



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

ANTONELLA DEL BUONO GUIMARÃES

Atividade larvicida da *Persea americana* (Lauracea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) evidenciada por modificações morfohistológicas

**Goiânia
2014**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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

Nome completo do autor: Antonella Del Buono Guimarães

Título do trabalho: Atividade larvívora da *Persea americana* (Lauracea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) evidenciada por modificações morfohistológicas

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 da tese ou dissertação.

Antonella Del Buono Guimarães

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 11 / 05 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita

ANTONELLA DEL BUONO GUIMARÃES

Atividade larvicida da *Persea americana* (Lauracea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) evidenciada por modificações morfohistológicas

Dissertação de Mestrado apresentada 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
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Del Buono Guimarães, Antonella

Atividade larvívora da *Persea americana* (Lauraceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) evidenciada por modificações morfohistológicas [manuscrito] / Antonella Del Buono Guimarães. - 2014.

xvii, 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, 2014. Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, lista de figuras.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Persea americana*. 3. Controle vetorial. 4. Prospecção de plantas. I. Garcia da Silva, Ionizete, orient. II. Título.

CDU 576.8



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANTONELLA DEL BUONO GUIMARÃES - Aos três dias do mês de novembro do ano de 2014 (03/11/2014), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. IONIZETE GARCIA DA SILVA, HELOISA HELENA GARCIA DA SILVA e WALQUÍRIA ARRUDA, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "ATIVIDADE LARVICIDA DA *Persea americana* (Lauracea) SOBRE *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) EVIDENCIADA POR MODIFICAÇÕES MORFOHISTOLÓGICAS, em nível de MESTRADO, de autoria de ANTONELLA DEL BUONO GUIMARÃES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. IONIZETE GARCIA DA SILVA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1047/2011 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada:**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva

Prof. Dr. Heloisa Helena Garcia da Silva

Profa. Dra. Walquíria Arruda

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
APROVADA.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata _____ (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO**, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva (IPTSP/UFG)

Prof. Dr. Heloisa Helena Garcia da Silva (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Walquíria Arruda (ICB/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

[Assinatura]
Heloisa H. G. Silva
walquiriaarruda
[Assinatura]

*“Não estacione na aprendizagem passada,
porquanto, à frente, há muito mais a ver,
ouvir e aprender.”*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à
Leonora, filha amada

AGRADECIMENTOS

A Deus, início de todas as coisas.

Aos meus pais, Edda e José Alberto e minha irmã, Camille, pela ajuda, apoio, incentivo, carinho e paciência.

À minha amada filha, Leonora, pelo amor, companheirismo e paciência em momentos de ausência.

Ao Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva, Professor Titular do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Patologia e Parasitologia (DMIPP), do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG), por aceitar-me como aluna, pelo auxílio, paciência e amizade.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro do IPTSP/UFG, pela oportunidade concedida.

À Prof. Dra. Heloísa Helena Garcia da Silva, professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Patologia e Parasitologia (DMIPP) do IPTSP/UFG pelo auxílio no Laboratório de Bioatividade de Plantas, pela atenção, paciência e amizade.

À Prof. Dra. Walquíria Arruda, do Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG, pela atenção, disponibilidade, paciência e imensa doçura.

À Prof. Dra. Gláucia Maria Cavasin, professora do Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFG, pela atenção, disponibilidade e carinho.

Aos técnicos Carmeci Natalina Elias, Edson de Castro, Judson Regozino, do Laboratório de Biologia de Insetos e Xenodiagnóstico, do IPTSP/UFG, pelo auxílio na criação dos mosquitos.

À Sueli Meira da Silva, coordenadora do Laboratório Margarida Dobler Komma do IPTSP/UFG e Aline Garcia Kozlowski pela ajuda, incentivo, amizade, apoio nos momentos decisivos.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Margarida Dobler Komma, do IPTSP/UFG, pela amizade e incentivo.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), da UFG, pela disponibilidade de uso do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Ao secretário de Pós-graduação José Clementino de Oliveira Neto, pela ajuda e amizade.

À Tatiane Schönholzer, aluna de PVIC, e à Thatiane Abreu de Castro, técnica do Laboratório de Técnicas Histológicas /ICBIII/ UFG, por auxiliar-me junto ao aparelho de microtomia.

Aos técnicos do Laboratório de Técnicas Histológicas, do Departamento de Histologia e Embriologia do ICBIII/UFG, funcionários e professores do Laboratório de Estudos Morfológicos (LABEM), do ICB III/UFG, pela atenção e disponibilidade.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1. O VETOR	1
1.1.1. CICLO BIOLÓGICO	2
1.2. DENGUE.....	7
1.3. FEBRE AMARELA	10
1.4. FEBRE CHIKUNGUNYA	11
1.5. VACINAS DENV.....	12
1.6. CONTROLE DO VETOR	13
1.7 <i>Persea americana</i>	15
1.8 MORFOLOGIA DO TUBO DIGESTIVO DE LARVAS <i>Aedes aegypti</i>	16
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Obtenção das larvas	19
4.2 Obtenção do extrato bruto etanólico (ebe) de <i>P. americana</i>	19
4.3 Ensaios	20
4.4 Microscopia de luz.....	22
4.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	23
5 RESULTADOS	25
5.1 Observações à fresco	25
5.2 Análises Histológicas	26
5.3 Análises da microscopia eletrônica de varredura	42
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS.....	56

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

- Figura 1.* Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. A- adulto. B- ovos. C- larva de primeiro estágio. D- larva de segundo estágio. E- larva de terceiro estágio. F- larva de quarto estágio. G- pupa.5
- Figura 2.* Transmissão do *Aedes egypti*.....6
- Figura 3.* *Persea americana* (abacateiro). A - aspectos das folhas. B – aspectos dos frutos. C - aspectos do caule. D – casca do caule. 20
- Figura 4.* Extrato bruto etanólico (ebe) de *Persea americana*. A - aspecto do ebe da casca de caule. B - solução do ebe a 100ppm. C - copo de poliestireno, contendo 25 mL da solução com larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*. D – Ensaio. 21
- Figura 5.* Processamento das amostras. A - lavagem e fixação das larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*. B – desidratação das larvas. C - infiltração e inclusão das larvas em resina. D - corte dos blocos de resina em micrótomo..... 23
- Figura 6.* Processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura. A - porta amostras. B - aparelho de ponto crítico. C - stubb contendo as amostras a serem analisadas no microscópio eletrônico de varredura. D - aparelho para metalização das amostras..... 24
- Figura 7.* Micrografias de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*. A – larvas do grupo controle. B – larvas tratadas com *Persea americana*. Cabeça (c), tórax (t), abdômen (a), sifão respiratório (sr), cerdas (cd); extrusão da matriz peritrófica (seta)..... 26
- Figura 8A.* Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. A - região anterior do intestino (IA), cecos (cc). HE 100µm.....27
- Figura 8B.* Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. B - região anterior (RA) e média do mesêntero (RM); ceco (cc); células epiteliais (ce); alimento (al); cutícula íntegra (ct). Observar a aparência normal das células epiteliais (ce) justapostas e presença de vesículas de secreção (setas). HE 100µm.....28
- Figura 9A.* Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle 9A - região média do mesêntero (RM); ceco (cc); células epiteliais (ce); alimento (al); cutícula íntegra (ct). Observar a aparência normal das células epiteliais (ce) justapostas e presença de vesículas de secreção (setas). HE 100µm.....29
- Figura 9B.* Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle 9B - região posterior do mesêntero (RP); células epiteliais (ce), alimento (al) e espessa borda em escova (ponta de seta).HE 100µm.....30
- Figura 10A.* Fotomicrografias da região média do mesêntero (RM) de larvas de *Aedes aegypti* do grupo tratado com ebe de casaca de caule de *Persea americana* após 24h, corados por hematoxilina/eosina. A - presença de grande quantidade de vesículas de

secreção (setas), junto às células epiteliais (ce), alimento (al), cutícula (ct) envolvendo todo o corpo da larva (ponta de seta) apresenta-se de forma frouxa e irregular. HE 10µm.....31

Figura 10B. Fotomicrografias da região média do mesêntero (RM) de larvas de *Aedes aegypti* do grupo tratado com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 24h, corados por hematoxilina/eosina B - região média do mesêntero, monstrando vesículas de secreção. HE 10 µm.....32

Figura 10C. Fotomicrografias da região média do mesêntero (RM) de larvas de *Aedes aegypti* do grupo tratado com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 24h, corados por hematoxilina/eosina. C- cutícula (ct) envolvendo todo o corpo da larva (setas) apresenta-se de forma frouxa e irregular. HE 10µm.....33

Figura 11A. Fotomicrografia da região posterior do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com o ebe de casca do caule de *Persea americana* por 24h. A - região posterior de mesêntero (RP) evidenciando, a presença das células epiteliais alteradas e vacuolizadas com citoplasma de aspecto espumoso e núcleos disformes e deslocados do centro (setas), alimento (al), cutícula (ct), microvilosidades (mv). HE 10 µm.....35

Figura 11B. Fotomicrografia da região posterior do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com o ebe de casca do caule de *Persea americana* por 24h. B - região posterior de mesêntero (RP) evidenciando, a presença das células epiteliais alteradas e vacuolizadas com citoplasma de aspecto espumoso e núcleos disformes e deslocados do centro (setas), alimento (al), cutícula (ct), microvilosidades (mv). HE 10 µm.....36

Figura 12. Fotomicrografia do mesêntero de larvas terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 48h. Região anterior do mesêntero, evidenciando o aumento do espaço subperitrófico (sbp) e alimento (al). Notar a presença de pequenos vacúolos nas células epiteliais (setas), cecos gástricos (cc), cutícula (ct). HE 100 µm.....37

Figura 13. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe da casaca do caule de *Persea americana* após 48h. Detalhe da região anterior do mesêntero (RA), demonstrando o espaço subperitrófico aumentado (sbp), células epiteliais de aspecto espumo e vacuolizado com núcleos desviados do centro da célula (setas) e matriz peritrófica (ponta de seta). HE 100µm.....38

Figura 14A. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe da casca do caule de *Persea americana* após 48h. A - Região média do mesêntero (RM) demonstrando a constrição e aspecto sinuoso da matriz peritrófica (setas) e alimento (al) retraído em seu interior, células epiteliais alongadas com núcleo deslocado da região central (ce). Notar a formação da cutícula com aspecto bastante frouxo (ponta de seta). HE 100 µm.....39

Figura 14B. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe da casca do caule de *Persea americana* após 48h. B - Detalhe da região média do mesêntero, células epiteliais (ce), espaço subperitrófico aumentado (sbp), alimento (al) membrana peritrófica (seta). HE 100 µm.....40

Figura 15 Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 48h. Notar a grande quantidade de secreção no espaço subperitrófico na luz do mesêntero, alimento (al) , as células epiteliais (ce) de vários tamanhos e formas com citoplasma vacuolizado (setas) , a forma sinuosa e angular com que se apresenta a matriz peritrófica e todo conteúdo alimentar. A cutícula (ct) também se mostra bastante enrugada e com células danificadas e espaçadas. HE 100 µm.....41

Figura 16. Eletrofotomicrografia de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* mostrando o aspecto morfológico externo. A - vista dorsal de larva do grupo controle. Corpo constituído por cabeça (c), tórax (t), abdômen (a) e sifão respiratório (sr). B - vista ventral de larva do grupo tratado com ebe de casca de caule de *Persea americana*, por 24h. Corpo constituído por cabeça (c), tórax (t), abdômen (a), sifão respiratório (sr) e papilas anais (pa). Notar que não há diferença entre o aspecto morfológico externo do grupo controle e tratado 24h.....42

Figura 1. Eletrofotomicrografia de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*, mostrando o aspecto do tegumento externo. A – tegumento externo da larva do grupo controle. Observar a superfície rugosa (tg) com a presença de algumas cerdas. B – tegumento externo da larva do grupo tratado 24h. Observar que não há diferença entre o aspecto rugoso da superfície externa das larvas do grupo controle e tratado 24h.....43

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

% - porcentagem

CL - Concentração letal

DENV- vírus da dengue

DMSO - dimetilssulfóxido

ebe - extrato bruto etanólico

°C - Grau celcius

HE - hematoxilina e eosina

g- grama

h – hora

Kg- quilograma

L - litro

L₃ - larva de terceiro estágio

m- molar

MEV - microscopia eletrônica de varredura

mL - mililitro

μL - microlitro

μm - micrômetro

ppm - parte por milhão

qsp - quantidade suficiente para

PA- para análise

RESUMO

A dengue apresenta impacto na saúde pública das regiões intertropicais do mundo e tem como principal vetor o *Aedes aegypti*. As medidas mais usadas no controle desse vetor, até o momento, são os inseticidas sintéticos, que aplicados em larga escala durante longo período, fez aparecer resistência. Diante disso, compostos químicos provenientes de plantas podem ser substitutos dos inseticidas sintéticos, com as vantagens do retardamento da resistência, devido à complexidade de seus constituintes, da fácil degradação, da menor toxicidade ao homem e por ser uma alternativa mais segura para o meio ambiente. Ensaios com extrato bruto etanólico (ebe) da casca do caule de *Persea americana* foram realizados em copos de poliestireno, contendo soluções a 100 ppm do ebe de *P. americana*, previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e água do sistema público de Goiânia. Em cada copo foram colocadas 5 larvas de 3º estágio (L₃) do mosquito *Aedes aegypti*. O estudo das modificações morfohistológicas foi feito a partir de observações realizadas com 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 48 h de tratamento com o ebe. Em cada período, as larvas foram coletadas, fixadas, desidratadas, infiltradas e incluídas em historesina. Foram realizados cortes de 3µm de espessura em micrótomo semiautomático, corados pela hematoxilina/eosina (HE), analisados e fotomicrografados em microscópio de luz. Para microscopia eletrônica de varredura (MEV) as larvas tratadas e controle foram fixadas, desidratadas, secas em aparelho de ponto crítico, metalizadas e analisadas em microscópio eletrônico. As modificações morfohistológicas foram observadas a partir de 24h após o tratamento das larvas L₃ com ebe de casca de caule de *P. americana*. As análises dos cortes histológicos do mesêntero de larvas de *Ae. aegypti*, em microscopia de luz, mostraram a presença de vacúolos no citoplasma das células epiteliais, grande quantidade de secreção e dobramentos da membrana peritrófica nas larvas tratadas por 48h. Houve extrusão de todo conteúdo alimentar juntamente com a matriz peritrófica, sugerindo assim a ação tóxica de *P. americana* sobre o tubo digestivo das larvas. Essas modificações não ocorreram no grupo controle. Não houve evidência de alterações externas pelo MEV.

Palavras Chave: *Aedes aegypti*, *Persea americana*, Controle Vetorial, Prospecção de Plantas

ABSTRACT

Dengue has impact on public health of the intertropical regions of the world and its main vector *Aedes aegypti*. The measures most commonly used to control this vector, so far, are the synthetic insecticides, which applied on a large scale for a long period, did show resistance. Thus, chemical compounds from plants can be substitutes for synthetic insecticides, with the advantages of resistance retardation, due to the complexity of its components, easy degradation, lower toxicity to man and to be a safer alternative to the environment. Assays crude ethanol extract (cee) of *Persea americana* stem bark were performed in polystyrene cups, solutions containing 100 ppm of *P. americana* cee, previously dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and water public Goiânia system. In each glass were placed 5 larvae of 3rd stage of the mosquito *Aedes aegypti*. The study was made of morfohistológico modifications from observations made with 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 48 h treatment with the cee. In each period, the larvae were collected, fixed, dehydrated, infiltrated and embedded in historesin. of 3µm thick cuts were made in microtome semiautomatic, stained with hematoxylin / eosin (HE), analyzed and photomicrographed under a light microscope. For scanning electron microscopy (MEV) the treated and control larvae were fixed, dehydrated, dried in a critical point apparatus, metallized and analyzed in electron microscope. The morfohistológico changes were observed from 24 hours after treatment of larvae 3rd stage with *P. americana* stem bark cee. The analysis of histological sections of the midgut of *Ae. aegypti* in light microscopy showed the presence of vacuoles in the cytoplasm of epithelial cells, large amount of secretion and folding of membrane peritrophic larvae treated for 48 hours. There was extrusion whole food content together with peritrophic matrix, thus suggesting the *P.americana*. toxic action on the gut of the larvae. These changes did not occur in the control group. There was no evidence of external changes by MEV.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. O VETOR

A origem do termo que deu nome ao gênero *Aedes* é proveniente do grego (*aēdēs*) que significa “odioso”, e da espécie *aegypti* é do latim e significa “do Egito”. *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor de algumas espécies de arbovírus que tem causado epidemias em várias regiões do mundo, dentro das faixas tropicais e subtropicais, como o vírus da dengue e da febre amarela, pertencentes ao gênero *Flavivirus* (Franco, 1968; WHO, 2009; Mascheretti et al., 2013), e o da febre chikungunya, do gênero *Alphavirus*, (Albuquerque et al., 2012; Bortel et al., 2014; MS, 2014).

As evidências da fauna indicam o continente Africano como o epicentro dessa espécie. Na década de 1950 esse mosquito foi erradicado da região do Mediterrâneo. A princípio pensou-se que havia entrado nas Américas provavelmente na época da colonização (Forattini, 2002), porém há relatos de epidemias de febre amarela na América Central, no Haiti, desde o ano de 1495 (Franco, 1968). Em 1648 o *Ae. aegypti* reaparece causando uma epidemia de febre amarela na Ilha de Guadalupe e na cidade de Yucatan, México (Franco, 1968). Foi considerado controlado em grande parte do continente americano nas décadas de 1950 e 1960, porém houve reinfestação na maioria destas áreas e hoje é considerada uma espécie cosmotropical (Barreto & Teixeira, 2008; WHO, 2009; MS, 2014).

No Brasil o *Ae. aegypti* é conhecido desde o século XVII. Há relatos de epidemias de dengue no país desde 1846, ocorridas em São Paulo e Rio de Janeiro, mas as primeiras citações na literatura datam de 1916 (Franco, 1968). Depois de ser considerado erradicado na década de 1950, reaparece a partir de 1967 em Belém e outras cidades do Estado do Pará. Posteriormente, a presença desse mosquito foi notificada em cidades litorâneas do Brasil e, no início da década de 1980, começou a sua interiorização, sendo responsável por grande surto de febre amarela urbana em estados da região Nordeste do país (Franco, 1968; Prata, 2000; Braga & Vale, 2007; Catão, 2011; MS, 2014).

Em Goiás, o *Ae. aegypti* foi introduzido em 1987 e em maio de 1990 foi relatada pela primeira vez sua ocorrência em vários bairros de Goiânia (Silva et al., 1991a) e alguns

meses depois praticamente todos os bairros da cidade estavam infestados (Silva et al., 1991b). Foi responsável pela primeira epidemia de dengue em Goiânia em janeiro de 1994 e a segunda entre o verão e outono de 1995.

Esse mosquito apresenta hábitos sinantrópico e antropofílico, atividade hematofágica diurna com pico de hematofagia entre 15 e 18h, quando a temperatura, umidade e luz solar apresentam-se mais intensas (Silva et al., 2002).

O *Ae. aegypti* cria-se em pequenas coleções de água limpa e parada como vasos, caixas de água, tampas de garrafa, pneus, baldes e outros recipientes encontrados próximos ao domicílio, nos quais põe seus ovos (Forattini, 2003). Este mosquito tem se adaptado a criadouros artificiais de água poluída, como foi demonstrado por Silva et al. (1999) o que pode significar sua ampliação territorial e de densidade.

A distribuição de *Ae. aegypti* é limitada pela altitude, sendo encontrado em altas densidades abaixo de 1.500m, embora haja registros de sua presença a 2.200m acima do nível do mar. É um mosquito essencialmente urbano, com acentuada antropofilia que encontrou no ambiente das cidades, vilas e povoados os recipientes que propiciaram o desenvolvimento de seu ciclo de vida. O adensamento populacional de mosquitos possibilitou a transmissão dos arbovírus de dengue, febre amarela urbana e, no momento, o da febre chikungunya (Franco, 1968; Prata, 2000; Braga & Valle, 2007; Geris et al., 2012; Thiberville et al., 2013; Staples & Fisher, 2014).

1.1.1. CICLO BIOLÓGICO

Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa e o ciclo de vida do *Ae. aegypti* é holometábolo (Figura 1) , passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. As larvas e pupas têm seu desenvolvimento no ciclo aquático, enquanto os adultos possuem ciclo de desenvolvimento terrestre. Após um período de 2 a 4 dias, em temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$, os ovos dão origem às larvas que passam por quatro estádios, em um período variável de 8 a 13 dias. Posteriormente, as larvas transformam-se em pupas e, após 1 a 3 dias, dão origem aos adultos.(Silva, 1998)

. Após algumas centenas de ciclos estudados ficou constatado que na emergência dos adultos mantinha-se sempre a proporção de um para um, entre machos e fêmeas (Silva & Silva, 1999; Silva & Silva, 2000, Geris et al., 2012).

O macho só se alimenta de carboidratos e néctar extraído dos vegetais e a fêmea necessita de alimentação sanguínea para tornar-se fértil. A postura dos ovos é feita após cada repasto sanguíneo. A fêmea necessita de, pelo menos, uma cópula para fecundar os ovos que produzirá em seu período de vida. O acasalamento geralmente ocorre imediatamente após a primeira hematofagia (Silva & Silva, 1999; Forattini, 2002).

A longevidade do *Ae. aegypti* em laboratório é de, em média, 25 dias para machos e 50 dias para fêmeas, e na natureza vivem entre 30 e 35 dias (Silva & Silva, 1999; Silva & Silva, 2000; Forattini, 2002; Natal, 2002; Gomes et al., 2006; Geris et al., 2012).

Os ovos de *Ae. aegypti* são depositados pelas fêmeas nas paredes internas do criadouro, a mais ou menos 1,5 cm acima do nível da água (Silva et al., 2003). Medem, aproximadamente, 1 mm de comprimento e são alongados e fusiformes. No momento da postura são brancos, escurecendo rapidamente (Forattini, 2002; Silva et al., 2003).

O que determina a duração do ciclo do *Ae. aegypti* é o período de incubação dos ovos, variável de acordo com a quiescência dos mesmos. Após um estudo do ciclo evolutivo, a partir de onze grupos de ovos com diferentes períodos de quiescência, observou-se que a incubação variou de 3 a 492 dias, mas a duração tanto do estágio larval quanto pupal foi estatisticamente igual, em todos os ciclos. (Silva, 1999) Os períodos de quiescência de 3 e 121 dias foram os mais favoráveis à eclosão das larvas, e o de 492 dias o mais desfavorável. Os ovos embrionados podem suportar grandes períodos de dessecação, podendo ficar mais de um ano em quiescência e apresentam viabilidade superior a 492 dias, demonstrando grande resistência. A capacidade de resistência à dessecação (quiescência) e os diferentes períodos de eclosão das larvas constitui fator importante e é um sério obstáculo para sua erradicação. A quiescência dos ovos permite que estes sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, facilitando assim a dispersão do mosquito (Silva & Silva, 1999; Silva & Silva, 2000; Silva et al., 2003; Geris et al., 2012).

As larvas de *Ae. aegypti* apresentam corpo alongado e filiforme, definido em cabeça, tórax e abdômen, A cabeça, de aspecto globoso e quitinoso, possui um par de antenas e pelos antenais; tórax com espinhos laterais e um grupo de cerdas no metatórax, também possui aspecto globoso e quitinoso; abdômen, dividido em nove segmentos bem distintos, de aspecto fino, liso e flexível, confere mobilidade à larva (Abed et al., 2007) O segmento anal ou posterior possui estruturas denominadas brânquias, necessárias para regulação osmótica da larva e um tubo respiratório O tubo respiratório é curto, grosso e de coloração

mais escura que o restante do corpo larval e denomina-se sifão respiratório, através do qual fazem a respiração quando se encontram na superfície da água. Passam a maior parte do tempo alimentando-se no fundo dos criadouros, principalmente de material orgânico. Quando provocadas por estímulos mecânicos ou luminosos, deslocam-se do fundo do criadouro para a superfície, e vice-versa, com movimentos em forma de “S”. A duração desta fase dependerá das condições de temperatura e umidade, disponibilidade de alimento e a densidade de larvas no criadouro (Silva & Silva, 1999; Forattini, 2002).

A pupa é uma fase intermediária entre o quarto estágio larval e o adulto. Durante essa fase, não se alimenta, apenas respira e sofre metamorfose resultando na formação do adulto. Apresenta o corpo todo recoberto por uma camada de material quitinoso, assim como as larvas, o que lhe confere grande resistência às agressões do meio externo (Silva & Silva, 1999; Forattini, 2002). Apresenta grande mobilidade na água e possui o corpo em forma de “vírgula”, dividido em cefalotórax e abdômen. A sua morfologia corresponde à do adulto nela contido. Dessa maneira, embora possam ser observadas várias estruturas, somente algumas podem ser atribuídas ao organismo pupal propriamente dito. Na face cefalotorácica anterior pode-se observar a presença da peça bucal, representando a probóscide. Lateralmente, estão presentes os olhos compostos do adulto, bem como os ocelos laterais da pupa que são em número análogo ao da larva. As antenas estão como arcos, a partir dos segmentos basais anteriores. As asas estão situadas lateralmente no mesotórax, e as metatorácicas, situadas posteriormente àquelas, correspondendo aos halteres e limitando-se ao segmento I do abdômen. As pernas mostram-se dobradas e justapostas na face lateral do cefalotórax. Na região dorsal, em órgão par, encontramos a trompeta respiratória. O abdômen da pupa é formado por dez segmentos aparentes, mostram mobilidade de flexão e extensão. No segmento I encontram-se a cerda flutuadora e o tufo dendrítico, estruturas que contribuem para a sustentação da pupa na superfície líquida (Foratini, 2002; Geris et al., 2012)

O adulto representa a fase reprodutiva do mosquito. Possui o corpo escuro com faixas brancas nos segmentos do tarso e um desenho característico em forma de lira no mesonoto. Machos e fêmeas apresentam-se aptos ao acasalamento 24h após emergirem da fase pupal (Geris et al., 2012).

A fêmea do *Ae. aegypti* infectada por qualquer um dos sorotipos do vírus DENV, pode transmitir o vírus verticalmente para a prole, gerando filhas infectadas, transmissão esta

chamada de transovariana. Quando se infecta com um dos sorotipos do vírus DENV, após 8 a 12 dias de incubação, é capaz de transmiti-lo a outra pessoa, essa é a transmissão horizontal (WHO, 2009). (Figura 2).

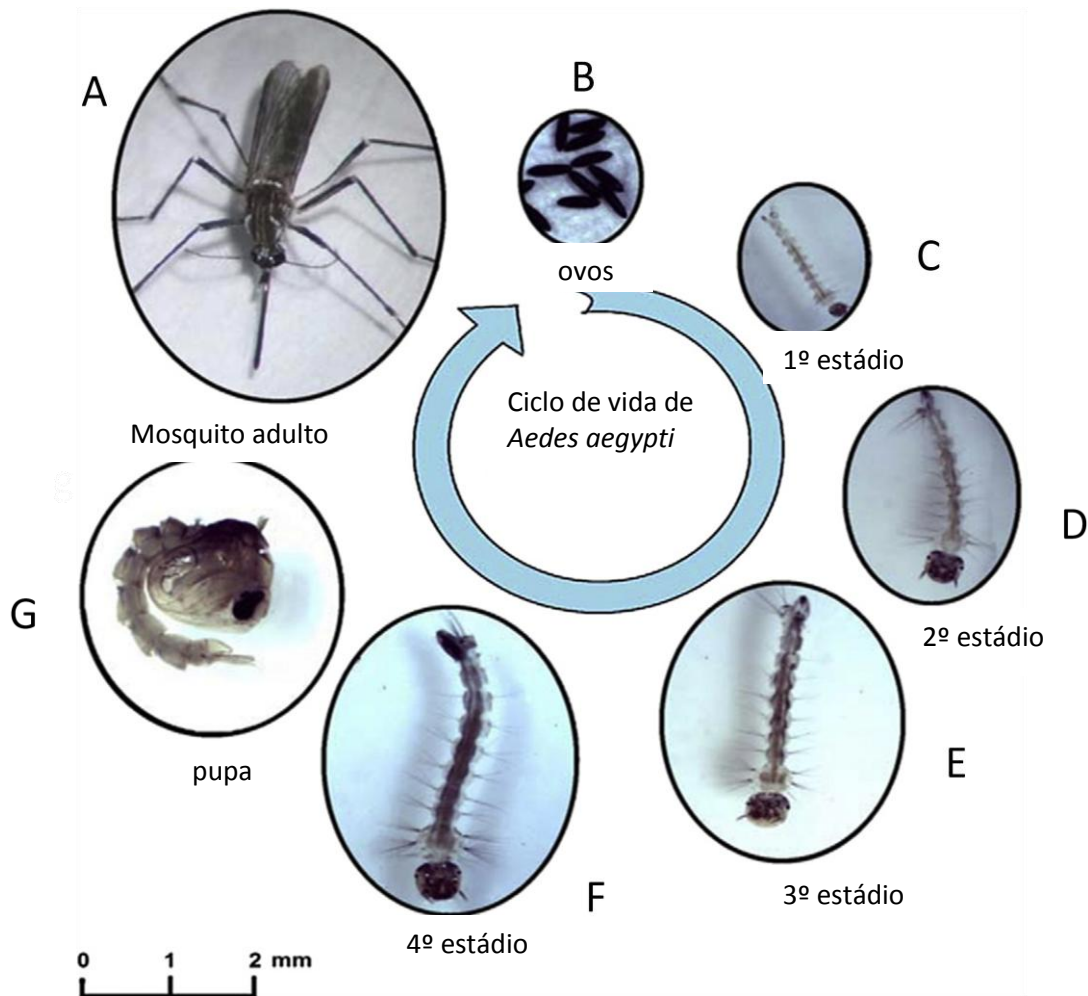


Figura 1. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. A- adulto. B- ovos. C-larva de primeiro estágio. D- larva de segundo estágio. E- larva de terceiro estágio. F- larva de quarto estágio. G- pupa. Fonte: Geris et al. 2012

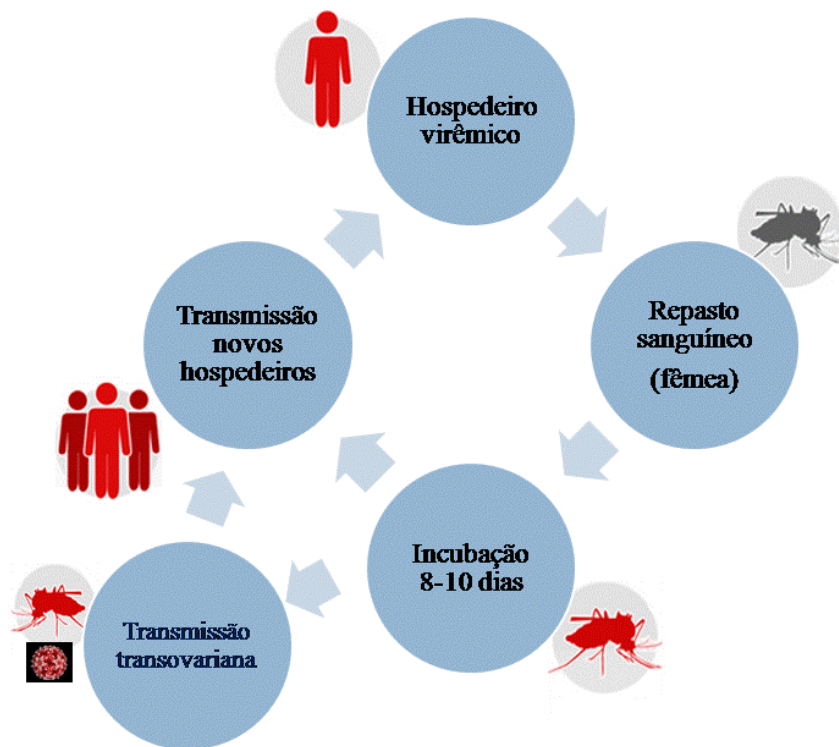


Figura 2. Vias de Transmissão do *Aedes aegypti*

A capacidade de dispersão do *Ae. aegypti* pelo vôo é pequena. A fêmea passa sua vida nas imediações do local onde emergiu desde que haja hospedeiros próximos; poucas vezes a dispersão pelo vôo excede os 100 m. A dispersão a grandes distâncias se dá, geralmente, pelo transporte dos ovos quiescentes e larvas em recipientes, configurando assim um transporte passivo, motivo pelo qual este vetor conseguiu ser reintroduzido em várias regiões onde já havia sido controlado (Forattini, 2002).

1.2. DENGUE.

A dengue é uma das doenças virais transmitidas pelo *Ae. aegypti* com grande importância em saúde pública no mundo. Causa enorme impacto nos serviços de saúde e grande prejuízo à economia local, devido aos elevados custos gerados pelo tratamento e as mortes resultantes. Classificada como uma doença de notificação compulsória atinge, atualmente, mais de 125 países. O vírus DENV é um RNA de fita simples e possui quatro sorotipos conhecidos, genética e antígenicamente distintos (1, 2, 3, 4) (Figueiredo, 2006; Braga & Valle, 2008; MS, 2014; Pinto Jr, 2014). A infecção por um dos sorotipos da dengue confere imunidade ao indivíduo apenas para aquele tipo específico. Recentemente foi descoberto, na região da Ásia o sorotipo 5 infectando a população durante um surto de dengue, na região da Malásia (Figueiredo, 2006; Braga & Valle, 2008; MS, 2014; Pinto Jr, 2014).

A dengue configura-se hoje como a doença tropical que se espalha com maior rapidez em decorrência da adaptação do vetor aos ambientes urbanos. A organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) estima que mais de 390 milhões de pessoas estejam sob o risco de infecção por um dos tipos do vírus DENV a cada ano, sendo, destas, 90 milhões acometidas pela forma mais grave da doença. Aproximadamente dois quintos da população mundial estão nas áreas de risco (regiões tropicais e subtropicais do planeta), evidenciando assim grande potencial para tornar-se uma epidemia mundial. Ondas de epidemias de dengue ocorrem simultaneamente às ondas de densidade do vetor. As razões para o ressurgimento global destas epidemias não estão completamente compreendidas, mas podem estar relacionadas a mudanças demográficas, climáticas e sociais (Ribeiro et al.,2006; WHO, 2009; Souza et al., 2010; Rocco et al., 2012; MS, 2014). Há relatos de epidemias de dengue no Brasil desde o ano de 1846, ocorridas em São Paulo e Rio de Janeiro. Mas a primeira evidência de epidemia no Brasil data de 1982 na cidade de Boa Vista (RO), ano em que foram isolados os sorotipos DENV-1 e 4.(Prata, 2000; Braga & Vale, 2007; Catão, 2011; MS, 2014) Nessa mesma década, teve início uma intensa circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus DENV, com epidemias que se espalharam por todas as regiões brasileiras (Franco, 1968; Prata, 2000; Braga & Vale, 2007; Catão, 2011; MS, 2014) Nos anos de 1986 e 1987 a doença já atingia os estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas, Pernambuco, Bahia, São Paulo e Minas Gerais e, em 1990, a dengue volta a aparecer de forma alarmante, provocando o aumento da transmissão do DENV-1 e

introdução do DENV-2.(Prata, 2000; Braga & Vale, 2007; Catão, 2011; MS, 2014) A terceira onda epidêmica ocorreu em 2001, com a entrada do DENV-3, com 800 mil casos e 150 óbitos.(Prata, 2000; Braga & Vale, 2007; Catão, 2011; MS, 2014) Após esse ano observou-se uma queda na incidência da doença, mas a partir de 2005 houve novo crescimento, culminando em mais de 700 mil casos graves e mais de 45 mil hospitalizações por dengue em 2008, registrados pelo Ministério da Saúde (Barreto & Teixeira, 2008; MS, 2014).

No Brasil, atualmente, há transmissão do vírus DENV nos 27 estados da federação, prevalecendo a circulação dos sorotipos 1, 2 e 3. Até fevereiro de 2013, foram notificados 204.650 casos no país (Barreto & Teixeira, 2008; MS, 2014).

Deste total, 324 foram notificados como casos graves e ocorreram 33 óbitos. Comparando esses resultados com o mesmo período de 2012, nota-se um aumento de 190% nos casos notificados (70.489), e uma importante redução de 44% nos casos graves e de 20% nos óbitos. As regiões Centro-Oeste e Sudeste lideram o número de notificações, com 80.976 casos e 80.876, respectivamente, isso equivale a 79% dos casos notificados no país. Nas demais regiões os números de notificações foram de 18.435, 11.943 e 12.420, respectivamente às regiões Norte, Nordeste e Sul (Braga & Valle, 2008; Carvalho et al., 2011; MS, 2014).

A maioria dos casos de dengue ocorre no primeiro semestre do ano correspondente aos meses mais quentes e úmidos. Nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, mais da metade dos casos ocorre no primeiro trimestre, ao contrário da região Nordeste, onde a maioria dos casos de dengue acomete a população no segundo trimestre do ano (Câmara et al., 2007; MS, 2014).

As infecções pelo vírus DENV podem ser assintomáticas ou levar a quadros que variam desde febre por dengue, dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue. A dengue é uma doença auto limitante, com sintomas como febre, cefaléia, artralgia, dor retro orbital, náusea e vômito. A dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue apresentam aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas, podendo ser fatal no caso da síndrome do choque por dengue. A doença grave ocorre mais frequentemente em indivíduos que já tiveram uma infecção com sorotipo heterólogo.

Esses vírus são mantidos em um ciclo de transmissão vetor/homem. Após repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas do mosquito, o vírus alcança a corrente sanguínea do hospedeiro, passa por um período de incubação de 8 a 10 dias, quando novamente pode ser transmitido para um novo hospedeiro (Yauch et al., 2010). (Figura 2).

O DENV-4 foi registrado no Brasil em julho de 2010 na cidade de Boa Vista, Roraima (Temporão et al., 2011), provavelmente, vindo do Norte da América do Sul (Venezuela, Guianas). Logo depois o DENV-4 foi detectado na região Nordeste (Bahia, Pernambuco e Piauí). Em seguida, foi notificado na região Norte (Pará e Amazonas) onde ocorreram casos de co-infecção entre DENV-3 e 4 (Figueiredo, 2011; MS, 2014).

No início de 2011 o DENV-4 foi detectado no Rio de Janeiro (Nogueira & Eppinghaus, 2011), depois no Estado de São Paulo, nas cidades de São José do Rio Preto e em Paulo Faria (Rocco et al., 2012). No ano seguinte, registrou-se o primeiro caso de DENV-4 em Campo Grande (MS). O caso foi confirmado através do isolamento em células de *Ae. albopictus*, imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos e, posteriormente, confirmado por testes de PCR-RT (Braga & Valle, 2008; Bertolacci-Rocha et al., 2014, MS, 2014).

O DENV-5 foi descoberto durante um surto de dengue na Malásia em 2007, novo subtipo após 50 anos. A pesquisa realizada em torno desta nova variante mostrou que este sorotipo difere dos outros que circulam entre a população mundial, pelo sequenciamento filogeneticamente distinto (Normile, 2013). Contudo, alguns pesquisadores ainda estão resistentes em afirmar que este “novo” vírus é um novo sorotipo ou uma variante dos quatro sorotipos de DENV já conhecidos. Esta descoberta impõe um novo desafio para o desenvolvimento da vacina para dengue.

1.3. FEBRE AMARELA

Doença infecciosa de caráter agudo, não contagiosa com período de incubação que varia de 3 a 6 dias, apresentando síndrome febril com icterícia, cefaléia, astenia, mialgia, artralgia, náusea e vômito (Brito et al, 2014) Pode apresentar as formas leve, que geralmente evolue para cura espontânea, moderada e grave, podendo levar a morte (Brito et al, 2014). Causada por um vírus da família *Flaviviridae* é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* (Vasconcelos, 2003; Brito et al, 2014). Presente nas regiões tropicais e subtropicais do continente Africano e Sul Americano, com ciclos silvestre e urbano (Vasconcelos, 2003; Brito et al, 2014).

O ciclo silvestre é mantido em hospedeiros primatas não humanos, onde o vetor principal é o mosquito hematófago do gênero *Haemagogus* (Vasconcelos, 2003; Brito et al, 2014). não podendo ser erradicado (Vasconcelos, 2003). A forma urbana, prevenível mediante vacinação, é mantida em um ciclo onde o homem é infectado após picada do mosquito hematófago dos gêneros *Aedes* e *Sabethes* (Vasconcelos, 2003). Os insetos funcionam tanto como transmissores, quanto como reservatórios do vírus amarelo pois uma vez infectados permanecem assim por toda a vida (Vasconcelos, 2003).

Segundo pesquisas realizadas, pode-se comprovar que o vírus amarelo é de origem africana e possivelmente chegou às Américas com a comercialização de escravos (Franco, 1968; Vasconcelos, 2003).

A população mais suscetível à doença é aquela que se expõe à picada do mosquito adentrando áreas de mata e florestas, dentro de zonas endêmicas (Vasconcelos, 2003) com predomínio de adultos do sexo masculino, trabalhadores rurais, ecoturistas, garimpeiros, seringueiros, caçadores etc.(Vasconcelos, 2003; Brito et al, 2014).

A primeira epidemia de febre amarela conhecida no Brasil data de 1685 na cidade do Recife, aconteceu provavelmente através de pessoas doentes nos navios negreiros originários da África (Franco, 1968). Em 1686 a doença acometeu pessoas no estado da Bahia e em 1849 a 1961 a doença espalhou-se de norte a sul do país (Franco,1968). A partir desta data a doença foi controlada através da vacinação da população exposta ao vetor (Franco,1968; Vasconcelos, 2003; Brito et al, 2014;).

Apesar da disponibilidade de vacinas desde o ano de 1940, houve reemergência da febre amarela em 1960 e 1980. Recentemente, nos anos de 2007 e 2009 surtos da doença fora da região amazônica afetaram o sul do Brasil, Paraguai e Argentina.(Romano et al, 2011; Mascheretti et al, 2013). Com a tendência de expansão da doença foram adotadas novas formas de controle, prevenção e vigilância, como rapidez na notificação dos casos, monitoramento dos primatas e tentativa de controle do vetor e mudança no calendário de imunização (Romano et al, 2011) .

As áreas de maior risco no Brasil são os estados do Centro Oeste e região Norte, Maranhão, Minas Gerais, Bahia, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Brito et al, 2014).

1.4. FEBRE CHIKUNGUNYA

Essa febre é causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), também transmitido pelo *Ae. aegypti*, tendo como segundo vetor *Ae. albopictus*. Os primeiros casos da febre Chikungunya foram relatados na África no início de 1950, e isolados pela primeira vez na Tanzânia, dois anos depois. A primeira epidemia foi documentada em Bangkok (Ásia) em 1958. Em dezembro de 2013 foi relatada a primeira transmissão do vírus Chikungunya no hemisfério ocidental. Desde então, foram notificados casos da doença em 31 países, incluindo os das Américas do Norte, Central e do Sul (Thiberville et al., 2013; Staples & Fisher, 2014).

No Brasil o vírus CHIKV foi notificado no Estado do Rio de Janeiro em 2010, em um paciente vindo de uma viagem à Ilha de Sumatra-Indonésia (Albuquerque et al., 2012). Atualmente já são 16 pessoas confirmadas com o vírus e 14 novos casos em Feira de Santana na Bahia (MS, 2014). Após o período de incubação, entre 7 a 10 dias, os sintomas geralmente desaparecem. As manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo vírus CHIKV são febre aguda, dores nas articulações, geralmente bilaterais e simétricas, podendo ser graves e debilitantes (Staples & Fisher, 2014). Outros sintomas podem incluir dores de cabeça, mialgia, artrite, conjuntivite, vômitos, exantema maculopapular (Thiberville et al., 2013). Nenhuma vacina foi desenvolvida até o momento apesar de vários estudos existirem com este intuito desde o ano de 1960. Várias drogas conhecidas

são efetivas sobre o vírus, porém com eficácia apenas *in vitro* (Thiberville et al., 2013). O tratamento é paliativo e inclui repouso, hidratação, analgésico e antitérmico (Staples & Fisher, 2014). O diagnóstico para esta virose é bastante limitado e possíveis casos não detectados podem ocorrer devido à dificuldade de diagnóstico diferencial entre DENV e CHIKV nas regiões onde aparecem as duas doenças (Weaver, 2014).

1.5 VACINAS DENV

No gênero *Flavivirus* há diferentes espécies e sorotipos importantes, sendo responsáveis por várias doenças humanas, como a dengue e a febre amarela. As infecções por um vírus deste grupo vão desde um resfriado até febres hemorrágicas. Vacinas para alguns *Flavivirus*, como o da febre amarela, são eficazes, porém apesar de vários estudos em andamento as vacinas para DENV ainda não foram licenciadas para uso humano (Ishikawaa, 2014). Os mecanismos de desenvolvimento da febre por dengue ainda não são totalmente compreendidos (Thisyakorn & Thisyakorn, 2014), e a hipótese mais aceita são os fatores virais como a virulência e a cepa; fatores relacionados ao organismo do hospedeiro, como a resposta imunológica, influencia no desenvolvimento de uma forma mais leve ou mais grave da doença (Thisyakorn & Thisyakorn, 2014).

Após infecção por um dos sorotipos do DENV, o indivíduo torna-se imune a uma infecção subsequente causada por antígenos homólogos. A proteção cruzada contra antígenos heterólogos parece acontecer apenas por um período curto (Ishikawaa, 2014; Thisyakorn & Thisyakorn, 2014). Por estes motivos as vacinas para DENV devem ser tetravalentes e, no futuro, pentavalentes, o que torna o desenvolvimento da vacina um desafio (Ishikawaa, 2014). Até o momento, várias vacinas têm sido desenvolvidas, a principal candidata atualmente já se encontra em testes de avaliação pré-clínica e clínica, considerada fase III (Amaku et al., 2012; Ishikawaa, 2014; Thisyakorn & Thisyakorn, 2014; Yauch & Shresta, 2014).

A primeira vacina tetravalente para DENV avaliada em ensaios clínicos foi de uma forma viva atenuada clássica desenvolvida na Tailândia, licenciada para Aventis Pasteur (atualmente Sanofi Pasteur); outra vacina clássica de vírus vivo atenuado foi desenvolvida nos EUA pelo Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed (WRAIR), licenciado para GlaxoSmithKline (GSK) (Guy et al., 2010; Lang, 2012). Recentemente, o

desenvolvimento e a avaliação da vacina viva atenuada foram retomados pela Universidade Mahidol, colaborando de forma independente com Chemo-Sero Instituto de Pesquisa Terapêutica (Kaketsuken, Japão) e Instituto de Vacinas da Índia, e estudos pré-clínicos deverão ser realizados ainda a partir deste ano. A vacina quimérica tetravalente, DENVax inicialmente desenvolvida pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Viragen, EUA e Takeda, Japão usando uma cepa atenuada do DENV-2 (16681-PDK53), como constituinte principal tem demonstrado ser bastante imunogênica e altamente segura (Ishikawaa, 2014; Thisyakorn & Thisyakorn, 2014). A vacina que contém o nucleotídeo atenuado, desenvolvida pelos institutos Nacional de Alergia e de Doenças Infecciosas (EUA) e o Laboratório de Saúde de Doenças Infecciosas (EUA) é uma vacina tetravalente baseada no DNA, contendo plasmídeos que codificam genes prM/E de quatro sorotipos do DENV, desenvolvida pelo Centro de Pesquisa Médica Naval dos EUA e Vical Inc (Ishikawaa, 2014). A Sanofi Pasteur ChimeriVax (CYD-TDV) é a vacina tetravalente em desenvolvimento mais avançada, até o momento, para os quatro sorotipos do vírus DENV (Fink & Shi, 2014).

1.6. CONTROLE DO VETOR

A partir das campanhas públicas iniciadas por Oswaldo Cruz (1902-1907), através de buscas ativas, o controle ao *Ae. aegypti* foi institucionalizado no Brasil, de forma sistematizada, tendo como foco a eliminação do mosquito. Essa campanha foi exitosa e notabilizou o seu idealizador, que se tornou o maior sanitarista brasileiro daquele século, interrompendo diversas epidemias de febre amarela urbana que ocorriam, e, conseqüentemente, impedindo a morte de milhares de pessoas. (Franco, 1968; Prata, 2000; Braga & Valle, 2007).

Depois dessa campanha de controle do *Ae. aegypti* houve um período silencioso das doenças transmitidas por este vetor, exceto nas regiões Norte e Nordeste, com poucos episódios sem grande importância epidemiológica nas outras regiões. Com o incentivo da Fundação Rockefeller, entre 1923 e 1940, foram executadas intensas campanhas de controle do *Ae. aegypti* nas américas. A partir de 1947 essas campanhas foram

coordenadas pelas Organizações Pan-Americana da Saúde e Mundial da Saúde em parceria com os governos dos países da América Latina. Em 1958, na XV Conferência Sanitária Pan-Americana, o Brasil foi oficialmente declarado livre do *Ae. aegypti*. A reinfestação ocorreu a partir de 1976, dez anos após as primeiras epidemias de dengue, com a entrada do sorotipo DENV-1, e em seguida, houve a sua dispersão pelo país. Alguns fatores contribuíram para o cenário atual, como a migração, a demografia, o crescimento desordenado das cidades, as condições precárias de saneamento básico e a falta de educação ambiental. Além desses fatores, o crescimento industrial e o aumento, sem controle, de embalagens e recipientes sem destino adequado possibilitaram a proliferação de *Ae. aegypti*, dificultando seu controle através das campanhas públicas (Franco, 1968; Prata, 2000; Braga & Valle, 2007).

Atualmente as ações de controle de mosquitos transmissores de doenças incluem o saneamento do meio ambiente, informação e educação da população, controle químico e biológico do vetor.

Até o momento, a maneira mais eficaz para o controle e a prevenção da doença tem sido o controle do vetor, através do uso de substâncias inseticidas e larvicidas e ações educativas para a eliminação definitiva de criadouros domiciliares e peridomiciliares (Tauil, 2002). No Brasil as principais estratégias usadas no controle vetorial são baseadas na utilização de produtos sintéticos como organofosforados (temefós) e piretróides (cipermetrina, deltametrina) que requerem monitoramento constante no seu manejo (Cunha et al. 2005). Porém, as populações de *Ae. aegypti* continuam em altas densidades (Braga & Valle 2007) e desenvolvendo tolerância a esses grupos de inseticidas. A resistência de populações de *Ae. aegypti* ao temefós foi registrada em várias regiões do Brasil (Beserra et al., 2007; Braga & Valle, 2007; Gambarra et al., 2013). Nos estados onde foi comprovada essa resistência adotou-se o uso do diflubenzuron que é um regulador de crescimento (Martins & Silva, 2004).

Faz-se necessário a pesquisa de novos produtos, eficazes e ecologicamente seguros. Nessa linha surgem as pesquisas de organismos larvicidas alternativos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* e plantas como potencial inseticida ao controle do *Ae. aegypti* (Arruda et al., 2003a; Pohlit et al., 2004; Silva et al. 2004; Furtado et al., 2005; Gomes et al., 2006; Silva et al., 2007; Simas et al., 2007; Geris et al., 2008; Guissoni et al., 2013; Lima et al., 2013; Dias & Moraes, 2014).

1.7 *Persea americana*

A *Persea americana* Mill (Lauraceae) popularmente conhecida como abacateiro, possui grande importância medicinal e econômica. A família Lauraceae, possui ampla distribuição nas regiões tropical e subtropical e inclui cerca de 50 gêneros e 2500 espécies. No Brasil ocorrem 25 gêneros e cerca de 400 espécies (Souza & Lorenzi, 2005; Lorenzi & Abreu, 2008).

Planta frutífera nativa do continente americano é encontrada desde o México, Guatemala e outros países da América Central até o Equador, Venezuela, Colômbia e Peru. Acredita-se que a planta tenha entrado na Amazônia, vinda do Peru na época pré-colombiana. Em 1809 o abacateiro entrou no Pará e hoje pode ser encontrado por toda costa Atlântica até o Rio de Janeiro e São Paulo (Falcão et al., 2001).

A *P. americana* é uma planta arbórea, mede de 6 a 20 m de altura, possui tronco reto de cor parda com ramos abundantes, copa ampla com folhas grandes, oblongas, alternas; as flores são pequenas, verde-amareladas ou branco-amareladas, dispostas em inflorescências do tipo cacho (Souza & Lorenzi, 2005).

O fruto é oval ou arredondado, comestível, de cor verde-amarelada (Alonso, 2004) e elevado teor nutricional, rico em gorduras, proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais. Sua semente parece ter atividade tóxica, larvicida (Rosalinda et al, 2014) e antifúngica (Brito et al., 2009; Leite et al., 2009).

As folhas possuem efeito antiviral (Almeida et al., 1998), antiinflamatório e analgésico (Adeyemi et al., 2002), anticonvulsivante (Ojewole et al., 2006) e regulador das taxas de glicose e colesterol no sangue (Brai et al., 2007) e pressão arterial (Owolabi et al., 2005). A infusão das folhas demonstrou atividade espasmogênica sobre o fêto de suínos e útero de ratas e efeito hipotensor e depressor do sistema respiratório destes animais.

Estudos com o fruto imaturo e a polpa demonstraram eficácia no tratamento antitumoral (Alonso, 2004), além de desempenharem um efeito larvicida (Rosalinda et al, 2014) mais potente que a rotenona (inseticida usado no combate a mosquitos) contra larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Carvalho et al., 2011; Geris et al., 2012)

1.8 MORFOLOGIA DO TUBO DIGESTIVO DE LARVAS *Aedes aegypti*

O tubo digestivo das larvas do *Ae. aegypti* apresenta aspecto cilíndrico contínuo, com três regiões distintas: estomodeu ou intestino anterior, mesêntero ou intestino médio e proctodeu ou intestino posterior; inicia-se nos cecos gástricos e termina na válvula pilórica. O intestino anterior subdivide-se em faringe e esôfago, e as células de revestimento são semelhantes às células pavimentosas. Após a porção final do esôfago inicia-se o intestino médio, formado por um longo tubo simples com a presença dos cecos gástricos ou entéricos, dispostos lateralmente, representando 2/3 do total do tubo digestivo (Snodgrass, 1997; Forattini, 2002). Essa região, por sua vez, subdivide-se em três partes de acordo com suas características morfohistológicas (Arruda et al., 2003; Barreto et al., 2006, Valotto et al. 2010; Valotto et al.,2011). As células epiteliais de revestimento são cúbicas e apresentam-se justapostas em uma única camada de diferentes tamanhos, com padrão poliédrico, limites distintos, possuem núcleo arredondado e centralizado, e estão apoiadas em uma membrana basal. (Arruda et al., 2003; Barreto et al., 2006, Valotto et al. 2010; Valotto et al.,2011).As células do mesêntero apresentam intensa atividade secretora, sendo responsável pela formação de uma membrana extracelular, fina, transparente, de formato tubular que separa todo conteúdo intestinal do epitélio, denominada, matriz peritífica, atuando como barreira protetora Toda a luz intestinal é envolvida por essa membrana, composta principalmente por proteína, quitina e mucopolissacarídeos (Richards & Richards, 1977; Snodgrass, 1997; Cavalcante & Cruz-Landim, 1999). A principal função da matriz peritrófica é a de proteção das células do intestino médio, contra qualquer partícula ou substância que eventualmente as danifiquem, sendo permeável a sais inorgânicos e açúcares e impermeável a moléculas maiores. Quando há ingestão de substâncias tóxicas, químicas e biológicas pelas larvas, esta membrana é eliminada como forma de proteção e desintoxicação (Arruda et al., 2003; Barreto et al., 2006, Valotto et al. 2010; Valotto et al.,2011).

Entre o intestino médio e posterior, encontramos a válvula pilórica, onde se inserem os túbulos de Malpighi. O intestino posterior, na maioria dos insetos divide-se em três regiões denominadas de íleo, cólon e reto. Externamente, o tubo digestivo é envolvido por fibras musculares longitudinais e circulares com função de controlar o movimento do conteúdo intestinal (Forattini, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A dengue é uma doença grave que atinge atualmente, várias regiões do mundo, com enorme impacto na saúde pública. As dificuldades de se encontrar uma vacina que atinja todos os sorotipos do vírus, a ausência de tratamento específico, a tolerância do mosquito aos inseticidas, as condições precárias de saneamento básico em regiões endêmicas e a falta de adesão da população aos programas de controle vetorial, tornam a erradicação da doença uma tarefa difícil. Até o momento, o controle do vetor tem sido a intervenção mais utilizada para quebrar a cadeia de transmissão de dengue. O uso contínuo de inseticidas químicos sintéticos tem gerado uma pressão constante sobre populações de mosquitos, e o resultado disso tem sido o aparecimento de tolerância às substâncias empregadas, exigindo estudos constantes de prospecção de novos compostos químicos candidatos ao uso no controle vetorial. Outro ponto importante a ser considerado é o risco de contaminação dos seres vivos e meio ambiente, exigindo dos pesquisadores a busca de produtos ecologicamente seguros. Diante deste contexto, buscou-se neste trabalho o estudo de um produto natural com propriedades larvicidas, de baixo impacto ambiental e pouco ou nenhum risco à população, extraídos da casca de caule da planta frutífera *P. americana*, que poderá vir a ser um candidato alternativo no controle do *Ae. aegypti*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Prospecção de compostos vegetais com atividade inseticida.
- Testar e verificar a ação provocada pelo extrato bruto etanólico da casca de caule de *P. americana* sobre larvas de *Ae. aegypti*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evidenciar as modificações morfohistológicas nas larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*, devido à ação inseticida, através de análises em microscopia de luz
- Microscopia eletrônica de varredura.
- Evidenciar a ação do ebe de *P. americana* sobre larvas de *Ae. aegypti* em diferentes tempos de exposição (24 e 48 h).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das larvas

Larvas de *Ae. aegypti* foram obtidas da criação do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG). A criação é mantida em câmara biológica climatizada, com temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80\pm 1\%$ e fotofase de 12h (Silva et al., 1998). Para os ensaios foram utilizadas larvas de 3º estágio por serem mais resistentes.

4.2 Obtenção do extrato bruto etanólico (ebe) de *P. americana*

Após a prospecção de compostos de várias plantas guiada por bioensaios, evidências da ação larvicida foram encontradas com o extrato bruto etanólico obtido de *P. americana*. Uma amostra de flores e folhas foi encaminhada ao herbário do Departamento de Botânica da UFG que, após a identificação, recebeu o registro com o nº 43.394 (Carvalho et al., 2011).

A casca do caule de *P. americana* (Figura 3) foi colhida e encaminhada ao laboratório de Bioatividade de Plantas do IPTSP da UFG. Inicialmente foi feita a secagem do material em estufa com ventilação forçada, a 40°C , e depois moído, em moinho de facas até obter fina granulometria. Após moagem, 1 kg do pó foi colocado em frasco tipo becker, contendo 3L de etanol (PA) e homogeneizado com agitador mecânico. Em seguida, o recipiente foi coberto com papel alumínio para evitar a evaporação do etanol e possível interferência da luz, permanecendo em repouso por 72h para percolação. Após este período o sobrenadante foi filtrado em funil de vidro com papel filtro comum, obtendo-se ao final da filtragem 1,5L de extrato etanólico de coloração caramelo escuro, o qual foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo. O extrato bruto etanólico (ebe) obtido foi transferido para placas de Petri (Figura 4A) para secagem em capela de exaustão, à temperatura ambiente e, logo após secagem, armazenado em freezer vertical a -4°C . Ao final do processo de extração obteve-se 81,84g de ebe.



Figura 3. *Persea americana* (abacateiro). A - aspectos das folhas. B – aspectos dos frutos. C - aspectos do caule. D – casca do caule.

Para o preparo da solução teste, o ebe de *P. americana* foi pesado em balança analítica com a precisão de 0,0001g e solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). A quantidade de solvente utilizada para o preparo da solução foi previamente determinada por ensaios de tolerância das larvas ao solvente. Observou-se tolerância até a proporção de 2,0 mL de DMSO para 25 mL de água.

4.3 Ensaios

Os ensaios foram realizados no laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos do IPTSP/ UFG e no Laboratório de Estudos Morfológicos (LABEM), do Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular do ICB da UFG. A solução mãe de ebe, a 100 ppm, foi preparada em água de rede pública de abastecimento (Figura 4B), após experiência piloto de letalidade. Usou-se para os ensaios, copos de poliestireno branco,

tanto para tratados quanto para controle. Em cada copo foram colocados 25mL de solução a 100 ppm, e 5 larvas de terceiro estágio, imediatamente após a muda, por se tratarem de larvas mais resistentes para tais estudos (Silva et al., 1998; Silva et al., 2003). As larvas foram deixadas na solução larvicida por um período de até 48h (Figura 4C e D) para observação da letalidade, mobilidade e reações a estímulos como foco de luz e toque na parte externa do recipiente. As coletas foram realizadas com 0; 4; 8; 12; 16; 20; 24 e 48h de tratamento com o objetivo de visualizar possíveis alterações nestes intervalos de tempo. Foram coletadas apenas as larvas que apresentavam estado letárgico. As larvas foram mantidas em incubadora BOD 411, a uma temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $80\pm 1\%$ durante todo o período dos experimentos. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. (Carvalho et al., 2011).

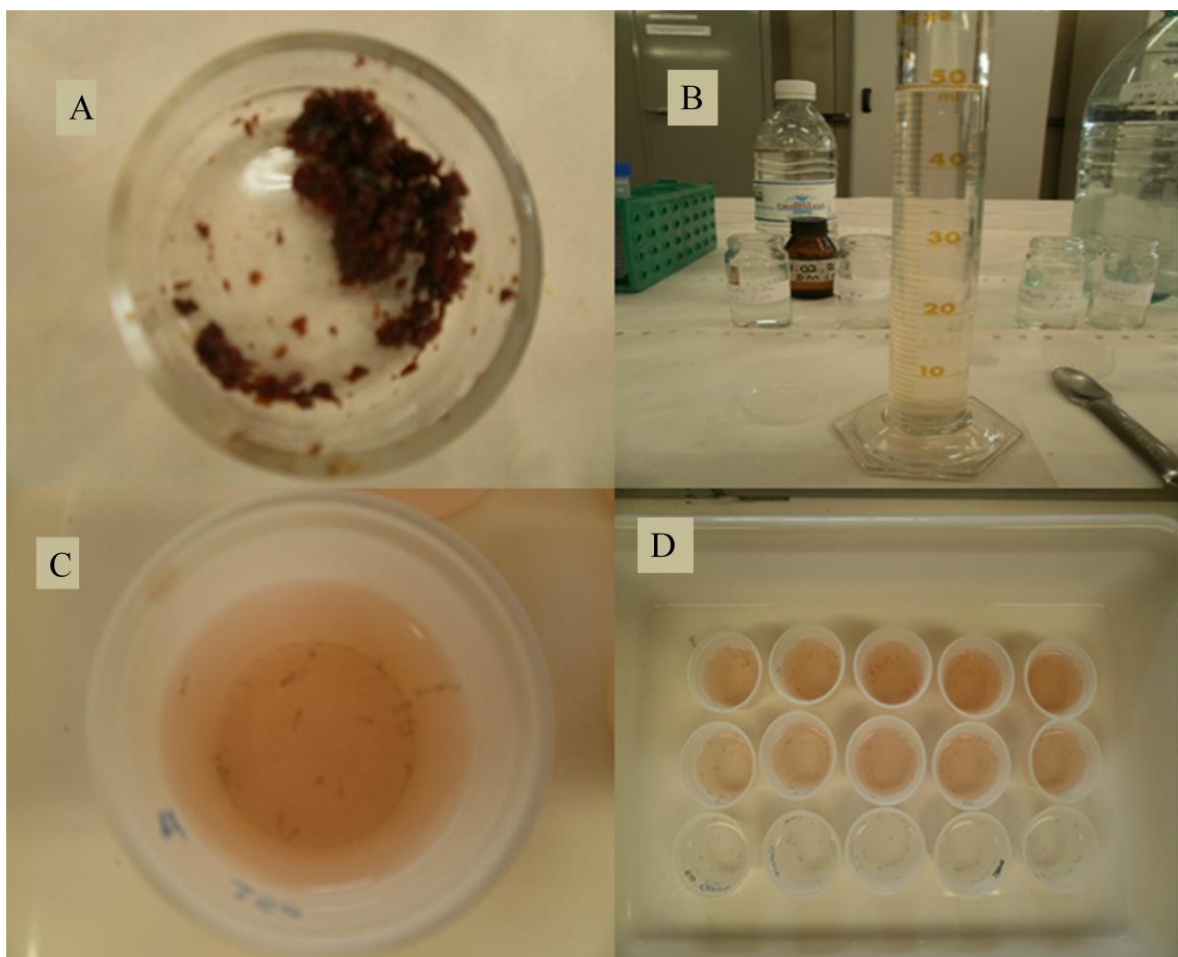


Figura 4. Extrato bruto etanólico (ebe) de *Persea americana*. A - aspecto do ebe da casca de caule. B - solução do ebe a 100ppm. C - copo de poliestireno, contendo 25 mL da solução com larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*. D - Ensaio.

4.4 Microscopia de luz

Para a microscopia de luz, tanto as larvas tratadas, quanto as larvas controles foram colocadas em tubos tipo *ependorff*, contendo aproximadamente 200 μ L de solução fixadora, constituída por 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M pH 7,2 e deixadas *overnight* em geladeira à temperatura de 4°C. Após este período, a solução fixadora foi completamente retirada com pipeta Pasteur e em cada tubo foram colocados 200 μ L de solução tampão cacodilato de sódio a 0,1M, lavadas por quatro vezes, por 10 minutos. A desidratação foi realizada em série gradual de etanol (30-100%) onde as larvas permaneceram por 10 minutos em cada solução de etanol. Em seguida, foram embebidas em solução infiltradora (resina básica e ativador), permanecendo por um período de 12h a temperatura ambiente. O material assim preparado foi incluído em resina de inclusão, preparado segundo fabricante *Leica Histo-resin Embedding Kit*, na proporção 15/1, colocado em moldes de polietileno e deixado a temperatura ambiente até completa polimerização. Os blocos de resina foram colados sobre pequenos suportes de madeira, usando resina epoxi. Cortes finos, com espessura de 3 μ m, foram feitos em micrótomo semi-automático com lâmina de tungstênio (Leica RM 2245) (Figuras 5 A, B, C e D), distendidos em recipiente com água à temperatura ambiente, colocados sobre lâmina de vidro, permanecendo assim até completa secagem. Em seguida as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (HE) (Arruda et al., 2003b).

Após coloração as lâminas foram montadas com lamínula e entellan, em capela de exaustão e levadas ao microscópio de luz para análise e fotomicrografia (Arruda et al., 2003b). As lâminas preparadas pela técnica de histo-resina foram fotomicrografadas em computador acoplado com câmera fotográfica Olympus BX41/MOTICAM 2500 5.0 Pixel USB 2,0 e softwear Motic Images Plus, no formato TIFF. As análises das alterações morfohistológicas foram realizadas no LABEM do ICB/UFG.



Figura 5. Processamento das amostras para microscopia de luz. A - lavagem e fixação das larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*. B – desidratação das larvas. C - infiltração e inclusão das larvas em resina. D - corte dos blocos de resina em micrótomo.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura

Para microscopia eletrônica de varredura, as larvas foram fixadas em 2% de paraformaldeído, 2% glutaraldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2; lavadas em tampão cacodilato de sódio a 0,1M 4 vezes por 10 minutos; desidratadas em série crescente de etanol (30-100%) quatro vezes por 10 minutos cada; colocadas em porta amostras (Figura 6A) e levadas ao aparelho de ponto crítico (Autosamdri 815) (Figura 6B) para completa secagem do material. Ao serem retiradas do aparelho de ponto crítico as amostras foram coladas em suportes de alumínio (stubs) (Figura 6C) com fita de carbono dupla face, na posição desejada e levadas ao aparelho (Dentum Vacuum/Desk V) para metalização em ouro (Figura 6D). Ao final do processo de metalização as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura para serem feitas as análises. Todo o processo para realização da microscopia eletrônica de varredura foi realizado no LABEM

do ICB/UFG e no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da UFG.

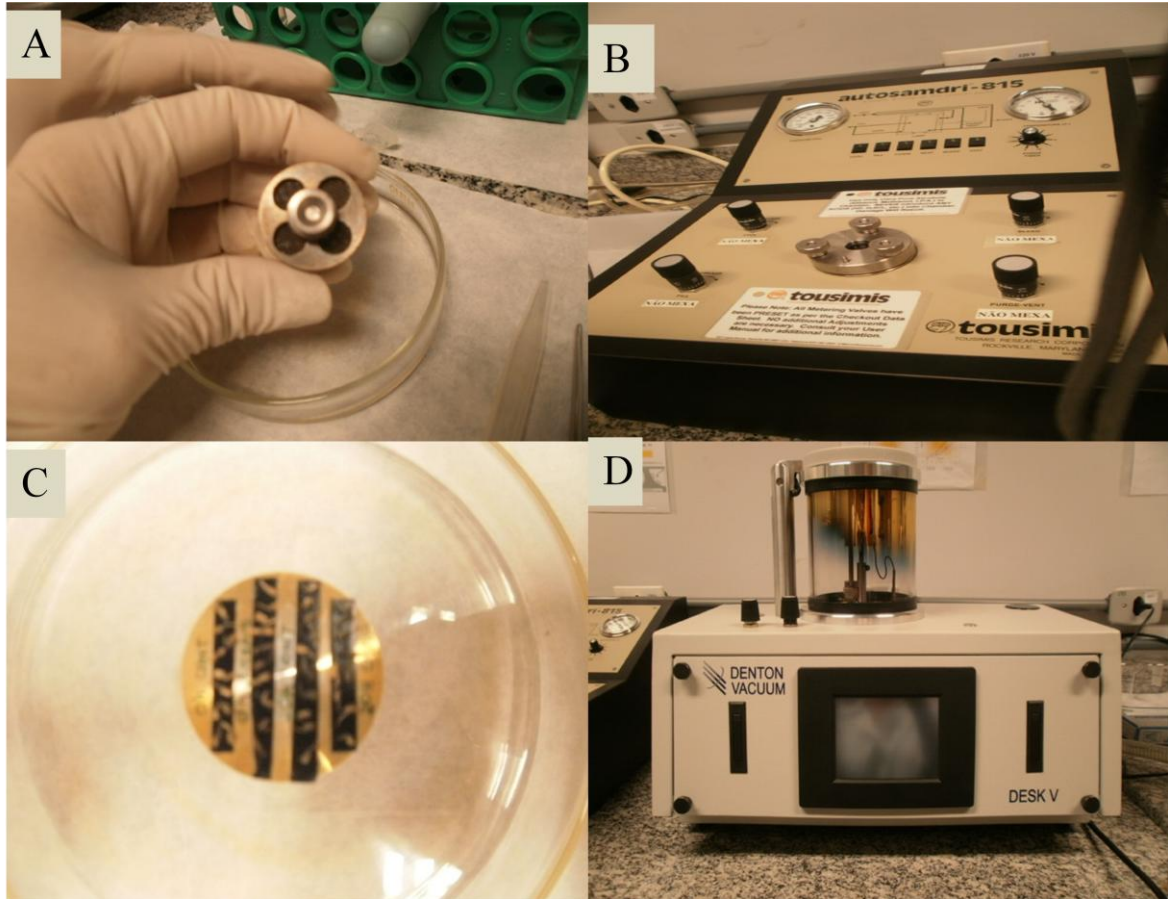


Figura 6. Processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura. A - porta amostras. B - aparelho de ponto crítico. C - stubb contendo as amostras a serem analisadas no microscópio eletrônico de varredura; D - aparelho para metalização das amostras.

5 RESULTADOS

5.1 Observações à fresco

Nas observações a fresco sob estereomicroscópio, as larvas do grupo controle apresentaram aspecto alongado, fusiforme e com corpo dividido em três segmentos distintos e transparentes, cabeça, tórax e abdômen. Cabeça e tórax de aspecto globoso, arredondado e o abdômen de aspecto alongado formado por oito segmentos. Ao longo do corpo larval foi observada a presença de várias cerdas dispostas simetricamente e na porção final foi observado o sifão respiratório curto e tubular (Figura 7A).

As larvas apresentavam movimentos rápidos e em forma de S mesmo após o período de 24 h.

As larvas submetidas ao tratamento com ebe da casca do caule de *P. americana* observadas após o período de 24 h não apresentaram alterações morfológicas externas, porém várias delas expulsaram o conteúdo alimentar presente no tubo digestivo envolto pela matriz peritrófica (Figura 7B). A extrusão não foi observada nas larvas do grupo controle.

Houve diminuição da mobilidade destas larvas quando imersas na solução de ebe de *P. americana* por mais de 12 h, até se tornarem completamente letárgicas com o passar das horas.

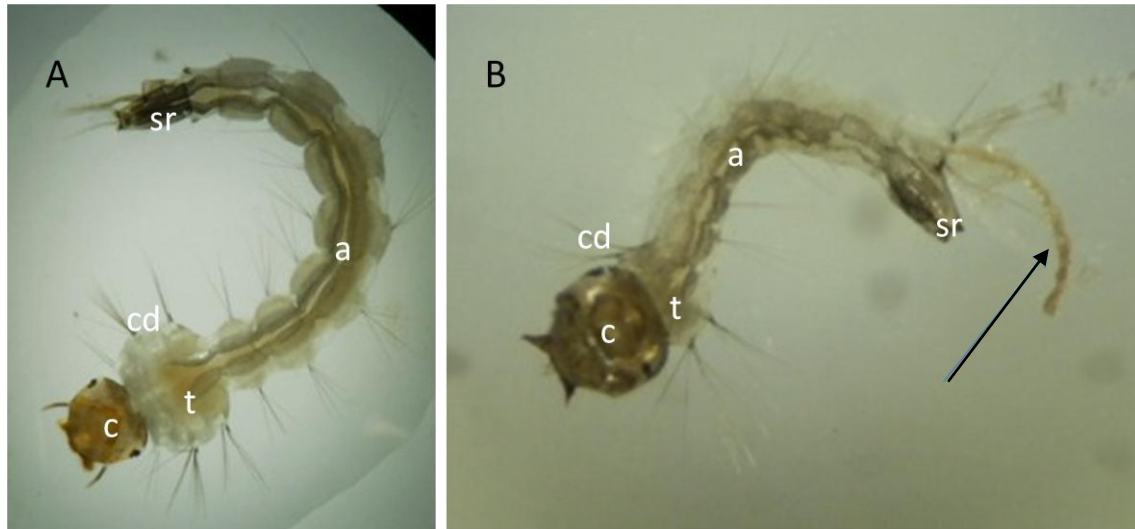


Figura 7. Larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*. observadas sob estereomicroscópio. A – grupo controle. B – tratadas com ebe de casca de caule de *Persea americana*. Cabeça (c), tórax (t), abdômen (a), sifão respiratório (sr), cerdas (cd); extrusão da matriz peritrófica (seta).

5.2 Análises Histológicas

As análises dos cortes longitudinais de larvas do grupo controle (Figuras 8 A e B, Figuras 9 A e B) demonstraram que as células epiteliais constituintes da parede do intestino apresentaram aspecto normal sem alteração citoplasmática e nuclear, com células de diferentes tamanhos, apresentando padrão poliédrico, limites distintos, e parede celular íntegra bem delimitada. A cutícula se apresentou de forma íntegra sem nenhuma alteração com células dispostas de maneira contínua e organizadas. Uma fina membrana denominada matriz peritrófica revestiu todo o conteúdo alimentar no interior do intestino.

O tubo digestivo das larvas apresentou três regiões distintas, estomodeu (intestino anterior), mesêntero (intestino médio) e proctodeu (intestino posterior). As células epiteliais de revestimento do estomodeu estavam dispostas em uma única camada de células cilíndricas baixas, citoplasma heterogêneo com regiões mais e menos acidofílicas, e núcleo esférico (Figura 8A e B). A região mediana do mesêntero apresentou células epiteliais cúbicas a cilíndricas, dependendo da atividade celular, com citoplasma acidofílico e núcleos esféricos (Figura 9 A e B). A região posterior do mesêntero apresentou células um pouco mais baixas, quando comparadas às células de revestimento

do mesêntero, com citoplasma basofílico e núcleo basal e esférico. A superfície celular desta região apresentou, espessa borda em escova na superfície apical (Figura 9 B).

Os cortes histológicos de larvas do grupo tratado com ebe da casca do caule de *P.americana* mostraram várias alterações, principalmente nas regiões mediana e posterior do mesêntero. As análises foram realizadas levando-se em consideração o tempo de exposição ao extrato. No grupo tratado com 4, 8, 12, 16 e 20h de exposição ao ebe, nenhuma alteração foi observada. As alterações evidentes apareceram nas larvas a partir de 24h de exposição ao ebe.

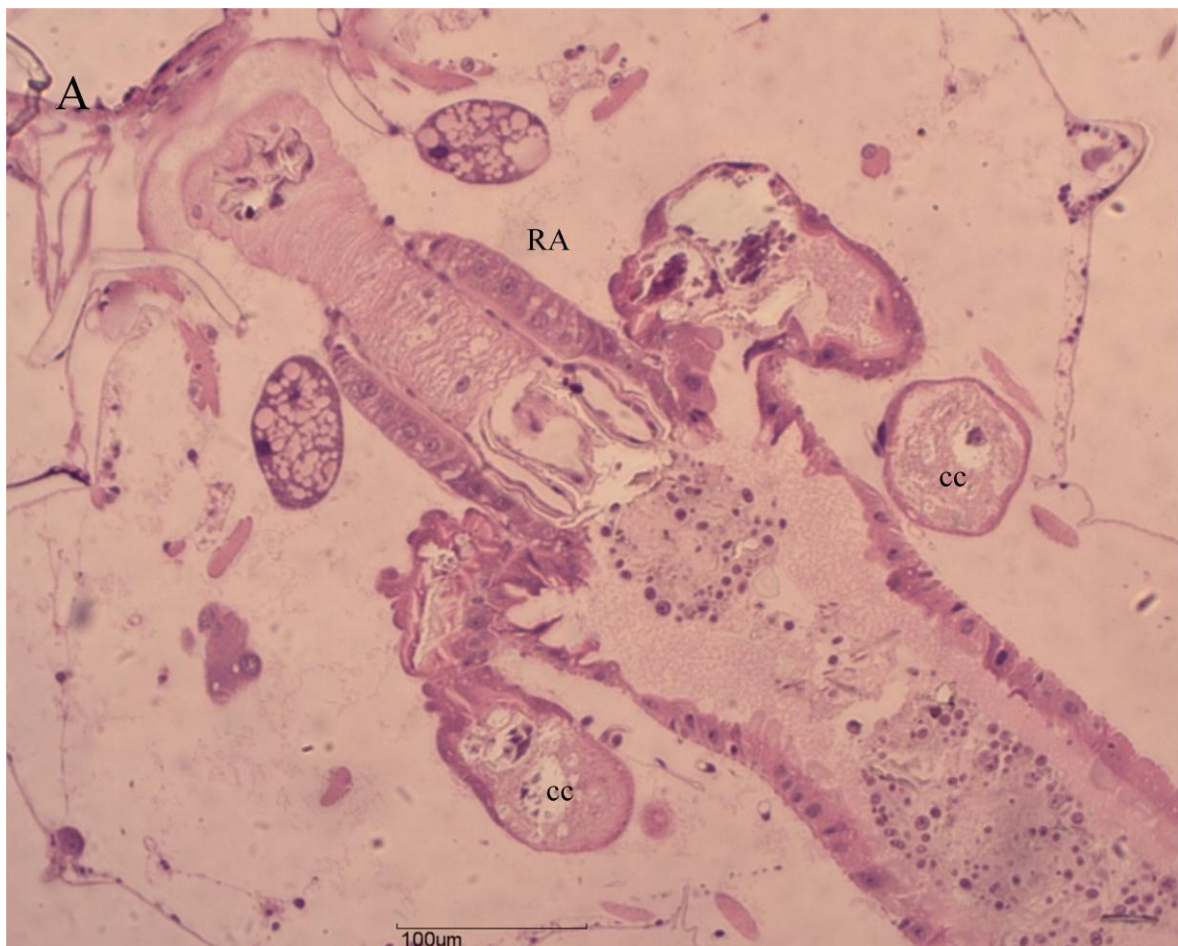


Figura 8. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. A - região anterior do intestino (IA), cecos (cc). HE 100µm.



Figura 8. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. B - região anterior (RA) e média do mesêntero (RM); ceco (cc); células epiteliais (ce); alimento (al); cutícula íntegra (ct). Observar a aparência normal das células epiteliais (ce) justapostas e presença de vesículas de secreção (setas). HE 100 μ m.



Figura 9A. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. A - região média do mesêntero (RM); ceco (cc); células epiteliais (ce); alimento (al); cutícula íntegra (ct). Observar a aparência normal das células epiteliais (ce) justapostas e presença de vesículas de secreção (setas). HE 100 μ m.

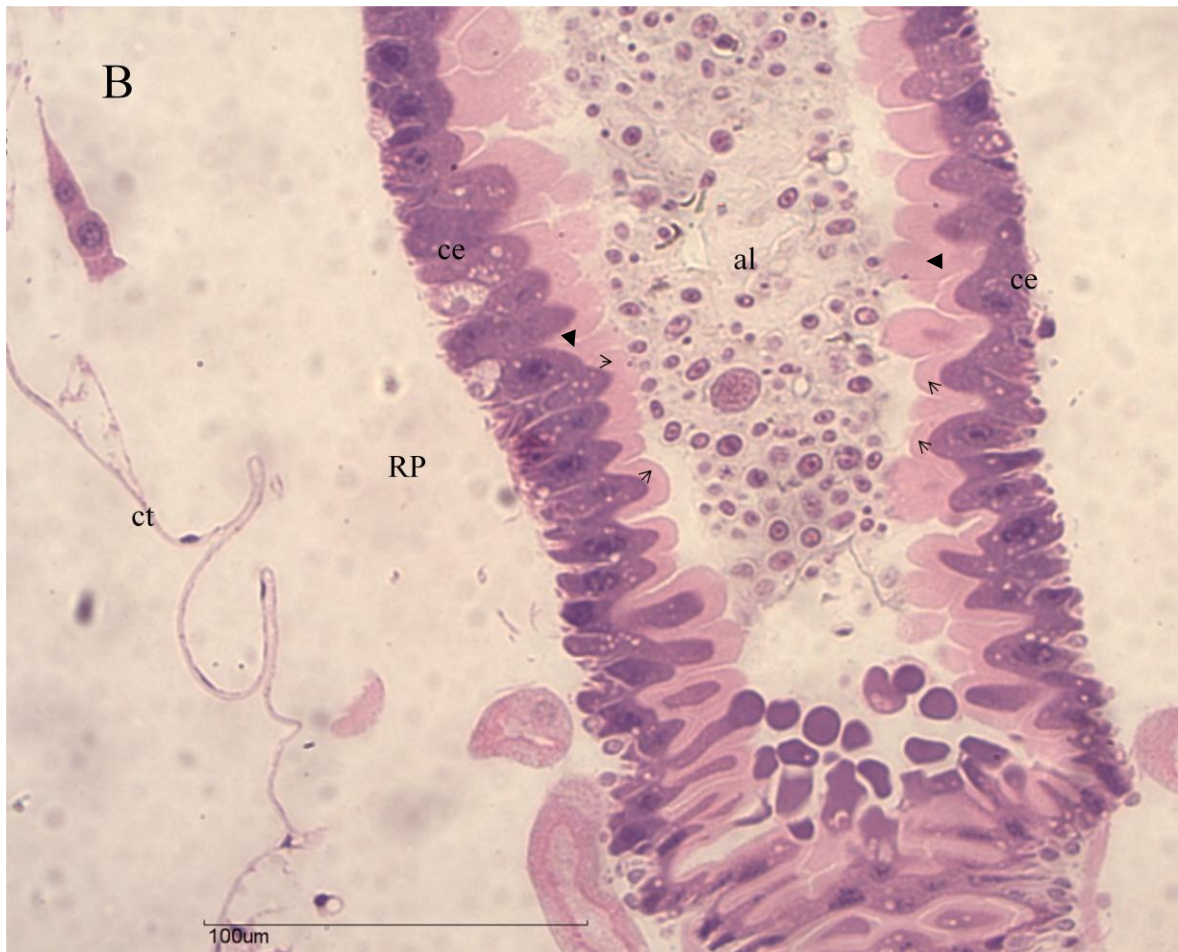


Figura 9B. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. B - região posterior do mesêntero (RP); células epiteliais (ce), alimento (al) e espessa borda em escova (ponta de seta).HE 100µm.

Entre 20 e 24h na solução de ebe, as larvas tornavam-se letárgicas (paradas no fundo do recipiente) movendo-se apenas quando submetidas a algum estímulo externo (luz e toque). Antes que perdessem completamente o movimento as larvas foram transferidas para a solução fixadora, para não interferir nos resultados da destruição celular pós-morte. Na análise dos cortes histológicos de larvas tratadas por 24h com ebe de casca do caule de *P. americana*, observou-se a presença de grande quantidade de vesículas secretoras de forma ovalada e/ou arredondadas nas células epiteliais na região mediana do mesêntero (Figura 10 A e B). Os núcleos destas células apareceram com formato arredondado, altamente corados em relação ao controle (Figura 10A) e com nucléolo evidente. O citoplasma destas células apresentaram estruturas esféricas, cromatina pouco condensada de coloração rósea (Figura 10C). Neste mesmo tempo de tratamento também foram visualizadas alterações na cutícula que apresentou aspecto irregular e sinuoso e as células

com aspecto frouxo (Figura 10 C). perdendo sua característica compacta, uniforme e contínua.

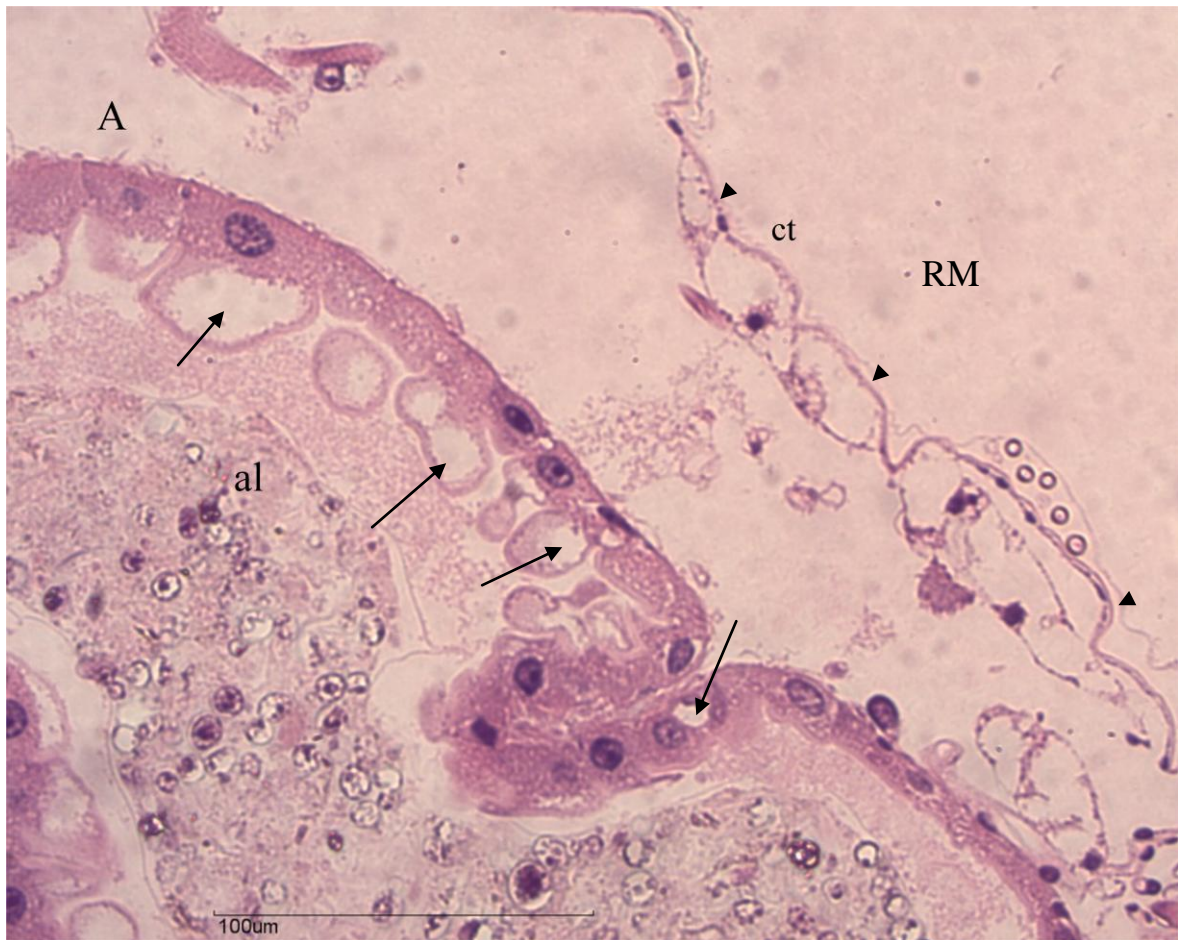


Figura 10A. Fotomicrografias da região média do mesêntero (RM) de larvas de *Aedes aegypti* do grupo tratado com ebe de casaca de caule de *Persea americana* após 24h, corados por hematoxilina/eosina. A - presença de grande quantidade de vesículas de secreção (setas), junto às células epiteliais (ce), alimento (al), cutícula (ct) envolvendo todo o corpo da larva (ponta de seta) apresenta-se de forma frouxa e irregular. HE 10µm
HE 10 µm.

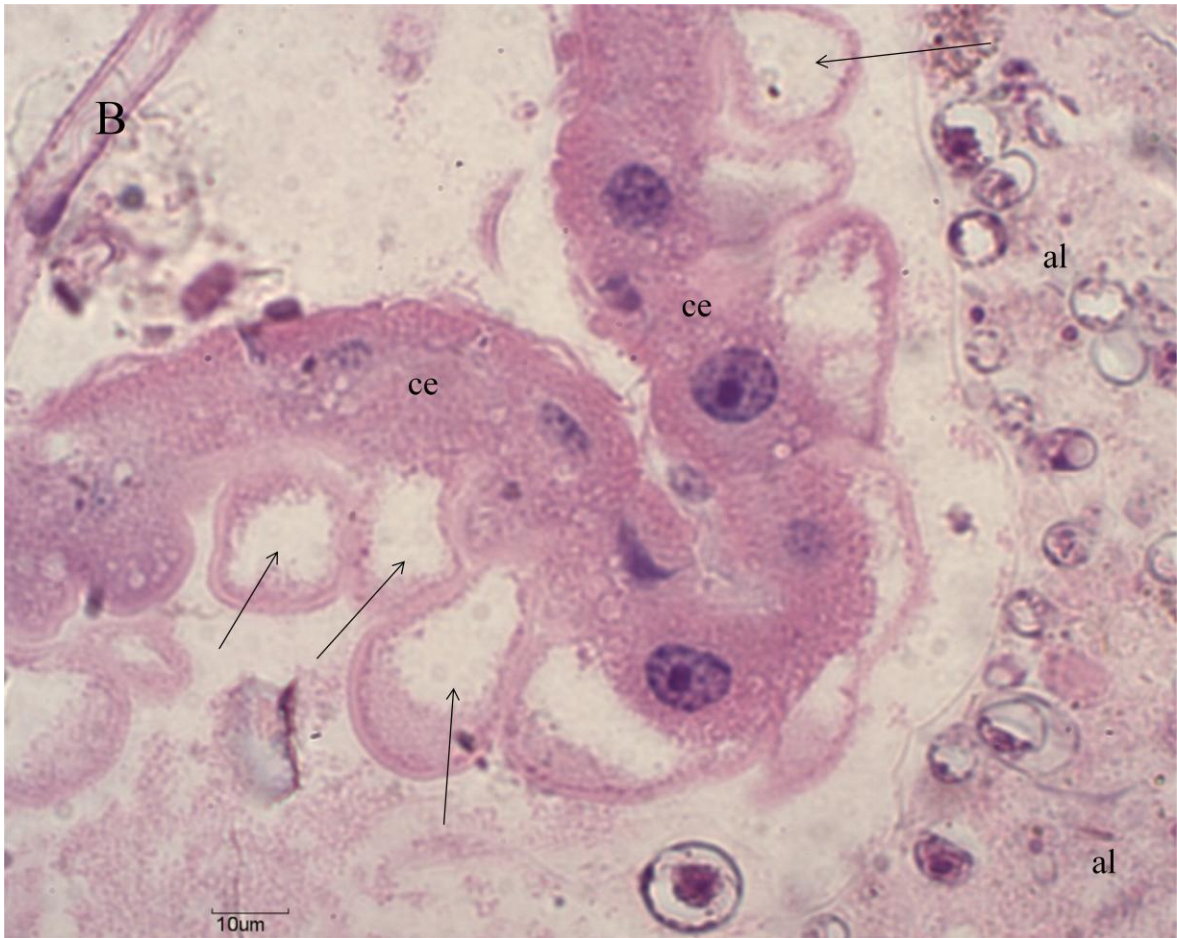


Figura 10B. Fotomicrografias da região média do mesêntero (RM) de larvas de *Aedes aegypti* do grupo tratado com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 24h, corados por hematoxilina/esosina. B - região média do mesêntero, mostrando vesículas de secreção.

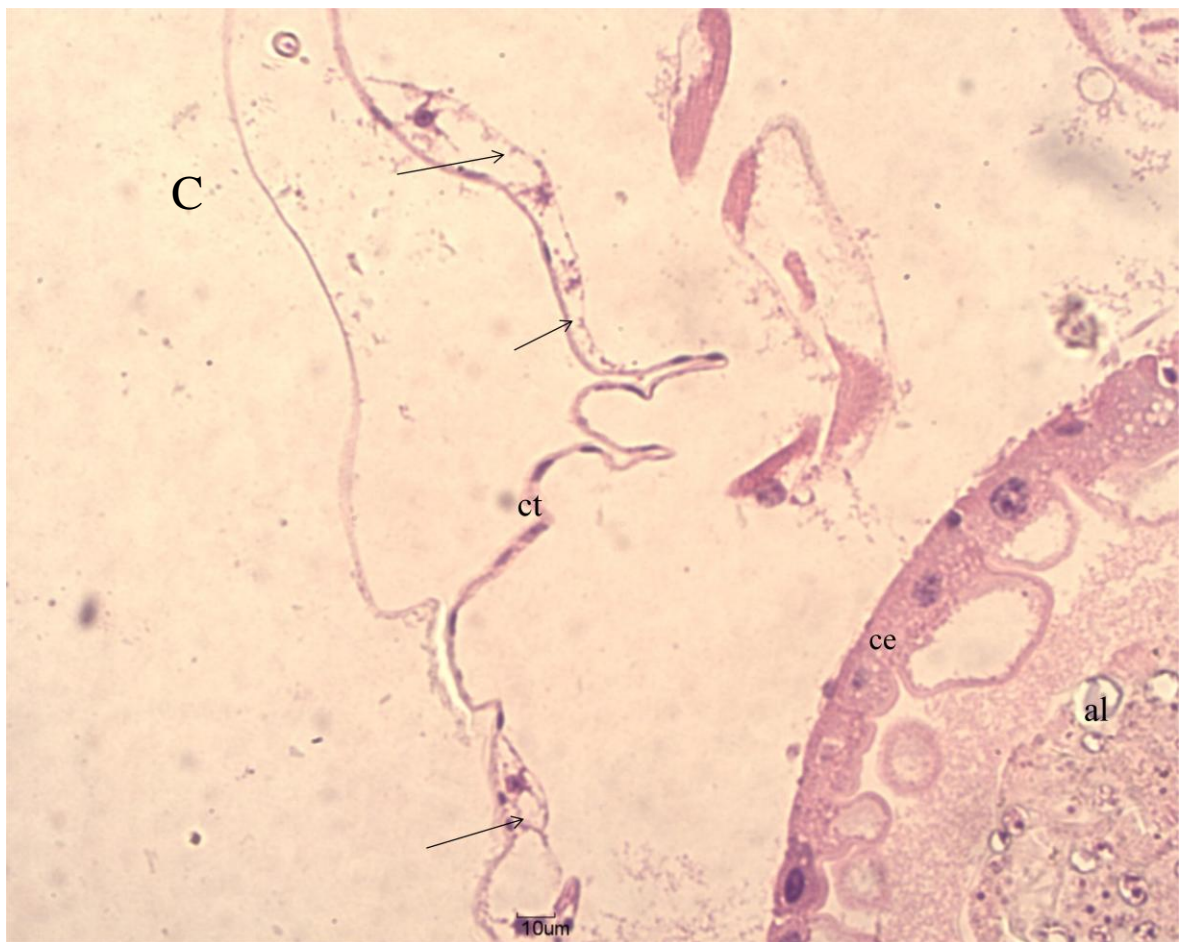


Figura 10C. Fotomicrografias da região média do mesêntero (RM) de larvas de *Aedes aegypti* do grupo tratado com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 24h, corados por hematoxilina/eosina. C cutícula (ct) envolvendo todo o corpo da larva (setas) apresenta-se de forma frouxa e irregular. HE 10µm.

As células epiteliais da região posterior do mesêntero apresentaram-se mais baixas, porém mantendo a presença de borda em escova (Figuras 9 B). A presença de vacúolos e núcleos disformes pôde ser evidenciada nas células desta região junto às microvilosidades (Figura 9A e 9B), o epitélio deixa de possuir aspecto uniforme e as células apresentam alturas e espessuras diferentes.

Nas análises realizadas nas larvas após 48h de tratamento com ebe da casca do caule de *P. americana* as alterações observadas foram mais intensas. Observou-se a presença de inúmeros vacúolos e aumento do espaço subperitrófico entre as células

epiteliais e a matriz peritrófica, a partir da região anterior do mesêntero até a parte final (Figuras 11, 12, 13 e 14).

As células epiteliais da região anterior do mesêntero apresentaram sua porção basal mais clara e núcleo deslocado da parte central, indicando a ação do ebe de *P. americana* (Figuras 12 e 13). Estas células apresentaram citoplasma com intensa vacuolização e aspecto mais alto. No detalhe da Figura 13 podemos observar a aparência espumosa destas células, devido à fusão de vários vacúolos maiores, dispostos irregularmente no citoplasma celular.

O espaço subperitrófico aumentou e promoveu a constrição da matriz peritrófica juntamente com o conteúdo alimentar (Figuras 13 e 14), processo acompanhado por uma grande sinuosidade no tubo digestivo associada às dobras do corpo da larva, evidenciadas através da cutícula enrugada como pode ser observado nas Figuras- 13,14 e 15. Essa situação provavelmente antecedeu à extrusão da matriz peritrófica e o conteúdo tóxico ingerido e absorvido pelas células da região (Figura 15). A região posterior do mesêntero demonstrou o aspecto alongado das células epiteliais e as células que constituem a cutícula do exoesqueleto da larva apresentaram-se de forma frouxa e irregular (Figuras 11 A e B)

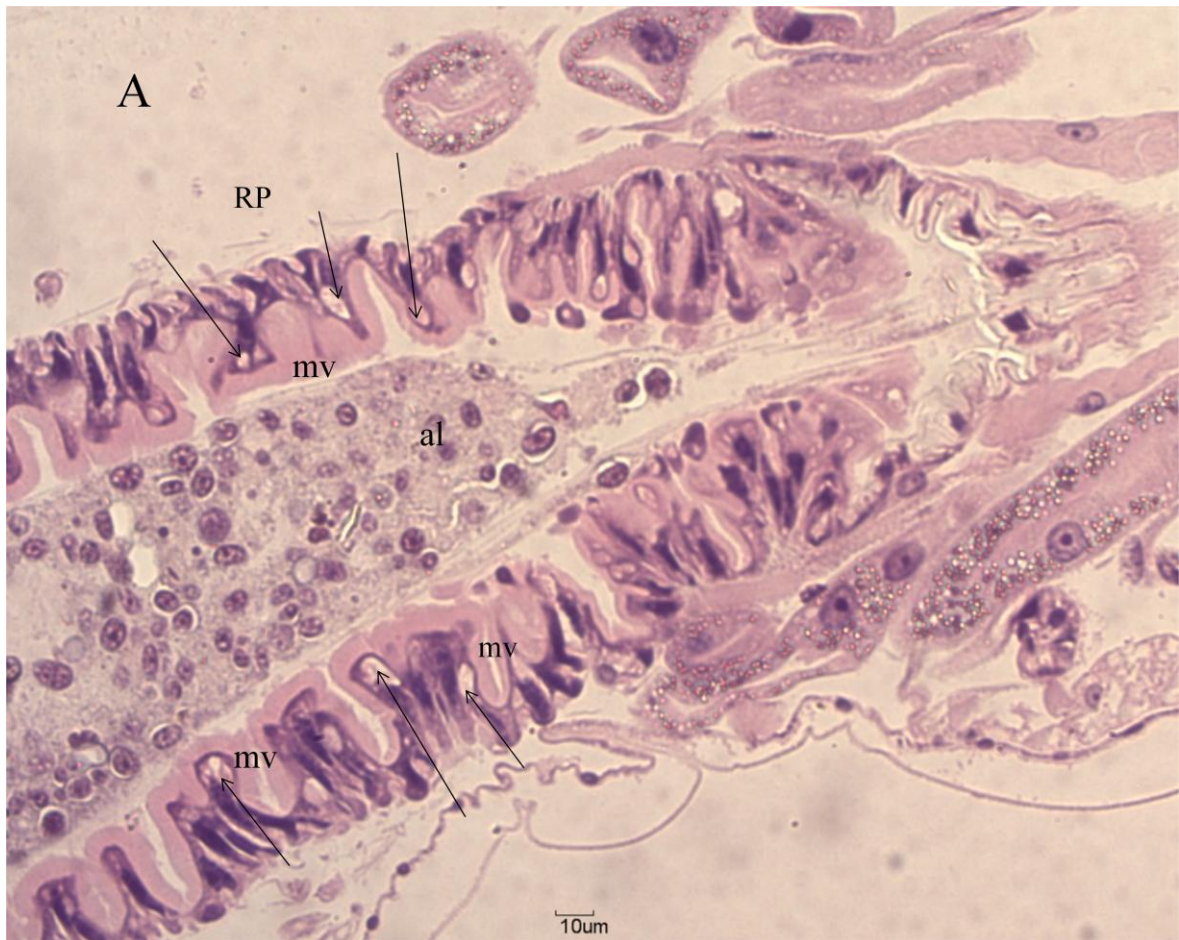


Figura 11A. Fotomicrografia da região posterior do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com o ebe de casca do caule de *Persea americana* por 24h. A - região posterior de mesêntero (RP) evidenciando, a presença das células epiteliais alteradas e vacuolizadas com citoplasma de aspecto espumoso e núcleos disformes e deslocados do centro (setas), alimento (al), cutícula (ct), microvilosidades (mv). HE 10 μm.

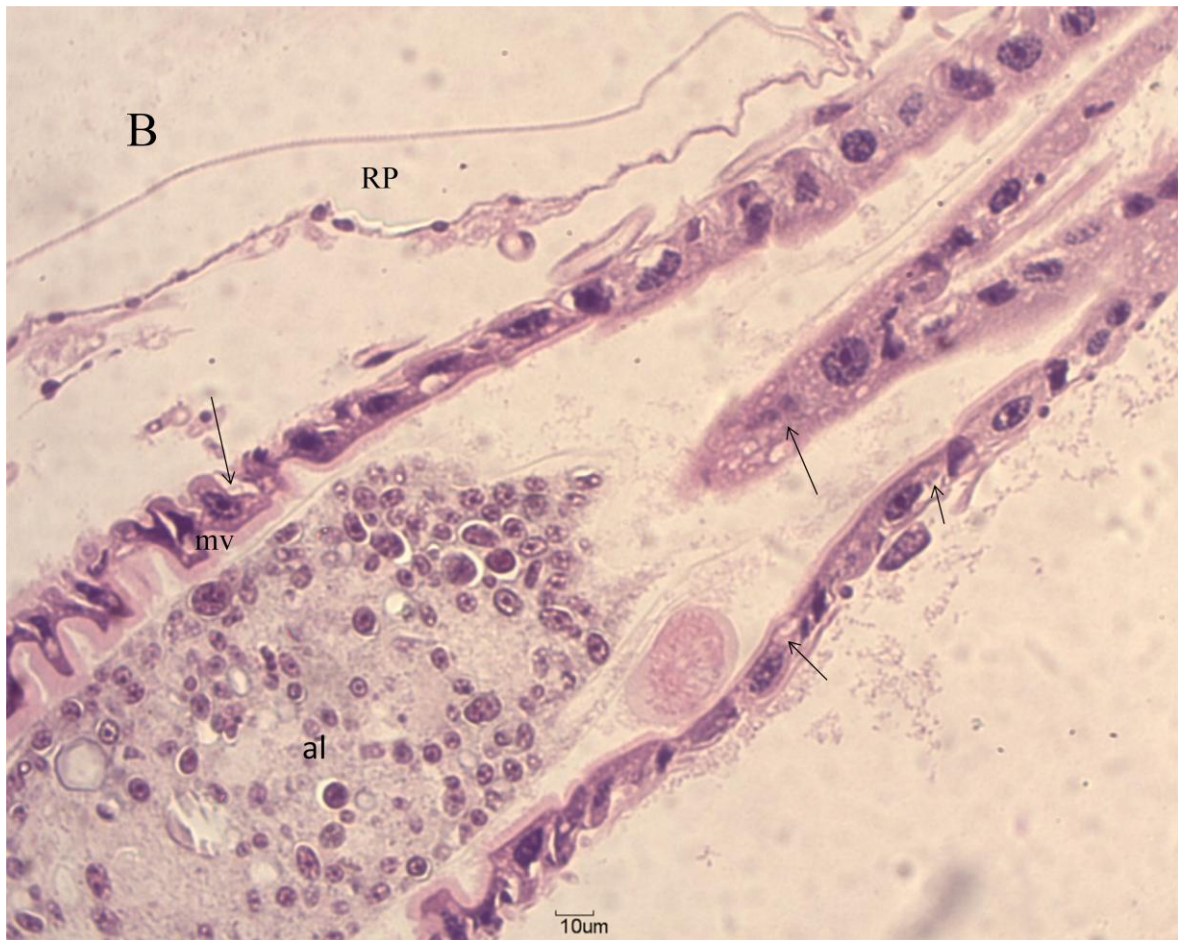


Figura 11B. Fotomicrografia da região posterior do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com o ebe de casca do caule de *Persea americana* por 24h. B - região posterior de mesêntero (RP) evidenciando, a presença das células epiteliais alteradas e vacuolizadas com citoplasma de aspecto espumoso e núcleos disformes e deslocados do centro (setas), alimento (al), cutícula (ct), microvilosidades (mv). HE 10 μ m.



Figura 12. Fotomicrografia do mesêntero de larvas terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 48h. Região anterior do mesêntero, evidenciando o aumento do espaço subperitrófico (sbp) e alimento (al). Notar a presença de pequenos vacúolos nas células epiteliais (setas), cecos gástricos (cc), cutícula (ct). HE 100 µm.

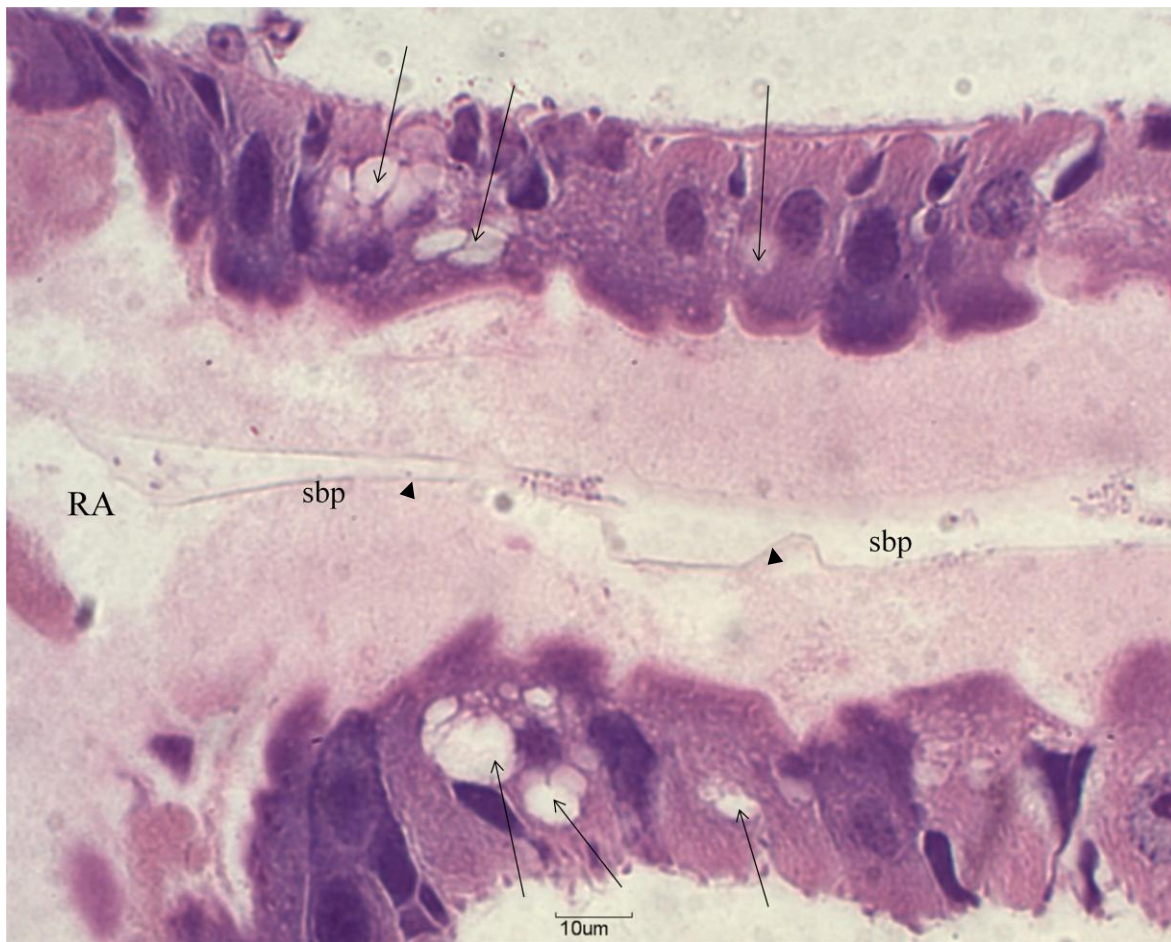


Figura 13. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe da casaca do caule de *Persea americana* após 48h. Detalhe da região anterior do mesêntero (RA), demonstrando o espaço subperitrófico aumentado (sbp), células epiteliais de aspecto espumo e vacuolizado com núcleos desviados do centro da célula (setas) e matriz peritrófica (ponta de seta). HE 100µm.

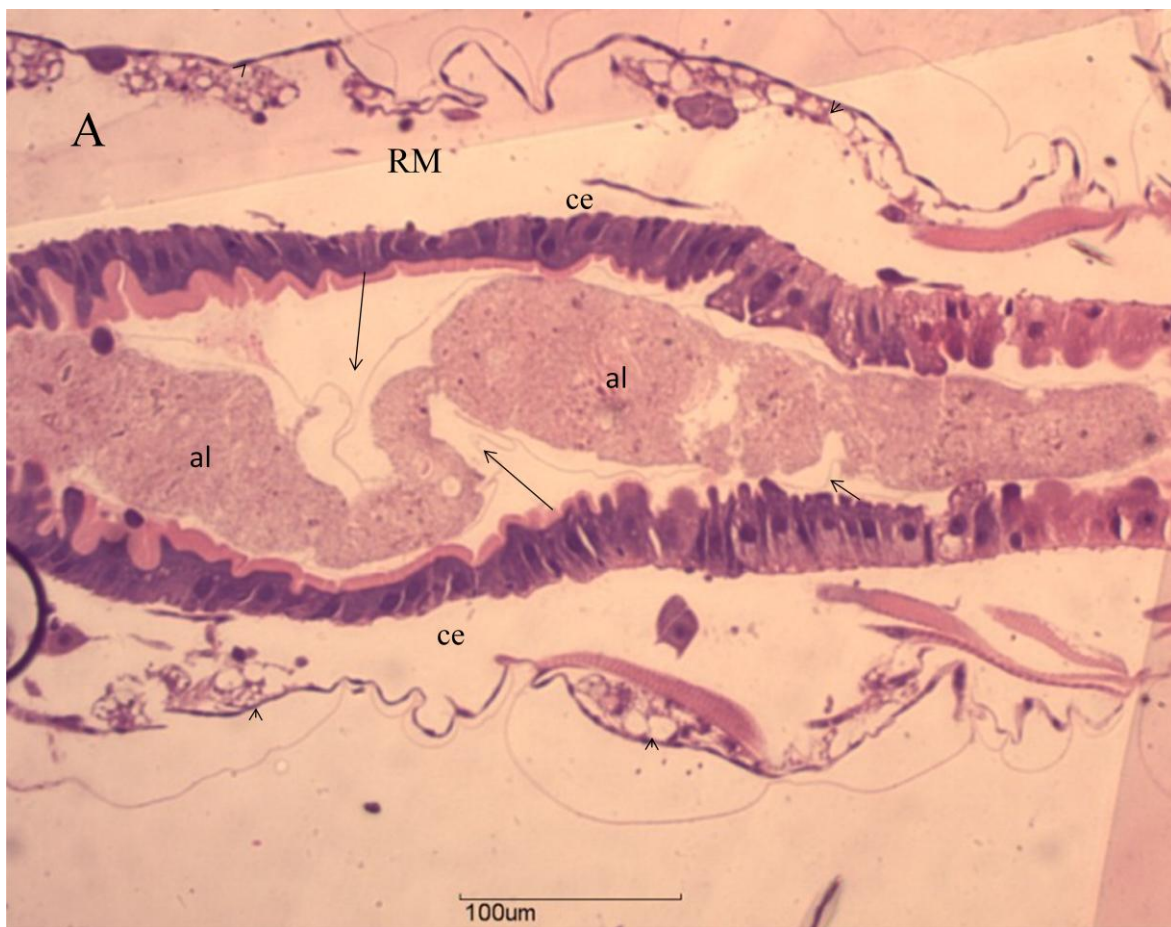


Figura 14A. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe da casca do caule de *Persea americana* após 48h. A - Região média do mesêntero (RM) demonstrando a constrição e aspecto sinuoso da matriz peritrófica (setas) e alimento (al) retraído em seu interior, células epiteliais alongadas com núcleo deslocado da região central (ce). Notar a formação da cutícula com aspecto bastante frouxo (ponta de seta). HE 100 μ m.

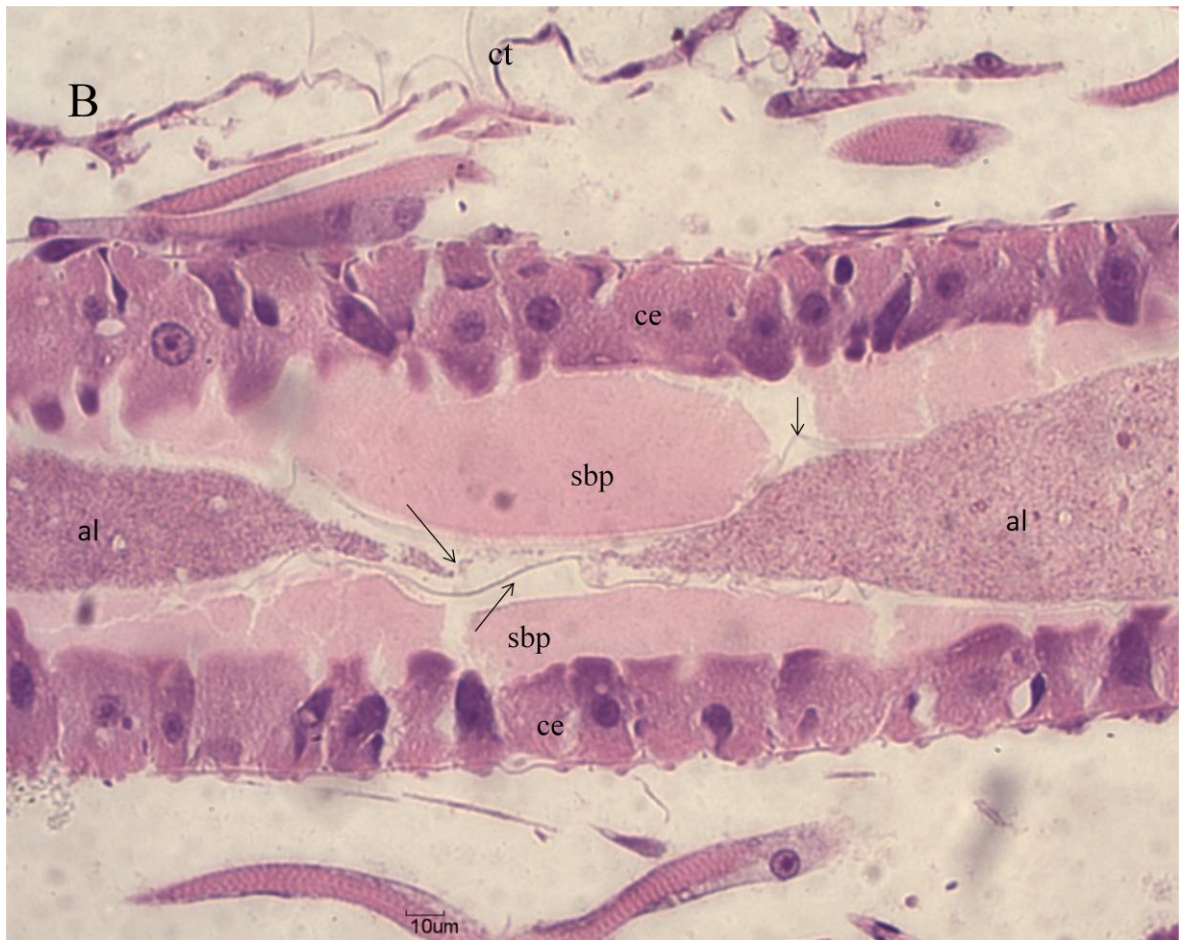


Figura 14B. Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe da casca do caule de *Persea americana* após 48h. B - Detalhe da região média do mesêntero, células epiteliais (ce), espaço subperitrófico aumentado (sbp), alimento (al) membrana peritrófica (seta). HE 100 μ m.



Figura 15 Fotomicrografia do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas com ebe de casca de caule de *Persea americana* após 48h. Notar a grande quantidade de secreção no espaço subperitrófico na luz do mesêntero, alimento (al) , as células epiteliais (ce) de vários tamanhos e formas com citoplasma vacuolizado (setas) , a forma sinuosa e angular com que se apresenta a matriz peritrófica e todo conteúdo alimentar. A cutícula (ct) também se mostra bastante enrugadas e com células danificadas e espaçadas. HE 100 μ m.

5.3 Análises da microscopia eletrônica de varredura

A análise da microscopia eletrônica de varredura não evidenciou nenhuma alteração na morfologia externa das larvas em 24 e 48h, que apresentaram morfologias idênticas quando comparada ao grupo controle. (Figuras 16 A e B). Nas eletrofotomicrografias do tegumento externo das larvas também não foram encontradas alterações visíveis e sugestivas de atuação do ebe de casca de caule de *Persea americana* para o grupo tratado até 24h, quando comparados ao grupo controle (Figura 17 A e B).

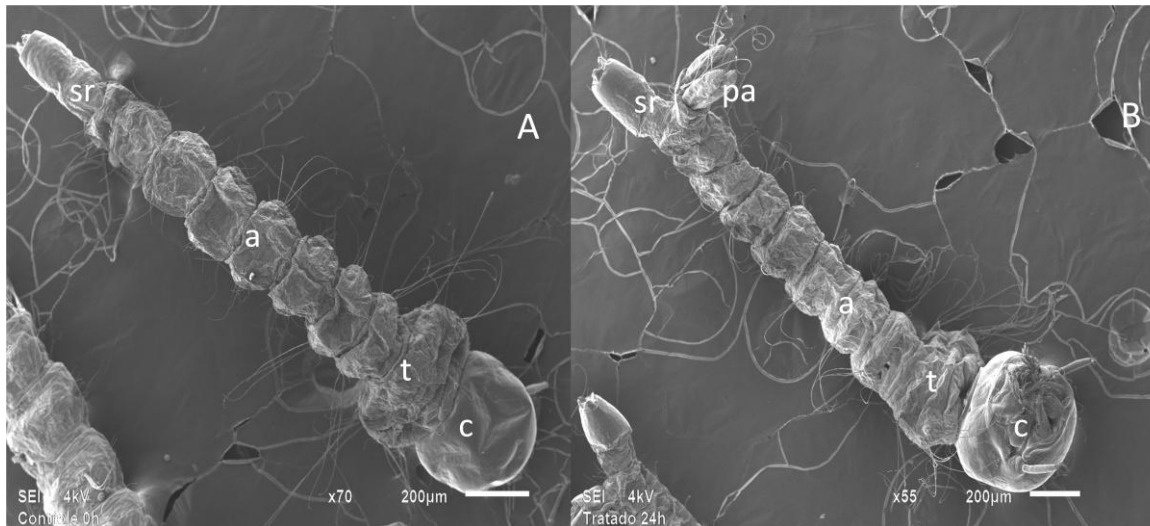


Figura 16. Eletrofotomicrografia de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* mostrando o aspecto morfológico externo. A - vista dorsal de larva do grupo controle. Corpo constituído por cabeça (c), tórax (t), abdômen (a) e sifão respiratório (sr). B - vista ventral de larva do grupo tratado com ebe de casca de caule de *Persea americana*, por 24h. Corpo constituído por cabeça (c), tórax (t), abdômen (a) sifão respiratório (sr) e papilas anais (pa). Notar que não há diferença entre o aspecto morfológico externo do grupo controle e tratado 24h.

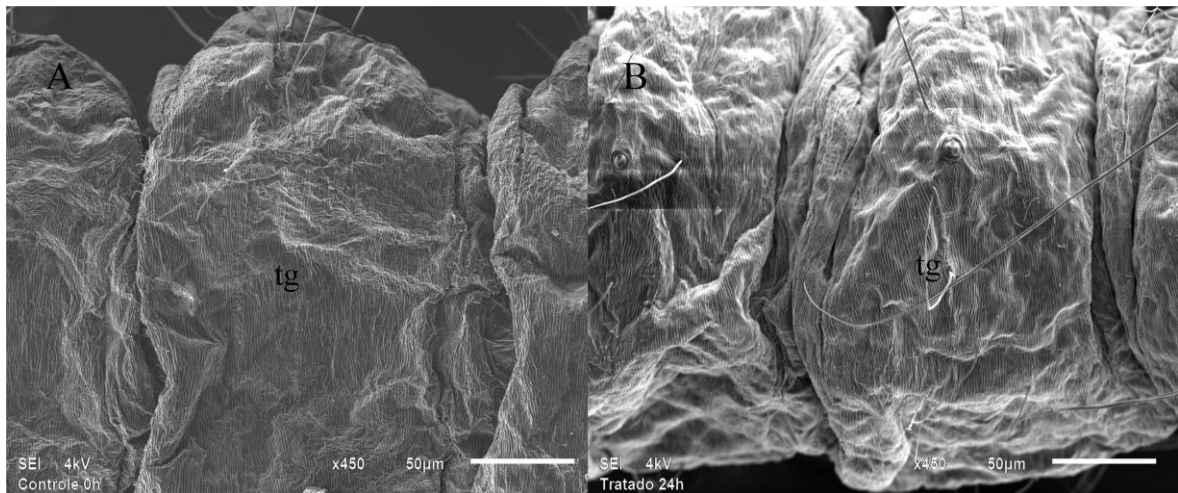


Figura 17. Eletrofotomicrografia de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*, mostrando o aspecto do tegumento externo. A – tegumento externo da larva do grupo controle. Observar a superfície rugosa (tg) com a presença de algumas cerdas. B – tegumento externo da larva do grupo tratado 24h. Observar que não há diferença entre o aspecto rugoso da superfície externa das larvas do grupo controle e tratado 24h sugestivas de ação do ebe de casca de caule da *Persea americana*.

6 DISCUSSÃO

Os primeiros sinais da toxicidade do extrato da casca do caule de *P. americana* sobre as larvas de *Ae. aegypti* foram observados no comportamento das mesmas, quando comparado o grupo tratado com o grupo controle. A mobilidade das larvas tratadas diminuía, à medida que aumentava o período de exposição ao ebe, até se tornarem completamente letárgicas, mesmo sendo estimuladas pela luz ou toque com um fino pincel. Esta alteração de comportamento foi concordante com as observações obtidas por Arruda et al. (2003a), Barreto et al. (2006) e Abed et al. (2007), utilizando compostos naturais provenientes da planta *Magonia pubescens*, *Sapindus saponaria* e *Copaifera reticulata*, respectivamente.

A toxicidade dos compostos químicos extraídos da planta *P. americana* sobre o *Ae. aegypti* também foi demonstrada através do fenômeno de extrusão da matriz peritrófica. Esse mecanismo indica uma forma de defesa da larva, expulsando o conteúdo intestinal, para ficar livre da ação de substâncias tóxicas ingeridas e que tiveram contato com as células que tem a função, no mesêntero, de absorção (Arruda et al. 2003, Barreto et al. 2006, Valotto et al. 2010, Valotto et al. 2011). Essa observação foi concordante com os estudos realizados por Arruda et al. (2003a) e Valotto et al. (2010), respectivamente, às plantas *M. pubescens* e *C. reticulata*.

As observações de estruturas celulares e histológicas descritas neste trabalho, relacionadas ao intestino de larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, nas partes denominadas de estomodeu, mesêntero e proctodeu, do grupo controle foram idênticas às descrições observadas por Snodgrass (1997); Chapman (1998); Arruda et al. (2003a); Barreto et al. (2006); Abed et al. (2007); Arruda et al. (2008); Valotto et al. (2011).

As larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* expostas ao extrato de *P. americana*, apresentaram alterações morfohistológicas na região média do mesêntero a partir de 24h de exposição. Alterações semelhantes foram observadas por Arruda et al. (2003a), com a planta *M. pubescens*, porém os achados de Arruda et al (2003a) aconteceram após 4 h de exposição, tendo início na parte anterior do mesêntero, e após 6 h de tratamento, essas alterações alcançaram a parte basal média. A partir de 12h as alterações eram mais intensas, se estendendo para outras partes. Evidenciando maior potencial inseticida da planta *M. pubescens*, quando comparada a ação tóxica causada pela *P. americana*.

Observamos que o período de contato com os compostos larvicidas foi determinante no processo das alterações morfohistológicas como relatado no parágrafo anterior. Nas larvas que tiveram um período de exposição maior, cerca de 48h, essas alterações se intensificaram e se estenderam por todas as regiões do mesêntero, indicando ação tóxica progressiva. Semelhante fato foi relatado por Abed et al. (2007) em toda extensão do mesêntero, quando estudaram a atividade larvicida do óleo-resina de *C. reticulata* para a mesma espécie de mosquito e estágio larvário. Enquanto as alterações observadas por Arruda et al. (2003a) apontavam a região anterior do mesêntero como a primeira a sofrer a ação tóxica de *M. pubescens*. Os estudos de Barreto et al. (2006) indicavam estas alterações mais evidentes na parte anterior e média do mesêntero, quando as larvas foram expostas à solução do extrato de *S. saponaria*.

7 CONCLUSÕES

1. *P. americana* apresentou atividade larvicida sobre o terceiro estágio de *Ae. aegypti*, evidenciada pelas alterações morfohistológicas no mesêntero e no comportamento, com a perda progressiva da mobilidade.
2. As principais alterações morfohistológicas foram encontradas na parte média do mesêntero das larvas de *Ae. aegypti*, e o tempo de exposição foi determinante na extensão dessas alterações para as partes anterior e posterior.
3. A toxicidade de *P. americana* sobre larvas de *Ae. aegypti* foi também evidenciada através da extrusão matriz peritrófica, sugerindo uma resposta das larvas diante da intoxicação sofrida.
4. As principais alterações morfohistológicas observadas foram intensa vacuolização citoplasmática, produção de grande quantidade de secreção e aumento do espaço subperitróficoaspecto com cutícula de aspecto frouxo e irregular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abed AA, Cavasin GM, Silva HHG, Geris R, Silva IG. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). *Rev Patol Trop* 36: 75-86, 2007.
2. Adeyemi OO, Okpo SO, Ogunti OO. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extracts of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia* 73: 375-380, 2002.
3. Albuquerque IGC, Marandino R, Mendonça AP, Nogueira RMR, Vasconcelos PFC, Guerra LR, Brandão BC, Mendonça APP, Aguiar GR, Bacco PAM. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:128-129, 2012.
4. Almeida AP, Costa SS, Miranda MMFS, Simoni IC, Wigg MD, Lagrota MHC. Flavonol monoglycosides from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phyt Res* 12: 562-567, 1998.
5. Alonso J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Rosário, Argentina. *Editora Corpus*, 2004.
6. Amaku M, Coudeville L, Massad E. Designing a vaccination strategy against dengue. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 54: 18-21, 2012.
7. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens*. *Entomol Vect* 10: 47-60, 2003a.
8. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 17-25, 2003b.
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. 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 Pat Trop* 35(1): 37-57, 2006.
11. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud Av* 22(64): 52-72, 2008.
12. Bertolacci-Rocha LG, Cunha RV, Lichs GG, Fabbro MM, Motta-Castro AR. Introduction of the dengue virus type 4 in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Cad Saúde Pública* 30 (8):1789-1792, 2014.
13. Beserra EB, Fernandes CRM, Queiroga MFC. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. *Neotrop Entomol* 36: 303-307, 2007.
14. Bortel WV, Dorleans F, Rosine J, Bateau A, Rousset D, Matheus S, Leparç-Goffart I, Flusin O, Prat CM, Césaire R, Najjoullah F, Ardillon V, Balleydier V, Carvalho L, Lemaître A, Noë H, Servas V, Six C, Zurbaran M, Léon L, Guinard A, Van den Kerkhof J, Henry M, Fanoy E, Braks M. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Euro Surveill* 19(13): 20759-20770, 2014.
15. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16(4): 279-293, 2007.
16. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: Histórico e controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, 16(2): 113-118, 2008.
17. Brai BIC, Odetola AA, Agomo PU. Hypoglycemic and hypocholesterolemic potential of *Persea americana* leaf extracts. *J Med Food* 10: 356-360, 2007.
18. Brito ÉHS, Cordeiro RA, Brilhante RS, Sidrim JJC, Bertini LM, Morais SM, Rocha MFG. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(2): 110-113, 2009.

19. Brito LBM, Santos, JÁ, Gomes ALP, Marcos AJF. Febre Amarela: Uma Revisão de Literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research* 8(3): 61-65, 2014.
20. Câmara FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RPC. Regional and dynamic characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study. *Rev Soc Bras Med Trop* 40(2): 192-196, 2007.
21. Carvalho GH, Silva HHG, Cunha LC, Silva IG. Atividade inseticida do extrato bruto etanólico de *Persea americana* (Lauraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Patol Trop* 40: 348-361, 2011.
22. Catão RC. Dengue no Brasil: abordagem geográfica na escala nacional. [Dissertação de mestrado em Geografia FCT/UNESP], 2011.
23. Cavalcante VM. & Cruz-Landim C. Types of cells present in the midgut of the insects: A Review. *Naturalia*, 24: 19-40, 1999.
24. Chapman RF. The alimentary canal. In: The insects: structure and function. *Cambridge University Press*. 749, 1998.
25. Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444, 2005.
26. Dias CN, Moraes DF. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res* 113: 565-592, 2014.
27. Falcão MA, Paraluppi ND, Clement C R, Kerr WE, Silva MF. Fenologia e Produtividade do Abacate (*Persea americana* Mill). Na Amazônia Central. *Acta Amaz* 31(1): 3-9, 2001.
28. Figueiredo LTM. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 203-210, 2006.
29. Figueiredo RMP, Naveca FG, Oliveira CM, Bastos MS, Mourão MPG, Viana SS, Melo MN, Itapirema EF, Saatkamp CJ, Farias IP. Co-infection of dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 53(6): 321-323, 2011.

30. Fink K, Shi PY. Live attenuated vaccine: the first clinically approved dengue vaccine. *Expert Rev Vaccines* 13(2): 185–188, 2014.
31. Forattini OP. Culicidologia. Vol. 1 e 2, São Paulo: EDUSP, 2002.
32. Forattini OP, Brito M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 37: 676-677, 2003.
33. Franco O. História da Febre Amarela no Brasil. Ministério da Saúde, Departamento Nacional de Endemias Rurais. 1968.
34. Furtado RF, Lima MGA, Andrade Neto MJ, Bezerra NS, Silva MG. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 34: 843-847, 2005.
35. Gambarra WP, Martins WF, Lucena Filho ML, Albuquerque IM, Apolinário OK, Besera EB. Spatial distribution and esterase activity in populations of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temephos. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 178-184, 2013.
36. Geris R, Silva IG, Silva HHG, Barison A, Rodrigues Filho E, Ferreira AG. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* (Ducke) with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop S Paulo* 50: 25-28, 2008.
37. 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 (Org). Studies in natural products chemistry, Amsterdã, Elsevier 37: 277-377, 2012.
38. Gomes AS, Sciavico CJS, Eiras AE, Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em laboratório e campo. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 327-332, 2006.
39. Guissoni ACP, Silva IG, Geris R, Cunha LC, Silva HHG. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. *Rev Bras Pl Med* 15: 363-373, 2013.

40. Guy B, Saville M, Lang J, Junior JBS, Bricks LF. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Hum Vaccines* 6(9): 669-705, 2010.
41. Ishikawaa T, Yamanakab A, Konishib E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 32: 1326-1337, 2014.
42. Lang J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 54(18):15-17, 2012.
43. Leite JGG, Brito ÉHS, Cordeiro RA, Brilhante RSN, Sidrin JJC, Bertini LM, Morais SM, Rocha MFG. Composição química, toxicidade, atividade larvicida e antifúngica de extratos de semente de *Persea americana* (abacate). *Rev Soc Bras Med Trop* 42(2): 110-113, 2009.
44. Lima GP, Souza TM, Paula Freire G, Farias DF, Cunha AP, Ricardo NM, Morais SM, Carvalho AF. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Parasitol Res* 112: 1953-1958, 2013.
45. Lorenzi H, Abreu MFJ. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas, 2ª edição. Nova Odessa, SP. Editora Instituto de Estudos da Flora, 2008.
46. Martins F, Silva I G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37(2):135-138, 2004.
47. Mascheretti M, Tengan CH, Sato HK, Suzuki A, Souza RP, Maeda M, Brasil R, Pereira M, Tubaki RM, Wanderley DM, Fortaleza CM, Ribeiro AF. Yellow fever: reemerging in the state of Sao Paulo, Brazil, 2009. *Rev Saúde Pública* 47: 881-889, 2013.
48. MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Balanço dengue informes técnicos, 2014. Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?idarea=11525>. Acesso em Agosto de 2014.
49. Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *An Biol* 64: 205-207, 2002.

50. Nogueira RMR, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.6:106-255, 2011.
51. Normile D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* 342: 415. 2013
52. Ojewole JAO, Amabeoku GJ. Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice. *Phytother Res* 20: 696-700, 2006.
53. Owolabi MA, Jaja SI, Coker HAB. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. *Fitoterapia*, 76: 567-573, 2005.
54. Pinto Jr, VL. Dengue e Chikungunya: coexistência possível no Brasil. *Rev Med Sau Bras*, 3(1): 2-3, 2014.
55. Pohlit AM, Quignard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Santos EVM, Morais SKR, Saraiva RCG, Ming LC, Alecrim AM, Ferraz AB, Pedroso ACS, Diniz EV, Finney EK, Gomes EO, Dias HB, Souza KS, Oliveira LCP, Don LC, Queiroz MMA, Henrique MC, Santos M, Lacerda Júnior OS, Souza PP, Silva SG, Graça YR. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amaz* 34:97-105, 2004.
56. Prata A. Yellow Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:183-187, 2000.
57. Ribeiro AF, Marques GRA, Voltolini JC, Condino MLF. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. *Rev Saúde Pública* 40: 671-676, 2006.
58. Richards AG, Richards PA. The peritrophic membranes of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22: 219-240, 1977.
59. Rocco IM, Silveira VR, Maeda AY, Silva SJS, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A. Brief communication first isolation of dengue 4 in state of São Paulo, Brazil, 2011. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 54(1): 49-51, 2012.
60. Romano APM, Ramos DG, Araújo FAA, Siqueira GAM, Ribeiro MPD, Leal SG, Elkhoury ANS. Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. *Epidemiol.Serv. Saúde*, Brasília, 20(1):101-106, 2011.

61. Rosalinda C. Torres, Alicia G. Garbo, Rikkamae Zinca Marie L. Walde. Larvicidal activity of *P. americana* Mill. against *Aedes aegypti*. *Asian Pac J Trop Med* (Suppl1):S167-S170, 2014.
62. Silva IG, Araújo ESO, Silva HHG, Soares AW, Cantuária PB. Ocorrência de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em Goiânia. *An Soc Ent Bras* 2: 45-460, 1991 a.
63. Silva IG, Cantuária PB, Silva HHG, Araújo ESO. Distribuição de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em Goiânia. *Rev Patol Trop* 20, 1: 1-5, 1991b.
64. 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.
65. Silva HHG, Silva IG, Oliveira CLNS, Elias CN. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomol Vect* 6(4): 383-391, 1999.
66. 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 Bra Med Trop* 32: 349-35, 1999.
67. Silva HHG, Silva IG. Estudos do ciclo evolutivo do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) a partir de ovos com quatro meses de estocagem em laboratório. *Rev Patol Trop* 29: 95-10, 2000.
68. 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(1): 15-24, 2002.
69. Silva IG, Silva HHG, Lima CG. Ovopositional behavior of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in different strata and biological cycle. *Acta Biol Par* 32: 1-8, 2003
70. Silva HHG, Silva IG, Santos RGM, Rodrigues FE, Elias CN. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37(5): 396-399, 2004.

71. 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(3): 264-267, 2007.
72. Simas NK, Lima EC, Kuster RM, Lage CLS, Oliveira Filho A M. Potential use of Piper nigrum ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 405-407, 2007.
73. Snodgrass, RE. Principles of Insect morphology. McGraw-Hill Book Company. 1997.
74. Souza VC, Lorenzi H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP. Editora Instituto Plantarum, 2005.
75. 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.
76. Staples MDE, Fischer MD. Chikungunya Virus in the Americas — What a vector born e pathogen can do. *N Engl J Med* 10: 371, 2014.
77. Tauil PL. Aspectos críticos do controle de dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública*, 18: 867-871, 2002.
78. Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Azevedo RSS, Nunes MRT, Vasconcelos PFC. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 17: 938-940, 2011.
79. Thiberville SD, Moyen N, Maguiraga LD, Nougairede A, Gould EA, Roques P, Lamballerie X. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiv Res* 99: 345-370, 2013.
80. Thisyakorn U, Thisyakorn C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines* (2)1:3-9, 2014.
81. Valotto CFB, Cavasin G, Silva HHG, Geris R, Silva IG. Alterações morfo-histológicas em larvas de (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico

- isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev Patol Trop* 39: 309-321, 2010.
82. Valotto CFB, Silva HHG, Cavasin G, Geris G, Rodrigues Filho E, Silva IG. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae) e uma fração rica em tanino de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev Soc Bras Med.Trop* 44: 194-200, 2011.
83. Vasconcelos, PFC. Febre Amarela. *Rev Soc Bras Med.Trop.*36(2):275-293, 2003.
84. Weaver SC. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLOS Neglec Tro Dis* 8:6 2917-2921, 2014.
85. Wikipédia (enciclopédia). http://pt.wikipedia.org/wiki/Aedes_aegypti. Acesso em 15 de outubro de 2014.
86. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition, Geneva, 2009. 160p. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf/>. Acesso em abril de 2014.
87. Yauch L E, Prestwood T R, May M M, Morar M M, Zellweger R M, Bjorn P, Sette A, Shresta S. CD4+ TCells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ TCell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol* 185: 5405-5416, 2010.
88. Yauch LE, Shresta S. Dengue virus vaccine development. *Adv Virus Res* 88: 315-372, 2014.

ANEXOS

1. Fixadores

1.1 Paraformaldeído 10% – Solução estoque

Dissolver 10g de paraformaldeído a quente (56°C) em 90 mL de água destilada até diluir completamente. Acrescentar algumas gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M até ficar transparente. Esfriar, ajustar o pH (7,2) e estocar à 4°C.

1.2 Paraformaldeído 4% - Solução de uso

Misturar 1 mL de tampão fosfato a 0,1 M PF 7,2 em 4 mL de paraformaldeído 10% quantidade suficiente para (qsp) 10mL de água destilada.

1.3 Fixador para MEV

Misturar 1 mL de paraformaldeído a 10%, 0,4 mL de glutaraldeído a 25%, 2,5 mL de tampão cacodilato a 0,2 M pH 7,2 a 0,15g de sacarose qsp 5mL de água destilada.

2. Tampões

2.1 Tampão Fosfato 1M pH 7,2 (solução estoque)

Misturar 68,4 mL de fosfato de sódio dibásico 1M (Na₂HPO₄) a 31,6 mL de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄).

Solução de uso (0,1M): diluir a solução estoque 1M para um volume de 1000 mL de água destilada.

2.2 Tampão Cacodilato de Sódio

Solução estoque 0,2M: Dissolver 12,84g do sal cacodilato de sódio (C₂H₆A₅O₂Na) em 200 mL de água destilada usando agitador magnético. Ajustar o ph para 7,2 e completar o volume para 300 mL.

3. Resinas

3.1 Resina de infiltração (embebição): preparar de acordo com o fabricante. Estocar em vidro âmbar a 4°C.

3.2 Resina de inclusão: para cada 15 mL de resina de infiltração acrescentar 1 mL de catalisador. Preparar no momento do uso para evitar polimerização.

4. Corantes

4.1 Eosina aquosa 1%

Adicionar 1g de eosina em pó a 100 mL de água destilada.

4.2 Hematoxilina