Garcia da Silva , Ionizete , orient. II. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Daniela Braz dos Santos

Orientador (a): Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva

Membros:

1. Prof. Dra. Walquíria Arruda

2. Prof. Dra. Heloisa Helena Garcia da Silva

3. Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva

Data: 30/06/2015

DEDICATÓRIA...

***Ao motivo da minha existência, meus pais, que tanto amo
Milson Arcanjo dos Santos (in memoriam)
e Leonice Braz dos Santos.***

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter permitido que eu chegasse onde estou com saúde para continuar perseverando nesta longa caminhada.

Ao professor Dr. Ionizete Garcia da Silva, do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG), pela confiança, orientação e aprendizado não somente na conclusão desse trabalho, mas também na área de Entomologia e Parasitologia.

A professora Dra. Helóisa Helena Garcia da Silva, do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG), pela amizade, colaboração e participação na execução dos bioensaios.

A professora Dra. Walquiria Arruda, do Laboratório de Estudos Morfológicos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFG), pela colaboração e ensinamentos na execução dos ensaios morfohistológicos.

A professora Dra. Adelair Helena dos Santos, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG), pela participação no exame de qualificação.

Aos técnicos Carmeci Natalina Elias, Edson de Castro e Judson Regozino, do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG), pelo apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da UFG, Sávio da Silva Cabral, pela grande amizade e companheirismo em todos os momentos deste trabalho.

A minha família e ao Petain José Ferreira Neto pela compreensão, apoio e incentivo.

A todos aqueles que de uma forma direta ou indireta colaboraram na realização e conclusão deste trabalho, minha sincera gratidão e reconhecimento.

SUMÁRIO

Figuras	X
Siglas e abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1 Revisão da literatura	1
1.1 Histórico do vírus dengue	1
1.2 Características do vírus	4
1.3 Histórico do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	7
1.4 <i>Aedes aegypti</i>	8
1.4.1 Morfologia da larva.....	11
1.5 Controle do vetor	14
1.5.1 Resistência aos inseticidas	17
1.5.2 Extratos botânicos no controle de <i>Aedes aegypti</i>	17
1.6 <i>Copaifera langsdorffii</i>	19
1.6.1 História da planta	20
1.6.2 Distribuição geográfica.....	21
1.6.3 Utilização do óleo-resina.....	21
2 Justificativa.....	23
3 Objetivos	24
3.1 Geral.....	24
3.2 Específico	24
4 Métodos	25
4.1 Obtenção das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	25

4.2 Obtenção do óleo-resina e da fração hexânica CLH ₃ de <i>Copaifera langsdorffii</i>	25
4.3 Bioensaio com o óleo-resina e com a fração hexânica CLH ₃ de <i>Copaifera langsdorffii</i>	25
4.4 Análise histológica	26
4.5 Análise estatística	27
5 Resultados	28
5.1 Análise do bioensaio com o óleo-resina e com a fração hexânica CLH ₃ de <i>Copaifera langsdorffii</i>	28
5.2 Análise morfohistológica	29
5.2.1 Grupo controle	29
5.2.2 Tratamento com o óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i>	32
5.2.3 Tratamento com a fração hexânica CLH ₃ de <i>Copaifera langsdorffii</i>	36
6 Discussão	40
7 Conclusões	42
Referências	43

FIGURAS

Figura 1.	Ciclo Biológico do <i>Aedes aegypti</i> . Adulto (A), ovos (B), larva de 1º estágio (C), larva de 2º estágio (D), larva de 3º estágio (E), larva de 4º estágio (F) e pupa (G) (Geris et al. 2012). .. 9
Figura 2.	Representação esquemática do tubo digestório da larva de <i>Aedes aegypti</i> . Adaptado de Gallo et al. 2002.12
Figura 3.	Espécime de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (A) aspecto arbóreo da planta, (B) aspectos da morfologia do fruto e da semente e (C) aspecto das flores.20
Figura 4.	Taxa de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i>28
Figura 5.	Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> , do grupo controle, coradas por HE.31
Figura 6.	Fotomicrografias de secções em resina da região mediana e posterior do mesêntero de larvas 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> submetidas por 12 horas ao óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i> , corados por HE.33
Figura 7.	Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> submetidas por 24 horas ao óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i> , corados por HE.35
Figura 8.	Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> submetidas por 12 horas à fração hexânica CLH ₃ do óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i> , corados por HE.37
Figura 9.	Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> submetidas por 24 horas à fração hexânica CLH ₃ do óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i> , corados por HE.39

SIGLAS E ABREVIATURAS

BHC	benzenohexacloro
Bs	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKV	vírus chikungunya
DENV	vírus dengue
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
DFB	diflubenzuron
DMSO	dimetilsulfoxido
e.b.e.	extrato bruto etanólico
FHD	febre hemorrágica do dengue
HE	hematoxilina-eosina
PAHO	Pan American Health Organization
SCD	síndrome do choque do dengue
UVB	ultrabaixo volume
WHO	World Health Organization
ZIKV	zika vírus

RESUMO

A principal espécie transmissora dos sorotipos do vírus dengue é o *Aedes aegypti*, o mosquito mais competente e mais adaptado ao ambiente urbano e antrópico. As medidas de controle dessa doença ainda estão prioritariamente sobre o vetor. Recentemente, diversos estudos têm evidenciado o uso de substâncias de origem botânica com potencial inseticida no controle de *Ae. aegypti*, como alternativa frente à resistência aos inseticidas convencionais. A eficácia do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* no controle das larvas de *Ae. aegypti* demonstrada em trabalhos de campo, sinaliza a possibilidade promissora desse composto botânico para o controle desse vetor requerendo estudos que esclareçam o seu mecanismo de ação. Dessa forma, propõe-se demonstrar o mecanismo do processo de mortalidade em larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, através de estudos morfohistológicos. As larvas de *Ae. aegypti* foram submetidas às soluções de óleo-resina e fração hexânica de *C. langsdorffii* nas concentrações de 70 ppm e 80 ppm, respectivamente. Posteriormente coletadas nos intervalos de tempo de 6 horas, 12 horas e 24 horas. Foram fixadas em paraformaldeído a 4% com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2, incluídas em resina, montadas, coradas pela hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia de luz. O óleo-resina e fração hexânica de *C. langsdorffii*, causaram a morte das larvas pela destruição das células da região posterior do mesêntero, por meio de intensa vacuolização citoplasmática, formação de vesícula citoplasmática apical, degeneração do bordo em escova, aumento do volume celular e a dobra na matriz peritrófica. As alterações descritas neste trabalho demonstram como compostos bioativos desencadeiam a degeneração celular e aceleram o rompimento celular.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, *Copaifera langsdorffii*, Atividade larvicida, alteração morfohistológica

ABSTRACT

The main transmitter species of serotypes of the dengue virus is *Aedes aegypti*, the most competent mosquitoes and more adapted to urban and man-made environment. The control measures of this disease are still mainly on the vector. Recently, several studies have shown the use of botanical origin of substances with potential insecticide in control of *Ae. aegypti*, alternatively opposite resistance to conventional insecticides. The efficacy oleoresin of *C. langsdorffii* the control of *Ae. aegypti* demonstrated in field work, signals the promising possibility of this botanical compound to control this vector requiring studies to clarify the mechanism of action. Thus, it is proposed to establish the mechanism of death process in the third stage larvae of *Ae. aegypti* through morphohistologic studies. The larvae of *Ae. aegypti* were subjected to oil-resin solutions and hexane fraction *C. langsdorffii* in concentrations of 70 ppm and 80 ppm, respectively. Subsequently collected in time intervals of 6h, 12h and 24h. They were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2, embedded in resin, mounted, stained with hematoxylin-eosin and analyzed by light microscopy. The oil-resin and hexane fraction *C. langsdorffii*, caused the death of the larvae by the destruction of the posterior cells of the midgut region through cytoplasmatic vacuolation, apical cytoplasmic vesicle formation, lip brush degeneration, increased cellular volume and fold in peritrophic matrix. The changes described in this paper demonstrate how bioactive compounds can trigger cell degeneration and accelerate cell disruption.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Copaifera langsdorffii*, larvicidal activity, morpho-histological

1 REVISÃO DA LITERATURA

Diante do cenário mundial das epidemias nas últimas décadas a doença febril aguda de etiologia viral (vírus dengue – DENV), popularmente conhecida como dengue, foi uma das doenças que se propagou mais rapidamente, sendo considerada emergente e reemergente, de grande relevância devido à mortalidade e morbidade. Estima-se que mais de um terço da população mundial viva em potenciais áreas de infecção, especificamente nos países tropicais cuja temperatura e umidade favorecem a proliferação do mosquito vetor. Em média 400 milhões de pessoas são infectadas anualmente (WHO 2009, CDC 2015).

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, até a semana epidemiológica 15, que corresponde à primeira semana do mês de maio de 2015, foram notificados 745.957 casos de dengue no Brasil dos quais 229 evoluíram para óbito. Mais da metade desses casos são procedentes da região Sudeste e Centro-Oeste. A prevalência viral identificada foi exposta de acordo com os percentuais de seus sorotipos, em ordem decrescente: DENV-1 (92,7%), seguido de DENV-4 (6,4%), DENV-2 (0,6%) e DENV-3 (0,2%) (Ministério da Saúde 2015a).

Em Goiás, de acordo com o Boletim Semanal de Dengue da Secretaria da Saúde (2015), da Semana Epidemiológica 21 (período de 04/01/2015 a 30/05/2015), foram notificados 133.907 casos de dengue, com 26 óbitos. O número de casos de dengue confirmados totalizou 40.537. Destes, 580 foram pelo sorotipo DENV-1 e 111 pelo sorotipo DENV-4. Os municípios goianos com maior número de casos notificados de dengue foram: Goiânia, Aparecida de Goiânia, Anápolis e Jataí. Estes números comparados com os dados do ano de 2014 evidenciaram um aumento de aproximadamente 64%, no número de casos da doença.

1.1 Histórico do vírus dengue

Os primeiros relatos históricos encontrados na Enciclopédia chinesa de sintomas e remédios durante a Dinastia Jin (265 a 420 d.C.), Dinastia Tang (610 a.C.) e Dinastia Norte Sung (992 a.C.), descrevem sobre uma doença conhecida pelos chineses como “veneno da água” ou “água envenenada”, pois acreditavam estar associada aos insetos próximos à água, e os sintomas descritos apresentavam características semelhantes aos conhecidos do dengue atualmente (Howe 1977).

No oeste da Índia Francesa e no Panamá, nos anos de 1635 e 1699 respectivamente, foram descritos surtos epidêmicos de uma doença febril aguda prolongada (Martinez-Torres 1990).

Em meados de 1778, Benjamin Rush descreveu clinicamente uma epidemia de “febre remitente biliar” ou “febre quebra ossos” na Filadélfia, cidade que se encontra na costa leste dos Estados Unidos da América. Em 1779, David Bylon relatou sobre uma epidemia denominada “Knokkel-koorts” ou “febre das juntas” em Jakarta (Indonésia) (Martinez-Torres 1990, Vasilakis et al. 2010). Apesar de a doença ter sido conhecida por diversos nomes refletindo as etimologias culturais e geográficas, foi adotado universalmente o termo dengue (Vasilakis & Weaver 2008). Acredita-se que o nome dengue tenha surgido no arquipélago de Zanzibar (Tanzânia) situado na margem leste-africana, e faz referência à frase nativa “Ki-denga Pepo”, que significa pancada ou golpe dado por um mau espírito (Halstead 1971, Gubler 1997).

Os primeiros registros de uma provável epidemia do dengue surgiram simultaneamente na Ilha de Java na Indonésia (Ásia) e no Cairo (Egito - África) em 1779. A partir de então, vários possíveis surtos de dengue foram registrados em diferentes países, possivelmente relacionados ao desenvolvimento dos meios de transportes comerciais através do tráfico de escravos e da atividade mercantil entre as regiões geográficas, destacando-se: em 1823 e 1870 no Zanzibar, (Tanzânia - África); nos anos de 1824, 1853, 1871 e 1905, em Calcutá (Índia - Ásia); no Caribe (América Central) e na Costa Atlântica dos EUA (América do Norte) em 1827, 1848 e 1850; nos anos de 1879, 1885 e 1897 na Austrália (Oceania); e 1901, em Hong Kong (China - Ásia). Entretanto, existem controvérsias se realmente todos esses surtos epidêmicos foram consequências

do DENV ou do vírus Chikungunya (CHIKV), clinicamente semelhantes (Kimura & Hotta 1944, Howe 1977, Henchal & Putnak 1990).

No ano de 1943, durante uma epidemia ocorrida em Nagasaki no Japão (Ásia), Kimura conseguiu isolar clinicamente o sorotipo DENV-1, a cepa recebeu a denominação de Mochizuki (Kimura & Hotta 1944, Zulkarnain et al. 1994).

Sabin e Schlesinger, em 1945, isolaram a partir de soros de soldados duas outras cepas, no Havaí e em Nova Guiné. Constatando-se que se tratava de cepas com características antigênicas diferentes que passaram a ser denominadas como diferentes sorotipos do mesmo vírus. Em 1953, dois novos sorotipos DENV-3 e DENV-4 foram isolados durante uma epidemia ocorrida em Manila, Filipinas (Sabin 1952, Hammon et al. 1960, Martinez-Torres 1990).

Scherer (1968) sugeriu uma classificação do DENV ao comitê da *World Health Organization* (WHO). As cepas isoladas do Japão e Havaí foram classificadas como DENV sorotipo 1, da Nova Guiné em DENV sorotipo 2 e os isolados do sudeste asiático como DENV sorotipo 3 e 4, de acordo com suas características antigênicas.

Até então, as epidemias por DENV eram caracterizadas como doenças brandas, mas após a Segunda Guerra Mundial devido à circulação de vários sorotipos em uma mesma área geográfica e mudanças ecológicas, surgiu a febre hemorrágica do dengue (FHD), uma forma grave da doença (Gubler 1997, Kuno 2007).

Nas Filipinas (Ásia), em 1953, foi relatado o primeiro surto de FHD, porém a confirmação ocorreu em 1958 com uma epidemia na Tailândia (Ásia). Por volta da década de 1960 foi comprovada a circulação viral dos sorotipos DENV-2 e DENV-3, e surtos epidêmicos do FHD alastraram-se por vários países do Sudeste Asiático, tais como Vietnã do Sul (1960), Cingapura (1962), Malásia (1963), Indonésia (1969) e Mianmar (1970) (Henchal & Putnak 1990, Martinez-Torres 1990, Gubler 1997).

Nas Américas, os registros documentados sobre o dengue são de 1827, com epidemias no Caribe e na Costa Atlântica dos EUA; entre 1848 e 1850, nas cidades de Havana e Nova Orleans; e nos anos de 1879/1880, em Cuba, Panamá, Porto Rico, Ilhas Virgens e Venezuela (Halstead 2006, WHO 2011).

Durante a década de 1950 houve um silêncio epidemiológico. A reintrodução e intensificação do DENV ocorreram na década posterior, com a

reemergência dos sorotipos DENV-2 e DENV-3. No ano de 1981, em Cuba, foi notificado o primeiro relato de FHD fora do continente asiático causado pelo sorotipo DENV-2. Este fato foi considerado o evento epidemiológico mais importante nas Américas, alcançando em 1989 a Venezuela, e no ano seguinte o Brasil (Ministério da Saúde 2005, Halstead 2006, WHO 2011).

No Brasil a primeira epidemia de dengue documentada pelo Ministério da Saúde e confirmada, laboratorialmente, foi causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4, entre 1981 e 1982, na cidade de Boa Vista (Roraima). Em 1986 nos estados do Rio de Janeiro, Alagoas e Ceará também foram registradas epidemias de dengue. A introdução dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 foram, respectivamente, em 1990 e 2000, no estado do Rio de Janeiro, épocas também do aparecimento dos primeiros casos de FHD (Nogueira et al. 1999, Ministério da Saúde 2005, Teixeira et al. 2005, Villabona-Arenas et al. 2014).

Em Goiás, na cidade de Goiânia, o dengue foi reintroduzido no período de 1993 e 1994. Em 2008, o sorotipo DENV-4 foi registrado no Brasil como um importante patógeno, e no período de 2010-2011 provocou grandes surtos. Desde então, os quatro sorotipos do vírus circulam descontroladamente em quase todo o território brasileiro, sugerindo uma hiperendemicidade associada ao aumento da transmissão e surgimento da FHD (Silva et al. 1991, Ministério da Saúde 2005, Villabona-Arenas et al. 2014).

1.2 Características do vírus

O vírus dengue (DENV) é um *Flavivirus* transmitido pelo *Ae. aegypti*, apresenta formato icosaédrico, com 45 a 55 nanômetros de diâmetro, é envelopado e seu material genético consiste em uma fita simples de RNA (Kuhn et al. 2002).

Os *Flavivirus* são considerados de grande importância médica, pois causam diversas doenças ao ser humano como a febre amarela, febre zika, dengue e as encefalites, japonesa e do oeste do Nilo, dentre outras (Leyssen et al. 2000, Figueiredo 2007, Gould & Solomon 2008).

Segundo critérios biológicos e sorológicos, são conhecidos cinco sorotipos geneticamente distintos DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 (Figueiredo 2000, Rodriguez-Barraquer et al. 2011) e, recentemente descrito, o

DENV-5 (Normile 2013), que foi isolado de um paciente na Tailândia (Ásia) com o quadro clínico grave. A identificação e a caracterização do DENV-5 foram feitas por meio de sequenciamento, análise do genoma e a confirmação através de sorologia (Mamani 2014).

A transmissão do vírus ao ser humano ocorre pela picada da fêmea do *Ae.aegypti* que para completar seu ciclo gonotrófico, realiza vários repastos sanguíneos e se contamina por um dos cinco sorotipos do DENV, ao realizar a hematofagia em uma pessoa infectada. Após intervalo de 8 a 12 dias do repasto sanguíneo, o que corresponde ao período de incubação viral, a fêmea do mosquito se torna apta a transmitir o vírus. A partir de então, existe também a possibilidade de transmitir o vírus para sua progênie por meio da transmissão transovariana natural, contribuindo com a persistência do DENV na natureza (Günther et al. 2007, Cecílio et al. 2009, Le Goff et al. 2011, Martins et al. 2012, Espinosa et al. 2014).

Pode ocorrer também a transmissão mecânica, quando o repasto sanguíneo é interrompido ou a fêmea não está completamente ingurgitada e imediatamente se alimenta de outro hospedeiro (Barata et al. 2001).

Estudos apontam que a circulação viral do DENV proporciona a compreensão dos caminhos da transmissão em diferentes áreas habitadas pelo ser humano, visto que ao longo da história da humanidade a disseminação do vírus tem acompanhado o homem e suas atividades. Como exemplo, podem-se citar os empreendimentos, o desenvolvimento das cidades, os reservatórios domésticos de abastecimento público de água das cidades, as migrações, a urbanização desordenada, as inadequadas condições de moradia, a destinação imprópria de resíduos sólidos, a globalização, o desenvolvimento da indústria automobilística, as mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global e o tráfego aéreo e terrestre (Donalísio & Glasser 2002, Tauil 2002, Teixeira et al. 2002, Marques et al. 2013).

O dengue é caracterizado como uma doença urbana, registrada principalmente em áreas superpovoadas, embora surtos em regiões rurais sejam notificados. A maior incidência do dengue está relacionado ao período de estação chuvosa e às altas temperaturas, quando aumentam as coleções de água parada que funcionam como potenciais criadouros. A principal espécie

transmissora dos sorotipos virais é o *Ae. aegypti*, o mosquito mais adaptado ao ambiente urbano e antrópico (Souza et al. 2010, Marques et al. 2013).

A espécie *Ae. albopictus*, também está associada ao ciclo de transmissão do DENV. É originário do sudeste asiático, mas pode ser encontrado em outras regiões de clima tropical, subtropical ou temperado, e apresenta maior tolerância ao frio do que o *Ae. aegypti*. No Brasil tem sido considerado como vetor secundário na transmissão do DENV, tendo maior importância epidemiológica em países asiáticos. Como apresenta ampla valência ecológica, tem sido encontrado em ambientes urbanos, periurbanos e silvestres, podendo estabelecer a ponte e a transferência de vírus como da febre amarela e de encefalites entre um e outro ambiente (Chiaravalloti Neto et al. 2002, Santos 2003).

As manifestações clínicas do dengue variam desde quadros assintomáticos a quadros sintomáticos, moderados a graves, independente do sorotipo. O período de incubação varia de 3 a 14 dias, em média 4 a 7 dias. As características clínicas podem se manifestar de forma assintomática, dengue clássico, FHD ou síndrome do choque do dengue (SCD). Os sintomas podem variar conforme a faixa etária, tempo de infecção, estado imunitário e genético do paciente e sorotipo (Gibbons & Vaughn 2002, Halstead 2002, WHO 2009).

A sintomatologia do dengue clássico é caracterizada pela presença de febre alta, cefaleia (principalmente na área retro-orbital), mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, exantema e as manifestações hemorrágicas como as petéquias. A FHD se diferencia do dengue clássico devido a um aumento na permeabilidade vascular e trombocitopenia, consequentemente ocorre hemoconcentração e diminuição na pressão sanguínea. Nos casos graves da FHD, o quadro pode evoluir para a SCD, que é caracterizado por permeabilidade vascular súbita gerada por citocinas liberadas quando as células T atacam as células infectadas com o vírus, seguido de hemoconcentração, falência circulatória e óbito (Ministério da Saúde 2005, Halstead 2007, WHO 2011, Andrade et al. 2013).

Foram relatados no Brasil casos de infecção simultânea, por exemplo, dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 em um paciente de Cuiabá (Mato Grosso), e dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 em Fortaleza (Ceará). A infecção por um dos sorotipos do DENV confere imunidade apenas para o mesmo sorotipo, ou seja,

não gera imunidade permanente contra os outros sorotipos (Pessanha et al. 2011).

1.3 Histórico do *Aedes aegypti* no Brasil

Através da história de surtos epidêmicos, aceita-se que em 1686 havia a presença do *Ae. aegypti* na Bahia e em Pernambuco como vetor da febre amarela. Cinco anos depois, o governo brasileiro colocou em prática, oficialmente, a primeira Campanha Sanitária de Combate ao Vetor, na cidade de Recife. O sucesso da campanha contribuiu para a erradicação do mosquito, e por 100 anos o Brasil se viu livre da febre amarela. Em meados de 1846 o *Ae. aegypti* reapareceu no país, provocando epidemias de dengue em São Paulo, Salvador e Rio de Janeiro. Entre 1850 e 1899, o mosquito se propagou pelo país seguindo as hidrovias, promovendo diversos surtos da doença em praticamente todo o país. Os primeiros registros na literatura médica são datados de 1916 na cidade de São Paulo, e em 1923 na cidade de Niterói, porém sem confirmação laboratorial (Meira 1916, Pedro 1923, Franco 1969).

Em 1901 na cidade de Sorocaba (SP), Emílio Ribas adota medidas de combate ao *Ae. aegypti*, vetor urbano da febre amarela. Paralelamente, em 1903, Oswaldo Cruz (Diretor Geral de Saúde Pública) cria o Serviço de Profilaxia da Febre Amarela e implanta o programa de combate ao mosquito por meio de instruções e “conselhos ao povo” publicados na imprensa (Franco 1969, FUNASA 2001).

Em 1908 o médico e pesquisador do Instituto Soroterápico Federal (atualmente Instituto Oswaldo Cruz) Antonio Gonçalves Peryassú publicou seu trabalho intitulado “Os Culicídeos do Brasil” descrevendo o ciclo de vida, os hábitos e a biologia do *Ae. aegypti*. Seus estudos revelaram informações importantes sobre a resistência do ovo à dessecação, a produtividade dos criadouros e a relação do mosquito com a temperatura e a densidade populacional, contribuindo para a erradicação do mosquito no território brasileiro (Lourenco-de-Oliveira 2008).

No ano de 1931, o governo brasileiro convida e assina um contrato com a Divisão Sanitária Internacional da Fundação Rockefeller para auxiliar no combate à febre amarela, ampliando o serviço de profilaxia da febre amarela para todo o território nacional, visando à eliminação dos focos e a utilização de petróleo para

evitar a formação de novos focos. Em 1957 o Brasil anuncia a erradicação da doença e na Conferência Sanitária Pan-americana, em Porto Rico no ano de 1958, é declarada a erradicação do *Ae. aegypti* do território brasileiro (Franco 1969).

Em 1967 o vetor reaparece e, subsequentemente, se consegue uma nova erradicação, seguida de nova reintrodução em 1976. Em 1987 a espécie foi introduzida no Estado de Goiás, e no ano de 1990 foi relatada sua ocorrência em praticamente todos os bairros da capital, Goiânia. Desde então, a presença desse mosquito ocorre em praticamente todo o território nacional. E em julho de 1986, outra espécie transmissora do DENV, *Ae. albopictus* foi introduzida no país (Osanai et al. 1983, Silva et al. 1991, FUNASA 2001).

1.4 *Aedes aegypti*

Ae. aegypti (Diptera, Culicidae) apresenta desenvolvimento holometábolo e duas fases de desenvolvimento em seu ciclo biológico (Figura1), sendo uma aquática caracterizada pelos estádios de ovo, larva e pupa; e a segunda fase terrestre que corresponde ao adulto alado (Geris et al. 2012).

Os ovos possuem formato elíptico com contorno alongado e fusiforme, medem aproximadamente um milímetro de comprimento. No instante inicial da oviposição são brancos, em seguida adquirem uma coloração escura. São ovipostos individualmente pela fêmea, em coleções aquáticas adjacentes à superfície da água (Forattini 2003).

O desenvolvimento embrionário ocorre 48 horas após a postura dos ovos em condições favoráveis de umidade, luminosidade e temperatura. Os ovos são resistentes à dessecação e seu período de quiescência pode variar de alguns meses ou até mais de um ano, fato que contribui para a dispersão passiva do inseto (Silva & Silva 1999, Silva & Silva 2000, Silva et al. 2003).

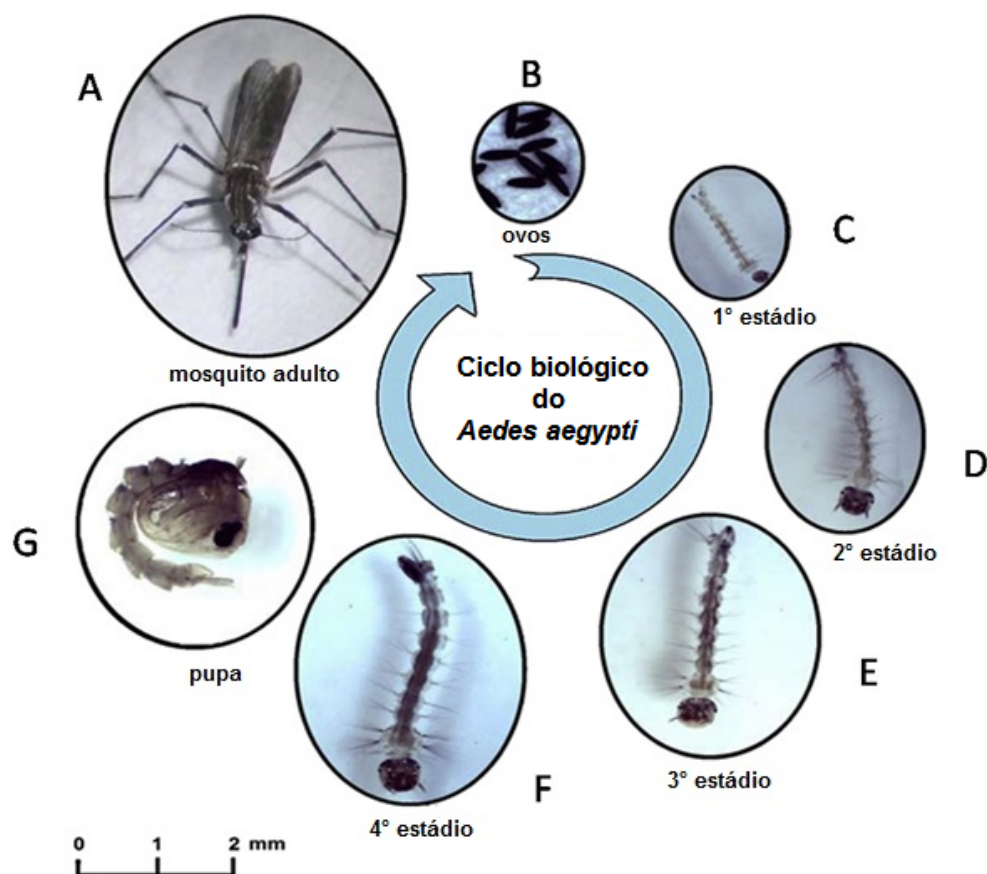


Figura 1. Ciclo Biológico do *Aedes aegypti*. Adulto (A), ovos (B), larva de 1º estágio (C), larva de 2º estágio (D), larva de 3º estágio (E), larva de 4º estágio (F) e pupa (G) (Geris et al. 2012).

As larvas emergem após a embriogênese dos ovos e passam por quatro estádios larvais denominados L₁, L₂, L₃ e L₄ (Figura 1), caracterizados pelo desprendimento do exoesqueleto, fenômeno conhecido como ecdise. Alguns fatores ambientais podem interferir no desenvolvimento larval, tais como a temperatura; a luminosidade; a salinidade; os movimentos na água; os poluentes orgânicos e inorgânicos, predadores naturais, entre outros. São aquáticas e providas de grande motilidade sinuosa (Silva & Silva 2000, Forattini 2003, Becker et al. 2010).

O estágio de pupa é caracterizado pelo processo de transição quando ocorrem profundas transformações que levam a formação do adulto, durante esse período não se alimentam, e respiram através das trompetas. A pupa é dividida em cefalotórax e abdômen (Forattini 2003).

O adulto vive em média de 55 a 60 dias (fêmeas) e 30 a 35 dias (machos), mede menos de um centímetro, representa a fase reprodutora da

espécie e é alado, fato importante na dispersão. Possui características específicas, predominando a coloração escura que contrasta com as escamas ornamentais prateadas, dois tufo de escamas prateadas no clípeo, escamas claras nos tarsos e palpos, e no escudo um desenho semelhante a uma “lira”. Nos espécimes mais longevos as escamas do escudo podem cair, dificultando a identificação da espécie. O macho se diferencia da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Alimenta-se de seivas das plantas e a fêmea é hematófaga (Silva et al. 1999, Forattini 2003, Becker et al. 2010, Geris et al. 2012).

As evidências faunísticas indicam que sua origem esteja ligada a Região Afrotropical, onde é possível encontrar populações selvagens e antrópicas. Provavelmente, o habitat larval seria buracos em árvores, e a alimentação sanguínea proveniente de animais (Brown et al. 2011/2013, Powell & Tabachnick 2013).

Inicialmente foi descrito por Linnaeus em 1762, no Egito, motivo do qual seu epíteto específico ser “*aegypti*”. Sua distribuição era restrita às regiões do Velho Mundo, porém, atualmente é considerado cosmopolita, pois se encontra em praticamente todos os continentes nas regiões tropical e subtropical. Acredita-se que sua introdução no continente americano esteja relacionada ao tráfego marítimo comercial entre a África e as Américas, por volta dos séculos XV até o XIX, por meio das formas imaturas, como os ovos dentro de barris de água nas embarcações (Brown et al. 2011 / 2013, Powell & Tabachnick 2013).

A densidade populacional desse mosquito está relacionada ao período chuvoso, mas ele também consegue manter seu nível populacional na estação de seca. Seus hábitos alimentares concentram-se no período diurno, sendo maior no período vespertino, mas também pode se alimentar a qualquer horário do dia e na fonte sanguínea mais próxima, preferencialmente o homem ou outro animal que esteja próximo de um possível criadouro (Silva et al. 2002, Forattini 2003, Souza et al. 2010).

No Brasil, o *Ae. aegypti* transmite dengue, febre amarela urbana, febre Chikungunya e febre zika. Nos últimos meses, foram notificados 3.657 casos autóctones suspeitos de febre Chikungunya nos estados do Amazonas, Amapá, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Roraima e São Paulo (Pialoux

et al. 2007, Sudeep & Parashar 2008, Albuquerque et al. 2012, Ministério da Saúde 2015a).

A febre de Chikungunya é uma doença febril aguda com manifestações clínicas semelhantes ao DENV, incluindo artralgia intensa e persistente, artrite e erupções cutâneas. O CHIKV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus* (Parola et al. 2007, Swaroop et al. 2007, Staples et al. 2009, PAHO 2011).

Recentemente, o Ministério da Saúde divulgou a confirmação, por critério laboratorial, de 16 casos de zika vírus (ZIKV) no país, sendo oito casos na Bahia e oito no Rio Grande do Norte. O ZIKV pertence à família *Flaviviridae*, filogeneticamente próximo ao DENV e também é transmitido pela picada do mosquito *Ae. aegypti*. Foi isolado em 1947, na floresta Zika em Uganda (África). (Hayes 2009, Ministério da Saúde 2015b).

A febre zika é uma doença viral com sintomatologia semelhante ao DENV e CHIKV, os sintomas mais comuns são febre baixa, artralgia, mialgia, cefaleia, edema de membros inferiores, hiperemia conjuntival não purulenta, exantema maculopapular em face, pescoço, tronco e braços. Com menos frequência, pacientes podem apresentar dor retro-orbital, anorexia, vômitos, diarreia ou dor abdominal. Porém, em alguns casos a infecção pode ser assintomática. A doença é autolimitada, com duração de 4 -7 dias (Hayes 2009, PAHO 2015).

1.4.1 Morfologia da larva

O aspecto do corpo é vermiforme e dividido em cabeça, tórax e abdome, sendo os dois primeiros globosos e o abdome com formato semicilíndrico possuindo oito segmentos com cerdas distribuídas ao longo do corpo. No abdome, o segmento posterior e anal possui quatro brânquias lobuladas que auxiliam na osmoregulação e um sifão respiratório que é colocado na superfície da água para respiração traqueal. A larva sobe à superfície para realizar a respiração, ficando praticamente em posição vertical. São sensíveis à luz e a movimentos na água, se refugiando no fundo do criadouro (FUNASA 2001, Forattini 2003, Becker et al. 2010).

A cabeça é revestida por um conjunto de escleritos, um par de antenas e de olhos compostos por 1 a 5 grupos de ocelos laterais. As peças bucais são

constituídas por epifaringe, mandíbulas, maxilas, hipofaringe e lábios; o aparelho bucal é do tipo mastigador-raspador. As mandíbulas são dentadas e as maxilas contêm pentes capazes de limpar as escovas do lábio. Os dentes e as cerdas auxiliam na trituração do alimento. As escovas orais ou palatais são constituídas por um par de escovas laterais e um par de escovas medianas, que quando em movimento provocam correntes de água que trazem os alimentos para a boca (Forattini 2003).

O tubo digestório (Figura 2) é dividido morfologicamente em estomodeo (intestino anterior), mesêntero (intestino médio) e proctodeo (intestino posterior). É revestido por uma única camada de células epiteliais apoiadas em uma membrana basal e circundado por fibras musculares estriadas, longitudinais e circulares com a função de realizar e controlar os movimentos peristálticos (Chapman 1998, Arruda et al. 2003, Barreto et al. 2006).

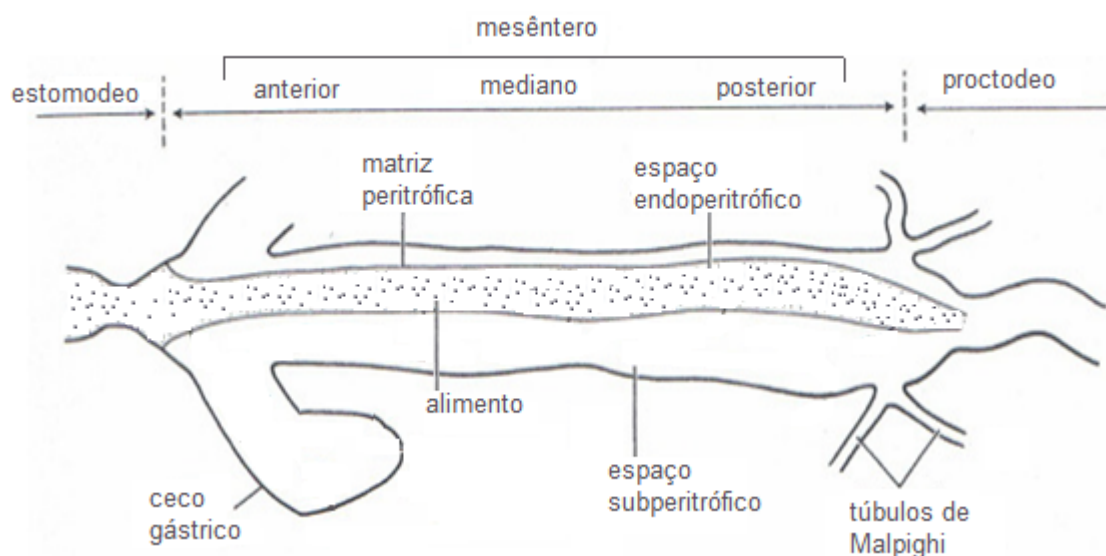


Figura 2. Representação esquemática do tubo digestório da larva de *Aedes aegypti*. Adaptado de Gallo et al. 2002.

O estomodeo tem origem embrionária ectodérmica, constituído por células achatadas, revestido internamente por uma bainha cuticular, e não participa dos processos de secreção e absorção. É formado pela faringe e pelo esôfago, fino e muscular. Internamente, encontra-se a válvula cárdia que é revestida por uma camada quitinosa e tem como função evitar o regurgitamento, e impulsionar o alimento para frente. Os cecos gástricos estão associados às células do mesêntero. Em volta da superfície externa do tubo digestório

visualiza-se o ramo traqueal (Chapman 1998, Forattini 2003, Barreto et al. 2006).

O mesêntero é responsável pelos processos de produção e secreção enzimática e também absorção de nutrientes. Tem origem embrionária endodérmica e é formado por três regiões distintas denominadas: anterior, mediana e posterior. Possui uma matriz peritrófica acelular, fina, transparente e semipermeável. Essa matriz é semelhante a um tubo simples contínuo e está localizada próximo ao ápice das células separando o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico e o espaço subperitrófico (Chapman 1998, Barreto et al. 2006, Valotto et al. 2014).

A matriz peritrófica é formada basicamente por quitina, glicoproteínas e proteoglicanas (Shao et al. 2001, Shao et al. 2005). Possui várias funções, como lubrificação intestinal evitando a abrasão de partículas ingeridas contra o epitélio intestinal; envolve o alimento protegendo as células do mesêntero contra vários componentes alimentares químicos, físicos e microbiológicos; regulação do fluxo de enzimas da célula e dos produtos de digestão; e proteção química contra substâncias tóxicas, tais como ferroprotoporfirina IX ou heme, DDT e compostos fenólicos de plantas conhecidos como pró-oxidantes (Terra 2001, Páscoa et al. 2002).

Na região anterior do mesêntero, as células epiteliais cúbicas possuem uma superfície apical com um fino bordo em escova e estão dispostas em camada única. Na região mediana, algumas células epiteliais têm formato cúbico e observa-se também a presença de células cilíndricas com atividade secretora, o bordo em escova apresenta-se mais espesso em relação à região anterior (Arruda et al. 2003, Barreto et al. 2006, Arruda et al. 2008).

As células da região posterior do mesêntero são cilíndricas, na superfície apical da célula possui um espesso bordo em escova, sugerindo uma grande quantidade de microvilosidades. Na porção distal da região posterior observa-se uma intensa atividade secretora, devido à formação de grandes vesículas. Em todas as regiões, o núcleo celular é basal e esférico. No mesêntero nota-se uma intensa atividade secretora das células e vesículas de secreções na superfície apical dessas (Arruda et al. 2003, Barreto et al. 2006, Arruda et al. 2008, Valotto et al. 2014).

O proctodeo tem origem embrionária ectodérmica, revestido internamente por uma bainha cuticular fina e permeável, e é subdividido em: piloro, íleo, colón e reto. Diferencia-se do mesêntero pela presença dos túbulos de Malpighi que se inserem no piloro (Chapman 1998).

O sistema circulatório é aberto e a hemolinfa é impulsionada pela ação do bombeamento do vaso dorsal, dividido em uma parte contrátil (coração) e uma não contrátil (aorta). O coração é formado por uma musculatura com estrias e a parede muscular é composta por uma única camada fina de cardiomiócitos transversalmente estriados. Na região ventral possui aparência enrugada (Leódido et al. 2013).

1.5 Controle do Vetor

As medidas de controle da dengue ainda estão restritas ao vetor, *Ae. aegypti*, elo mais vulnerável do ciclo epidemiológico, por meio de inseticidas, de origem química ou biológica (Garcez et al. 2013).

Ainda não existe uma vacina pronta e eficaz para uso preventivo, e nem drogas antivirais específicas, mas estudos recentes relatam o desenvolvimento de uma vacina tetravalente já em fase de testes (Coller & Clements 2011, Lang 2012, Huang et al. 2013, Osorio et al. 2015).

Para controle do vetor são necessárias ações conjuntas e permanentes do governo e da sociedade, buscando a eliminação e o tratamento de criadouros potenciais, priorizando atividades de educação em saúde, mobilização social e vigilância epidemiológica (Donalísio & Glasser 2002, Madeira et al. 2002, Ferreira et al. 2009, Freitas et al. 2011).

O controle direto ao vetor pode ser feito por métodos mecânicos, físicos, biológicos ou químicos. O controle mecânico consiste na adoção de medidas capazes de eliminar os criadouros, ou seja, impedir a procriação do *Ae. aegypti* (Ministério da Saúde 2009).

Para o controle biológico podem ser utilizados predadores naturais como as larvas do gênero *Toxorhynchites* ou peixes larvófagos das espécies *Astyanax fasciatus*, *Betta splendens*, *Gambusia affinis*, *Poecilia* spp e *Trichogaster trichopteos*. Também vem sendo utilizados mosquitos transgênicos

como machos estéreis, buscando a redução da fertilidade populacional local (Cavalcanti et al. 2007, Honório et al. 2007, Ministério da Saúde 2009).

Os inseticidas biológicos também têm sido utilizados no controle do *Ae. aegypti*, como as bactérias *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) e o *Bacillus sphaericus* (Bs). Consideradas bioinseticidas, são produtoras de endotoxinas proteicas com ação tóxica em larvas de *Ae. aegypti*. Ensaio em laboratório demonstram a eficácia do Bti induzindo a mortalidade nos quatro estádios larvais tratados. O uso em ambientes externos possui baixo efeito residual devido à inativação da toxina pela luz ultravioleta do sol. Atualmente, o Bti tem sido utilizado nas regiões em que foram detectadas resistência ao organofosforado *temephos*. Embora já existam relatos na literatura de resistência ao Bti (Almalraj et al. 2000, Batra et al. 2000, Russell et al. 2003, Ruiz et al. 2004, Lima et al. 2005, Espindola et al. 2008, Oliveira et al. 2011, Campanini et al. 2012).

O controle químico é a medida mais adotada mundialmente pelos programas de saúde pública, através da utilização de adulticidas e larvicidas. Os organoclorados constituem o grupo pioneiro dos inseticidas, em sua formulação contêm hidrocarbonetos e cloro, destacando-se o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Desenvolvido no período da Segunda Guerra Mundial, foi o inseticida mais utilizado e com maior propriedade residual. Atua nos canais de sódio impedindo a transmissão do impulso nervoso dos insetos e também dos mamíferos. Atualmente encontra-se em desuso devido a seus efeitos prejudiciais ao ambiente (Chen & Rogan 2003, Ferrer 2003, Santacoloma Varón et al. 2010).

Outros inseticidas que fazem parte do grupo dos organoclorados são o benzenohexacloro (BHC), com ação semelhante ao DDT; clordado, aldrin, dieldrin, toxafeno e estrobane, que inibem o receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) impedindo que íons cloreto entrem nos neurônios (Waliszewski et al. 2003, Torres et al. 2009).

Os compostos orgânicos atuam no sistema nervoso central dos insetos, os mais utilizados atualmente pertencem aos grupos dos organofosforados, carbamatos e piretróides (Campos & Andrade 2001, FUNASA 2001, Braga & Valle 2007)

Os organofosforados são os inseticidas que contêm em sua formulação fósforo, destacando-se os *fenitrothion*, *temephos*, *malathion* e *dimetoato*. Agem

inibindo a enzima do sistema nervoso acetilcolinesterase (AChE) resultando no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas impedindo a transmissão do impulso nervoso. Os carbamatos são compostos instáveis derivados do ácido carbâmico e o carbaril é o mais utilizado, sua ação é semelhante a dos organofosforados (Charpentier & Fournier 2001, FUNASA 2001, Braga & Valle 2007, Ministério da Saúde 2009).

Os piretróides são compostos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, substância natural extraída do crisântemo, destacando-se a deltametrina. Afetam o sistema nervoso central e periférico estimulando os neurônios a produzirem descargas elétricas repetitivas causando paralisia, sua ação é semelhante ao DDT (FUNASA 2001, Chiaravalloti Neto et al. 2006, Braga & Valle 2007, Ministério da Saúde 2009, Santacoloma Varón et al. 2010).

Geralmente, são adotadas duas medidas de controle químico para o mosquito a primeira de uso frequente que consiste na aplicação de inseticida de ação residual e a segunda, adotada em situação de transmissão, baseada na aplicação espacial de inseticida a ultrabaixo volume (UBV). A mortalidade do *Ae. aegypti* depende de vários fatores, os mais comuns são físicos, químicos e os das técnicas de aplicação do inseticida, como UBV e termonebulização (Silva et al. 2001, FUNASA 2001, Ferreira et al. 2009, Ministério da Saúde 2009).

Recentemente, formulações de hormônios reguladores de crescimento sintéticos, como o *methoprene*, *diflubenzuron* (DFB), *pyriproxyfen* e *triflumuron* vêm sendo utilizadas no controle de larvas de *Ae. aegypti*. As larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* submetidas ao tratamento com DFB apresentaram aumento do número das cerdas que se enrolavam nos sulcos intersegmentares causando constrições e estrangulamentos das partes segmentares, contribuindo com o bloqueio do processo da ecdise, ou seja, não efetuavam a muda e produziam diversas cutículas. As larvas tratadas com DFB quando observadas sob estereomicroscópio, aparentavam um aspecto mumificado, esbranquiçado e anormal se comparadas ao grupo controle. Foram observadas também, alterações na morfologia das células do mesêntero, sendo estas com aspecto muito danificado, vacuolizado e esponjoso (Martins & Silva 2004, Braga et al. 2005, Silva & Mendes 2007, Borges et al. 2012).

1.4.1 Resistência aos inseticidas

A utilização contínua e em larga escala de inseticidas na agricultura, agropecuária e nos programas de saúde pública, tem contribuído com o aparecimento de populações resistentes e a re-emergência de doenças transmitidas por vetores, fato verificado em praticamente todos os grupos de inseticidas (Lima et al. 2006, WHO 2009)

O conceito de resistência definido pela Organização Mundial de Saúde consiste na habilidade em tolerar uma dose de inseticida que em condições normais, causaria a morte de uma população de insetos, ou seja, é uma resposta de sobrevivência à pressão seletiva desencadeada pelo processo de evolução acelerada, resultando em modificações genéticas. A mudança do *status* de tolerância e de resistência ocorre com a pressão de aplicações de inseticidas. O inseticida em si não gera uma mutação gênica, entretanto seu uso contínuo pode selecionar indivíduos resistentes. Os possíveis mecanismos de resistência que se destacam são detoxificação metabólica aumentada, mudanças comportamentais, diminuição da taxa de penetração pela cutícula e diminuição da sensibilidade do sítio alvo (Socorro et al. 2001, Lima et al. 2006, Oliveira et al. 2009, WHO 2009, Kasai et al. 2014, Maciel-de-Freitas et al. 2014).

1.5.2 Extratos botânicos no controle de *Aedes aegypti*

Recentemente diversos estudos têm relatado a potencialidade do uso de substâncias de origem botânica no controle de *Ae. aegypti* como fontes alternativas ao controle diante do aparecimento de resistência aos inseticidas convencionais.

Os vegetais produzem e acumulam inúmeras substâncias naturais, denominadas metabólitos secundários, com capacidade inseticida auxiliando na proteção e defesa em resposta aos ataques patogênicos, raios solares, animais herbívoros e atrativos para polinizadores. Os compostos bioativos que se destacam são: amidas, lactonas, flavonoides, rotenoides, quinonas, taninos, prenilados, fenilpropanoides, cumarinas, alcaloides, terpenos (mono, sesqui, di, tri e tetranortriterpenos), saponinas, entre outros. Geralmente nos extratos brutos, os constituintes bioativos são encontrados em pequenas quantidades e

com diferentes concentrações de atividade inseticida (Dewick 2009, Geris et al. 2012, Garcez et al. 2013).

Trabalhos utilizando extratos brutos, óleos essenciais e frações dos componentes químicos vêm sendo registrados na literatura. Por exemplo, o extrato bruto etanólico (e.b.e.) da casca do caule de *Magonia pubescens* tem atividade larvicida; bioensaios realizados com o tanino catéquico, extraído da *M. pubescens*, mostraram alterações morfohistológicas e a extrusão da matriz peritrófica, sugerindo um mecanismo de defesa da larva a toxicidade do produto. O fracionamento do extrato da *M. pubescens* resultou em uma atividade mais significativa quando comparada aos resultados do e.b.e. (Silva et al. 1996, Arruda et al. 2003, Silva et al. 2004, Valotto et al. 2010).

Ensaios realizados por Barreto et al. (2006), com o e.b.e. da casca do fruto de *Sapindus saponaria* mostraram, inicialmente alterações na motilidade das larvas de *Ae. aegypti*. Já o e.b.e obtido de cascas do caule de *Persea americana*, demonstrou atividade larvicida e pupicida para larvas e pupas de *Ae. aegypti*, tanto criadas em laboratório como de campo (Carvalho et al. 2011). A planta *Melia azedarach* apresentou maior atividade larvicida para o *Ae. aegypti* quando o extrato bruto foi obtido de frutos maduros (Prophiro et al. 2008). O extrato metanólico de *Annona coriacea* também apresentou atividade larvicida e alterações morfohistológicas no mesêntero das larvas de *Ae. aegypti* (Costa et al. 2012, Costa et al. 2014).

Entre os óleos essenciais extraídos de *Ageratum conyzoides*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *C. winterianus*, *Lippia sidoides*, *Ocimum basilicum purpurascens*, *O. gratissimum*, *O. tenuiflorum*, *Tagetes minuta* e *Vanillosmopsis arborea*, o que demonstrou maior atividade larvicida foi o óleo de *V. arborea* (Furtado et al. 2005). Já os ensaios utilizando os óleos essenciais de *Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *L. organoides*, *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *C. flexuosus*, *Citrus sinensis*, *Swinglea glutinosa* e *Cananga odorata*, demonstraram atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller. Destacando-se a atividade de *C. flexuosus*, composto principalmente de citral (Vera et al. 2014).

O óleo essencial obtido de *Ruta chalepensis* e seus compostos químicos fracionados possuem atividade larvicida e repelente ao *Ae. aegypti* (Ali et al. 2013). Foi analisado também, o óleo-resina de *Copaifera reticulata*, que possui

atividade larvívica e apresenta efeitos tóxicos às células do mesêntero das larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* (Abed et al. 2007).

Outro composto que também apresentou atividade larvívica contra o *Ae. aegypti*, foi o 1,8-cineol, um monoterpene oxigenado extraído do óleo essencial das folhas frescas de *Piper aduncum* (Oliveira et al. 2013). Há ainda, o líquido extraído da castanha de *Anacardium occidentale* que demonstrou uma atividade larvívica sobre o *Ae. aegypti* e perspectivas potenciais de uso pela baixa dose letal e por ser um subproduto da indústria da castanha do caju (Guissoni et al. 2013).

Tanto a fração hexânica de *Myroxylon balsamum* como a fração etanólica extraída da planta de mangue *Rhizophora mucronata*, também apresentaram atividade larvívica contra o *Ae. aegypti* (Simas et al. 2004, Ali et al. 2014).

1.6 *Copaifera langsdorffii*

Copaifera langsdorffii Desf. (Figura 3 - A,B,C) pertence à ordem Fabales, família Leguminosae Juss e a subfamília Caesalpinoideae Kunth, (Record & Hess 1972, Cascon 2004). Caracteriza-se por ser uma planta hermafrodita de crescimento lento, atingindo de 5 a 40 metros de altura, heliófita e longeva, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, cilíndrico com casca aromática, coloração escura, e medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternas, pecioladas e penuladas. A floração ocorre no período mais quente e úmido entre os meses de outubro a março, e a frutificação entre junho e outubro, com variações dependentes do clima e da região. A polinização é feita por abelhas e vespas. As flores são branco-esverdeadas, pequenas, apétalas e dispostas em inflorescências paniculadas axilares. Os frutos contêm uma semente ovóide, envolvida por um arilo colorido, e o conjunto de características morfológicas do fruto indica que a dispersão é hidrocória e zoocória, principalmente por aves e macacos (Lorenzi 2002, Pedroni et al. 2002, Veiga Júnior & Pinto 2002).



Figura 3. Espécime de *Copaifera langsdorffii* Desf. (A) aspecto arbóreo da planta, (B) aspectos da morfologia do fruto e da semente e (C) aspecto das flores.

Esta árvore geralmente é empregada na recuperação de áreas degradadas. A madeira pode ser utilizada na construção civil, como vigas, caibros, batentes de portas e janelas, e ainda na confecção de móveis e peças torneadas, coronhas de armas, cabos de ferramentas, de vassouras, e também como tábuas para carrocerias e assoalhos (Lorenzi, 2002).

1.6.1 Histórico da planta

Historicamente, os indígenas foram os primeiros a utilizar e descrever a ação cicatrizante e anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba. A busca pelas copaibeiras instigou o interesse de viajantes, freis jesuítas, historiadores e cientistas devido as suas propriedades farmacológicas, com isso sua utilização se perpetua até os dias atuais (Pio Corrêa 1984).

A origem do nome copaíba pode ser atribuída ao tupi cupa-yba, “árvore de depósito, ou que tem jazida” em alusão ao óleo encontrado em seu interior. As espécies de *Copaifera* são conhecidas popularmente como copaíba, copaibeira, pau-d’óleo, copai, óleo-vermelho e palo-de-bálsamo (Pio Corrêa 1984).

O óleo produzido pela planta é popularmente comercializado em diversos mercados populares no Brasil, sendo conhecido como copahyba, copaibarana, copaúba, copaibo, copal, maram, marimari e bálsamo dos jesuítas (Rodrigues 1989). A designação correta é óleo-resina, devido ao fato de ser um exsudato, constituído por seiva formada por ácidos resinosos e compostos voláteis (Veiga Júnior et al. 2007).

1.6.2 Distribuição geográfica

A *C. langsdorffii* é comumente encontrada em mata de galeria, mata mesofítica de interflúvio, cerradão distrófico e cerrado. Apresenta uma ampla distribuição no território brasileiro, especialmente nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, mas também pode ser encontrada nos estados do Amazonas, Ceará e Pará (Paiva et al. 2002, Veiga Júnior & Pinto 2002).

1.6.3 Utilização do óleo-resina

O óleo-resina de *C. langsdorffii* é encontrado nos canais secretores localizados em todas as partes da planta, principalmente no tronco, com coloração variando do amarelo ao marrom. Quimicamente apresenta fração volátil rica em sesquiterpenos e fração constituída por compostos fixos predominantemente de diterpenos. Os componentes podem variar conforme fatores bióticos externos, como ataques provocados por fungos ou insetos (Veiga Júnior et al. 2007, Silva et al. 2007).

A extração do óleo-resina é feita no tronco por meio da técnica de incisão com trado, a altura de aproximadamente 70 cm. Terminada a coleta, o orifício é vedado com argila para impedir a infestação por fungos e cupins na planta. A quantidade de óleo-resina produzido pela planta pode sofrer influência do estágio fenológico e da interação entre o genótipo e o ambiente, ocorrendo maior produção na fase de brotação foliar e menor em períodos de maior umidade relativa do ar (Veiga Júnior & Pinto 2002, Almeida et al. 2006).

O óleo-resina pode ser usado *in natura* como combustível para motores a *diesel* e, na medicina popular, é utilizado como fitoterápico para tratar males das

vias urinárias, das vias respiratórias, da pele e também como cicatrizante de feridas e úlceras. O óleo-resina é também utilizado nas indústrias de perfumaria e cosméticos, como fixador, em sabonete, creme, espuma de banho, condicionador, loção hidratante e capilar, entre outros. E nas indústrias de tintas e vernizes (Veiga Júnior & Pinto 2002).

O ácido caurenóico é um diterpeno presente no óleo-resina, que possui potenciais anti-inflamatórios e citotóxicos, inibindo o crescimento de células cancerígenas (Paiva et al. 2004, Pereira et al. 2008). Os principais efeitos farmacológicos do óleo-resina já descritos são: anti-inflamatórios (Paiva et al. 2002), analgésicos (Gomes et al. 2007), antissépticos (Cascon 2004), cicatrizantes (Pieri et al. 2009), antibacterianos (Gonçalves et al. 2005, Pieri et al. 2010), antitumorais (Brito et al. 2010), antireumáticos (Paiva et al. 2002), repelência contra insetos (Freire et al. 2006), atividade acaricida (Fernandes & Freitas 2007), atividade contra o parasito *Leishmania amazonensis* (Santos et al. 2008), atividade larvicida (Silva et al. 2007) e inseticida contra a traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (Trindade et al. 2003).

Estudos indicam a atividade larvicida do óleo-resina de *C. langsdorffii* e *C. reticulata* contra larvas de 1º, 2º, 3º e 4º estádios de *Ae aegypti*. Deste óleo, originaram-se oito frações hexânicas e oito frações metanólicas que também apresentaram atividades larvicidas contra o *Ae aegypti* em condições laboratoriais e larvas coletadas em criadouros encontrados nos centros urbanos. A fração hexânica CLH₃ caracterizada como um diterpeno apresentou melhor atividade larvicida quando comparada às demais frações. (Silva et al. 2001, Mendonça et al. 2005, Barbosa Neto et al. 2006, Abed et al. 2007, Oliveira 2008, Valotto et al. 2014).

A eficácia do óleo-resina de *C. langsdorffii* no controle das larvas de *Ae. aegypti* demonstrada em trabalhos de campo (Oliveira 2008), sinaliza a possibilidade promissora desse composto botânico para o controle do *Ae. aegypti*, requerendo estudos que esclareçam o seu mecanismo de ação. Dessa forma, propõe-se demonstrar o mecanismo do processo de mortalidade em larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, através de estudos morfohistológicos.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil e em outros países o uso de inseticidas, como *temephos*, *malathion* e *fenitrothion*, constitui a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública no controle de culicíneos vetores de doenças, principalmente o *Ae. aegypti*. Entretanto, o uso inadequado e indiscriminado de inseticidas, a contaminação ambiental, os danos à saúde pública e também, a destruição rápida dos inimigos naturais do *Ae. aegypti*, tem contribuído com o aumento dos casos de resistência do mosquito. Assim, diferentes alternativas são necessárias para a obtenção de novos prováveis compostos no uso no controle desse mosquito.

A grande biodiversidade de vegetais existentes no Brasil, estimada entre 350 e 550 mil espécies, favorece estudos que utilizam extratos botânicos. Estes trazem a expectativa de se encontrarem substâncias com propriedades inseticidas, e simultaneamente seletivas para serem usadas em futuras formulações de um produto comercial. Os extratos botânicos e seus componentes, de forma isolada ou em ação sinérgica com outros constituintes, têm demonstrado efeitos como a repelência, inibição na oviposição e na alimentação, alterações morfológicas no desenvolvimento e morte dos insetos. Diversos estudos comprovam a eficácia de extratos botânicos contra diferentes espécies de mosquitos, incluindo *Ae. aegypti*.

Os inseticidas de origem botânica têm sido amplamente estudados, visando o seu uso no controle do *Ae. aegypti*, por serem de baixo impacto ambiental, baixo custo de produção, ecologicamente mais desejados, não poluentes, biodegradáveis e com toxicidade baixa ou ausente à maioria dos vertebrados. Além disso, o sinergismo de várias substâncias de um composto ativo retarda a mudança de suscetibilidade e/ou da resistência. Outros estudos já demonstraram a potencialidade do óleo-resina de *C. langsdorffii* no controle das larvas de *Ae. aegypti*, entretanto, requer-se estudos para elucidar o mecanismo de ação desse promissor composto botânico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ocorrência de alterações morfohistológicas no tubo digestório de larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, tratadas com óleo-resina e fração hexânica (CLH₃) de *C. langsdorffii*.

3.2 Específico

Analisar o mecanismo de ação letal do óleo-resina e da fração hexânica (CLH₃) de *C. langsdorffii*, através de análises em microscopia de luz, bem como os níveis de alterações teciduais e/ou celulares no tubo digestório de larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*.

4 MÉTODOS

4.1 Obtenção das larvas de *Aedes aegypti*

As larvas de *Ae. aegypti* utilizadas nos testes foram obtidas de ovos, provenientes de fêmeas de uma criação cíclica, mantida no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG). A criação é mantida em uma câmara biológica climatizada a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $80\pm 5\%$ e fotofase de 12 horas, conforme a metodologia de Silva et al. (1998). Desta criação foram retirados ovos de *Ae. aegypti* que, posteriormente, foram colocados para incubar em bacias plásticas, contendo água proveniente da rede pública de abastecimento. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com ração para gato, colocada diretamente nas bacias. Para o experimento foram utilizadas larvas de terceiro estágio, imediatamente após a muda, por serem mais resistentes aos bioensaios com compostos inseticidas (Silva et al. 1998, Silva et al. 2003).

4.2 Obtenção do óleo-resina e da fração hexânica CLH₃ de *Copaifera langsdorffii*

Tanto o óleo-resina de *C. langsdorffii* como a fração hexânica CLH₃ foram obtidos do banco de amostras do Laboratório de Bioatividade de Plantas, do IPTSP/UFG.

4.3 Bioensaio com o óleo-resina e com a fração hexânica CLH₃ de *Copaifera langsdorffii*

Inicialmente foi preparada uma solução-mãe, na concentração de 100 ppm, pesando-se 12 mg de óleo-resina em 120 ml de água proveniente da rede pública de abastecimento, buscando manter as condições ambientais e etológicas do mosquito. Devido à baixa solubilidade da amostra, a mesma foi

previamente solubilizada em 0,4 ml de dimetilsulfoxido (DMSO). A partir da solução de 100 ppm foram preparadas diluições seriadas obtendo as concentrações de 80, 70, 60, 55 e 50 ppm, com a finalidade de encontrar as concentrações letais (CL₅₀ e ₉₀). As soluções foram colocadas em copos de poliestireno, descartáveis e com capacidade para 30 mL. Nestes, foram colocados 25 mL de cada uma das concentrações e, em seguida, 20 larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. Os bioensaios foram realizados em uma câmara biológica climatizada a 28±1°C, umidade relativa de 80±5% e fotofase de 12 horas. Para cada ensaio foram feitas quatro repetições. A leitura da mortalidade foi feita após 24 horas de exposição das larvas às soluções. Os experimentos foram acompanhados de uma série controle, contendo o mesmo número de larvas, o mesmo volume de DMSO completando-se o volume para 25 mL com água. O mesmo procedimento foi realizado para os bioensaios com a fração hexânica CLH₃ de *C. langsdorffii*.

4.4 Análise histológica

Foram colocadas 40 larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* em solução contendo o óleo-resina à concentração de 70 ppm (CL₉₀). Em seguida foram coletadas 4 larvas vivas nos intervalos de tempo de 6 horas, 12 horas e 24 horas para verificar os níveis de alterações morfohistológicas. As larvas mortas foram descartadas do experimento. O mesmo procedimento foi realizado com a fração hexânica CLH₃ de *C. langsdorffii*, na concentração de 80ppm (CL₉₀) e com o controle.

As larvas coletadas foram colocadas em fixador e posteriormente no congelador a - 2 °C por 4 minutos para morrerem. As larvas foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 a temperatura ambiente por um período de no mínimo de 2 horas.

Depois de fixadas, as larvas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 e submetidas a desidratação, utilizando concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 80, 90, e 100%) por um período de 10 minutos em cada solução. Após a desidratação, as larvas foram colocadas em resina de embebição (resina básica + ativador) Leica Historesin Embedding Kit®, por um período de 12 horas, a temperatura ambiente. As amostras foram incluídas em

resina (resina de embebição + catalisador) pertencente ao mesmo kit (soluções preparadas segundo especificações do fabricante). Utilizando moldes de plástico, as larvas foram colocadas na posição desejada. Os moldes com o material foram deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas, para total polimerização da resina. Após a polimerização, os blocos de resina foram seccionados com navalha de tungstênio, em micrótomo modelo Leica RM 2245, com espessura de 3 μ m. As secções foram distendidas em banho-maria contendo água destilada, a temperatura ambiente e transferidos para lâminas histológicas, que foram coradas por hematoxilina e eosina. Depois de secas, foram montadas com entellan, conforme Gabe (1976), Melo & Vidal (1980), Prophet et al. (1992).

As lâminas preparadas foram fotomicrografadas em fotomicroscópio adaptado, modelo Olympus MC80. As preparações em historesina foram realizadas no Laboratório de Estudos Morfológicos (LABEM) do Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular do ICB/UFG.

4.5 Análise estatística

As concentrações letais (CL_{50} e $_{90}$) e seus respectivos intervalos de confiança (IC), foram calculados pela interpolação de dados, mortalidade *versus* concentração (ppm), em gráfico de Probit, pelo programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas – UFV) versão 9.1, 2007.

5 RESULTADOS

5.1 Análise do bioensaio com o óleo-resina e com a fração hexânica CLH₃ de *C. langsdorffii*

O óleo-resina de *C. langsdorffii* apresentou aparência líquida amarelada e atividade larvicida contra larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. Após 24 horas de exposição ao óleo-resina, a taxa de mortalidade foi de 100% na concentração de 100 ppm. E de 95%, 90%, 80%, 60%, 50% para as concentrações de 80, 70, 60, 55, 50 ppm, respectivamente (Figura 5). As concentrações letais, CL₅₀ e CL₉₀, foram de 49,7 ppm e 70,9 ppm, respectivamente.

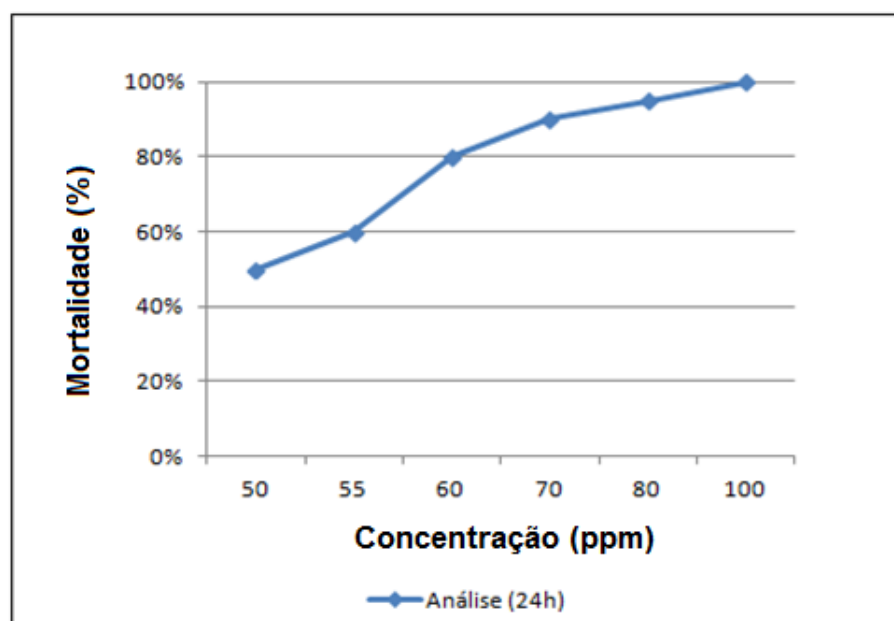


Figura 4. Taxa de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*.

A fração hexânica CLH₃ de *C. langsdorffii* apresentou aparência líquida amarelada e atividade larvicida contra larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. As concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀, foram de 8,2 ppm e 82,5 ppm, respectivamente.

5.2 Análise morfohistológica

5.2.1 Grupo controle

Em análise a fresco, as larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* do grupo controle apresentaram aspecto morfológico externo alongado e vermiforme, aparência saudável e grande motilidade.

Secções longitudinais (Figura 5) demonstraram a morfologia normal do tubo digestório das larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, sendo revestido por uma única camada de células epiteliais apoiada em uma membrana basal e circundado por fibras musculares estriadas. Observa-se que o tubo digestório é dividido morfológicamente em: estomodeo, mesêntero e proctodeo.

O estomodeo, formado pela cavidade oral, faringe, esôfago e termina em uma região denominada proventrículo, de onde se projetam os cecos gástricos, caracterizados por células globosas (Figura 5A). A região do proventrículo é constituída por células cilíndricas compactas com alta basofilia e apresentou perfeito estado de conservação. Internamente, notou-se a presença da válvula cárdia revestida por uma camada quitinosa.

A maior porção do tubo digestório é o mesêntero, sendo este dividido em três regiões: anterior, mediana e posterior. O mesêntero apresentou aspecto de tubo simples cilíndrico com início nos cecos gástricos e término na válvula pilórica. O epitélio de revestimento caracterizou-se pela presença de células cúbicas e dependendo da região analisada, observam-se diferenças quanto à coloração e altura das células.

A região anterior do mesêntero (Figura 5C) caracterizou-se por apresentar células epiteliais cúbicas justapostas, citoplasma heterogêneo quanto à coloração, acidofilia moderada, superfície apical com um fino bordo em escova, representado por uma fina e delgada linha pouco corada. O núcleo celular apresentou-se esférico e central com alta atividade. Nesta região, observou-se uma fina membrana refringente à luz que envolve todo o conteúdo alimentar, denominada matriz peritrófica.

A região mediana do mesêntero (Figura 5A) apresentou células epiteliais cúbicas com citoplasma heterogêneo quanto à coloração, núcleo esférico e bordo em escova fino representado por uma linha acidófila. Observou-se nesta

região que algumas células apresentaram aspecto morfológico irregular na superfície apical devido à presença de vesículas secretoras, indicando provavelmente algum processo de secreção. Nessa região, o espaço subperitrófico apresentou maior e preenchido por substância acidófila, tornando difícil a delimitação entre ele e o bordo em escova.

A região posterior do mesêntero (Figura 5B) apresentou células cúbicas. O núcleo caracterizou-se como esférico e basal. Na superfície apical, mostrou-se com espesso bordo em escova (Figura 5D), levemente acidófilo indicando a grande quantidade de microvilosidades existente nessa região.

Na região de transição entre a região posterior do mesêntero e o proctodeo, está localizada a válvula pilórica, estrutura que separa o mesêntero do proctodeo, e também o local de inserção dos túbulos de Malpighi. O proctodeo restringiu-se a um pequeno e delgado tubo, e as células epiteliais apresentaram bordo em escova pouco diferenciado. O tubo digestório termina em contato direto com a placa anal.

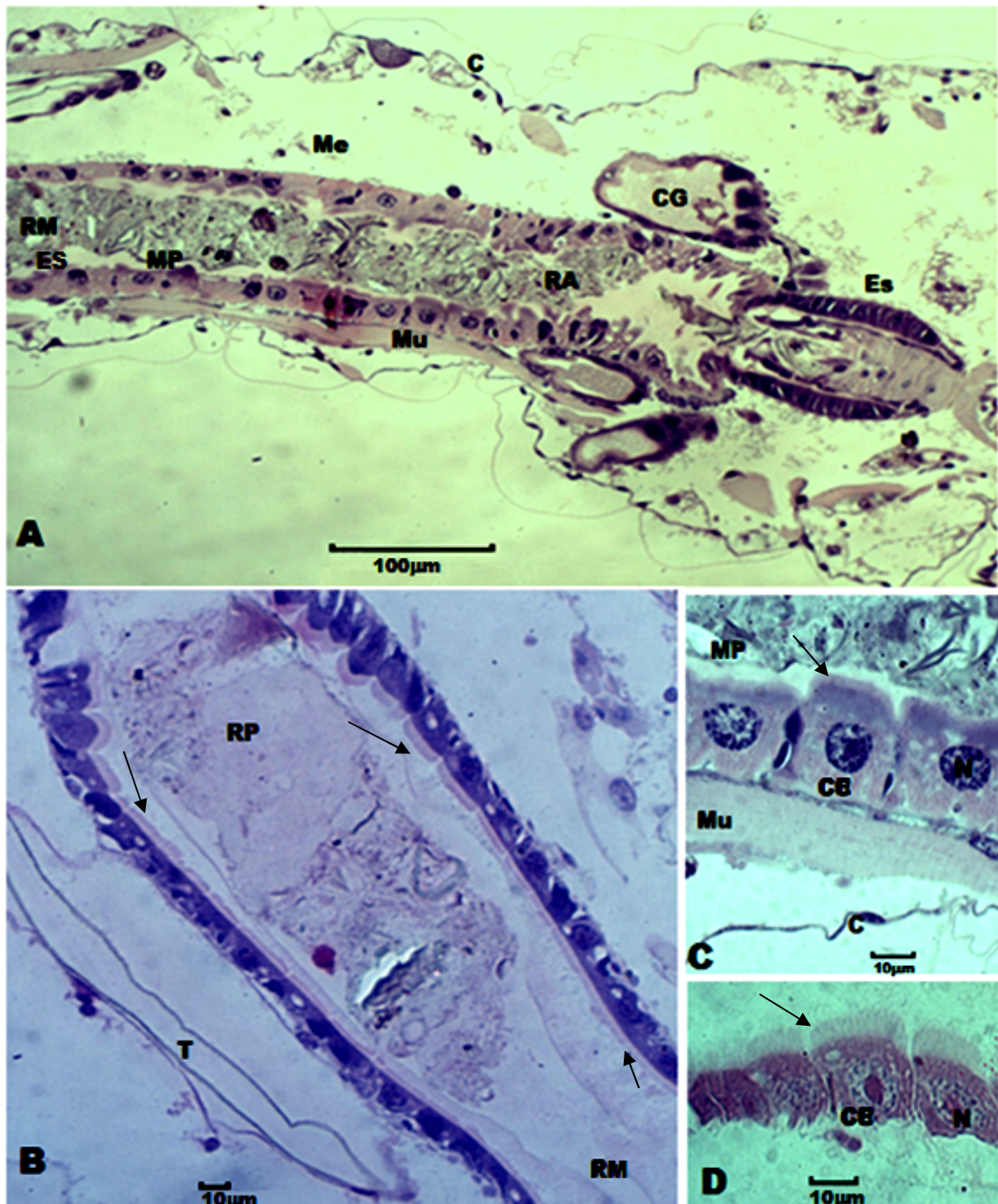


Figura 5. Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de *Aedes aegypti*, do grupo controle, coradas por HE.

A: Região anterior da larva, evidenciando a transição entre o estomodeo (Es) e o mesêntero (Me). C= cutícula, CG= cecos gástricos, ES= espaço subperitrófico, Mu= músculo, MP= matriz peritrófica, RA= região anterior do mesêntero e RM= região mediana do mesêntero. 100X.

B: Região posterior do mesêntero (RP) e o espesso bordo em escova (setas). RM= região media do mesêntero, T= traquéia. 200X.

C: Detalhe das células epiteliais cúbicas região anterior do mesêntero (CE) e do bordo em escova (seta). N=núcleo, Mu= músculo, MP= matriz peritrófica. 400X.

D: Detalhe das células epiteliais da região posterior do mesêntero (CE) e do bordo em escova (seta). N=núcleo. 400X.

5.2.2 Tratamento com o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*

As larvas submetidas ao tratamento com o óleo-resina de *C. langsdorffii*, não apresentaram alterações morfológicas externas quando comparadas ao grupo controle. Observou-se uma alteração etológica nas larvas expostas a concentração de 100 ppm durante as duas horas iniciais do tratamento, através de um comportamento excessivo e constante de limpeza do sifão respiratório. Essa alteração não foi observada no grupo controle. De modo geral, as larvas tratadas apresentaram menor motilidade e após as 12 horas de tratamento ficavam vagarosas e letárgicas, quando comparadas ao grupo controle. As larvas mortas, caracterizadas pelo escurecimento da cápsula cefálica, foram descartadas para evitar qualquer interferência na análise histológica.

As alterações morfohistológicas, observadas pela ação do óleo-resina à concentração de 70 ppm (CL₉₀), foram mais significativas nas células da região posterior do mesêntero, nos tempos de 12 horas e 24 horas. No tempo de 6 horas não se observaram alterações significativas.

A Figura 6, mostra em secções longitudinais a região mediana e a posterior do mesêntero, de larvas mantidas por 12 horas na solução de óleo-resina de *C. langsdorffii*, evidenciando nas células a formação de vesículas na região apical e citoplasma vacuolizado.

A Figura 6A evidencia algumas alterações celulares na região mediana do mesêntero, as células perderam a forma de epitélio cúbico e passaram a ser caracterizadas como cilíndricas e alongadas, sugerindo a formação de vesículas na porção apical celular. No citoplasma, observou-se a formação de pequenos vacúolos e com aspecto acidófilo semelhante ao controle.

As células da região posterior do mesêntero (Figura 6A e B) apresentaram formação vesicular, alta basofilia e intensa atividade secretora. O citoplasma mostrou-se intensamente vacuolizado. Nota-se em algumas células desta região a presença do bordo em escova. A matriz peritrófica apresentou-se fracamente corada.

As células do estomodeo, da região anterior do mesêntero e do proctodeo apresentaram características de normalidade e nenhuma alteração significativa quando comparadas ao grupo controle. A cutícula também se mostrou íntegra e normal, bem como as fibras musculares.

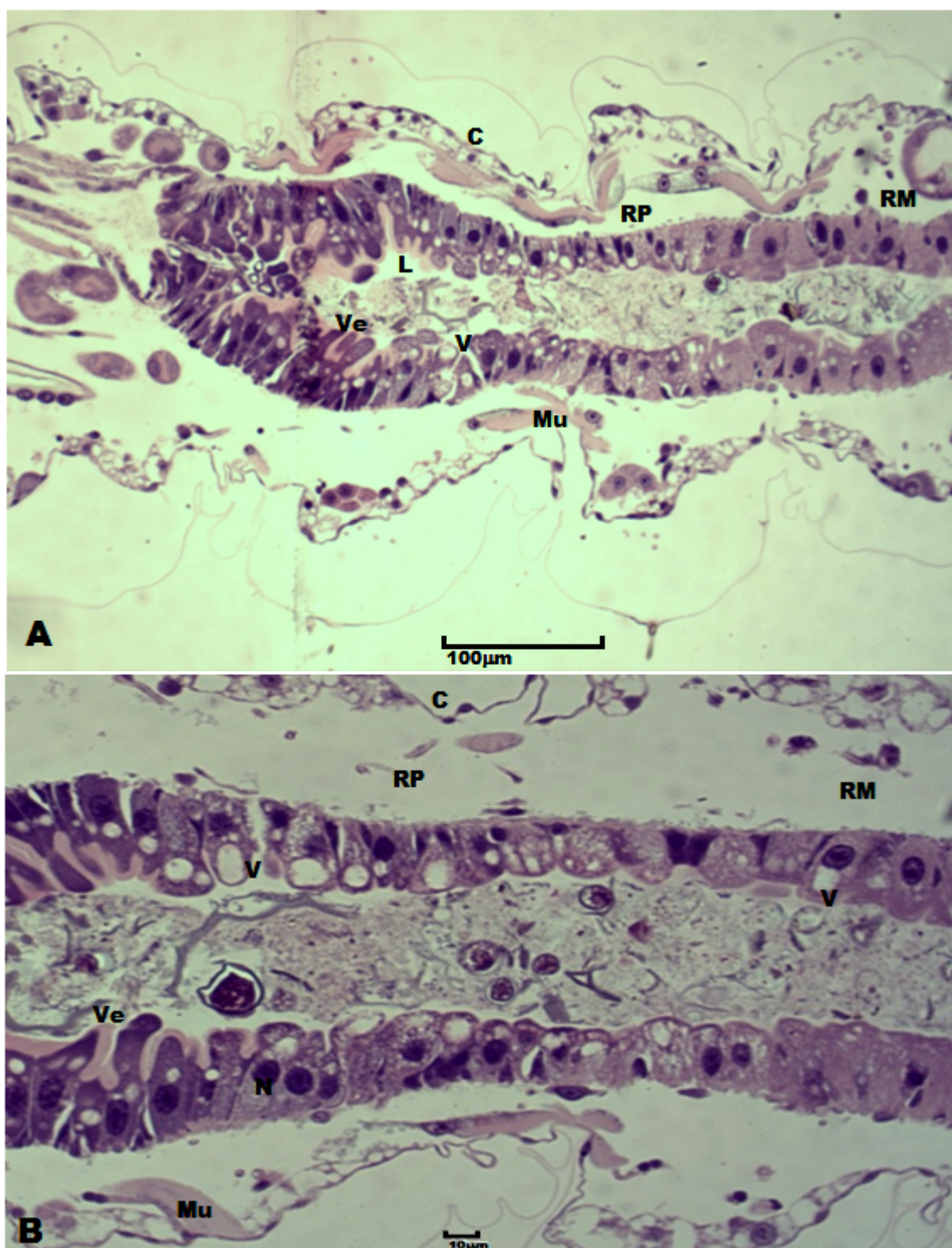


Figura 6. Fotomicrografias de secções em resina da região mediana e posterior do mesêntero de larvas 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 12 horas ao óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, corados por HE.

A: Região mediana (RM) e região posterior do mesêntero (RP) da larva, com formação vesicular. C= cutícula, L=lúmen, Mu= músculo, N= núcleo, V= vacúolos e Ve= vesículas. 100X.

B: Região posterior do mesêntero (RP) evidenciando a intensa formação de vacúolos (V) no citoplasma das células. C= cutícula, L=lúmen, Mu= músculo, N= núcleo, V= vacúolos e Ve= vesículas. 200X.

A Figura 7, mostra, em secções longitudinais a região anterior, mediana e posterior do mesêntero, de larvas mantidas por 24 horas na solução de óleo-resina de *C. langsdorffii*. Nestas condições, foi possível observar que a destruição celular, antes mais intensa na região posterior, foi evidenciada também na região anterior e mediana do mesêntero.

As células da região anterior do mesêntero (Figura 7A) apresentam formato cúbico a cilíndrico, algumas com núcleos picnóticos, demonstrando menor atividade celular. O citoplasma das células apresentou várias vesículas secretoras.

A região mediana do mesêntero (Figura 7A e B) apresentou alterações similares a do tempo anterior com avançado estado de destruição e poucas vesículas apicais.

As células da região posterior do mesêntero (Figura 7C) apresentaram um alto grau de destruição. O citoplasma apresenta-se com grandes vacúolos apicais. Em algumas células não é possível visualizar o nucléolo. Notaram-se ainda células com bordo em escova. As células do estomodeo e do proctodeo apresentaram características de normalidade e nenhuma alteração significativa quando comparadas ao grupo controle. A cutícula também se mostrou íntegra e normal, bem como as fibras musculares.

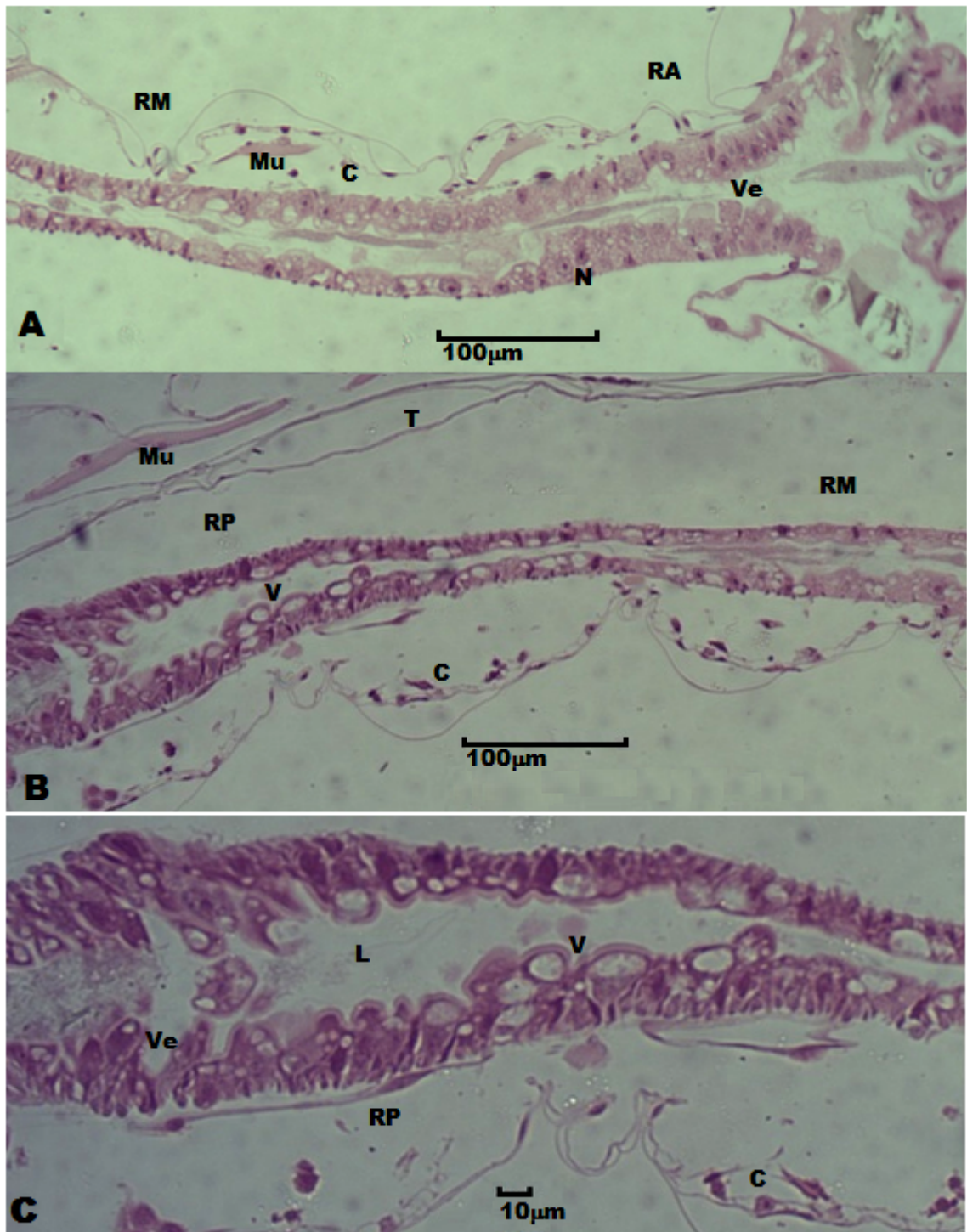


Figura 7. Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 24 horas ao óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, corados por HE.

A: Região anterior (RA) e região mediana do mesêntero (RM) com formação vesicular (Ve). C= cutícula, Mu= músculo e N= núcleo. 100X.

B: Região mediana (RM) e região posterior (RP) do mesêntero, evidenciando a intensa formação de vacúolos (V) no citoplasma das células. C= cutícula, Mu= músculo e T= traquéia. 100X.

C: Detalhe da região posterior do mesêntero (RP) com grandes vacúolos apicais citoplasmáticos (V). C= cutícula, L=lúmen e Ve= vesículas. 200X.

5.2.3 Tratamento com a fração hexânica CLH₃ de *Copaifera langsdorffii*

As larvas submetidas ao tratamento com a fração hexânica CLH₃ de *C. langsdorffii*, não apresentaram alterações morfológicas externas quando comparadas ao grupo controle. De modo geral, as larvas tratadas apresentaram menor motilidade e após as 12 horas de tratamento ficavam vagarosas e letárgicas, quando comparadas ao grupo controle.

As alterações morfohistológicas observadas pela ação da fração hexânica CLH₃ de *C. langsdorffii* à concentração de 80 ppm (CL₉₀) foram mais significativas nas células da região posterior do mesêntero, nos tempos de 12 e 24 horas. A Figura 8, mostra em secções longitudinais da região mediana e posterior do mesêntero, larvas mantidas por 12 horas na solução da fração hexânica CLH₃ do óleo-resina de *C. langsdorffii*. Nestas condições, foi possível observar a formação de vacúolos nas células da região posterior do mesêntero.

A Figura 8A evidencia algumas alterações celulares na região mediana do mesêntero, sendo que em poucas células ainda é possível notar um aspecto semelhante ao encontrado nas células do grupo controle. No citoplasma observou-se a formação de pequenos vacúolos, e aspecto acidófilo semelhante ao controle. O núcleo apresentou cromatina descondensada. O bordo em escova apresenta um aparente rompimento (Figura 8B).

As células da região posterior do mesêntero (Figura 8A e B) apresentaram formação vesicular, alta basofilia e grandes vacúolos. Nota-se em algumas células a presença do bordo em escova e a formação de uma grande dobra na matriz peritrófica (Figura 8B).

As células do estomodeo, da região anterior do mesêntero e do proctodeo não apresentaram nenhuma alteração significativa quando comparadas ao grupo controle. A cutícula também se mostrou íntegra e normal, bem como as fibras musculares.

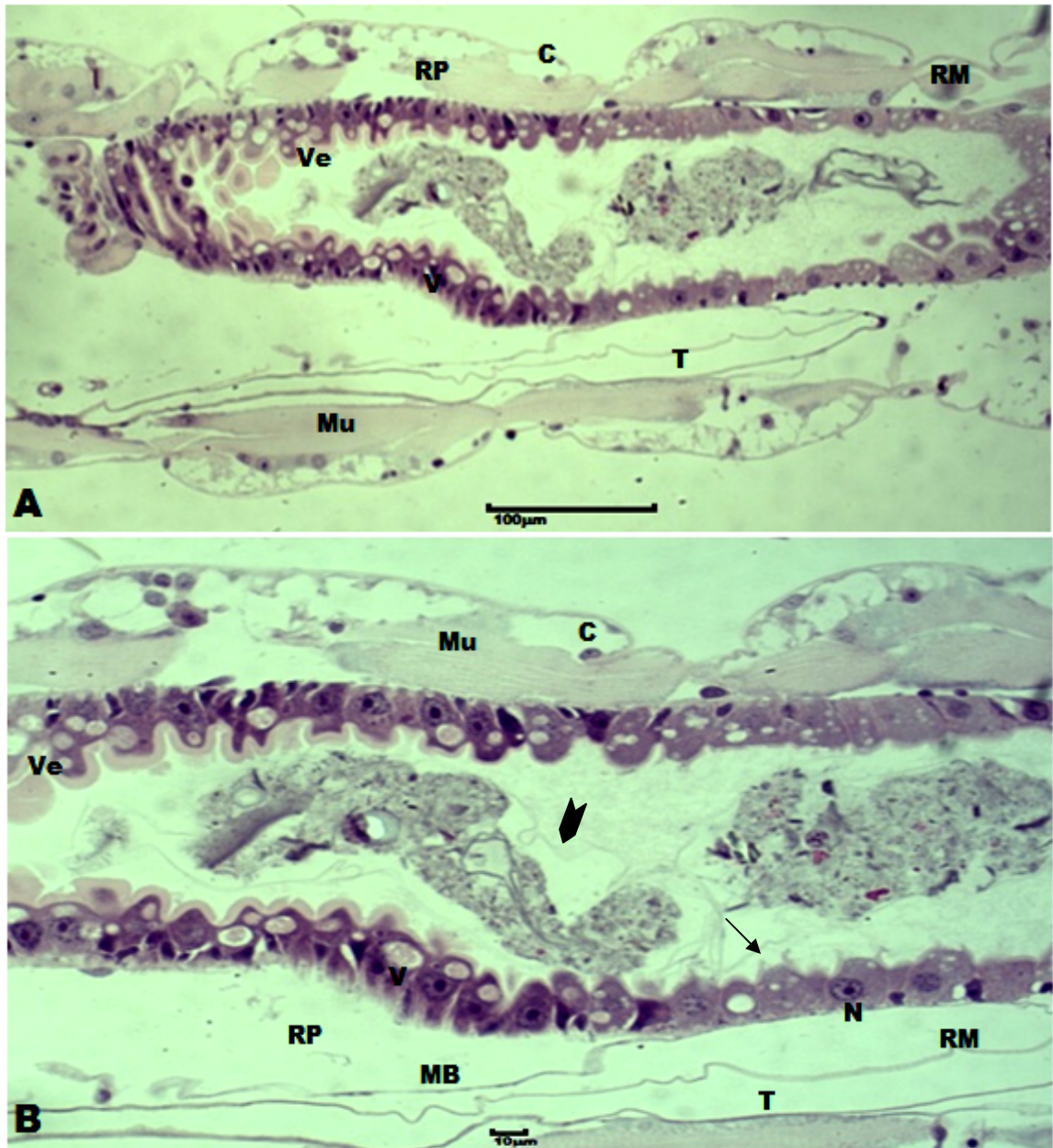


Figura 8. Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 12 horas à fração hexânica CLH_3 do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, corados por HE.

A: Vista geral das regiões mediana (RM) e posterior do mesêntero (RP) com formação vesicular (Ve) na porção apical da célula e presença de vacúolos (V). C= cutícula, Mu= músculo e T= traquéia. 100X.

B: Região posterior (RP) do mesêntero, evidenciando alta vacuolização citoplasmática, dobra na matriz peritrófica (cabeça de seta) e bordo em escova (seta). C= cutícula, MB= membrana basal, Mu= músculo, N= núcleo, RM= região mediana do mesêntero, T= traquéia, V= vacúolo e Ve= vesícula. 200X.

A Figura 9, mostra em secções longitudinais a região mediana e posterior do mesêntero, de larvas mantidas por 24 horas na solução da fração hexânica CLH₃ do óleo-resina de *C. langsdorffii*. Nestas condições, foi possível observar uma intensa destruição celular e imensos vacúolos nas células da região posterior do mesêntero.

A região mediana do mesêntero (Figura 9A) apresentou alterações similares à do tempo anterior com um avanço no estado de destruição e a formação de pequenas vesículas apicais. Algumas células apresentaram um formato globoso, diferente das células epiteliais cúbicas encontradas no grupo controle. No citoplasma observou-se a formação de pequenos vacúolos e aspecto acidófilo. Nota-se a ausência do bordo em escova em algumas células.

As células da região posterior do mesêntero (Figura 9B) apresentaram diferentes graus de vacuolização. Os núcleos dessas células perderam sua forma arredondada, apresentando-se picnóticos, o que demonstra menor atividade celular. Observou-se a formação vesicular na região apical das células, alta basofilia e imensos vacúolos. Nota-se em algumas células a presença do bordo em escova e a presença de secreção acidófila no espaço subperitrófico.

As células do estomodeo, da região anterior do mesêntero e do proctodeo não apresentaram nenhuma alteração significativa ao serem comparadas ao grupo controle. A cutícula e as fibras musculares também se mostraram íntegras e normais.

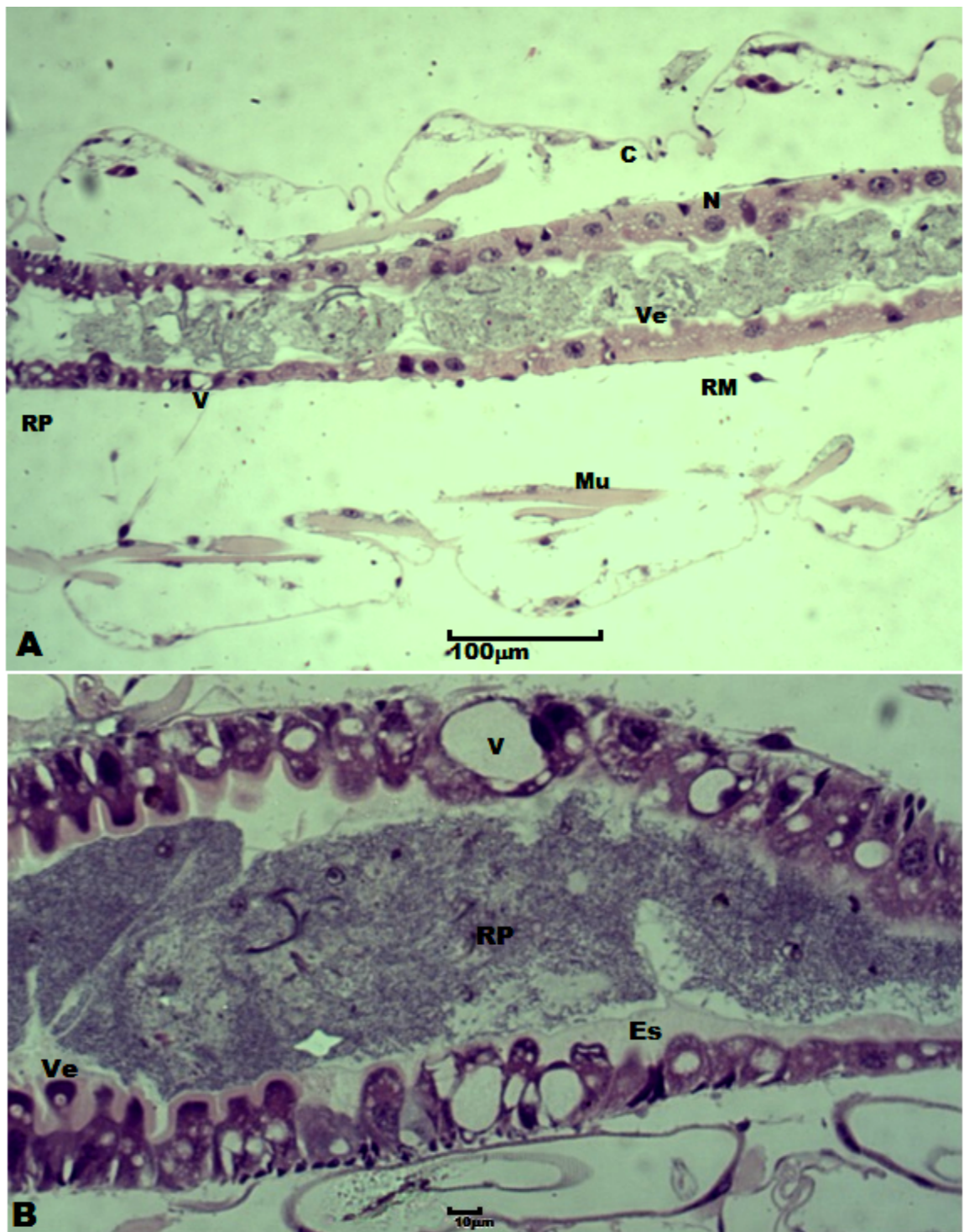


Figura 9. Fotomicrografias de secções em resina de larvas 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 24 horas à fração hexânica CLH₃ do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, corados por HE.

A: Vista geral das regiões mediana (RM) e posterior do mesêntero (RP) com formação vesicular (Ve) na porção apical da célula e presença de vacúolos (V). C= cutícula, Mu= músculo e N=núcleo. 100X.

B: Região posterior (RP) do mesêntero, evidenciando alta vacuolização citoplasmática. ES= espaço subperitrófico, V= vacúolo e Ve= vesícula. 200X.

6 DISCUSSÃO

As larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* do grupo controle apresentaram morfologia externa com aspectos normais e providas de grande motilidade sinuosa em meio líquido, realizada através de contrações do corpo, semelhante ao que foi descrito por Silva & Silva (2000), Forattini (2003) e Becker et al. (2010). Este comportamento não foi observado nas larvas submetidas ao tratamento com o óleo-resina e com fração hexânica (CLH₃) de *C. langsdorffii*. De modo geral, as larvas tratadas apresentaram menor motilidade e após as 12 horas de tratamento ficavam vagarosas e letárgicas. A redução da mobilidade larval foi o primeiro sinal da atividade larvívora desses compostos de origem botânica e isto foi semelhante aos resultados encontrados por Barreto et al. (2006), Abed et al. (2007) e Valotto et al. (2014).

As análises morfohistológicas confirmaram a morfologia normal do tubo digestório, das larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* no grupo controle, revestido por uma única camada de células epiteliais apoiada em uma membrana basal e circundado por fibras musculares. Observou-se o mesêntero dividido em três regiões distintas: anterior, mediana e posterior. Essas observações foram idênticas às descritas na literatura pertinente a esse assunto (Arruda et al. 2003, Abed et al. 2007, Valotto et al. 2010, Costa et al. 2012, Costa et al. 2014).

As células da região anterior do mesêntero apresentaram morfologia cúbica e na superfície apical um fino bordo em escova sugerindo uma possível função absorptiva dessas células. A região mediana apresentou células epiteliais cúbicas, com um bordo em escova um pouco mais espesso que o das células da região anterior e a presença de vesículas secretoras, indicando provavelmente algum processo de secreção. A região posterior evidenciou uma maior basofilia celular e um espesso bordo em escova. Todas essas características foram semelhantes às descritas em outros trabalhos (Abed et al. 2007, Valotto et al. 2010, Valotto et al. 2014).

A matriz peritrófica observada nas larvas do grupo controle apresentou-se íntegra e envolvendo todo o conteúdo alimentar no tubo digestório. Essa é

secretada por células especializadas da região anterior do mesêntero e tem a função de proteger as células do mesêntero contra vários componentes alimentares químicos, físicos e microbiológicos (Chapman 1998, Páscoa et al. 2002, Shao et al. 2005). Arruda et al. (2003) e Valotto et al. (2010), evidenciaram dobras e extrusão da matriz peritrófica, como mecanismo de defesa da larva, indicando uma tentativa de eliminar do seu interior agentes tóxicos presentes no e.b.e de *M. pubescens*. Neste trabalho foi observado apenas o início do processo com as dobras da matriz peritrófica.

As alterações deletérias causadas pelo óleo-resina e pela fração hexânica (CLH₃) de *C. langsdorffii* foram visualizadas nas três regiões do mesêntero das larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* e ocorreram de forma progressiva conforme se aumentava o tempo de exposição das larvas, sendo a região posterior a mais afetada. As evidências de toxicidade foram através de intensas e inúmeras vacuolizações citoplasmáticas, degeneração do bordo em escova, formação de vesícula apical citoplasmática, aumento do volume celular e dobra na matriz peritrófica. Essas alterações celulares foram semelhantes às encontradas por diversos autores (Abed et al. 2007, Valotto et al. 2010, Costa et al. 2012, Costa et al. 2014, Valotto et al. 2014).

Estudos realizados por Abed et al. (2007) e Valotto et al. (2014), com óleo-resina e o diterpeno ácido 3-acetoxi-labdano-8 (17) 13-dien-15-oico (C₂₂H₃₄O₄) de *C. reticulata* mostraram as alterações, principalmente na região mediana do mesêntero. Enquanto que para a *M. pubescens* as alterações se concentraram na região anterior do mesêntero (Arruda et al. 2003 e Valotto et al. 2010). Já o extrato da planta *Sapindus saponaria* provocou alterações em todo o mesêntero da larva de *Ae. aegypti* (Barreto et al. 2006). No entanto, estudos com a toxina Cry11Bb de Bti evidenciaram que as alterações mais relevantes ocorreram na região posterior do mesêntero, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho (Ruiz et al. 2004).

As alterações descritas neste trabalho demonstraram como os compostos bioativos desencadeiam a degeneração celular e aceleram o processo de rompimento celular. De modo que, independentemente da substância larvicida utilizada, ela pode causar intoxicação e danos irreversíveis nas células epiteliais do tubo digestório da larva, indicando ser este o possível local de absorção desses compostos e que, as alterações deletérias podem ser semelhantes.

7 CONCLUSÕES

As principais alterações do óleo-resina e da fração hexânica (CLH₃) de *C. langsdorffii* observadas sobre larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* foram:

1. Diminuição da motilidade das larvas;
2. Danos celulares iniciando-se na região posterior do mesêntero e estendendo-se em direção a região mediana e anterior de acordo com o tempo de exposição;
3. Modificações celulares mais intensas no mesêntero, e incluem a vacuolização citoplasmática, a formação de vesícula citoplasmática apical, a degeneração do bordo em escova, aumento do volume celular e a dobra na matriz peritrófica.

REFERÊNCIAS

1. Abed RA, Cavasin GM, Silva HHG, Geris R, Silva IG. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvívica do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). *Rev Patol Trop* 36: 75-86, 2007.
2. Albuquerque IGC, Marandino R, Mendonça AL, Nogueira RMR, Vasconcelos PFC, Guerra LR, Brandão BC, Mendonça APP, Aguiar GR, Bacco PAM. Chikungunya vírus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 128-129, 2012.
3. Ali A, Demirci B, Kiyan HT, Bernier UR, Tsikolia M, Wedge DE, Khan IA, Başer KH, Tabanca N. Biting deterrence, repellency, and larvicidal activity of *Ruta chalepensis* (Sapindales: Rutaceae) essential oil and its major individual constituents against mosquitoes. *J Med Entomol* 50: 1267-1274, 2013.
4. Ali MS, Ravikumar S, Beula JM, Anuradha V, Yogananth N. Insecticidal compounds from Rhizophoraceae mangrove plants for the management of dengue vector *Aedes aegypti*. *J Vector Borne Dis* 51: 106-114, 2014.
5. Almalraj DD, Sahu SS, Jambulingam P, Boopathi DPS, Kalyanasundaram M, Das PK. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta Tropica* 75: 243-246, 2000.
6. Almeida CIM, Leite GLD, Rocha SL, Machado MML, Maldonado WCH. Fenologia e artrópodes de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado. *Rev Bras Pl Med* 8: 64-70, 2006.
7. Andrade LG, Lira AF, Passos CO, Silva DR, Pugliese FS, Silva MS, Alves TS, Lima LSS. Dengue no Brasil do contágio ao tratamento: uma breve revisão bibliográfica. *Rev Cien Tecnol* 13: 31-36, 2013.
8. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 17-25, 2003.
9. Arruda W, Cavasin GM, Silva IG. Estudo ultra-estrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (ST. HIL.) no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Patol Trop* 37: 255-267, 2008.

10. Barata EAMF, Costa AIP, Chiaravalloti Neto F, Glasser CM, Barata JMS, Natal D. *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. *Rev Saúde Públ* 35: 237-242, 2001.
11. Barbosa Neto MF, Silva IG, Silva HHG. Atividade larvívica do óleo-resina de *Copaífera langsdorffii* planta medicinal brasileira, e de suas frações, sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *An Eletronic Conpeex* 3: 1-4, 2006.
12. Barreto CF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (SAPINDACEAE). *Rev Patol Trop* 35: 37-57, 2006.
13. Batra CP, Mittal PK, Adakt T. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* formulation. *J Am Mosq Control Assoc* 16: 321-323, 2000.
14. Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. *Mosquitoes and their control*. Springer Science & Business Media, 2010.
15. Borges RA, Arruda W, Oliveira ESF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. Mecanismos da ação larvívica do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. *Rev Patol Trop* 41: 222-232, 2012.
16. Braga IA, Mello CB, Peixoto AA, Valle D. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 435-440, 2005.
17. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 279-293, 2007.
18. Brito NM, Brito MV, Carvalho RK, Matos LT, Lobato RC, Correa SC, Brito RB. The effect of copaiba balsam on walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. *Acta Cir Bras* 25: 176-180, 2010.
19. Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, Fernandez-Salas I, Sylla M, Ponlawat A, Cornel AJ, Black WC, Gorrochotegui-Escalante N, Urdaneta-Marquez L, Slotman M, Walker C, Murray K, Powell JR. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc Biol Sci* 278: 2446-2454, 2011.
20. Brown JE, Evans B, Zheng W, Abas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, Zhao H, Caccone A, Powell JR. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution* 68: 514-525, 2013.

21. Campanini EB, Davolos CC, Alves ECC, Lemos MVF. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Braz J Biol* 72: 243-247, 2012.
22. Campos J, Andrade CFS. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Públ* 35: 232-236, 2001.
23. Carvalho GHF, Silva HHG, Cunha LC, Silva IG. Atividade inseticida do extrato bruto etanólico de *Persea americana* (Lauraceae) sobre larvas e pupas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Patol Trop* 40: 348-361, 2011.
24. Cascon V. Copaíba: *Copaifera* spp. In: Carvalho JCT. *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Tecmedd. Ribeirão Preto, 2004.
25. Cavalcanti LPG, Pontes RJS, Regazzi ACF, de Paula Junior FJ, Frutuoso RL, Sousa EP, Dantas Filho FF, Lima JWO. Efficacy of fish as predators of *Aedes aegypti* larvae, under laboratory conditions. *Rev Saúde Públ* 41: 638-644, 2007.
26. Cecílio AB, Campanelli ES, Souza KPR, Figueiredo LB, Resende, MC. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Braz J Biol* 69: 123-127, 2009.
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Dengue*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/Dengue/>. Acessado em 07/06/2015.
28. Chapman RF. *The insects: Structure and function*. Cambridge University Press, 1998.
29. Charpentier A, Fournier D. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pestic Biochem Phys* 70: 100-107, 2001.
30. Chen A, Rogan WJ. Nonmalarial infant deaths and DDT use for malaria control. *Emerg Infect Dis* 9: 960-964, 2003.
31. Chiaravalloti Neto F, Dibo MG, Barbosa AAC, Battigaglia M. *Aedes albopictus* (S) in the region of São José do Rio Preto, SP, Brazil: a study of its infestation in an area where *Aedes aegypti* was already established and a discussion of its role as a possible vector of dengue and yellow fever. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 351-357, 2002.
32. Chiaravalloti Neto F, Barbosa AAC, Cesarino MB, Favaro EA, Mondini A, Ferraz AA. Controle do dengue em uma área urbana do Brasil: avaliação do impacto do programa saúde da família com relação ao programa tradicional de controle, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Públ* 22: 987-997, 2006.

33. Collier BG, Clements DE. Dengue vaccine: progress and challenges. *Curr Opin Immunol* 23: 391-398, 2011.
34. Costa MS, Pinheiro DO, Serrão JE, Pereira MJB. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. *Neotrop Entomol* 41: 311-314, 2012.
35. Costa MS, Cossolin JFS, Pereira MJB, Sant'Ana AEG, Lima MD, Zanuncio JC, Serrão JE. Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxins* 6: 1169-1176, 2014.
36. Dewick PM. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons LTD. UK, 2009.
37. Donalísio MR, Glasser CM. Entomological Surveillance and control of dengue fever vectors. *Rev Bras Epidemiol* 5: 259-272, 2002.
38. Espindola CB, Guedes RN, Souza RCP. Avaliação da eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de formas imaturas do *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em ambiente de laboratório. *Entomo Brasiliis* 1: 10-13, 2008.
39. Espinosa M, Giamperetti S, Abril M, Seijo A. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 56: 165-167, 2014.
40. Fernandes FF, Freitas EPS. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 147: 150-154, 2007.
41. Ferreira BJ, Souza MFM, Soares Filho AM, Carvalho AA. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. *Cienc Saúde Coletiva* 14: 961-972, 2009.
42. Ferreira ITRN, Veras MASM, Silva RA. Participação da população no controle da dengue: uma análise da sensibilidade dos planos de saúde de municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Públ* 25: 2683-2694, 2009.
43. Ferrer A. Pesticide poisoning. *An Sist Sanit de Navar* 26: 155-171, 2003.
44. Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect* 2: 1643-1649, 2000.
45. Figueiredo LTM. Emergent arboviroses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 224-229, 2007.

46. Forattini OP. *Culicidologia Médica*. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo, 2003.
47. Franco O. *História da febre amarela no Brasil*. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 1969.
48. Freire DCB, Brito-Filha CRC, Carvalho-Zilse GA. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. *Acta Amaz* 36: 365-368, 2006.
49. Freitas RM, Rodrigues CS, Almeida MCM. Estratégia Intersetorial para o controle da dengue em Belo Horizonte (Minas Gerais), Brasil. *Saúde Soc São Paulo* 30: 773-785, 2011.
50. FUNASA. *Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas*. Ministério da Saúde. Brasília, 2001.
51. Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MGV. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 34:843-847, 2005.
52. Gabe M. *Histological Techniques*. Masson. Paris, 1976.
53. Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JPR, Zucchi RA, Alves SB, Vendramin JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C. *Entomologia Agrícola*. FEALQ. Piracicaba, 2002.
54. Garcez WS, Garcez FR, Silva LMGE, Sarmiento UC. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. *Rev Virtual Quim* 5: 363-393, 2013.
55. Geris R, Ribeiro PR, Brandão MS, Silva HHG, Silva IG. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector dengue e. In: Atta-ur-Rahman, FRS. *Studies in natural products chemistry*. Elsevier. Amsterdã, 2012.
56. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BJM* 324: 1563-1566, 2002
57. Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaíba oils. *J Ethnopharmacol* 109: 486-492, 2007.
58. Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol* 72: 353-358, 2005.
59. Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371: 500-509, 2008.

60. Gubler, DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, 1997.
61. Guissoni APC, Silva IG, Geris R, Cunha L, Silva HHG. Atividade larvívica de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. *Rev Bras Pl Med* 15: 363-367, 2013.
62. Günther J, Martínez-Muñoz JP, Pérez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. *Intervirology* 50: 347-352, 2007.
63. Gusmão DS, Páscoa V, Mathias L, Vieira IJC, Braz-Filho R, Lemos FJA. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 371-375, 2002.
64. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg* 23: 974-982, 1974.
65. Halstead SB. Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. *Rev Cubana Med Trop* 54: 171-179, 2002.
66. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 20: 407-415, 2006.
67. Halstead SB. Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652, 2007.
68. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* 13:1102-1103, 1960.
69. Hayes EB. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis* 15: 1347-1350, 2009.
70. Hensch EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3: 376-396, 1990.
71. Honório NA, Barros FSM, Tsouris P, Rosa-Freitas MG, Occurrence of *Toxorhynchites guadeloupensis* (Dyar & Knab) in oviposition trap of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 36: 809-811, 2007.
72. Howe GM. *A World geography of human diseases*. Academic Press. New York, 1977.

73. Huang CY, Kinney RM, Livengood JA, Bolling B, Arguello JJ, Luy BE, Silengo SJ, Boroughs KL, Stovall JL, Kalanidhi AP, Brault AC, Osorio JE, Stinchcomb DT. Genetic and phenotypic characterization of manufacturing seeds for a tetravalent dengue vaccine (DENVax). *PLoS Negl Trop Dis* 7: 1-11, 2013.
74. Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, Tomita T. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS negl Trop Dis* 8: 1-23, 2014.
75. Kimura R, Hotta S. On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaku* 3379: 629-633, 1944.
76. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for Flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108: 717-725, 2002.
77. Kuno G. Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the first half of the 20th century. *Rev Med Virol* 17: 327-341, 2007.
78. Lang J. Development of SANOFI Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 54: 15-17, 2012.
79. Le Goff G, Revollo J, Guerra M, Cruz M, Barja Simon Z, Roca Y, Vargas Flores J, Herve JP. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. *Parasite* 18: 277-280, 2011.
80. Leódido ACM, Ortigão MR, Martins GF. The ultrastructure of the *Aedes aegypti* heart. *Arthropod Struct Dev* 42: 539-550, 2013.
81. Leyssen P, Clercq E, Neyts J. Perspectives for the Treatment of Infections with Flaviviridae. *Clin Microbiol Rev* 13: 67-82, 2000.
82. Lima EP, Oliveira Filho AM, Lima JWO, Ramos Júnior AN, Cavalcanti LPG, Pontes RJS. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 259-263, 2006.
83. Lima JBP, Melo NV, Valle D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 47: 125-130, 2005.
84. Lorenzi H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 2002.
85. Lourenco-de-Oliveira, R. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103: 627-628, 2008.

86. Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, Lima JB, Martins AJ, Coelho GE, Valle D. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS One* 9: 1-9, 2014.
87. Madeira NG, Macharelli CA, Pedras JF, Delfino MCN Education in primary school as a strategy to control dengue. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 221-226, 2002.
88. Mamani E. New serotype 5 of dengue virus: need to strengthen the molecular surveillance in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 31: 171-173, 2014.
89. Marques GRAM, Chaves LSM, Serpa LLN, Arduíno MB, Chaves FJM. Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Públ* 47: 579-587, 2013.
90. Martinez-Torres, M. E. *Dengue hemorrágico em crianças*: editorial. Havana: José Martí, 1990.
91. Martins F, Silva IG. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 135-138, 2004.
92. Martins VEP, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, Guedes MIF. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One* 7: 1-9, 2012
93. Meira, R. "Urucubaca" gripe ou dengue? Dengue. In: *Clínica médica*. São Paulo, 1916.
94. Melo MLS, Vidal BC. *Práticas de Biologia Celular*. Edgar Blücher Ltda. São Paulo, 1980.
95. Mendonça FA, Silva KF, Santos KK, Ribeiro Júnior KA, Sant'Ana AE. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 76: 629-636, 2005.
96. Ministério da Saúde. *Doenças Infecciosas e Parasitárias – Guia de Bolso*. Ministério da Saúde. Brasília, 2005.
97. Ministério da Saúde. *Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica*. Ministério da Saúde. Brasília, 2009.
98. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>. Acessado em 07/06/2015a.

99. Ministério da Saúde. Confirmação do Zika vírus no Brasil. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/17702-confirmacao-do-zika-virus-no-brasil>. Acessado em 07/06/2015b.
100. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araujo ES, de Filippis AM. Dengue in the state of Rio de Janeiro, Brazil 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 297-304, 1999.
101. Normile D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* 342: 415, 2013.
102. Oliveira CD, Tadei WP, Abdalla FC. Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albiparvus* Lynch-Arribáizaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* neide?. *Neotrop Entomol* 38: 624-631, 2009.
103. Oliveira GL, Cardoso SK, Lara Junior CR, Vieira TM, Guimarães EF, Figueiredo LS, Martins ER, Moreira DL, Kaplan MAC. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *An Acad Bras Cienc* 85: 1227-1234, 2013.
104. Oliveira JA. Atividade larvicida de *Copaifera reticulata* e *C. langsdorffii* sobre larvas de *Aedes aegypti*, em ensaios de campo. Goiânia [Tese de Doutorado em Medicina Tropical - IPTSP/UFG], 2008.
105. Oliveira SL, Carvalho DO, Capurro ML. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. *Rev Bio* 6: 38-43, 2011.
106. Osanai CH, Rosa AP, Tang AT, Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25: 53-54, 1983.
107. Osorio JE, Partidos CD, Wallace D, Stinchcomb DT. Development of a recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate. *Vaccine* 33: 7112-7120, 2015.
108. Paiva LA, Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother Res* 16: 737-739, 2002.
109. Paiva LA, Gurgel LA, De Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, Rao VS. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin against acetic acid induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol* 93: 51-56, 2004.
110. Pan American Health Organization (PAHO). *Preparedness and Response for Chikungunya Virus: Introduction in the Americas*. PAHO. Washington, 2011.

111. Pan American Health Organization (PAHO). Confirmada a circulação do Zika vírus no Brasil. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=comcontent&view=article&id=4838%3Aconfirmada-a-circulacao-do-zikavirus-no-brasil&catid=1272%3Anoticias&Itemid=816>. Acessado em 07/06/2015.
112. Parola P, Simon F, Oliver M. Tenosynovitis and vascular disorders associated with chikungunya virus-related rheumatism. *Clin Infect Dis* 45: 801-802, 2007.
113. Páscoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, JacobsLorena M, Lemos FJA. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 517-523, 2002.
114. Pedro, A. O dengue em Nictheroy. *Brazil-Médico* 1: 173-177, 1923.
115. Pedroni F, Sanchez M, Santos FAM. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Rev Bras Bot* 25: 183-94, 2002.
116. Pereira FJ, Martins FT, Corrêa RS, Moreira MEC, Costa AMDD, dos Santos MH, Polo M, Barbosa LA. Isolamento, composição química e atividade anti-inflamatória do óleo essencial do pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. *Lat Am J Pharm* 27: 369-374, 2008.
117. Pessanha JEM, Caiaffa WT, Cecilio AB, Iani FCM, Araujo SC, Nascimento JC, Kroon EG, Proietti FA, Arias JR. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 103-105, 2011.
118. Pialoux G, Gaüzere B-A, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319-327, 2007.
119. Pieri FA, Mussi MC, Moreira MAS. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extrato, aplicações industriais e propriedade medicinais. *Rev Bras Pl Med* 11: 465-472, 2009.
120. Pieri FA, José RM, Galvão NN, Nero LA, Moreira MAS. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaíba oil on *Listeria monocytogenes*. *Cienc Rural* 40: 1797-1801, 2010.
121. Pio Corrêa M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro, 1984.
122. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 11-17, 2013.

123. Prophet EB, Arrington JB, Sabin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology. Washington-DC, 1992.
124. Prophiro JS, Rossi JCN, Kanis LA, Santos TG, Silva OS. Estudo comparativo do efeito larvívica de extratos de frutos verdes e maduros de *Melia azedarach* L. (Sapindales: Meliaceae) em *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *BioAssay* 3:1-5, 2008.
125. Record SJ, Hess R. *Timbers of the new world*. Arno Press. New York, 1972.
126. Rodrigues RM. *A flora da Amazônia*. Cejup. Belém, 1989.
127. Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, Souza WV, Marques ET, Cummings DA. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 5: 1-7, 2011.
128. Ruiz LM, Segura C, Trujillo J, Orduz S. In vivo binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73-79, 2004.
129. Russell TL, Brown MD, Purdie DM, Ryan PA, Kay BH. Efficacy of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*) formulations for mosquito control in Australia. *Ecotoxicology* 96: 1786-1791, 2003.
130. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Hyg.* 1952; 1: 30-50.
131. Santacoloma Varón L, Chaves Córdoba B, Brochero HL. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Rev Panam Salud Publica* 27: 66-73, 2010.
132. Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga-Junior VF, Pinto AC, Nakamura VC. Effect of Brazilian copaíba oils on *Leishmania amazonenses*. *J Ethnopharmacol* 120: 204-208, 2008.
133. Santos RLC. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Rev Saúde Pública* 37: 671-673, 2003.
134. Scherer WF. The complexity of arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. *Am J Epidemiology* 88: 145-146, 1968.
135. Secretaria de Estado da Saúde. Boletim semanal de dengue – Goiás. Disponível em http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_333_BoletimASemanalASE-21.pdf. Acessado em 07/06/2015.
136. Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 119-125, 2001.

137. Shao L, Devenport M, Fujijoka H, Ghosh A, Jacobs-Lorena M. Identification and characterization of a novel peritrophic matrix protein, Ae-Aper50, and the microvillar membrane protein AEG12, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 947-959, 2005.
138. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 51-63, 1998.
139. Silva HHG, Silva IG. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 349-355, 1999.
140. Silva HHG, Silva IG. Estudo do ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* a partir de ovos com quatro meses de estocagem em laboratório. *Rev Patol Trop* 29:95-100, 2000.
141. Silva HHG, Silva IG, Souza SS, Guimarães VP, Elias CN, Pimenta JF. Estudo comparativo da eficácia das técnicas de ultrabaixo volume e termonebulização no controle de *Aedes aegypti*. *Info Epidemiol SUS* 10: 45-46, 2001.
142. Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399, 2004.
143. Silva HHG, Geris R, Rodrigues Filho E, Rocha C, Silva IG. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 264-267, 2007.
144. Silva IG, Araújo ESO, Silva HHG, Soares AW, Cantuária PB. Ocorrência de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em Goiânia. *An Soc Entomol Brasil* 20: 459-460, 1991.
145. Silva IG, Santos AH, Ferri PH, Alves RBN, Melo RL, Peixoto L, Silva HHG, Elias CN, Isac E, Lira KS, Camargo MF. Ação larvica de extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. (tinguí do cerrado) sobre o *Aedes aegypti* (Lin) em laboratório. *Rev Patol Trop* 25: 51-59, 1996.
146. Silva IG, Silva HHG, Guimarães VP, Lima CG, Pereira AL, Rodrigues Filho E, Rocha C. Prospecção da atividade inseticida de plantas do cerrado, visando ao combate do *Aedes aegypti*. *Info Epidemiol SUS* 10: 51-52, 2001.
147. Silva IG, Silva HHG, Guimarães VP, Elias CN, Lima CG. Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. *Entomol Vect* 9: 15-24, 2002.

148. Silva IG, Silva HHG, Lima CG. Ovipositional behavior of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in different strata and biological cycle. *Acta Biol Par* 32: 1-8, 2003.
149. Silva IG, Zanon VOM, Silva HHG. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 32: 729-732, 2003.
150. Silva JJ, Mendes J. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 612-616, 2007.
151. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Oliveira FAM. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim Nova* 27: 46-49, 2004.
152. Socorro M, Carvalho L, Caldas ED, Yoshizawa MAC, Degallier N, Oliveira C, Knox MB. Susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao inseticida *temephos* no Distrito Federal, em 2000. *Info Epidemiol SUS* 10: 41-43, 2001.
153. Souza SS, Silva IG, Silva HHG. Associação entre a incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti*, no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 152-155, 2010.
154. Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 49: 942-948, 2009.
155. Sudeep AB, Parashar D. Chikungunya: an overview. *J Biosci* 33: 443-449, 2008.
156. Swaroop A, Jain A, Kumhar M, Parihar N, Jain S. Chikungunya fever. *J Indian Acad Clin Med* 8: 164-168, 2007.
157. Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública* 18: 867-871, 2002.
158. Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Ferreira LDA, Vasconcelos PFC, Caincross S. Dinâmica de circulação do vírus da dengue: uma epidemia silenciosa em um complexo de área urbana. *Trop Med Int de Saúde* 7: 757-762, 2002.
159. Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experience?. *Cad Saúde Pública* 21:1307-1315, 2005.

160. Terra WR. The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 47-61, 2001.
161. Torres JPM, Lailson-Brito J, Saldanha GC, Dorneles P, Silva CEA, Malm O, Guimarães JR, Azeredo A, Bastos WR, Silva VMF, Martin AR, Cláudio L, Markowitzh S. Persistent toxic substances in the Brazilian Amazon: contamination of man and the environment. *J Braz Chem Soc* 20: 1175-1179, 2009.
162. Trindade RCP, Silva PP, Oliveira DS, Lima IS, Sant'ana, AEG. Efeito do óleo da copaíba, *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae: Caesalpinoideae) no desenvolvimento da Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Hortic Bras* 21: 344-348, 2003.
163. Valotto CFB, Cavasin G, Silva HHG, Geris R, Silva IG. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (SAPINDACEAE) *Rev Patol Trop* 39: 309-321, 2010.
164. Vasilakis N, Hanley KA, Weaver SC. Dengue Virus Emergence from its Sylvatic Cycle. In: Hanley KA, Weaver SC, editors. *Frontiers in Dengue Virus Research*. 1^a ed. USA: Caister Academic Press; 2010.
165. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 72:1-76, 2008.
166. Valotto CFB, Cavasin G, Silva HHG, Regina Geris, Silva IG. Atitude larvívica do ácido 3- β -acetoxilabdan 8-(17)-13-dien-15-óico isolado da planta medicinal *Copaifera reticulata* (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) evidenciadas pelas alterações morfohistológicas. *Rev Patol Trop* 43:375-384, 2014.
167. Veiga Júnior VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. *Quím Nova* 25: 273-286, 2002.
168. Veiga Júnior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. *J Ethnopharmacol* 112: 248-254, 2007.
169. Vera SS, Zambrano DF, Méndez-Sánchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko EE, Duque Luna JE. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 113: 2647-2654, 2014.
170. Villabona-Arenas CJ, Oliveira JL, Capra CS, Balarini K, Loureiro M, Fonseca CRTPF, Passos SD, Zanotto PMA. Detection of four dengue serotypes suggests rise in hyperendemicity in urban centers of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 8: 1-3, 2014.

171. Waliszewski SM, Gomez-Arroyo S, Infanzon RM, Villalobos-Pietrini R, Hart MM. Comparison of organochlorine pesticide levels between abdominal and breast adipose tissue. *Bull Environ Contam Toxicol* 71: 156-162, 2003.
172. World Health Organization (WHO). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition*. WHO Library Cataloguing-in-Publication, 2009.
173. World Health Organization (WHO). *Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Revised and expanded edition*. WHO Library Cataloguing-in-Publication, 2011.
174. Zulkarnain E, Hotta S, Takegami T. Molecular comparison of dengue type 1 Mochizuki strain virus and other selected viruses concerning nucleotide and amino acid sequences of genomic RNA: a consideration of viral epidemiology and variation. *Microbiol Immunol* 38: 581-585, 1994.