



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

CLEYDE FERREIRA BARRETO VALOTTO

Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens* (Sapindaceae) e ao diterpeno de *Copaifera reticulata* (Leguminosae)

Orientador:

Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva

Tese de Doutorado

Goiânia – GO

2009



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

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

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

12. Identificação da Tese ou Dissertação

| | | | | | |
|--|---|---------|--|-------|--|
| Autor(a): | Cleyde Ferreira Barreto Valotto | | | | |
| CPF: | 917.223.901-82 | E-mail: | drcleydevalotto@gmail.com | | |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? | | | <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não | | |
| Vínculo Empregatício do autor | | | | | |
| Agência de fomento: | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior | Sigla: | CAPES | | |
| País: | Brasil | UF: | Goiás | CNPJ: | |
| Título: | Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao tanino catéuico isolado da <i>Magonia pubescens</i> (Sapindaceae) e ao diterpeno de <i>Copaifera reticulata</i> (Leguminosae). | | | | |
| Palavras-chave: | <i>Magonia pubescens</i> . <i>Copaifera reticulata</i> . <i>Aedes aegypti</i> . Ultraestrutura. Controle. | | | | |
| Título em outra língua: | Study of alterations in morphohistologic larvae of <i>Aedes aegypti</i> subjected to catechist tannins isolated from <i>Magonia pubescens</i> (Sapindaceae) and the diterpene <i>Copaifera reticulata</i> (Leguminosae) | | | | |
| Palavras-chave em outra língua: | <i>Magonia pubescens</i> . <i>Copaifera reticulata</i> . <i>Aedes aegypti</i> . Ultrastructure. Control. | | | | |
| Área de concentração: | Parasitologia | | | | |
| Data defesa: (dd/mm/aaaa) | 25/06/2009 | | | | |
| Programa de Pós-Graduação: | Programa de Pós-graduação <i>stricto sensu</i> em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG | | | | |
| Orientador(a): | Ionizete Garcia da Silva | | | | |
| CPF: | | E-mail: | ionizete@iptsp.ufg.br | | |
| Co-orientador(a): | | | | | |
| CPF: | | E-mail: | | | |

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

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

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

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

CLEYDE FERREIRA BARRETO VALOTTO

Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens* (Sapindaceae) e ao diterpeno de *Copaifera reticulata* (Leguminosae)

Tese apresentada ao
PPGMT/IPTSP /UFG como
requisito parcial para obtenção
do Grau de Doutor em
Medicina Tropical na área de
concentração em Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva

Goiânia – GO

2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

V199e Valotto, Cleyde Ferreira Barreto.
Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens* (Sapindaceae) e ao diterpeno de *Copaifera reticulata* (Leguminosae) [manuscrito] / Cleyde Ferreira Barreto Valotto. - 2009.
103 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ionizete Garcia da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.
Bibliografia.

1. *Magonia pubescens*. 2. *Copaifera reticulata*. 3. *Aedes aegypti* – Morfohistológicas. I. Título

CDU: 595.771

Ao meu esposo,
Adriano, presente de Deus na
minha vida, dedico.

*“O amor é paciente, é benigno; o
amor não arde em ciúmes, não se ufana, não
se ensoberbece, não se conduz
inconvenientemente, não procura os seus
interesses, não se exaspera, não se ressentido
do mal; não se alegra com a injustiça, mas
regozija-se com a verdade; tudo sofre, tudo
crê, tudo espera, tudo suporta.
O amor jamais acaba...”*

Coríntios 12 (4-8)

“Parece que fui apenas um menino brincando na praia e descobrindo de vez em quando um seixo mais liso, uma conchinha mais bonita, enquanto o grande oceano da verdade lá estava, inexplorado diante de mim”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sua presença em todos os momentos de minha vida.

Ao 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), pela orientação, apoio e incentivo;

A Dra. Heloísa Helena Garcia da Silva, professora do DMIPP/IPTSP/UFG, pela amizade, convívio e prestabilidade em todas as etapas deste trabalho;

Ao IPSTP e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da UFG pela oportunidade;

A CAPES, pela bolsa concedida;

A Dra. Gláucia Maria Cavasin, pela amizade, confiança e pelo valioso apoio na realização dos estudos histopatológicos;

A Carmeci Natalina Elias, Técnica de laboratório da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás/ Fundação Nacional de Saúde - GO, pelo grande auxílio na realização deste trabalho e pela inestimável amizade;

Aos técnicos Edson de Castro, Girlene Sena de Assis e Taísia Izabel Vieira, pelo apoio em todos os momentos deste trabalho;

Ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e o Departamento de Morfologia, pela concessão do Laboratório de Histologia para a realização dos cortes em historesina e aos seus funcionários técnicos do Departamento de Morfologia, Judth Alves Barbosa e Otávio Cavalcante Barros, pelo auxílio na coloração e montagens das lâminas;

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade do Estado de São Paulo – Rio Claro, na pessoa do Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, pela concessão do Laboratório de Microscopia Eletrônica para a realização nas análises de ultra estrutura;

Ao funcionário Antônio Yabuk, pelo auxílio no manuseio do Microscópio Eletrônico;

Aos meus filhos, Pedro e Paulo Adriano, pelo amor incondicional mesmo durante os períodos de ausência.

APRESENTAÇÃO

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Suas manifestações clínicas variam de uma síndrome viral, inespecífica e benigna, até um quadro grave e fatal de doença hemorrágica com choque. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 50 a 100 milhões de novos casos ocorram anualmente em todos os continentes, exceto na Europa. O Brasil passou cerca de 60 anos sem apresentar nenhum registro de casos de dengue em seu território, porém, as condições sócio-ambientais favoreceram a expansão do mosquito vetor, o *Aedes aegypti*, desde a sua reintrodução em 1976 até o momento, com sucessivas epidemias da doença.

As razões para o ressurgimento da dengue, não só no Brasil, mas em todo mundo, ainda não são muito esclarecidas, no entanto, sabe-se que o crescimento global da população e a urbanização não planejada e descontrolada, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento, têm contribuído plenamente para a expansão do *A. aegypti*.

A febre amarela é uma doença infecciosa, não contagiosa, que ocorre em florestas tropicais das Américas e da África, causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior importância. A transmissão ao homem ocorre a partir da picada de fêmeas de *A. aegypti* infectadas com vírus amarelo no ambiente urbano e de espécies dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* no silvestre.

O último relato de febre amarela urbana no Brasil, foi em 1942, no Acre, porém a forma silvestre da doença se mantém endêmica. Em 2008 o Brasil registrou um surto de febre amarela silvestre, quando foram confirmados dezoito casos desta virose em áreas silvestres de Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, sendo Goiás o responsável por 14 desses casos. A vacinação é a melhor forma de prevenção e controle da febre amarela interrompendo o ciclo de transmissão.

O *A. aegypti*, vetor tanto da dengue como da febre amarela urbana, tem uma grande capacidade de se adaptar ao ambiente humano e uma extraordinária competência na busca e na escolha de locais para a oviposição, colonizando os mais variados tipos de criadouros. Essa incrível adaptação, associada à fatores como temperatura, umidade, altitude, entre outros, dá ao *A. aegypti* totais condições de propagação territorial. A disseminação desse vetor já alcançou tamanha proporção que, hoje, acredita-se ser impossível uma nova erradicação desse mosquito, falando-se apenas em controle do mesmo.

A luta contra *A. aegypti* requer várias atividades de vigilância. Estas atividades baseiam-se no saneamento básico, inspeção e eliminação de reservatórios através da ação de guardas-sanitários que visitam periodicamente todas as edificações urbanas, e em medidas de informação e educação realizadas através das campanhas nacionais de combate à dengue, veiculadas nas principais vias de comunicação (rádio, TV, jornais, revistas, etc.). Como 90% dos focos do mosquito estão presentes nas residências, a participação da comunidade torna-se imprescindível para tornar o combate eficaz e evitar a sua proliferação.

A principal estratégia de controle do *A. aegypti* tem sido o uso intensivo de inseticidas químicos, principalmente o organofosforado temefós e o piretróide cipermetrina. O uso indiscriminado desses inseticidas vem sendo questionado quanto à sua real eficiência e quanto aos danos ambientais que podem causar. Durante a vigência de uma epidemia, a aplicação espacial de inseticida em ultra-baixo-volume pode ser uma medida valiosa no extermínio do vetor, porém pouco efetiva na manutenção de baixos índices de infestação predial. Além disso, o uso freqüente de inseticidas tem levado ao desenvolvimento de resistência do mosquito a estes compostos. No Brasil, já foi detectada a resistência ao temefós em populações de *A. aegypti* em 12 estados. A resistência resulta no aumento da freqüência de aplicação de inseticidas, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de novos casos da doença quando o vetor não pode ser controlado.

Em busca de novas alternativas para o controle do vetor da dengue, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de encontrar um

inseticida menos tóxico ao meio ambiente, mais eficaz no combate e com menos chances de desenvolver resistência no mosquito. Neste contexto, os inseticidas botânicos vêm sendo amplamente estudados.

Este trabalho mostrou o mecanismo de ação de substâncias purificadas extraídas das plantas *Copaifera reticulata* e *Magonia pubescens* frente às larvas de *A. aegypti*. Os experimentos realizados com estas plantas demonstraram o potencial larvicida contra o *A. aegypti* e o modo de ação das substâncias isoladas através da destruição celular do tubo digestório do inseto, com alterações irreversíveis.

Diante da situação atual do Brasil, com novas e mais graves epidemias de dengue a cada ano, com o risco iminente da introdução do vírus Den-4 e a diminuição da suscetibilidade do *A. aegypti* aos inseticidas químicos, a prospecção de substâncias candidatas potenciais como inseticida, de baixa toxicidade ao meio ambiente e ao homem, poderá constituir numa alternativa ao controle do *A. aegypti*.

Este trabalho teve como finalidade mostrar o potencial de substâncias naturais extraídas de *C. reticulata* e *M. pubescens* como alternativas ao controle de *A. aegypti*.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao tanino catéuico isolado da <i>Magonia pubescens</i> (Sapindaceae) e ao diterpeno de <i>Copaifera reticulata</i> (Leguminosae)..... | i |
| Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao tanino catéuico isolado da <i>Magonia pubescens</i> (Sapindaceae) e ao diterpeno de <i>Copaifera reticulata</i> (Leguminosae)..... | i |
| RESUMO..... | 18 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 1.1. Dengue, Febre Amarela e <i>Aedes aegypti</i> | 22 |
| 1.4. Inseticidas botânicos como alternativa no controle de vetores..... | 27 |
| 1.6. Bioprospecção..... | 29 |
| 2. OBJETIVOS..... | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 3.1. Obtenção das larvas..... | 33 |
| Figura 1 – A: camundongos presos em tela de náilon usados na alimentação de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> . B: absorvente interno feminino embebido em água açucarada usado na alimentação de machos de <i>Aedes aegypti</i> | 34 |
| 3.2. Obtenção do Material Vegetal..... | 34 |
| 3.2.1. <i>Copaifera reticulata</i> | 34 |
| 3.2.2. <i>Magonia pubescens</i> | 35 |
| 3.3. Bioensaios..... | 36 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 39 |
| Artigo 1 – será submetido à Revista de Patologia Tropical..... | 45 |
| Alterações ultraestruturais em larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao diterpeno isolado da <i>Copaifera reticulata</i> (Leguminosae) e ao tanino catéuico da <i>Magonia pubescens</i> (Sapindaceae)..... | 86 |
| RESUMO..... | 86 |

LISTA DE ABREVIÇÕES²

| | |
|------------------|---|
| AL | Alimento |
| <i>Bti</i> | <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> |
| ¹³ C | Carbono 13 |
| ¹ H | Hidrogênio |
| C | Cerdas |
| °C | Graus Celsius |
| CC | Cromatografia em Coluna |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CCDP | Cromatografia em Camada Delgada Preparativa |
| CDCL3 | Clorofômio Deuterado |
| CD3OD | Metanol Deuterado |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CL | Concentração letal |
| CL ₅₀ | Concentração letal que mata 50% das larvas |
| CL ₉₀ | Concentração letal que mata 90% das larvas |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DMORF | Departamento de Morfologia |
| DDT | Dicloro-Difenil-Tricloroetano |
| e.b.e | Extrato bruto etanólico |
| EM | Espectrometria de Massa |
| ES | Espaço Subperitrófico |
| EtOH | Etanol |
| g | Gramas |
| GC-MS | Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de Massa |
| h | Hora |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| IGR | Inibidor de Crescimento |
| IPTSP | Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública |
| IV | Cromatografia na região do Infravermelho |
| kg | Quilograma |
| L | Litro |
| LA | Lobo Anal |
| L | Luz intestinal |

² Algumas abreviações foram mantidas em inglês por já estarem estabelecidas na literatura e entre pesquisadores.

| | |
|-------|---------------------------------|
| M | Molar |
| MeOH | Metanol |
| m | metro |
| Mi | Mitocôndria |
| min | minutos |
| mL | Mililitro |
| MS | Ministério da Saúde |
| Mu | Músculo |
| MV | Microvilosidades |
| N | Núcleo |
| Nu | Nucléolo |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PA | Papilas Anais |
| ppm | Parte por milhão |
| RA | Região Anterior |
| RM | Região Mediana |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RP | Região Posterior |
| SR | Sifão Respiratório |
| CCD | Cromatografia de Camada Delgada |
| TM | Túbulos de Malpighi |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UFG | Universidade Federal de Goiás |
| UV | Ultravioleta |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista |
| V | Vesícula secretora |
| Va | Vacúolos |
| VD | Vacúolos digestivos |
| Ve | Vesículas |
| % | Por cento |
| µm | Micrômetro |

LISTA DE FIGURAS

Figuras da Apresentação

Figura 1 – A: camundongos presos em tela de náilon usados na alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti*. B: absorvente interno feminino embebido em água açucarada usado na alimentação de machos de *Aedes aegypti*.....34

Figuras do Artigo I

Figura 1. Aspecto morfológico das larvas de *Aedes aegypti*. A. Larva Controle. B. Larva tratada com tanino catéquico da *Magonia pubescens*. Notar a extrusão da matriz peritrófica (seta). Abreviações: SR = Sifão respiratório, LA = Lobo anal, C = cerdas, PA = Papilas anais..... 51

Figuras 2A, B e C. Fotomicrografias do mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* controle coradas com HE. 2A. Região Anterior. 400X. 2B. Região Mediana 400X. 2C. Região Posterior. 400X. Notar a presença do bordo em escova (seta) e da matriz peritrófica (cabeça de seta). Figuras 2D, E e F. Fotomicrografias do mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* submetidas por 6h ao tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens*. 2D. Região Anterior. Presença de grandes vacúolos no citoplasma das células. 400X. 2E. Região Mediana apresentando células com formação de vesículas apicais no citoplasma. 400X. 2F. Região Posterior evidenciando a intensa atividade secretora. 400X. Figuras 2G, H e I. Fotomicrografias do mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* submetidas por 12 h ao tanino catéquico da planta *Magonia pubescens*. 2G. Região Anterior com formações vesiculares na porção apical do citoplasma e a presença de grandes vacúolos. 400X. 2H. Região Mediana. Notar o citoplasma altamente vacuolizado. 2I. Região Posterior. Grande quantidade de vesículas nesta região, com células se desprendendo da membrana basal (*). 400X. Bordo em escova (seta), Matriz peritrófica (cabeça de seta), núcleo (N), alimento (AL), vacúolos (Va), vesículas (V)..... 54

Figuras 3A, B e C. Fotomicrografias do mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* submetidas por 18h ao tanino catéquico da *Magonia pubescens*. 3A. Região Anterior. Presença de vesículas na porção apical das células e grandes vacúolos citoplasmáticos. 400X. 3B. Região Posterior. Presença de vacúolos apicais citoplasmáticos. 400X. 3C. Região Mediana. Notar o aumento do espaço intercelular (setas). Ocorre um acúmulo de substância no espaço subperitrófico que também é notado na região anterior. 400X. Figuras 3D, E e F. Fotomicrografias do mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* submetidas por

24h ao tanino catéquico isolado de *Magonia pubescens*. 3D. Região Anterior. Células com citoplasma vacuolizado. 400X. 3E. Região Mediana. Maior espaço intercelular (seta) e acúmulo de substância no espaço subperitrófico. 400X. 3F. Região Posterior. Células com citoplasma altamente vacuolizado. 400X. Núcleo (N), alimento (AL), vacúolos (Va), vesículas (V), espaço subperitrófico (ES).....55

Figuras do Artigo II

Figuras 1A, B e C. Fotomicrografias de secções em historesina, de larvas 3° estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle, coradas em Hematoxilina-eosina. 1A. Região anterior constituída por um epitélio colunar com células evidenciando um fino bordo em escova (seta). 400X. 1B. Região mediana - células com aspectos de normalidade com fino bordo em escova (seta) e presença da matriz peritífica (cabeça de seta) 400X. 1C. Região posterior com células com maior basofilia e um espesso bordo em escova. 400X. Figuras 1D e E. Fotomicrografias de secções em historesina, de larvas 3° estágio de *Aedes aegypti* tratadas por 3h, coradas em Hematoxilina-eosina. 1D. Região anterior e mediana do mesêntero evidenciando a formação vesicular apical em todo o epitélio. 1E. Região posterior do mesêntero onde se percebe maior basofilia celular e vesículas apicais. Apenas em algumas células há presença do bordo em escova (seta). Figuras 1 F, G e H. Fotomicrografias de secções em historesina, de larvas 3° estágio de *Aedes aegypti* tratadas por 9h. 1F. Região anterior do mesêntero com células vacuolizadas. 1G. Região mediana com grandes vacúolos no citoplasma dessas células. 1H. Região posterior com células liberando conteúdo granular do citoplasma para a luz intestinal em processo de lise celular. Abreviações: RA=região anterior, RM= região mediana, N=núcleo, Nu=nucléolo, V=vesícula secretora, L=luz intestinal, AL = alimento.....75

Figuras 2A, B e C. Fotomicrografias de secções em historesina, do mesêntero de larvas 3° estágio de *Aedes aegypti* tratadas por 15h. 2A. Região anterior com formação de vesículas na região apical das células e núcleos disformes.

400X. 2B. Região mediana, alta vacuolização citoplasmática 400X. 2C. Região posterior com estratificação do epitélio, vesículas apicais em processo de lise celular através da liberação de conteúdo granular na luz intestinal. 400X. Figuras 2D, E, F e G. Fotomicrografias de secções em historesina, do mesêntero de larvas 3° estágio de *Aedes aegypti* expostas por 18h, coradas em Hematoxilina-eosina. 2D. Vista geral evidenciando grande dobra na matriz peritrófica (cabeça de seta). 400X. 2E. Região anterior com formação de vesículas na porção apical das células. 400X. 2F. Região mediana com vesículas apicais e núcleos disformes. 2G. Região posterior com células altamente destruídas (seta) e núcleos disformes. 400X. Figura 2H, I e J. Fotomicrografias de secções em historesina, do mesêntero de larvas 3° estágio de *Aedes aegypti* expostas por 24h, coradas em Hematoxilina-eosina. 2H. Região anterior - células com grandes vacúolos citoplasmáticos. Ocorre um deslocamento das células da membrana basal (*). 400X. 2I. Região mediana com grandes vacúolos citoplasmáticos. 2J. Região posterior - células com vesículas apicais e em processo de lise celular (seta), núcleos alterados. Abreviações: RA=região anterior, RM= região mediana, RP=região posterior, N=núcleo, V=vesícula secretora, L=luz intestinal, AL = alimento, Mu=músculos.76

Figuras do Artigo III

Figura 1. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 3° estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. 1A: vista geral das células epiteliais da região anterior do mesêntero. Notar a presença de inúmeras mitocôncrias (detalhe) e presença da matriz peritrófica (seta). 1B: detalhe da região basal, evidenciando a presença de mitocôndrias e dobras da membrana plasmática. 1C: Notar a presença de vacúolos e microvilosidades na região apical destas células. 1D: vista geral das células epiteliais da região mediana do mesêntero. 1E: aspecto da região basal, destacando as dobras na membrana plasmática basal, indicando trocas iônicas (seta). 1F: detalhe da região apical destas células evidenciando as microvilosidades e vacúolos digestivos de mitocôndria. 1G: vista geral das células epiteliais da região

posterior do mesêntero. 1H: detalhe da região basal com vacúolos digestivos. 1I: detalhe da região apical destas células, evidenciando a presença de longas microvilosidades de vacúolos digestivos com presença de figuras mielínicas. Nu=nucléolo, N=núcleo, ES= espaço subperitrófico, M=mitocôndria, MV=microvilosidades, VD=vacúolo digestivo.....93

Figura 2. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 24 h ao diterpeno da *Copaifera reticulata*. 2A: vista geral das células da região anterior do mesêntero. 2B: detalhe da região basal destacando presença de mitocôndrias (detalhe). 2C: detalhe da região apical, evidenciando a matriz peritrófica (cabeça de seta). 2D: vista geral das células da região mediana do mesêntero. 2E: região basal celular evidenciando a lâmina basal e vacúolo digestivo. 2F. Região apical celular com intensa vacuolização. 2G. Vista geral das células da região posterior do mesêntero. 2H: região basal celular com dobras da membrana plasmática basal (seta). 2I: detalhe da região apical celular evidenciando grande quantidade de microvilosidades e a formação de grandes vesículas secretoras. Nu=nucléolo, N=núcleo, ES= espaço subperitrófico, M=mitocôndria, MV=microvilosidades, VD=vacúolo digestivo, Va=vacúolos...95

Figura 3. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 24 h ao tanino catéquico de *Magonia pubescens*. 3A: vista geral das células da região anterior do mesêntero, evidenciando o alto grau de destruição celular. Notar no detalhe a presença de mitocôndrias. 3B: detalhe da região basal celular com grande quantidade de mitocôndrias e de dobras da membrana plasmática basal. 3C: detalhe da região apical celular com a presença de grandes vacúolos. 3D: vista geral das células da região mediana do mesêntero. 3E: detalhe da região basal celular destacando a presença de vacúolos digestivos. 3F: detalhe da região apical celular evidenciando os vacúolos digestivos e a formação de projeções apicais secretoras. 3G: vista geral das células da região posterior do mesêntero com a presença de vacúolos digestivos e núcleos irregulares. 3H: detalhe da região

basal evidenciado o descolamento da célula da membrana basal (setas). 3l: detalhe da região apical celular evidenciando os vacúolos. Nu=nucléolo, N=núcleo, ES= espaço subperitrófico, M=mitocôndria, MV=microvilosidades, VD=vacúolo digestivo, Ve=vesículas, V=vacúolos.....95

RESUMO

A dengue e a febre amarela urbana são doenças causadas por *Flavivirus*, constituindo problemas de importância em saúde pública nas faixas tropical e subtropical do mundo. Há apenas vacina disponível para a febre amarela. A transmissão de ambas as doenças ao homem se faz pela picada da fêmea de *Aedes aegypti*. O controle do vetor é feito através da eliminação dos criadouros potenciais, aplicação de larvicidas em coleções de água e, para os adultos, aplicações espaciais de inseticidas. Os problemas originados do uso contínuo de inseticidas químicos foram o aparecimento de populações resistentes a esses produtos e a preocupação com os danos ambientais provocados pela degradação lenta destes produtos. Na busca de alternativas de controle ao vetor, estudos estão sendo desenvolvidos com substâncias de origem botânica, com o intuito de controlar os vetores e preservar o meio ambiente. A utilização dos inseticidas naturais tem algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, por serem renováveis e de degradação rápida. Além disso, a sua composição é bastante complexa, diminuindo a velocidade do aparecimento de resistência e é de baixa toxicidade para mamíferos, aves e meio ambiente. Neste trabalho, apresentam-se as alterações morfohistológicas e ultraestruturais do tanino catéquico extraído da *Magonia pubescens*, e do Diterpeno extraído da *Copaifera reticulata* sobre as larvas de *A. aegypti* a fim de evidenciar os mecanismos de ação dessas substâncias. Para a microscopia de luz, larvas de 3º estágio foram submetidas a soluções a 37ppm de tanino catéquico e 9ppm do diterpeno, onde permaneceram por até 24h. As larvas que atingiram estado letárgico foram coletadas e fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2, incluídas em resina e as lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina-eosina. Para a microscopia eletrônica, as larvas foram submetidas às mesmas concentrações do tanino catéquico e diterpeno, onde permaneceram por 22 h. As larvas que atingiram estado letárgico foram coletadas e dissecadas e seus tubos digestórios fixados em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2 e pós fixado em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0.1M. Em seguida foram contrastados com acetato de uranila a 1%, desidratados, emblocados e polimerizados. Os cortes

ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo, depois eletromicrografados. As alterações causadas pelo tanino catéquico observadas pela microscopia de luz e eletrônica foram a alta vacuolização, ausência dos limites citoplasmáticos, morte por autofagia, desorganização celular, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático, aumento do espaço intercelular, desprendimento de células da lâmina basal e mudança estrutural dos microvilos. As alterações pelo diterpeno, pela microscopia de luz e eletrônica foram alta vacuolização citoplasmática, hipertrofia celular e dos núcleos, degeneração do bordo em escova, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático das células, estratificação do epitélio e dobras na matriz peritrófica.

Palavras-chaves: *Magonia pubescens*. *Copaifera reticulata*. *Aedes aegypti*. Ultraestrutura. Controle.

ABSTRACT

The dengue and yellow fever are caused by *Flavivirus*, and are an important problems in public health in the range of tropical and subtropical world. There is only available vaccine for yellow fever. The transmission of both diseases to humans is by the bite of female *Aedes aegypti*. The vector control is done through the elimination of breeding potential, application of larvicides in collections of water for adults' vectors space applications of insecticides. The problems arising from continuous use of chemical insecticides have been the emergence of resistant populations to these products and concern about the environmental damage caused by slow degradation. In search of alternatives for the vector control, studies are being developed with substances of botanical origin, with the aim to control the vectors and preserve the environment. The use of natural insecticides has some advantages when compared to synthetic because they are renewable and have rapid degradation. Moreover, its composition is quite complex, reducing the speed of emergence of resistance and be of low toxicity to mammals, birds and environment. This study presents the morphohistologic and ultrastructural changes of catechist tannin extracted from *Magonia pubescens*, and the Diterpene extracted from *Copaifera reticulata* on the larvae of *A. aegypti* with the objective to evidence the mechanisms of action of these substances. For light microscopy, the 3rd stage larvae were subjected to a solution of catechist tannin 37ppm and the diterpene 9ppm, where they remained for up to 24h. Larvae that reached lethargic state were collected and fixed in 4% in the paraformoldehyde buffer 0.1 M sodium cacodilate pH 7.2, included in resin and the slides stained with hematoxylin-eosin technique. For electron microscopy, larvae were subjected to the same concentrations of catechist tannin and diterpene, where they remained for 22 h. Larvae that reached lethargic state were collected and dissected and their gut fixed in 2% glutaraldehyde, 2% paraformoldehyde, 3% sucrose in sodium buffer cacodilate 0.1 M pH 7.2 and post fixed in osmium tetroxide at 1% in cacodilate sodium 0.1 M. After this they were contrasted with uranyl acetate 1%, dehydrated, embedded and polymerized. The ultra sections were contrasted with uranyl acetate 3% and lead citrate and were characterized by electron microscopy. The changes caused by catechist tannin observed by light

and electron microscopy were high vacuolation, absence of cytoplasmic limits, cellular aging, cell disruption, vesicular apical formation with release of cytoplasmic content, increase in intercellular spaces, detachment of cells from the basal lamina and structural change of microvilli. Changes by diterpene by light and electron microscopy were high cytoplasmic vacuolation, cells and nuclei hypertrophy, degeneration of the edge brush, vesicular apical formation with release of cytoplasmic contents of cells, stratification of the epithelium and folds in the peritrophic matrix.

Keywords: *Magonia pubescens*. *Copaifera reticulata*. *Aedes aegypti*. Ultrastructure. Control.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue, Febre Amarela e *Aedes aegypti*

A dengue é uma doença febril aguda, causada por vírus, de evolução benigna na forma clássica, e grave, quando se apresenta na forma hemorrágica. É hoje a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui um sério problema de saúde pública no mundo. Seu agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivirus*. São conhecidos quatro sorotipos do vírus da dengue: Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4 (MS 2002).

O quadro clínico da dengue clássica envolve sintomas como febre, enxaqueca, mialgia, artralgia, fraqueza e anorexia; vômitos e diarreia moderada são comuns. A forma hemorrágica é caracterizada por febre súbita, náusea, vômitos, todos os tipos possíveis de manifestações hemorrágicas, sinais de vazamento capilar difuso e queda da pressão arterial (Marzochi 1994; Monath 1994). A taxa de fatalidade da dengue hemorrágica é 5%, mas nos países onde a fisiopatologia da doença é bem conhecida pelos clínicos e as condições de atendimento ao paciente são boas, a taxa cai para menos que 1% (Gubler 2004).

A transmissão da dengue ao homem se faz pela picada da fêmea de *Aedes aegypti*. Infelizmente, ainda não se desenvolveu uma vacina eficaz na prevenção da dengue. Então, até o momento, o controle do vetor se apresenta como única forma de controlar a doença. Basicamente, esse controle é feito através da eliminação dos criadouros potenciais do vetor, aplicação de larvicidas em depósitos de água de consumo e uso de inseticidas para as formas adultas, durante os períodos de transmissão (Tauil 2001).

Nos últimos anos tem-se observado um aumento da circulação da dengue no Brasil e no mundo, assim como a incidência de casos de dengue hemorrágica. As razões para essa re-emergência da dengue ainda não são completamente entendidas, mas estão claramente relacionadas às mudanças demográficas e da sociedade, que ocorreram nos últimos 50 anos. Os crescentes processos de urbanização, com o aumento da densidade populacional nas grandes cidades contribuem para uma maior possibilidade de transmissão do vírus. Além disso, as cidades crescem de forma desordenada,

sem infra-estrutura adequada, insuficiência de saneamento básico, principalmente o abastecimento de água e coleta de lixo. A produção, cada vez maior, de recipientes plásticos descartáveis, aumenta o número de criadouros potenciais do mosquito e o aumento das viagens aéreas e do transporte em geral nos últimos tempos propicia um ambiente ideal para a propagação do vírus entre os centros populacionais (Marzochi 1994; Taail 2001; Gubler 2004).

A febre amarela também é uma doença infecciosa causada por *Flavivirus*. A maioria das pessoas infectadas com o vírus da febre amarela desenvolve sintomas discretos ou não apresenta manifestações da doença. O grau de gravidade da doença é bastante variado podendo ocorrer formas oligossintomáticas até fulminantes (Vasconcelos 2003; Figueiredo 2006). Acredita-se que 90% dos casos sejam classificados como formas leves e moderadas e apenas 10% como formas graves e malignas. A forma leve da doença tem como características clínicas febrícula ou febre moderada, de início súbito, acompanhada ou não de cefaléia discreta, astenia ou indisposição passageira e tontura. Após algumas horas ou dias, o paciente recupera-se completamente, sendo esta forma facilmente confundida com um mal estar passageiro. Na forma moderada o quadro clínico mostra-se mais duradouro. Acontece com início súbito ocorrendo febre e cefaléia intensa, náuseas com ou sem vômitos, mialgias e artralgias. Ocorrem sintomas clássicos como epistaxe, albuminúria e subicterícia. Esta forma dura cerca de três dias e o paciente também se recupera sem seqüelas. A forma grave inicia-se abruptamente com febre elevada, cefaléia intensa e dores musculares generalizadas. Há icterícia, albuminúria e hemorragias. Esta forma cursa por até 7 dias. Na forma grave o paciente apresenta sintomas clássicos que caracterizam a falência hepato-renal. Seus sintomas são início abrupto, febre elevada, cefaléia holocraniana intensa e os demais sintomas da forma leve e moderada. Esse quadro evolui por dois a três dias e depois o paciente relata sensação de melhora, porém, repentinamente ocorre piora do quadro quando os sintomas de toxicidade e hemorragia podem ser fatais (MS 1999).

A febre amarela urbana é transmitida ao homem através da picada do *A. aegypti*, um mosquito hematófago altamente domiciliado. Já a transmissão da febre amarela silvestre ocorre através do mosquito *Haemagogus*, que vive

nas copas das árvores, onde sugam os primatas. Pessoas não vacinadas que se expõem em áreas florestais endêmicas podem se infectar, adoecerem de febre amarela e uma vez retornando à cidade para tratamento, podem servir de fonte de infecção para o *A. aegypti*, principal disseminador da febre amarela urbana (MS 1999; Prata 2000; Penna 2003; Vasconcelos 2003; Figueiredo 2006).

O mosquito *A. aegypti* é originário da África onde ainda mantém seus hábitos silvestres, se alimentando, principalmente, em roedores e outros animais selvagens. Foi disseminado por todo continente americano pelo próprio homem através do transporte dos seus ovos, larvas e até do mosquito adulto em navios, aviões e veículos terrestres. No mundo moderno o *A. aegypti* se adaptou facilmente às áreas urbanas das cidades e vive preferencialmente dentro das casas ou perto delas, uma vez que lá encontra melhores condições para sua reprodução: sangue humano e depósitos com água. As fêmeas passaram a ovipor em ecótopos artificiais localizados no domicílio e peridomicílio. Quase toda coleção de água limpa e parada (caixas d' água, cisternas, latas, pneus, cacos de vidro e vasos de plantas) funciona como criadouro potencial para sua proliferação. Alguns pesquisadores já relataram o desenvolvimento do mosquito também em água poluída (Monath 1994; Silva et al. 1999). Apenas a fêmea é hematófaga e a alimentação sanguínea é necessária para completar o processo de amadurecimento de seus ovos (Monath 1994; Gubler 1998).

Os ovos não são colocados em contato com a água, mas sim na parede do recipiente. Os ovos podem permanecer viáveis por até 490 dias, bastando apenas o contato com a água para ocorrer a eclosão, que acontece em diferentes intervalos de tempo, dando ao *A. aegypti* maiores chances de sobreviver às adversidades do meio ambiente. A quiescência e os diferentes períodos de eclosão dos ovos são adaptações do mosquito que favorecem sua expansão e que dificulta seu controle (Silva et al. 1998; Silva & Silva 1999).

1.2. Resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos

Mesmo diante de diversos avanços importantes no desenvolvimento de medidas alternativas para o controle de mosquitos, como os inseticidas

botânicos, os inseticidas químicos ainda se mantêm como parte vital dos programas de controle de insetos vetores. A maior problemática no controle vetorial da dengue é o desenvolvimento da resistência aos inseticidas químicos, o que favorece o crescimento das populações de mosquitos resultando no aumento dos índices de casos da doença (Luna et al. 2004).

Por mais de 30 anos, o organofosforado temefos foi o larvicida exclusivo usado no Brasil para controle do *A. aegypti*. Com as epidemias de 1986, seu uso foi amplamente intensificado. Em pouco tempo, casos de resistência começaram a surgir, levando à implantação de programas de monitoramento da suscetibilidade do mosquito aos inseticidas químicos (Braga et al. 2004). Pesquisadores vêm relatando o desenvolvimento de resistência em diversas regiões do Brasil (Andrade & Modolo 1991; Campos & Andrade 2001; Polanczyk et al. 2003; Braga et al. 2004; Carvalho et al. 2004; Luna et al. 2004).

A existência de vetores resistentes a um determinado produto químico pode ocorrer como resultado de fatores genéticos e operacionais, entre outros. A resistência é uma característica genética que se insere numa população em função do uso de inseticidas. Ou seja, quanto mais o inseticida for utilizado, mais rápido e maior é a seleção de insetos resistentes na população e, conseqüentemente, maior o nível de resistência atingido. A capacidade dos insetos de tolerar concentrações inicialmente letais promove uma redução gradual na eficácia dos inseticidas, até a sua completa ineficiência. Os fatores operacionais também desempenham um importante papel na implantação da resistência. Estes estão relacionados ao uso de inseticidas (classe, formulação e concentração do inseticida, método de aplicação, freqüência de tratamentos, etc.) e por isso, podem ser perfeitamente controlados, fato que, na verdade, não ocorre devido ao uso indiscriminado dos produtos (Cruz 2002; Carvalho et al. 2004).

No processo de desenvolvimento de resistência pode ocorrer um fenômeno denominado de “resistência cruzada” que é a proteção contra mais de um inseticida por apenas um mecanismo de ação; comum entre inseticidas piretróides, onde toda a classe torna-se comprometida. E, dependendo do mecanismo envolvido, a resistência a um determinado inseticida pode levar também ao estabelecimento de resistência a inseticidas de outras classes,

dificultando a substituição do produto. O principal problema, quando ocorre indicativo de resistência, é a necessidade do emprego de maiores concentrações ou quantidade do composto, na tentativa de recuperar sua eficácia e o aumento da frequência de aplicação e substituição do produto. Essa medida é econômica e ambientalmente negativa, além de não conseguir controlar a expansão territorial dos insetos vetores (Cruz 2002).

1.3. Impacto na natureza

Uma questão ainda mais séria se refere ao impacto ambiental. Devido a existência de populações do mosquito resistentes ao produto, um número maior de aplicações é utilizada de forma irracional, de modo que, cada vez mais quantidades desses produtos são colocadas na natureza causando grandes estragos. Um bom exemplo disto foi o uso do DDT, um inseticida do grupo dos organoclorados que foi utilizado com grande sucesso a partir dos anos 40 no combate ao mosquito vetor da malária e em pragas agrícolas. Durante décadas, o produto foi largamente usado no país até ser comprovado seu potencial cancerígeno e seu extenso tempo de degradação (4 a 30 anos). O principal problema do DDT é sua ação indiscriminada, que atinge tanto os insetos quanto o resto da fauna e da flora da área afetada (D'Amato et al. 2002).

A contínua utilização do controle químico no combate aos insetos vetores pode causar grandes desequilíbrios ambientais mediante a eliminação de insetos benéficos, a contaminação do meio ambiente (solo, água, atmosfera e seres vivos), e as intoxicações acidentais em pessoas devido à má utilização dos inseticidas. Este último, trazendo sérios problemas de saúde pública. Generalizando, todas as substâncias químicas podem causar efeitos adversos à saúde dependendo da dose e das condições às quais os indivíduos são expostos a elas (Paumgartten 1993).

As maiores vítimas de intoxicações são os agentes de saúde que trabalham no controle de vetores causadores de endemias. Esses agentes, normalmente, não têm treinamento adequado para o manuseio dos inseticidas utilizados, trabalham sem os equipamentos de proteção individual necessários e os aparelhos de pulverização utilizados encontram-se em péssimo estado de

conservação. E, infelizmente esse problema ainda se estende por diversos municípios brasileiros. Os sintomas de intoxicação por inseticidas organofosforados são lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. A intoxicação por inseticidas do grupo piretróide são menos comuns, devido a sua baixa toxicidade aos mamíferos. Reações alérgicas são os sintomas mais comumente encontrados, incluindo; dermatite, asma, rinite alérgica. As manifestações cutâneas mais frequentes são eritema, prurido, pápulas e vesículas (Cavaliere et al. 1996).

Todos esses fatores alertam a comunidade científica para a elaboração de formas alternativas para o controle dos insetos vetores. Neste contexto, os inseticidas botânicos ou inseticidas naturais apresentam-se como uma opção econômica e correta ecologicamente.

1.4. Inseticidas botânicos como alternativa no controle de vetores

Na busca por alternativas de controle contra o *A. aegypti*, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas no intuito de se descobrirem novas substâncias inseticidas de origem vegetal.

As plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microrganismos e que, portanto, desenvolvem mecanismos de defesa contra predadores, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas. Estas também sintetizam inúmeros compostos voláteis para atrair polinizadores e se defenderem de herbívoros (Simas et al. 2004). Desta forma, substâncias extraídas da casca do caule, das folhas e dos frutos de diversas plantas têm demonstrado propriedades larvicidas no controle de diversos culicídeos.

A utilização dos inseticidas botânicos tem algumas vantagens quando comparada ao emprego de inseticidas químicos. Os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradáveis, ou seja, possuem baixo poder residual e por isso são considerados menos poluentes; sua composição é bastante complexa e isso diminui o risco de resistência, além de também minimizar a toxicidade aos mamíferos, aves e ao meio ambiente (Roel 2001).

Vários experimentos já demonstraram o efeito tóxico de substâncias extraídas de plantas sobre diversos culicídeos. Investigações sobre a atividade larvicida do *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e da *Magonia pubescens* sobre *A. aegypti* demonstraram resultados significativos no controle deste inseto (Silva et al. 2004; Simas et al. 2004). Para controle do mosquito *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose bancroftiana, comprovou-se o efeito larvicida do óleo-resina de *Copaifera reticulata* (Silva et al. 2003).

A maioria dos estudos existentes relata apenas a atividade de extratos brutos, poucos trabalhos relatam à atividade de extratos purificados e princípios ativos puros (Silva et al. 2004; Geris et al. 2008).

Os estudos sobre as propriedades inseticidas das plantas nos remetem a um possível controle vetorial com baixo impacto ambiental e baixo custo econômico.

1.5. Estudos morfohistológicos

Apesar da existência de várias linhas de pesquisas sobre a atividade larvicida de plantas, poucos estudos relatam o mecanismo de ação desses compostos no vetor, através de análises morfológicas. Destes trabalhos, a maioria é sobre técnicas de microscopia de luz e uma minoria utiliza a microscopia eletrônica com técnica de análise metodológica.

Rey et al. (1999) estudando os efeitos histopatológicos de ácido tânico sobre o mesêntero de larvas de Diptera, em microscopia eletrônica, relataram o efeito tóxico do ácido sobre o epitélio intestinal destas larvas destacando seu mecanismo de ação.

David et al. (2000) estudaram a toxicidade das plantas *Alnus glutinosa*, *Populus nigra* e *Quercus robur* em larvas de Diptera através da técnica de microscopia eletrônica e relataram os efeitos histopatológicos destas plantas sobre as larvas, destacando sua capacidade larvicida e descrevendo seu mecanismo de ação.

Os efeitos tóxicos do extrato etanólico de *M. pubescens*, sobre larvas de *A. aegypti*, foram analisados por Arruda et al. (2003) através da microscopia de luz e de testes histoquímicos, onde as alterações detectadas

principalmente ao longo de todo mesêntero da larva comprovaram o efeito deletério celular do extrato.

Estudos de análise das alterações morfohistológicas, em microscopia de luz, também em larvas de *A. aegypti* causadas pelo óleo-resina da planta *C. reticulata* foram realizados por Abed et al. (2007) que comprovaram o potencial larvicida deste extrato.

1.6. Bioprospecção

As plantas respondem a estímulos ambientais bastante variáveis, de natureza física, química ou biológica. Fatores ambientais como tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica, dentre outros, podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais. Além desses, há interações e adaptações coevolutivas complexas produzidas entre as plantas e o ecossistema. Nesta adaptação ao meio ambiente, são produzidas substâncias importantes para sua manutenção e proteção. O metabolismo primário das plantas é o responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares e outras substâncias responsáveis por suas principais funções vitais. Do metabolismo secundário resultam substâncias de baixo peso molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades, como alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides. Tais estruturas funcionariam como agentes defensivos na luta contra predadores, a exemplo de microorganismos patogênicos. Os fenilpropanóides e, especialmente, os terpenóides são os principais constituintes que estão envolvidos nas interações planta-inseto (Alves 2001).

Na busca para se obter substâncias ativas de plantas, a medicina popular pode ser fonte de importantes informações. Estudos revelam a existência de uma maior probabilidade de se encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Logo, para a análise das substâncias bioativas de uma planta, deve-se primeiramente, escolher a espécie a ser estudada e em seguida definir o local de coleta. A planta deve ser seguramente identificada. Deve-se coletar entre 3-5 kg do material, pois grandes quantidades da planta possibilitarão a determinação dos constituintes presentes em baixas

concentrações. A secagem pode ser realizada ao sol, à sombra ou em estufa a 40°C, sempre com circulação de ar. A armazenagem deve ser feita em sacos plásticos, acondicionados em caixas de papelão guardadas em local seguro, com baixa umidade e temperatura para a prevenção de reações de oxidação, hidrólise, ataque de microorganismos, entre outros. A moagem só deverá ser efetuada na ocasião da preparação dos extratos (Maciel et al. 2002).

Para a extração, a percolação é o processo preferencialmente utilizado, pois apresenta menor risco de reações químicas, na formação de artefatos, decorrentes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas. Para uma única extração (a frio ou a quente) usa-se geralmente um solvente polar metanol (MeOH) ou etanol (EtOH); para mais de uma extração utiliza-se três tipos de solventes: apolar, de polaridade moderada e polar. No entanto, devido aos protocolos internacionais que condenaram o uso de solventes clorados, proibindo sua produção, estes solventes já não devem ser mais utilizados para a preparação de extratos, sendo portando, mais indicado, uma única extração utilizando MeOH ou EtOH. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades (Cechinel Filho & Yunes 1998).

Todos os extratos devem ser testados biologicamente e aquele que apresentar atividade de interesse, deverá ter seus compostos isolados e purificados através de procedimentos cromatográficos. Podem ser empregadas a cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O tipo de extrato que se está trabalhando e as condições de infra-estrutura do laboratório são fatores determinantes na escolha dos métodos e separação (Maciel et al. 2002).

Para a identificação dos compostos orgânicos podem ser utilizadas: cromatografia na região do infravermelho (IV) – indica a presença ou ausência de grupos funcionais; cromatografia na região do ultravioleta (UV) – define a presença de compostos que possuem ligações insaturadas em conjugação; ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ^1H e ^{13}C) – que,

respectivamente, determina a natureza e o ambiente químico de hidrogênios e carbonos, é a técnica mais importante para investigação da estrutura molecular; espectrometria de massa (EM) – fornece dados sobre o peso e a fórmula molecular e possibilita a identificação de fragmentos característicos da molécula (Cechinel Filho & Yunes 1998; Maciel et al. 2002).

Como se pode observar, as pesquisas das propriedades medicinais das plantas requerem o envolvimento de diversas áreas de conhecimento (biólogos, químicos, etc.). A integração destas áreas conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de substâncias capazes de auxiliar o homem no controle de várias doenças.

1.7. *Copaifera reticulata*

A *C. reticulata* (*Leguminosae*) é caracterizada como uma árvore de grande porte, de crescimento lento, medindo de 25 a 40 m de altura. A floração das copaibas ocorre entre os meses de outubro e julho e a frutificação entre junho e outubro, com variações dentro destes intervalos, dependendo da região e do clima (Almeida et al. 1998).

As espécies de *Copaifera* são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. O gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que dezesseis destas só são encontradas no Brasil nas regiões Amazônica e Centro-oeste. Entre as espécies mais abundantes destaca-se a *C. reticulata* Ducke (Veiga Junior & Pinto 2002). São árvores popularmente conhecidas como copaibas ou pau d'oleos (Veiga Júnior & Pinto 2002; Rigamonte-Azevedo et al. 2006).

A madeira da *Copaifera* é de grande interesse econômico, seu óleo é utilizado na medicina popular por possuir propriedade anti-inflamatória, além de também ser utilizado na indústria de cosméticos (Veiga Junior & Pinto 2002).

As copaibeiras são árvores de crescimento lento podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0.4 a 4 m de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvida por um arilo abundante e colorida. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares. A

floração e frutificação das copaíbas ocorrem a partir dos 5 anos de idade, em plantios (Veiga Júnior & Pinto 2002).

A espécie mais utilizada para a aquisição do óleo de copaíba é a *C. reticulata*. As utilizações do óleo de copaíba pela medicina popular ocorrem principalmente como antiinflamatório, cicatrizante, antimicrobiano, antibacteriano, diurético e expectorante. A composição química do óleo de copaíba é principalmente de sesquiterpenos e diterpenos (Geris et al. 2008; Veiga Júnior & Pinto 2002; Veiga Júnior et al. 2007).

1.8. *Magonia pubescens*

A planta *M. pubescens*, pertencente à família Sapindaceae, é caracterizada como uma árvore de médio porte, geralmente atingindo entre 5 e 9 m de altura. Sua distribuição é predominante no Cerrado, sendo encontrada nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. É normalmente utilizada na construção civil, na recuperação de áreas degradadas e no fornecimento de subprodutos como o papel (Lorenzi 1992; Joly 1993).

Suas folhas são paripenadas, com três a seis pares de folíolos glabros, medindo de três a seis centímetros de largura. Floresce nos meses de agosto e setembro e a maturação dos frutos ocorre depois de cerca de nove meses.

A espécie *M. pubescens* possui um fruto grande e marrom e é popularmente conhecida como tinguí ou timbó. Sua madeira é muito utilizada na produção de carvão e suas sementes são usadas para a fabricação de sabão caseiro utilizado para o tratamento de dermatites, seborréia, inseticida e mata piolho (Souza & Felfili 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Verificar a ocorrência de alterações provocadas pelo uso do diterpeno ($C_{22}H_{34}O_4$) de *C. reticulata* e do tanino catéquico ($C_{45}H_{16}O_{18}$) de *M. pubescens* no tubo digestório de larvas de 3º estágio do *A. aegypti*.

2.2. Específicos

Evidenciar o mecanismo de ação do diterpeno extraído da planta *C. reticulata* e do tanino catéquico extraído da planta *M. pubescens* através das análises, em microscopia de luz e eletrônica de transmissão, das principais alterações celulares ocorridas no mesêntero de larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* submetidas a estes compostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das larvas

As larvas do mosquito *A. aegypti* foram obtidas da criação do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do IPTSP/UFG mantida há mais de 10 anos. A criação do mosquito se processou numa câmara biológica climatizada com temperatura de $28 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 h de acordo com a metodologia de Silva et al. (1998).

Nesta criação as fêmeas são alimentadas em camundongos imobilizados em uma tela de náilon e os machos em algodão, usando para isso um absorvente feminino interno (tipo o.b.) embebido em água açucarada (Silva et al. 1998) (Figura 1A, B). Um recipiente de vidro âmbar contendo água e um papel de filtro, do tipo coador de café, é colocado dentro da gaiola para a realização de posturas. O papel contendo os ovos é coletado diariamente, seco em temperatura ambiente e em seguida, acondicionado em sacos plásticos e armazenado em uma ovoteca.

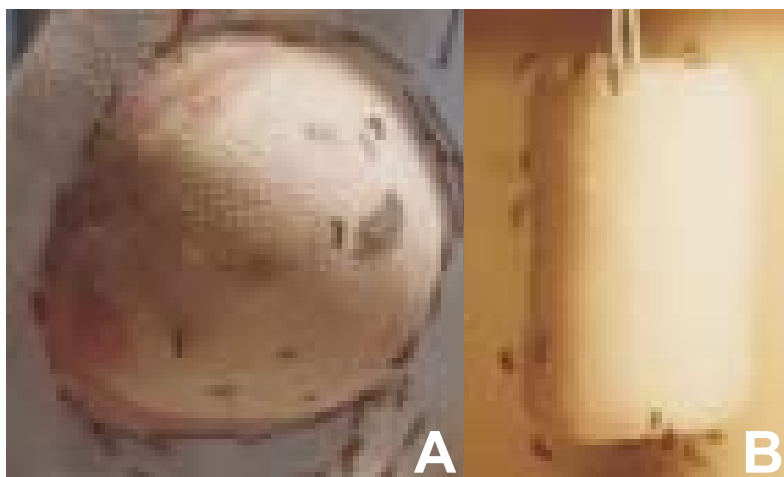


Figura 1 – A: camundongos presos em tela de náilon usados na alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti*. B: absorvente interno feminino embebido em água açucarada usado na alimentação de machos de *Aedes aegypti*.

3.2. Obtenção do Material Vegetal

3.2.1. *Copaifera reticulata*

O óleo bruto de *C. reticulata* foi obtido a partir da coleta direta do seu tronco, em Jacundá, Pará, Brasil (outubro 2001). O tronco foi perfurado em 70 centímetros do solo. O óleo-resina foi coletado, filtrado através de nylon, e armazenado em frascos âmbar até a sua utilização. O furo na planta foi selado com argila.

Uma amostra do óleo (186,5g) foi submetida à partição líquido-líquido com hexano e metanol (1:1), resultando em dois extratos: hexânico (162,3g) e metanólico (22,8g). Esses extratos foram posteriormente submetidos a CC, usando hexano, diclorometano e metanol, seguindo a técnica de gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 8 frações do extrato hexânico (CRH₁ a CRH₈) e mais 8 frações a partir do extrato metanólico (CRM₁ a CRM₈). As frações bioativas (CRH₁, CRH₄, CRH₅, CRM₁, CRM₅) foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando solução de vanilina como revelador. Este procedimento resultou em subfrações que foram monitoradas por CCD e analisadas por RMN de ¹H.

As análises determinaram a composição química das subfrações ativas derivadas de *C. reticulata* contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. A subfração CRM₅₋₇ foi a que apresentou maior atividade larvicida. Esta subfração foi analisada por CCD e posteriormente por RMN ¹H ¹³C, sendo identificado em sua composição um diterpeno labdano nomeado de 3-acetoxi-labdano-8(17)13-dien-15-oico (C₂₂H₃₄O₄). Suas CL₅₀ e CL₉₀ foram estabelecidas em 0.8 e 8.2 ppm, respectivamente (Silva *et al.* 2007; Geris *et al.* 2008).

3.2.2. *Magonia pubescens*

As cascas do caule de *M. pubescens* foram coletadas na região de Alto Paraíso – Chapada dos Veadeiros – Goiás, no mês de novembro de 2001, e trazidas ao Laboratório de Bioatividade de Plantas, IPTSP/UFG. As cascas foram secas em estufa de ventilação forçada, a 40°C, e moídas até baixa granulometria. Em seguida, 1.4Kg do pó foi extraído por percolação com etanol (72 h), por duas vezes consecutivas, à temperatura ambiente, e o extrato bruto foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo (60.2g). Após os resultados de atividade larvicida do extrato bruto etanólico (e.b.e.) sobre *A. aegypti*, cerca de 51.2g deste material foi submetido à cromatografia em coluna utilizando como fase móvel os solventes *hexano*, diclorometano e metanol, seguindo a técnica de gradiente de polaridade. Foram obtidas nove frações, as quais foram codificadas como MP₁ a MP₉. As frações bioativas foram monitoradas quimicamente através de CCD, utilizando como revelador uma solução ácida de vanilina. Além disso, essas amostras foram analisadas por RMN de H¹ em um espectrômetro Bruker ARX-200, utilizando como solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃) ou metanol deuterado (CD₃OD), e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno de referência. A análise das frações por espectrometria de massa foi realizada em um espectrômetro QuattroLC – Micromass, utilizando como fonte de ionização ESI/APCI nos modos negativo e positivo.

As análises determinaram previamente a atividade e a composição química das frações derivadas de *M. pubescens* contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, sendo que a fração MP-9, na qual se identificou um tanino catéuico, foi a fração química que mostrou maior atividade larvicida contra *A.*

aegypti, sendo as CL₅₀ e CL₉₀ estabelecidas em 3.1 e 36.6 ppm respectivamente (Silva et al. 2004)

3.3. Bioensaios

Cartelas de papel de filtro contendo ovos de *A. aegypti* foram retiradas da ovoteca e colocadas em bacias plásticas, com água proveniente da rede pública de abastecimento. As larvas foram alimentadas com ração para gatos, colocada diretamente nas bacias, segundo a metodologia de Silva et al. (1998). À medida que ocorreriam as eclosões, as larvas eram retiradas e separadas em outras bacias, para dar continuidade ao ciclo. Para o experimento foram utilizadas larvas em início de 3º estágio, imediatamente após a muda, por se tratarem de larvas mais resistentes para tais estudos (Silva et al. 1998).

Para o presente estudo foi utilizada as CL₉₀ do diterpeno de *C. reticulata* (8,2 ppm) e do tanino de *M. pubescens* (36,6 ppm). A fim de facilitar os cálculos e pesagem do material, estas concentrações foram ajustadas para 9 ppm e 37 ppm respectivamente. Estes compostos foram diluídos utilizando-se apenas água destilada. Optou-se pela não utilização de diluentes químicos a fim de descartar qualquer interferência destes produtos nas análises morfohistológicas.

Essas soluções foram distribuídas em copos de poliestireno, descartáveis. Nestes foram colocados 25 mL de cada uma das soluções e, em seguida, 25 larvas. Foram feitos 4 experimentos, todos em duplicata.

Para a realização deste experimento foram separados 3 grupos, sendo eles: Grupo 1: Larvas submetidas a solução larvicida de diterpeno; Grupo 2: Larvas submetidas a solução larvicida de tanino catéquico e Grupo 3: larvas controle submetidas a água destilada.

As larvas controle foram submetidas às mesmas condições do teste. Todos os grupos foram alimentados com ração para gato, triturada, segundo a metodologia de Silva et al. (1998).

Para a microscopia de luz as larvas foram deixadas nas substâncias por tempos variados, sendo coletadas em intervalos de 3 h, por 24 h, para a verificação das alterações. Para as análises em microscopia eletrônica de

transmissão as larvas foram deixadas nas soluções por 22 h, sendo coletadas apenas as larvas em estágio de letargia.

Para verificar a letalidade foram observadas a mobilidade das larvas e a reação das mesmas a estímulos externos como foco de luz (luz de lanterna) e mecânico (toque com estilete, toque com bastão de vidro na parte externa do recipiente). As larvas foram observadas em estereomicroscópio Dimex MZS 250, e só foram coletadas as larvas que se apresentavam em estado letárgico, as larvas mortas foram descartadas, porém seus dados foram anotados. Após serem retiradas das soluções teste e controle, as larvas foram imediatamente colocadas em fixador.

3.4. Processamento histopatológico

3.4.1. Microscopia de luz

As preparações em historesina para microscopia de luz foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia (DMORF) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG.

O fixador utilizado para este experimento foi paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2. As larvas foram fixadas inteiras em temperatura ambiente por um período de no mínimo 2 h, segundo metodologia utilizada por Arruda et al. (2008). Depois de fixadas, as larvas foram lavadas no mesmo tampão e submetidas à desidratação através de soluções com concentrações crescentes de etanol (50, 70, 80, 90 e 95%) por um período de 10 min em cada solução. Após a desidratação as larvas foram colocadas em resina de embebição (resina básica + ativador) “Leica Historesin Embedding Kit”, por um período de 12 h à temperatura ambiente. Posteriormente à embebição, o material foi incluído em resina (resina de embebição + catalizador), pertencente ao mesmo kit (soluções preparadas segundo especificações do fabricante), utilizando-se para isso moldes de silicone, colocando as larvas na posição desejada. Os moldes com o material foram deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 12 h para total polimerização da resina.

Após a polimerização, os materiais foram montados em blocos de madeira com cola araldite, e posteriormente seccionados com navalha de vidro, em micrótomo Leiz 1512, adaptado para cortes semifinos, com espessura de 3 μm , pertencente ao Departamento de Morfologia do ICB-UFG. Os cortes foram distendidos em banho-maria, a temperatura ambiente, e transferidos para lâminas histológicas, em seguida corados em hematoxilina e eosina (HE) como método de rotina baseado nos livros: Pearse (1985), Gabe (1976); Melo & Vidal (1980); Filipe & Lake (1983); Prophet et al. (1992); conforme a seguinte técnica:

1. Corar com hematoxilina de Harris à temperatura ambiente por 5 min
2. Lavar em água corrente
3. Secar em estufa a 40°C
4. Corar com Eosina alcoólica por 20 segundos
5. Lavar imediatamente em água corrente
6. Secar e montar em entellan

As lâminas foram analisadas e foi realizado o registro fotográfico em Fotomicroscópio Zeiss Axioskop MC80 adaptado com câmera digital.

3.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro, segundo as técnicas descritas nos livros: Glauert (1975); Souza (1989); Bozzola & Russel (1992); Benchimol et al. (1996) e Souza (1998).

As larvas coletadas foram dissecadas sob estereomicroscópio (MZS-250), em uma gota do fixador apropriado e seus tubos digestórios retirados e fixados para microscopia eletrônica de transmissão. O fixador utilizado teve a seguinte composição: 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2.

Após esta fixação, o material foi lavado no tampão cacodilato de sódio (2 lavagens de 30 min) e pós fixado em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0.1M, por 2 h a 4°C e, depois submetido a duas lavagens de 30 min com o tampão cacodilato de sódio 0.1M. Em seguida os tubos digestórios foram colocados em álcool 10% como preparativo para a contrastação em

bloco. Esta contrastação foi feita com acetato de uranila a 1% em álcool 10% a temperatura ambiente “overnight”. O material foi lavado com água destilada e submetido ao processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool 70, 80, 90, 95, 100% (3x), álcool+óxido de propileno (volume/volume), óxido de propileno por 15 min cada. Após a desidratação os tubos digestórios foram deixados em óxido de propileno+Spurr e depois em Spurr puro por 1 h. Este último processo foi repetido por 3 vezes. Em seguida o material foi deixado em Spurr por 24 h, emblocado e polimerizado por 24 h a 70°C.

Os blocos, já preparados, foram seccionados em ultramicrotomo Leica Ultracut. Inicialmente foram feitos cortes semifinos que foram transferidos para lâminas de vidro e corados com azul de toluidina para observação e rastreamento do material no microscópio de luz. Os cortes ultrafinos foram colocados em telinhas de cobre recobertas com Colódio/Carbono, e contrastadas com Acetato de Uranila 3% por 30 min e solução de Citrato de Chumbo(Reynolds) por 10 min em temperatura ambiente. Após a secagem, as telinhas foram levadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 para serem examinadas e fotografadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são apresentados nos artigos 1, 2 e 3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed RA, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG 2007. 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 Pat Trop* 36: 87-95.
- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF 1998. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA – CPAC. 129 pp.
- Alves HM 2001. A diversidade química das plantas como fonte de

fitofármacos. *Cad Tem Quím Nova Esc.* 3: 10-15.

Andrade CFS, Modolo M 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev. Saúde. Publ.* 25: 184-187.

Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG 2008. 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 Pat Trop* 37: 255-267.

Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG 2003. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas a ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. *Entomol Vect* 10: 47-60.

Benchimol M, Attias M, Silva NLC, Carvalho TMU 1996. *Métodos de Estudo da Célula*. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF, 143 pp.

Bozzola JJ, Russel LD 1992. *Electron Microscopy: principles and techniques for biologist*. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 199 pp.

Braga IA, Lima JBP, Silva SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.

Campos J, Andrade CFS 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Publ.* 35: 232-236.

Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C 2004. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev Saúde Pública* 38: 623-629.

Cavaliere MJ, Calore EE, Perez NM, Puga FR 1996. Miotoxicidade por

organofosforados. *Rev Saúde Pública* 30: 267-272.

Cechinel Filho V, Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. *Quím Nova* 21: 99-105.

Cruz I 2002. *Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em Spodoptera frugiperda (Smith)*. Embrapa Milho e Sorgo. Documentos 21, 150 pp.

D'Amato C, Torres JPM, Malm O 2002. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Quím Nova* 25: 995-1002.

David JP, Delphine R, Pautou MP, Meyran JC 2000. Differential Toxicity of Leaf Litter to Dipteran Larvae of Mosquito Developmental Sites. *J Invertebr Pathol* 75: 9-18.

Figueiredo LTM 2006. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 203-210.

Filipe MI, Lake BD 1983. *Histochemistry in Pathology*. New York: Churchill Livingstone. 349 pp.

Gabe M 1976. *Histological Techniques*. Paris. Masson. 1106 pp.

Geris R, Silva IG, Silva HHG, Barison A, Rodrigues-Filho E, Ferreira AG 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med trop S Paulo* 50: 25-28.

Glauert AM 1975. *Fixation, dehydration and embedding of biological Specimens*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. 207 pp.

- Gubler DJ 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
- Gubler, DJ 2004. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp. Immun Microbiol Infect Dis* 27: 319–330.
- Joly AB 1993. *Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal*. São Paulo: Ed. Nacional Família Sapindaceae. 428 pp.
- Lorenzi H 1992. *Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, Piracicaba, Plantarum. 196 pp.
- Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev Saúde Publ.* 38: 842-843.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova* 25: 429-438.
- Marzochi KBF 1994. Dengue in Brazil- situation, transmission and control – A proposal for ecological control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 235-245.
- Melo MLS, Vidal BC 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo, Edgar Blücher Ltda. 69 pp.
- Monath, TP 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Nati Acad Sci* 91: 2395-2400.
- MS – Ministério da Saúde 2002. *Guia de vigilância epidemiológica*/Fundação Nacional de Saúde, Brasil. 806 pp.
- MS – Ministério da Saúde 1999. *Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela – Brasília* : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde. 60 pp.

- Paumgarten FJR 1993. Avaliação de risco de substâncias químicas: O elo entre a toxicologia e a saúde pública. *Cad Saúde Pública* 9: 439-447.
- Pearse AGE 1985. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. London, J & A Churchill Ltda. 998 pp.
- Penna, MLF 2003. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cad Saúde Pública* 19: 305-309.
- Polanczyk RA, Garcia MO, Alves SB 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis Berliner* no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 37: 813-816.
- Prata, A 2000. Yellow Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 9: 183-187.
- Prophet EB, Arrington JB, Sabin LH 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington-DC, American Registry of Pathology. 275 pp.
- Rey D, Pautou MP, Meyran JC 1999. Histopathological Effects of Tannic Acid on the Midgut Epithelium of Some Aquatic Diptera Larvae. *J Invertebr Pathol* 73: 173-181.
- Rigamonte-Azevedo OC, Wadt PGS, Wadt LHO 2006. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da amazônia. *Soc Invest Florest* 30: 583-591.
- Roel AR 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Católica Dom Bosco. *Rev Intern Desenvol Local* 1: 43-50.
- Silva HHG, Geris R, Rodrigues Filho E, Rocha C, Silva IG 2007. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinioideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 264-267.
- Silva HHG, Silva IG 2000. Estudos do ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*

(Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) a partir de ovos com quatro meses de estocagem em laboratório. *Rev Pat Trop* 29: 95-100.

Silva HHG, Silva IG, Lira KS 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Pat Trop* 27: 53-63.

Silva HHG, Silva IG, Oliveira CLNS, Elias CN 1999. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomol Vect* 6: 383-391.

Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindácea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399.

Silva IG, Zanon VOM, Silva HHG 2003. Larvicidal Activity of *Copaifera reticulata* Ducke Oil-Resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 32: 729-732.

Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Filho AMO 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova* 27: 46-49.

Souza W 1998. *Manual sobre técnicas básicas em Microscopia Eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas*. 179 pp.

Souza W 1989. *Manual sobre técnicas básicas em Microscopia Eletrônica*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 105 pp.

Souza CD, Felfili JM 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 135-142.

Tauil PL 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Pública* 17:

99-102.

Vasconcelos PFC 2003. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 275-293.

Veiga Junior VF, Pinto AC 2002. O GÊNERO *Copaifera* L. *Quim Nova* 25: 273-286.

Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *J Ethnopharmacol* 112: 248–254.

Artigo 1 – será submetido à Revista de Patologia Tropical

ALTERAÇÕES MORFOHISTOLÓGICAS EM LARVAS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA, CULICIDAE) CAUSADAS PELA TANINO CATÉQUICO ISOLADO DA PLANTA *Magonia pubescens* (SAPINDACEAE)

RESUMO

O controle do *Aedes aegypti* é hoje um dos grandes problemas de saúde pública no Brasil, por ser o principal vetor da dengue e febre amarela urbana. De origem africana, este mosquito adaptou-se muito bem as condições climáticas brasileiras e hoje se encontra distribuído em todos os estados. Os métodos usuais de combate e controle desse mosquito têm sofrido vários questionamentos. Os inseticidas químicos atualmente utilizados têm levado ao surgimento de populações resistentes de mosquitos, e a conseqüente elevação de sua densidade desencadeou grandes epidemias de dengue. Substâncias inseticidas de origem botânica têm mostrado ser candidatas alternativas ao controle. Este trabalho apresenta pela primeira vez, as alterações morfohistológicas causadas pela atividade larvicida do tanino catéquico extraído de *Magonia pubescens* sobre as larvas de *A. aegypti*, mostrando o potencial larvicida deste

composto natural. Larvas de 3º estágio foram submetidas ao tanino catéquico, a 37ppm, solubilizado em água, onde permaneceram por até 24 h. As larvas que atingiram estado letárgico foram coletadas e fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2, incluídas em resina, montadas em lâminas, coradas pela hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia de luz. Os principais efeitos tóxicos celulares do tanino catéquico sobre larvas de *A. aegypti* foram a alta vacuolização e ausência dos limites citoplasmáticos, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático, aumento do espaço intercelular e desprendimento de células da membrana basal.

DESCRITORES: *Aedes aegypti*. *Magonia pubescens*. Controle.

INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue e febre amarela urbana no Brasil, tem sido alvo de constantes campanhas de saúde pública no país. De origem africana, chegou ao Brasil na época da colonização através dos navios de tráfico negreiro (44). Por se tratar de um inseto altamente antropofílico, doméstico e hematófago, se adaptou prontamente às condições urbanas e hoje tem como criadouros preferenciais os mais variados depósitos artificiais de água limpa e também poluída (15, 19, 32, 52, 59). Seus ovos podem permanecer viáveis por até 490 dias no meio ambiente bastando apenas o contato com a água para que ocorra a eclosão (50).

A febre amarela, causada por um vírus do gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae é endêmica em 34 países africanos. A África retém 90% dos casos de febre amarela do mundo. Na América do Sul sua ocorrência tem sido registrada na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela. No Brasil, as áreas de risco incluem as regiões Norte, Centro Oeste, o estado do Maranhão e parte dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (31, 41, 62).

O primeiro relato de febre amarela no Brasil consta de 1685 e ocorreu em Recife/PE. Em 1686 uma epidemia levou ao óbito 900 pessoas em Salvador/BA. A realização de grandes campanhas de prevenção possibilitou o controle das epidemias,

mantendo um período de silêncio epidemiológico por cerca de 150 anos no país. Em 1849 uma epidemia de febre amarela matou 2.500 pessoas em Salvador/BA e 4.160 pessoas no Rio de Janeiro/RJ. Somente em 1932 o ciclo silvestre foi identificado e desde então surtos localizados acontecem nas áreas classificadas como áreas de risco (30). Em Goiás ocorreram dois surtos de febre amarela urbana, um em 1972 com 44 óbitos e o outro em 2000 com 53 óbitos. No período de 1980 a 2004 houve a ocorrência de 339 óbitos devido à febre amarela silvestre (31).

Clinicamente, a febre amarela pode variar de quadros assintomáticos e oligossintomáticos até as formas moderada, grave e maligna. Seus principais sintomas são calafrios, cefaléia intensa, dor lombossacral, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, bradicardia e hemorragia gengival nos quadros mais leves. Nos quadros graves a febre com vômitos se torna mais freqüente, há epigastria, prostração e icterícia, seguidos de diátese hemorrágica com hematêmese (vômito negro), melena, metrorragia, petéquias, equimoses, sangramento de mucosas, desidratação e disfunção renal. Apesar de letal esta doença pode ser facilmente prevenida pelo uso da vacina anti-amarilica, uma das vacinas de vírus vivo atenuado mais segura e eficaz (17, 41).

A dengue é causada por um vírus do gênero *Flavivírus* e atualmente são conhecidos quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (23, 47). A dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 estados da Federação, distribuída por 3.794 municípios (7, 49).

A primeira epidemia documentada ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista/RO. Em 1986, ocorreram epidemias no Rio de Janeiro e em algumas capitais da região Nordeste onde se identificou a ocorrência da circulação do sorotipo DEN-1. Em 1990 foi identificada a circulação de um novo sorotipo, o DEN-2, também no estado do Rio de Janeiro. A circulação do DEN-3 foi identificada, pela primeira vez, em dezembro de 2000, também no estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, no estado de Roraima, em novembro de 2001. Ainda não há relatos sobre a circulação do DEN-4 no Brasil. Durante a epidemia de 2002 observou-se a rápida dispersão do sorotipo 3 para outros estados, sendo que em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue. A ocorrência de grandes epidemias geralmente está associada à introdução de novos sorotipos em áreas indenes (31, 45, 60, 61). Nas epidemias de 1998, 2002 e 2007 houve mais de 1,8 milhões de casos notificados de dengue no Brasil.

Ainda hoje não existe nenhuma vacina eficaz para prevenção da dengue, desta forma o combate ao *A. aegypti* continua sendo a única forma de se impedir o avanço da doença no país (56). Dentre as formas de controle ao *A. aegypti* destacam-se o controle químico, o biológico, o genético e o botânico.

O controle químico é basicamente realizado pelo uso de organofosforados e piretróides, comumente utilizados nas campanhas de saúde pública (36). Porém, apesar de eficazes, o uso destes compostos por várias décadas tem provocado o aparecimento da resistência dos insetos a estes larvicidas e adulticidas; resistência que tem sido relatada por muitos pesquisadores (6, 8, 9, 12, 28).

Entre as medidas de controle biológico, os peixes larvófagos são bastante utilizados, especialmente para bebedouros de grandes animais, fossos de elevador de obras, espelhos d'água/fontes ornamentais, piscinas abandonadas e depósitos de água não potável. Estudos revelam que as espécies *Trichogaster trichopteros*, *Astyanax fasciatus*, e *Betta splendens* são peixes que apresentam grande competência como predadores de larvas (33). As bactérias do tipo *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti) são também eficientes no controle de larvas de *A. aegypti* e vêm sendo usadas no Brasil em substituição ao temephos em regiões onde foi detectada resistência do *A. aegypti* a esse organofosforado. Sua ação é causada por três tipos de toxinas produzidas pela bactéria o que reduz a probabilidade do desenvolvimento de resistência. Além disso, o Bti não é tóxico a humanos e pode ser usado juntamente com produtos químicos para aumentar a eficiência do controle (40).

Como controle genético de mosquitos vetores, várias linhas de estudos estão sendo desenvolvidas como a utilização de machos estéreis para a redução da fertilidade da população local e a produção de cepas não suscetíveis a agentes de doenças, visando à substituição das populações locais por essas cepas. No entanto, ainda não foi possível incorporar nenhum desses métodos aos programas de controle (15).

Na busca de medidas alternativas para o controle de *A. aegypti*, muitos pesquisadores tem se dedicado à pesquisa de inseticidas de origem botânica. Estes inseticidas possuem as vantagens de persistirem por pouco tempo no meio ambiente e por serem formados por vários princípios ativos a resistência dos insetos a essas substâncias só ocorreria muito lentamente (46). Vários experimentos já demonstraram o efeito tóxico de substâncias extraídas de plantas sobre diversos insetos vetores (2, 10, 20, 22, 24, 25, 27, 37, 39, 51, 54, 55, 57).

Magonia pubescens é uma árvore de médio a grande porte, pertencente à família Sapindaceae e possui um fruto grande e marrom. É comumente encontrada nos Cerrados do Ceará até Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, popularmente é conhecida como tingui. A madeira é muito utilizada na produção de carvão e as sementes usadas para a fabricação de sabão caseiro utilizado para o tratamento de dermatites, seborréia e piolhida (59).

A planta *M. pubescens* tem se destacado como um potente larvicida natural no combate ao *A. aegypti* e outros culicíneos, porém a maioria dos trabalhos realizados com esta planta destaca o uso do extrato bruto (2, 16, 24, 37, 54, 63).

Do fracionamento do extrato bruto etanólico de *M. pubescens*, obteve-se a fração MP₉, na qual, por técnicas cromatográficas e espectrométricas identificou-se um tanino catéquico (C₄₅H₁₆O₁₈) que apresentou um maior potencial larvicida contra o *A. aegypti*.

Os taninos são fenóis hidrossolúveis que participam do sistema de defesa vegetal contra os microrganismos, herbívoros e contra condições ambientais hostis (29, 38).

Este trabalho tem o objetivo de elucidar o mecanismo de ação do tanino catéquico extraído da planta *M. pubescens* sobre as larvas de *A. aegypti* a fim de confirmar o potencial larvicida deste composto natural.

MATERIAL E MÉTODOS

As larvas do mosquito *A. 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 do mosquito se processou numa câmara biológica, climatizada a 28±1°C, umidade relativa de 80±5% e fotoperíodo de 12 h com metodologia já definida (53).

Para o experimento foram utilizadas larvas em início de 3º estágio, imediatamente após a muda, por se tratarem de larvas mais resistentes para tais estudos (53).

Estudos realizados pelo Laboratório de Bioatividades de Plantas do IPTSP/UFG determinaram previamente a atividade e a composição química das frações derivadas de *M. pubescens* contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, sendo que a fração rica em

tanino catéquico foi a que mostrou maior atividade larvicida contra *A. aegypti*, sendo as CL_{50} e CL_{90} estabelecidas em 3,1 e 36,6 ppm, respectivamente (54).

Para o presente estudo foi utilizada uma concentração de 37 ppm, e não foi necessária a utilização de diluentes químicos, descartando qualquer interferência nas análises morfohistológicas.

Essa solução foi dividida igualmente, em 6 copos de poliestireno, descartáveis, e em seguida colocadas 25 larvas de 3º estágio em cada copo. Os experimentos foram realizados em duplicata. Foram utilizadas um total de 300 larvas.

Para as larvas controle utilizou-se apenas água destilada. Todos os grupos foram alimentados com ração para gato, triturada, segundo a metodologia já estabelecida (53).

As larvas foram deixadas na solução teste por tempos variados, sendo coletadas em intervalos de 3 h, por 24 h, para verificação das alterações. Após a coleta as larvas foram observadas em estereomicroscópio Dimex MZS 250. As larvas mortas foram descartadas, já as larvas que apresentavam estado letárgico e as larvas testes foram retiradas das soluções e imediatamente colocadas inteiras em fixador.

As preparações em historesina foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia (DMORF) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG.

A fixação foi realizada em paraformaldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2, em temperatura ambiente por um período de duas horas (2). Depois de fixadas as larvas foram lavadas no mesmo tampão e submetidas à desidratação através de soluções com concentrações crescentes de etanol por um período de 10 min em cada solução. Após a desidratação as larvas foram colocadas em resina de embebição “Leica Historesin Embedding Kit”, por 12 h, à temperatura ambiente, incluídas em resina, segundo especificações do fabricante, utilizando-se para isso moldes de silicone.

Após a polimerização, os blocos foram seccionados com navalha de vidro, em micrótomo Leiz 1512, adaptado para cortes semifinos, com espessura de 3 μ m. Em seguida os cortes foram corados em hematoxilina e eosina segundo método já estabelecido (18, 21, 35, 42).

As lâminas foram analisadas e o registro fotográfico foi em fotomicroscópio Zeiss Axioskop MC80 adaptado com câmera digital.

RESULTADOS

As larvas controle de *A. aegypti* apresentaram aspecto morfológico externo alongado e vermiforme. As larvas tratadas com o tanino catéquico isolado da *M. pubescens* apresentaram aspecto morfológico externo semelhante às larvas controle, porém, após 6 h de tratamento, foi observado que as larvas expulsavam a matriz peritrófica contendo todo o alimento do tubo digestório para o meio externo (Figura 1A e 1B).

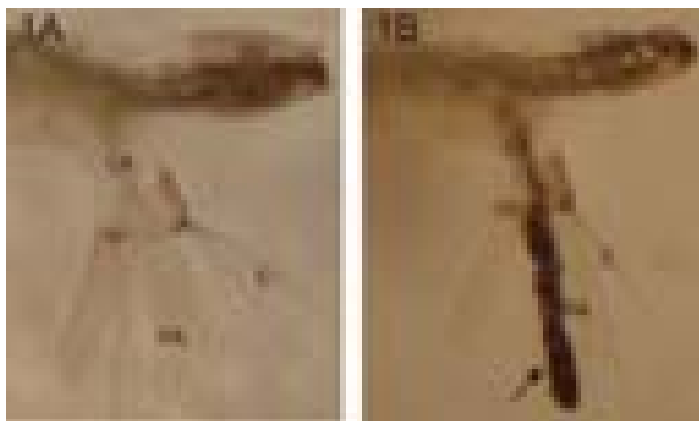


Figura 1. Aspecto morfológico das larvas de *Aedes aegypti*. **A.** Larva Controle. **B.** Larva tratada com tanino catéquico da *Magonia pubescens*. Notar a extrusão da matriz peritrófica (seta).
 Abreviações: SR = Sifão respiratório, LA = Lobo anal, C = Cerdas, S de Culicidae é formado por PA = Papilas anais. posterior.

A região anterior (Figura 2A) caracterizou-se por apresentar células epiteliais com citoplasma heterogêneo, acidofilia moderada, núcleo esférico e basal. Na superfície apical destas células encontrou-se um fino bordo em escova. A região mediana (Figura 2B) apresentou células epiteliais cúbicas com núcleo esférico e um bordo em escova fino e bem corado. Nesta região, observou-se uma fina membrana refringente à luz que envolve todo o conteúdo alimentar, denominada matriz peritrófica.

A região posterior (Figura 2C) apresentou células cilíndricas com intensa basofilia e núcleo esférico basal. A superfície apical mostrou-se com espesso bordo em escova, levemente acidófilo representando a grande quantidade de microvilosidades existentes nesta região. Em todas as três regiões do mesêntero, as células epiteliais apresentaram-se aderidas a membrana basal.

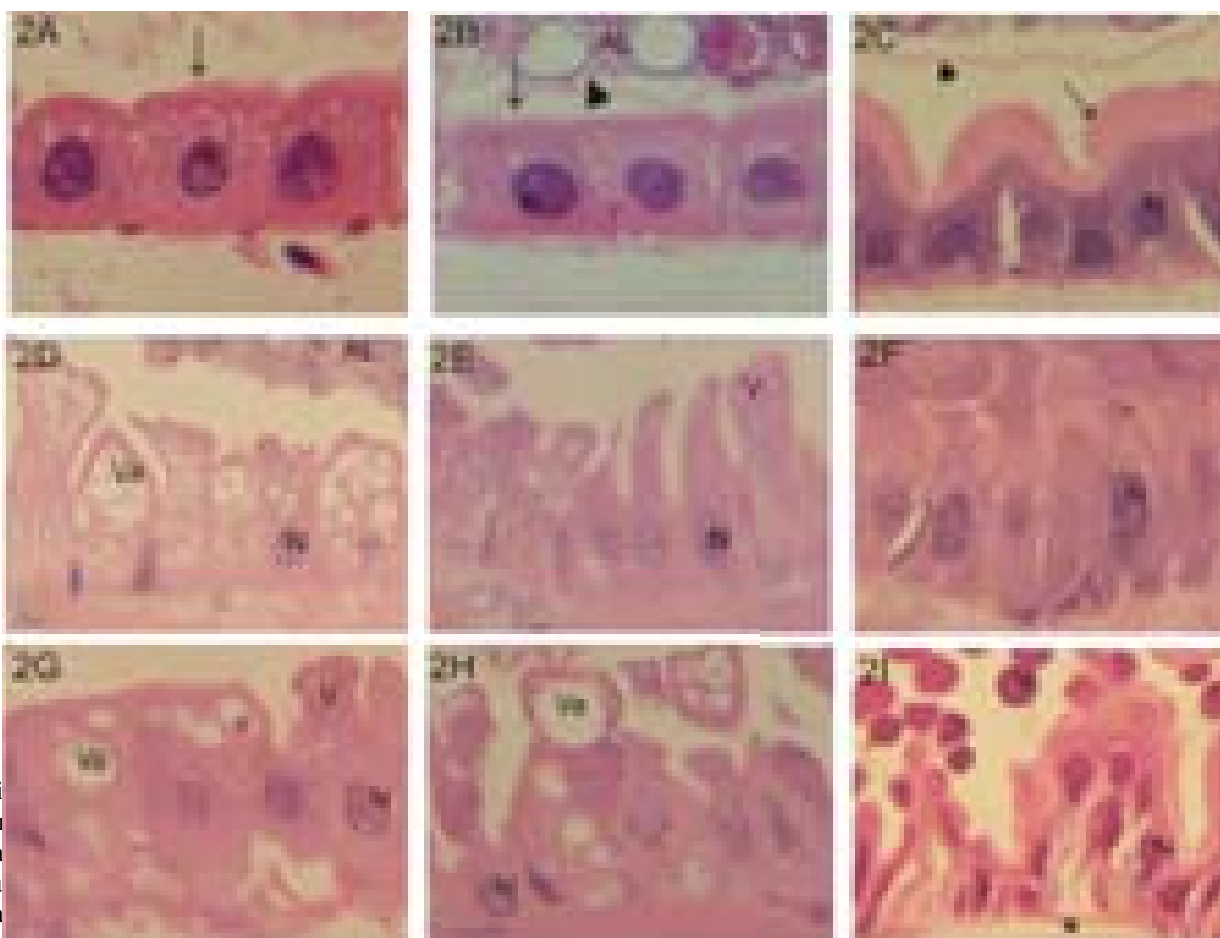
O epitélio intestinal das larvas de *A. aegypti* tratadas com o tanino catéquico mostrou-se com várias alterações, sendo que as mais significativas ocorreram nos tempos de 6, 12, 18 e 24h.

Após 6 h de tratamento com o tanino catéquico, as células da região anterior do mesêntero destas larvas apresentaram-se com um alto grau de destruição (Figura 2D). O citoplasma mostrou-se vacuolizado, adquirindo um aspecto ramificado e o núcleo apresentou-se com cromatina descondensada e ausência de nucléolo. Ao contrário da região anterior em que às alterações foram evidentes, a região mediana do mesêntero destas larvas apresentou células com certo aspecto de conservação (Figura 2E). O citoplasma mostrou-se com menor vacuolização e com aspecto esponjoso semelhante ao controle. Foi também possível notar que as células da região anterior e mediana perderam seu aspecto cúbico e se apresentaram com uma forma alongada, sugerindo a formação de vesículas na porção apical celular (Figuras 2D e 2E). As células da região posterior do mesêntero destas larvas mostraram-se com características de normalidade apresentando maior basofilia celular, forma cilíndrica, citoplasma esponjoso e intensa atividade secretora bem característica desta região (Figura 2F).

Com 12 h de exposição à solução de tanino catéquico as alterações celulares se estenderam por todas as três regiões do mesêntero. A região anterior mostrou-se com grandes vacúolos citoplasmáticos e formação de vesículas na região apical das células (Figura 2G). As células da região mediana também apresentaram grande quantidade de vacúolos no citoplasma além da ausência dos limites celulares (Figura 2H). A região posterior apresentou células com intensa atividade secretora percebida pela presença de várias vesículas nesta região. Notou-se que algumas células desprenderam-se da membrana basal (Figura 2I).

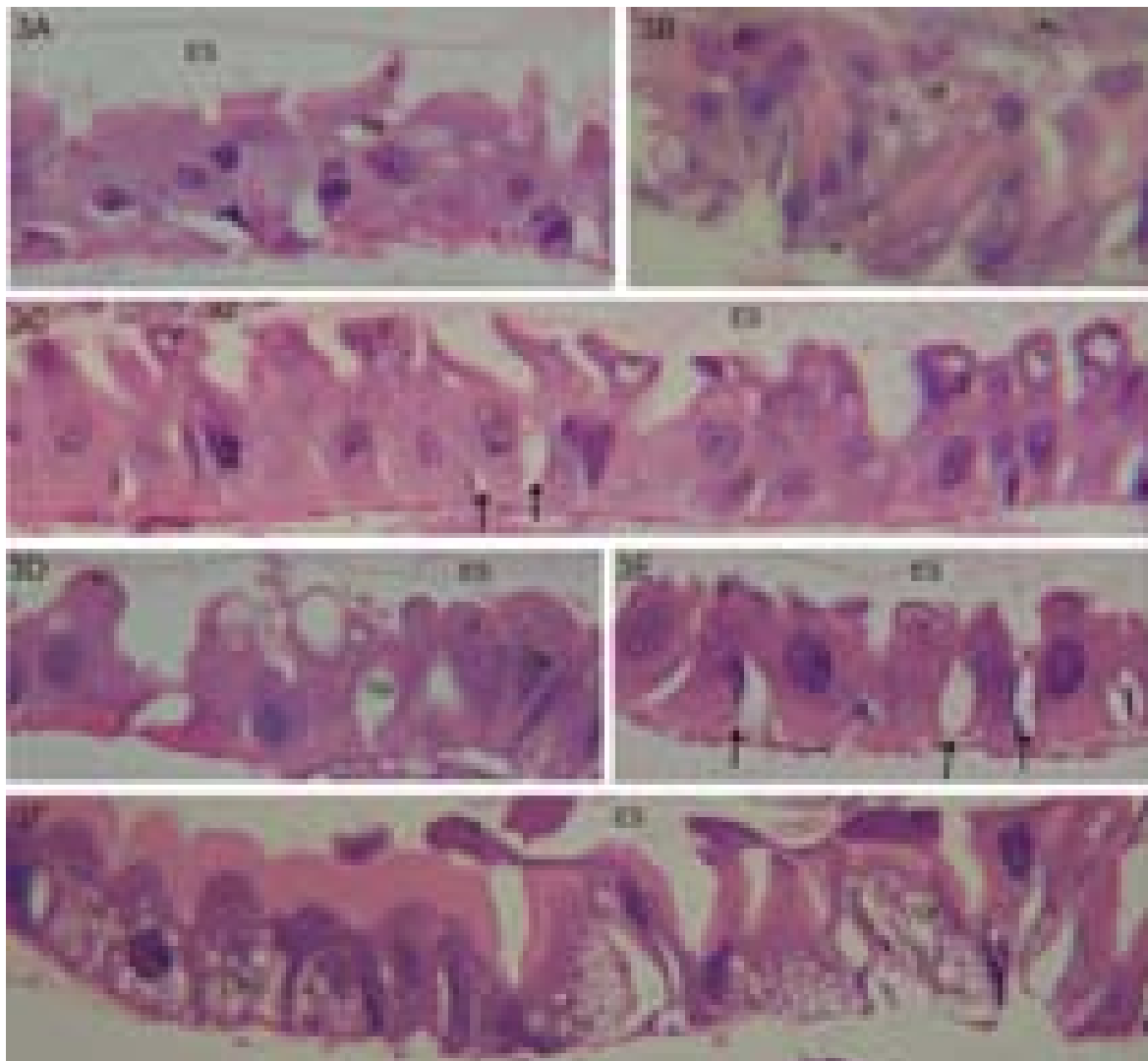
As Figuras 3A, B, C mostram as regiões anterior, mediana e posterior do mesêntero de larvas mantidas por 18 h na solução de tanino catéquico. Neste momento foi possível perceber que a destruição celular, antes mais intensa nas regiões anterior e mediana, agora se apresentou também na região posterior do mesêntero. As células da região anterior (Figura 3A) apresentaram-se com acúmulo de material na região apical, limite citoplasmático irregular e com diversos vacúolos no citoplasma. A região mediana (Figura 3C) apresentou-se com células vacuolizadas e um processo avançado de lise, uma vez que foi marcante a presença de formações vesiculares apicais em quase todas as células desta região. Esta vacuolização também foi observada na região posterior do mesêntero destas larvas (Figura 3B). As figuras 3A e 3C demonstraram um aumento do espaço subperitrófico e a presença de uma substância levemente corada neste espaço. Foi possível também observar nestas larvas a ausência do alimento na luz intestinal e a presença da matriz peritrófica fracamente corada.

Com 24 h de exposição ao tanino catéquico, as três regiões do mesêntero se mostraram altamente afetadas. As células da região anterior (Figura 3D) apresentaram grandes vacúolos citoplasmáticos e vesículas apicais. A região mediana (Figura 3E) apresentou células vacuolizadas, com formas irregulares e aumento do espaço intercelular. Já as células da região posterior do mesêntero destas larvas (Figura 3F) apresentaram-se altamente vacuolizadas e em intensa atividade secretora.



Fi
Ar
da
su
va
no

Fotomicrografias do mesenterio de larvas de *Aedes aegypti* submetidas por 12h ao tanino catequico isolado da planta *Magonia pubescens*. **2G.** Região Anterior com formação vesicular na porção apical do citoplasma e a presença de grandes vacúolos. 400X. **2H.** Região Mediana. Notar o citoplasma altamente vacuolizado. **2I.** Região Posterior. Grande quantidade de vesículas nesta região, com células se despreendendo da membrana basal (*). 400X. Bordo em escova (seta), Matriz peritrófica (cabeça de seta), núcleo (N), alimento (AL), vacúolos (Va), vesículas (V).



Figuras 3. A, B e C. Fotomicrografias do mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* submetidas por 18h ao tanino catéuico da *Magonia pubescens*. **3A.** Região Anterior. Presença de vesículas na porção apical das células e grandes vacúolos citoplasmáticos. 400X. **3B.** Região Posterior. Presença de vacúolos apicais citoplasmáticos. 400X. **3C.** Região Mediana. Notar o aumento do espaço intercelular (setas). Ocorre um acúmulo de substância no espaço subperitrófico que também é notado na região anterior. 400X. **Figuras 3D, E e F.** Fotomicrografias do mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* submetidas por 24 h ao tanino catéuico isolado de *Magonia pubescens*. **3D.** Região Anterior. Células com citoplasma vacuolizado. 400X. **3E.** Região Mediana. Maior espaço intercelular (setas). 400X. **3F.** Região Posterior. Células com citoplasma altamente vacuolizado. 400X. Núcleo (N), alimento (AL), vacúolos (Va), vesículas (V), espaço subperitrófico (ES).

DISCUSSÃO

Apesar da morfologia externa das larvas teste ter apresentado características semelhantes às larvas controle, a expulsão da matriz peritrófica após 6 h de tratamento foi um achado de grande importância para este estudo (Figuras 1A e 1B). Isto também foi notado em estudos com larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato bruto etanólico da mesma planta onde os autores também relataram a expulsão da matriz peritrófica pelas larvas tratadas, como uma forma de eliminar as substâncias tóxicas do seu interior e assim evitar maiores danos aos seus tecidos (2, 5, 11, 58).

A matriz peritrófica é uma matriz extracelular secretada pelo epitélio do mesêntero em alguns artrópodes. Esta membrana age como uma barreira protetora contra várias substâncias químicas, agentes microbianos e até mesmo contra agressões físicas causadas pelos alimentos ingeridos (2, 3, 4, 11, 25, 34, 58). O mesêntero é o principal alvo de substâncias tóxicas, químicas e biológicas, e a eliminação da matriz peritrófica juntamente com o alimento ingerido parece ser um mecanismo de defesa das larvas na tentativa de eliminar o tanino catéuico ingerido junto com o alimento e assim impedir os possíveis danos ao epitélio intestinal. Estudos relataram que a matriz peritrófica de larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato etanólico de *Derris urucu* sofreu ruptura e eliminação para o meio exterior e que estas alterações foram primordiais para comprovar a ação letal do extrato (25).

Nas análises microscópicas, as larvas controle apresentaram o mesêntero com três regiões distintas: anterior, mediana e posterior conforme descrito na literatura (1, 2, 3, 58). O epitélio destas três regiões apresentou-se formado por células cúbicas, citoplasma esponjoso e núcleos esféricos. As células das regiões anterior e mediana (Figuras 2A e 2B) apresentaram-se mais claramente coradas enquanto que as da região

posterior (Figura 2C) apresentaram-se mais basofílicas. Na superfície apical de todas as células do mesêntero observou-se a presença de uma camada delgada e refringente à luz, formando um fino bordo em escova. Esta camada mostrou-se muito delgada na região anterior, levemente mais aparente na região mediana e bastante espessa na região posterior, evidenciando a grande quantidade de microvilosidades nesta porção do mesêntero (Figuras 2C). As microvilosidades também estão presentes nas células epiteliais de Lepdoptera (26). Tanto em Lepdoptera como em Diptera as microvilosidades têm a função de absorção de nutrientes (26, 44). Também foi observada, na região posterior, a presença de células em intensa atividade secretora, caracterizada pela liberação do conteúdo citoplasmático em vesículas. Estudos demonstraram que estas vesículas são formadas por glicosaminoglicanos e que estas células teriam função de produzir enzimas e proteínas responsáveis pelo processo de digestão e absorção dos alimentos (2). Em todo o tubo digestório das larvas controle observou-se a presença de uma matriz peritrófica envolvendo o conteúdo alimentar.

As alterações morfológicas causadas pelo tanino catéquico isolado de *M. pubescens* foram mais evidenciadas na região anterior do mesêntero das larvas de *A. aegypti* tratadas, uma vez que esta região foi a primeira a ser atingida. Estas alterações progrediram para as outras regiões do mesêntero de forma progressiva. Em pesquisas recentes, as alterações causadas pelo extrato bruto etanólico de *M. pubescens* no mesêntero de larvas de *A. aegypti* também atingiram a região anterior, tornando-se extensivas para as outras regiões (2). Diversos autores demonstraram que a ação de extratos tóxicos no mesêntero de larvas de Diptera ocorre nas diversas regiões. Estudos de análise das alterações morfológicas em larvas de *A. aegypti* causadas pelo óleo-resina da planta *Copaifera reticulata* evidenciaram que as alterações celulares ocorreram em todo o mesêntero, sendo mais graves na região mediana (1). Estudos histopatológicos de larvas de Diptera submetidas à toxina Cry11Bb de *B. thuringiensis* sub. *medellin* (48) mostraram que o mesêntero posterior e os cecos gástricos são os principais sítios de localização dessa toxina.

Os principais efeitos tóxicos causados pelo tanino catéquico nas células do mesêntero de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* foram: alta vacuolização citoplasmática, ausência dos limites citoplasmáticos, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático das células, aumento do espaço intercelular e células desprendidas da membrana basal. Estes resultados são semelhantes aos processos

histopatológicos relatados em insetos, em resposta a uma variedade de substâncias tóxicas biológicas (1, 2, 3, 13, 14, 25, 43).

Estudos histopatológicos usando o ácido tânico sobre larvas de Diptera, relataram que as alterações atingiram primeiramente a região anterior do mesêntero progredindo para as regiões mediana e posterior (43). As principais alterações relatadas foram a presença de vacuolização, hipertrofia celular, deslocamento da membrana basal e degeneração da porção apical das células. Estes resultados são semelhantes aos relatados no presente trabalho.

A toxicidade de folhas frescas finamente trituradas de *Alnus glutinosa*, *Populus nigra* e *Quercus robur* foi demonstrada para larvas de Diptera, inclusive *A. aegypti*, no qual o mesêntero também se mostrou como o principal órgão atingido, seguido pelos cecos gástricos e túbulos de Malpighi. As principais alterações observadas por estes autores foram inchaço celular apical, vacuolização citoplasmática, ruptura da membrana basal e liberação do conteúdo citoplasmático para o lúmen intestinal. Em outro estudo (1) foi observado que estas mesmas alterações, somadas as modificações dos nervos periféricos, das microvilosidades, núcleo e nucléolo ocorreram em larvas de *A. aegypti* expostas ao óleo-resina de *C. reticulata*. Estas observações são compatíveis com as apresentadas neste trabalho.

Alterações em larvas de *A. aegypti*, *Anopheles albimanus* e *Culex quinquefasciatus* expostas à toxina Cry11Bd de *B. thuringiensis* sub. *medellin* ocorreram principalmente no mesêntero posterior destacando esta região como o principal ponto de ação desta toxina (48). As alterações mais comumente encontradas foram vacuolização citoplasmática, hipertrofia celular, destruição do bordo em escova, e degeneração celular. Estas mesmas alterações deletérias ocorreram em todo o mesêntero de larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato da planta *Sapindus saponaria* (3). Estes resultados, semelhantes aos relatados neste trabalho, evidenciam o processo de degeneração celular e aceleração do processo de lise das células epiteliais.

Larvas de *A. aegypti*, submetidas ao extrato bruto etanólico de *M. pubescens*, apresentaram alterações primariamente na região anterior do mesêntero que se direcionaram continuamente para as regiões mediana e posterior (2). Este fato também pôde ser observado no presente trabalho. As principais alterações histológicas observadas foram: destruição celular, alta vacuolização citoplasmática, aumento do espaço subperitrófico com acúmulo de material no seu interior, aumento no número de camadas do epitélio, aumento da espessura da matriz peritrófica e hipertrofia das

células (2). A destruição celular, a alta vacuolização do citoplasma, o aumento do espaço subperitrófico e a hipertrofia celular são compatíveis com os resultados deste trabalho e evidenciam a aceleração do processo de lise celular provocado pelo tanino catéquico. Em nosso trabalho a matriz peritrófica das larvas tratadas apresentou-se menos espessa do que as das larvas controle, se contrapondo aos resultados apresentados por outros pesquisadores (2). Isso se deve ao fato que a extrusão desta membrana foi um fato marcante neste trabalho. A maioria das larvas tratadas e coletadas para estudo apresentou no exame físico a extrusão da matriz peritrófica, e no exame histológico, apresentaram ausência do alimento no tubo digestório e aumento do espaço subperitrófico. Desta forma, concluímos que as características da matriz peritrófica apresentadas neste trabalho se deram pelo fato de ser uma membrana recém formada e que por isso apresentou-se mais fina e clara. Não foi observado no presente trabalho um aumento no número de camadas epiteliais em nenhuma região.

A presença de vesículas na região apical das células do mesêntero das larvas tratadas com tanino catéquico foi uma alteração presente em todos os tempos de exposição analisados e também presente na maioria dos trabalhos aqui referenciados (1, 2, 3, 13, 25, 43, 48).

Segundo Snodgrass (58) o processo de degeneração das células epiteliais do mesêntero dos insetos em geral ocorre através do acúmulo de material granular na porção apical e a liberação desse material na luz intestinal do inseto. De forma que a presença destas vesículas indica o potencial larvicida do tanino catéquico através da estimulação da lise celular.

Diante das alterações provocadas pelo tanino catéquico nas larvas de *A. aegypti* este produto se mostrou potencialmente tóxico e capaz de atuar como um eficiente larvicida contra este vetor. Maiores estudos serão necessários para a elaboração comercial deste produto e sua implementação nas medidas de controle e combate ao *A. aegypti*.

ABSTRACT

Changes in morphohistologic larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) caused by tannins catechist isolated from plant *Magonia pubescens* (Sapindaceae)

The control of *Aedes aegypti* is nowadays one of the great public health problems in Brazil, being the main vector of dengue and urban yellow fever. Of African origin, this mosquito is well adapted to Brazilian climatic conditions and is now distributed in all states. The usual methods to combat and control the mosquito have been suffering several questions. The chemical insecticides currently used have led to the emergence of resistant populations of mosquitoes and the consequent increase of its density, causing great epidemics of dengue. Substances insecticides of botanical origin are shown to be alternative candidates to the control. This work presents for the first time, morphohistologic changes caused by the larvicidal activity of tannin catechist extracted from *Magonia pubescens* on larvae of *A. aegypti*, showing the potential of this compound larvicidal natural. Larvae of the 3rd stage were subdue to tannin catechists, the 37ppm soluble in water, where they remained for up to 24 h. Larvae that reached lethargic state were collected and fixed in paraformaldehyde 4% in the buffer 0.1 M sodium cacodilate pH 7.2, included in resin, mounted on slides, stained with hematoxylin-eosin and analyzed by light microscope. The main cell toxic effects of tannin catechist on larvae of *A. aegypti* are the high vacuolation and absence of cytoplasmic limits, training with vesicular apical release of cytoplasmic content, increase in intercellular spaces and detachment of cells from the basal membrane.

Keywords: *Aedes aegypti*. *Magonia pubescens*. Control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abed RA, Cavasin GM, Silva HHG, 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 Pat Trop* 36: 87-95, 2007.
2. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36: 17-25, 2003.
3. Barreto CF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. Estudos das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato

- bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Rev Pat Trop* 35: 37-57, 2006.
4. Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 115-137, 2000.
 5. Borges RA, Cavasin GM, Silva IG, Arruda W, Oliveira ESF, Silva HHG, Martins F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Pat Trop* 33: 91-104, 2004.
 6. Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D. *Aedes aegypti*: Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203, 2004.
 7. Câmara FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RRC. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:192-196, 2007.
 8. Campos J, Andrade CFS. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Pública* 35: 232-236, 2001.
 9. Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev Saúde Pública* 38:623-629, 2004.
 10. Cavalcanti ESB, Moraes SM, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 541-544, 2004.
 1. Chapman, R. F. The insects: structure and function. Cambridge University Press. The alimentary canal . 1998
 1. Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Mova 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.

- 1 David JP, Delphine R, Pautou MP, Meyran JC. Differential Toxicity of Leaf Litter to
3. Dipteran Larvae of Mosquito Developmental Sites. *J Invertebr Pathol* 75: 9–18,
2000.
- 1 Delphine R, Pautou MP, Meyran JC. Histopathological Effects of Tannic Acid on the
4. Midgut Epithelium of Some Aquatic Diptera Larvae. *J Invertebr Pathol* 73, 173–
181, 1999.
- 1 Donalísio MR, Glasser CM. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue.
5. *Rev Bras Epidemiol* 5: 259-272, 2002.
- 1 Fernandes FF, D’Alessandro WB, Freitas EPS. Toxicity of Extract of *Magonia*
6. *pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dog Tick,
Rhipicephalus sanguineus (Latreille) (Acari: Ixodidae). *Neotrop Entomol* 37: 205-
208, 2008.
- 1 Figueiredo LTM. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:
7. 203-210, 2006.
- 1 Filipe MI, Lake BD. *Histochemistry in Pathology*. New York: Churchill Livingston,
8. 1983.
- 1 Forattini OP, Brito M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*.
9. *Rev Saúde Pública* 37:676-677, 2003.
- 2 Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MG. Atividade Larvicida de
0. Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 34:
843-847, 2005.
- 2 Gabe M. *Histological Techniques*. Paris. Masson, 1976.
1.
2 Geris R, Silva IG, Silva HHG, Barison A, Rodrigues-Filho E, Ferreira AG.
2. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes*
aegypti (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med trop S. Paulo* 50: 25-28, 2008.

- 2 Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496,
3. 1998.
- 2 Guimarães VP, Silva IG, Silva HHG, Rocha C. Atividade larvicida do extrato bruto
4. etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* St. Hil. sobre *Aedes albopictus*
(Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae). *Rev Pat Trop* 30: 243-249, 2001.
- 2 Gusmão DS, Páscoa V, Mathias L, Vieira IJC, Braz-Filho R, Lemos FJA. *Derris*
5. (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix
Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 371-
375, 2002.
- 2 Levy SM, Falleiros AMF, Gregório EA. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis*
6. (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the
epithelial cells. *Braz J Biol* 64: 633-638, 2004.
- 2 Lima MGA, Maia ICC, Souza BD, Morais SM, Freitas SM. Effect of stalk and leaf
7. extracts from euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae.
Rev Inst Med trop S Paulo 48: 211-214, 2006 .
- 2 Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA. Susceptibilidade
8. de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev Saúde Pública*
38:846-853, 2004.
- 2 Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Cavalcanti ELA. Taninos: Uma
9. abordagem da Química à Ecologia. *Quím Nova* 28: 892-896, 2005.
- 3 MS – Ministério da Saúde. Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela –
0. Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 1999.
- 3 MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância
1. Epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. –
Brasília : Ministério da Saúde, 2005.
- 3 Neves DP. Parasitologia Humana. 11 edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2005.
2.

- 3 Pamplona LGC, Pontes RJS, Regazzi ACF, Júnior FJP, Frutuoso RL, Sousa EP,
3. Dantas Filho FF, Lima JWO. Competência de peixes como predadores de larvas de
Aedes aegypti, em condições de laboratório. *Rev Saúde Pública* 41: 638-644, 2007.
- 3 Páscoa V, Oliveira MDP, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena M, Lemos FJA.
4. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood
digestion. *Insect Biochem. Mol Biol* 32: 517-523, 2002.
- 3 Pearse AGE. Histochemistry: Theoretical and Applied. London, J & A Churchill Ltda,
5. 1985.
- 3 Penna MLF. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cad*
6. *Saúde Pública* 19: 305-309, 2003.
- 3 Pimenta FC, Silva HHG, Ito IY, Guimarães VP, Silva IG. Avaliação da atividade
7. antimicrobiana do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil.
(Sapindaceae). *Rev Pat Trop* 29: 35-43, 2000.
- 3 Pinto GAS, Couri S, Leite SGF, Brito ES. Tanase: Conceitos, Produção e Aplicação.
8. B.Ceppa 23: 435- 462, 2005.
- 3 Pohlit AM, Quignard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Santos
9. EVM, Moraes SKR, Saraiva RCG, Ming LC, Alecrim AM, Ferraz AB, Pedrosa ACS,
Diniz EV, Finney EK, Gomes EO, Dias HB, Souza KS, Oliveira LCP, Castro LD,
Queiroz MMA, Henrique MC, Santos M, Lacerda Júnior OS, Pinto OS, 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.
- 4 Polanczyk RA, Garcia MO, Alves SB. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis*
0. Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 37: 813-816, 2003.
- 4 Prata A. Yellow Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 183-187, 2000.
1.
- 4 Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sabin LH. Laboratory Methods in
2. Histotechnology. Washington-DC: American Registry of Pathology, 1992.
- 4 Rey D, Pautou MP, Meyran JC. Histopathological Effects of Tannic Acid on the

- Midgut Epithelium of Some Aquatic Diptera Larvae. *J Invertebr Pathol* 73: 173–181, 1999.
- 4 Rey L. Parasitologia. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na
4. África. Artrópodes Parasitos ou Vetores de Doenças. Rio de Janeiro – RJ. 2001
- 4 Ribeiro AF, Marques GRAM, Voltolini JC, Condino MLF. Associação entre
5. incidência de dengue e variáveis climáticas. *Rev Saúde Pública* 40: 671-676, 2006.
- 4 Roel AR. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o
6. Desenvolvimento Rural Sustentável. *Interações (Campo Grande)* 1: 43-50, 2001.
- 4 Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*
7. 113: 946-951, 2004.
- 4 Ruiz LM, Segura C, Trujillo J, Orduz S. *In Vivo* Binding of the Cry11Bb Toxin of
8. *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the Midgut of Mosquito Larvae (Diptera:
Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73-79, 2004.
- 4 Serufo JC, Nobre V, Rayes A, Marcial TM, Lambertucci JR. Dengue: uma nova
9. abordagem. *Rev Soc Bras Med Trop* 33:465-476, 2000.
- 5 Silva HHG, Silva IG. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de
0. vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de
laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop* 32:349-355, 1999.
- 5 Silva HHG, Santos RMG, Rodrigues Filho E, Rocha C, Silva IG. Larvicidal activity of
1. oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke
(Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc
Bras Med Trop* 40: 264-267, 2007.
- 5 Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Rodrigues Filho E, Elias CN. Atividade larvicida
2. de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes
aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399, 2004.
- 5 Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e
3. estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Pat Trop*

27: 53-63, 1998.

- 5 Silva HHG, Silva IG, Oliveira CLNS, Elias CN. Adaptação do *Aedes aegypti*
4. (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomol Vet* 6: 383-391, 1999.

- 5 Silva IG, Santos AH, Ferri PHA, Rosa BN, Melo RL, Peixoto L, Silva HHG, Elias CN,
5. Isac E, Lira KS, Camargo MF. Ação larvicida de extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St.Hil. (tingui-do-cerrado), sobre o *Aedes aegypti* (Lin.) em laboratório. [*Rev Pat Trop* 25: 51-59, 1996.](#)

- 5 Silva LJ, Richtman R. Vaccines under development: group B *streptococcus*, herpes-
6. zoster, HIV, malaria and dengue. *J Pediat* 82: 115-124, 2006.

- 5 Simas NK, Lima EC, Kuster RM, Lage CLS, Filho AMO. Potential use of *Piper*
7. *nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 405-407, 2007.

- Snodgrass RE. Principles of insects morphology. Cornell University Press. The alimentary canal. 1993.

- 5 Souza CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás,
9. GO, Brasil. *Acta Bot. Bras* 20: 135-142. 2006.

- 6 Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública* 18:
0. 867-871, 2002.

- 6 Teixeira MG, Costa MCN, Barret ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever
1. epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saúde Pública*, 21: 1307-1315, 2005.

- 6 Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 275-293, 2003.
- 2.
- 6 Zanon VOM, Silva HHG, Santos RMG, Silva IG. Atividade larvicida do extrato
3. etanólico bruto da casca do caule de *Magonia pubescens* St. Hil. sobre *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae). *Acta Biol Par.* 35: 185-195, 2006.

Artigo II – será submetido à Revista Brasileira de Entomologia

**CHANGES IN MORPHOHISTOLOGIC LARVAE OF *Aedes aegypti*
(LINNAEUS, 1762) (DIPTERA, CULICIDAE) CAUSED BY DITERPENE
ISOLATED FROM THE PLANT *Copaifera reticulata* DUCKE
(LEGUMINOSAE)**

ABSTRACT. The main mechanism of control of dengue has been through the fight against *Aedes aegypti*, the transmitter more competent. The fight is primarily to eliminate the potential breeding, health education and use of synthetic insecticides. These insecticides have performance but are highly toxic to vertebrates and the environment. With the emergence of resistance of mosquitoes to them, opens up an opportunity to insecticides of botanical origin. This study looks at the larvicidal activity of diterpene extracted from the medicinal plant *Copaifera reticulata* on the 3rd stage larvae of *A. aegypti*. Larvae were subjected to a solution of diterpene 9ppm for up to 24 h. Those that reached lethargic state were collected and fixed in 4% in the paraformaldehyde buffer 0.1 M sodium cacodilate pH 7.2, included in resin and the slides stained with hematoxylin-eosin technique and examined by light microscope. The main changes caused by diterpene on the mesenterion of the larvae were the high cytoplasmic vacuolation, cells and nuclei hypertrophy, degeneration of the edge brush, formation vesicular apical with release of cytoplasmic contents of cells, stratification of the epithelium and folds in the peritrophic matrix.

KEY WORDS. *Aedes aegypti*. Control. *Copaifera reticulata*.

RESUMO. O principal mecanismo de controle da dengue tem sido através do combate ao *Aedes aegypti*, o transmissor mais competente. O combate consiste principalmente na eliminação dos criadouros potenciais, na educação sanitária e no uso de inseticidas sintéticos. Esses inseticidas apresentam eficiência, mas são altamente tóxicos aos vertebrados e ao meio ambiente. Com o aparecimento da resistência dos mosquitos a essas substâncias, abre-se uma oportunidade aos inseticidas de origem botânica. Neste estudo, apresenta-se a atividade larvicida do diterpeno extraído da planta medicinal *Copaifera reticulata* sobre larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. Larvas foram submetidas a uma solução a 9ppm do diterpeno por até 24 h. Aquelas que atingiram estado letárgico foram coletadas e fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2, incluídas em resina e as lâminas coradas pela técnica de

hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia de luz. As principais alterações causadas pelo diterpeno sobre o mesêntero das larvas foram a alta vacuolização citoplasmática, hipertrofia celular e dos núcleos, degeneração do bordo em escova, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático das células, estratificação do epitélio e dobras na matriz peritrófica.

PALAVRAS-CHAVES. *Aedes aegypti*. Controle. *Copaifera reticulata*

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) tem causado grande preocupação à saúde pública dos países tropicais e subtropicais do mundo. Primeiro por se tratar do mosquito transmissor da dengue e segundo por ser o possível transmissor da febre amarela urbana (Prata 2000).

A dengue é uma arbovirose causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos conhecidos (Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4). A transmissão ao homem ocorre através da picada da fêmea do *A. aegypti* infectada com vírus. Essa doença apresenta um período de incubação entre 5 e 6 dias. Clinicamente, manifesta-se de forma assintomática, ou pelos sintomas de febre alta, cefaléia intensa, dor retro-orbital, mialgia e exantema, podendo evoluir para um quadro grave com hemorragia, choque e óbito (WHO 1997; Serufo *et al.* 2000; Ministério da Saúde 2005). Até o momento, várias pesquisas estão em andamento para a produção de uma vacina que induza a imunidade contra os quatro sorotipos, mas nenhuma em fase de comercialização (Silva & Richtmann 2006).

Aproximadamente 40% da população mundial está em áreas de risco de transmissão de dengue, na faixa tropical e subtropical do globo. Nesta faixa ocorrem anualmente cerca de 50 milhões de novos casos. No Brasil, a prevalência é de aproximadamente 500 mil casos novos anuais (WHO 2008).

A febre amarela urbana é transmitida pelo *A. aegypti* e a silvestre pelo *Haemagogus* sp (Williston, 1896) e *Sabethes* sp (Robineau-Desvoidy, 1827). Essa doença é causada por um vírus do mesmo gênero do vírus da dengue. Acredita-se que tenha sido introduzido no Brasil vindo da África. A incubação é em média de 3 a 6 dias e a maioria dos casos apresenta-se oligossintomática, com febre, calafrios, cefaléia intensa, mialgia generalizada, anorexia, náuseas, vômitos, bradicardia, hemorragia gengival e/ou epistaxe. Cerca de 10% dos casos se expressam na forma grave e com alta letalidade, associados à icterícia e hemategênese (Ministério da Saúde 1999; Prata 2000; Vasconcelos 2002, 2003; Penna 2003; Figueiredo 2006).

O controle de insetos vetores enfrenta muitas dificuldades, quando as espécies estão adaptadas ao meio urbano, associadas às condições sócio-ambientais, ou ausência de serviços básicos de saúde. O controle de dengue, que não tem vacina, é feito com base no combate ao vetor (Donalísio & Glasser 2002; Penna 2003; Polanczyk *et al.* 2003; Braga *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2004; Cunha *et al.* 2005; Ribeiro *et al.* 2006).

Diante do desenvolvimento de resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas (Braga *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2004; Luna *et al.* 2004) e a grande diversidade de plantas existentes no Brasil, surge uma alternativa de produtos naturais como candidatos a inseticidas (Gusmão *et al.* 2002; Arruda *et al.* 2003; Cavalcanti *et al.* 2004; Pohlit *et al.* 2004; Silva *et al.* 2004; Furtado *et al.* 2005; Lima *et al.* 2006; Silva *et al.* 2007; Simas *et al.* 2007).

O isolamento e a purificação da substância que apresentou o maior potencial inseticida, o ácido 3-acetoxi-labdano-8(17)13-dien-15-oico ($C_{22}H_{34}O_4$), da *Copaifera reticulata*, foi realizado por Silva *et al.* (2007). Neste trabalho, foi elucidada a ação inseticida desta substância através das alterações morfológicas ocorridas no intestino das larvas de *A. aegypti* submetidas a diferentes doses.

MATERIAL E MÉTODOS

As larvas de *A. aegypti* foram obtidas da criação do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do IPTSP/UFG. A criação do mosquito se processou numa câmara biológica climatizada com temperatura de $28 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 h de acordo com a metodologia de Silva *et al.* (1998). Para cada experimento foram utilizadas larvas de 3º estágio, imediatamente após a muda.

Após o isolamento e a purificação do ácido 3-acetoxi-labdano-8(17)13-dien-15-oico ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$), de acordo com Silva *et al.* (2007) e Geris *et al.* (2008), as concentrações letais foram determinadas para larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, sendo as CL_{50} e CL_{90} de 0.8 e 8.2 ppm, respectivamente.

Os bioensaios foram realizados em duplicata, em copos de poliestireno descartáveis, nos quais foram colocadas 25 larvas de 3º estágio em cada um, totalizando 100 larvas. Optou-se pela não utilização de diluentes químicos a fim de descartar qualquer interferência deste composto nas análises morfohistológicas.

Para as larvas controle utilizou-se apenas água destilada. Todos os grupos foram alimentados com ração para gato triturada, segundo a metodologia de Silva *et al.* (1998).

As larvas foram deixadas nas soluções por diferentes tempos, sendo coletadas em intervalos de 3 h, até completar 24 h e examinadas em estereomicroscópio Dimex MZS 250. As mortas foram descartadas, as que se encontraram em estado letárgico e as controle foram retiradas das soluções e imediatamente colocadas inteiras em fixador.

A fixação ocorreu em paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio (0.1 M pH 7.2), à temperatura ambiente, por um período de no mínimo 2 h, segundo metodologia utilizada por Arruda *et al.* (2003). Depois de fixadas inteiras, as larvas foram lavadas no mesmo tampão e submetidas à desidratação através de soluções com concentrações crescentes de etanol, por 10 min, em cada solução. Após a desidratação as larvas foram colocadas em resina de embebição “Leica Histo-resin Embedding Kit”, por 12 h à temperatura ambiente, e incluídas em resina segundo especificações do fabricante, utilizando-se para isso moldes de silicone.

Após a polimerização, os blocos foram seccionados com navalha de vidro, em micrótomo, com espessura de 3 μm e em seguida os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (Pearse 1985; Gabe 1976; Filipe & Lake 1983).

As lâminas foram analisadas e o registro fotográfico foi em Fotomicroscópio Zeiss Axioskop MC80 adaptado com câmera digital.

RESULTADOS

Algumas mudanças no comportamento das larvas tratadas com o diterpeno foram notadas durante os bioensaios. Houve diminuição gradativa dos movimentos das larvas quando comparadas às do grupo controle. As larvas tratadas começaram a apresentar movimentos mais lentos após 3 h do início dos testes e tornaram-se lentas ou imóveis após 6 h. A partir daí, algumas larvas entravam em estado letárgico, permanecendo assim mesmo quando estimuladas por toque. As larvas mortas, caracterizadas pelo escurecimento da cápsula cefálica, eram descartadas para evitar qualquer interferência na análise histológica.

O mesêntero das larvas se divide em três regiões distintas denominadas de anterior, mediana e posterior (Snodgrass 1993; Chapman 1998; Arruda *et al.* 2003; Borges *et al.* 2004). As Figuras 1A, 1B e 1C mostram a morfologia das células do tubo digestório das larvas do grupo controle.

A região anterior (Figura 1A) caracterizou-se por um epitélio simples formado por células epiteliais cúbicas, com citoplasma heterogêneo, acidofilia moderada, núcleo esférico e basal. Na superfície apical destas células encontra-se um fino bordo em escova. A região mediana (Figura 1B) apresentou células epiteliais cúbicas altas, com núcleo esférico e um bordo em escova fino e bem corado. Nesta região, observou-se uma fina membrana refringente à luz que envolve todo o conteúdo alimentar, denominada matriz peritrófica.

A região posterior (Figura 1C) apresentou células cilíndricas com intensa basofilia e núcleo esférico basal. A superfície apical mostrou-se com espesso bordo em escova, levemente acidófilo representando a grande quantidade de microvilosidades existentes nesta região.

O epitélio intestinal das larvas de *A. aegypti* tratadas com o diterpeno mostrou-se com várias alterações, sendo que as mais significativas ocorreram nos tempos de 3, 9, 15, 18 e 24 h.

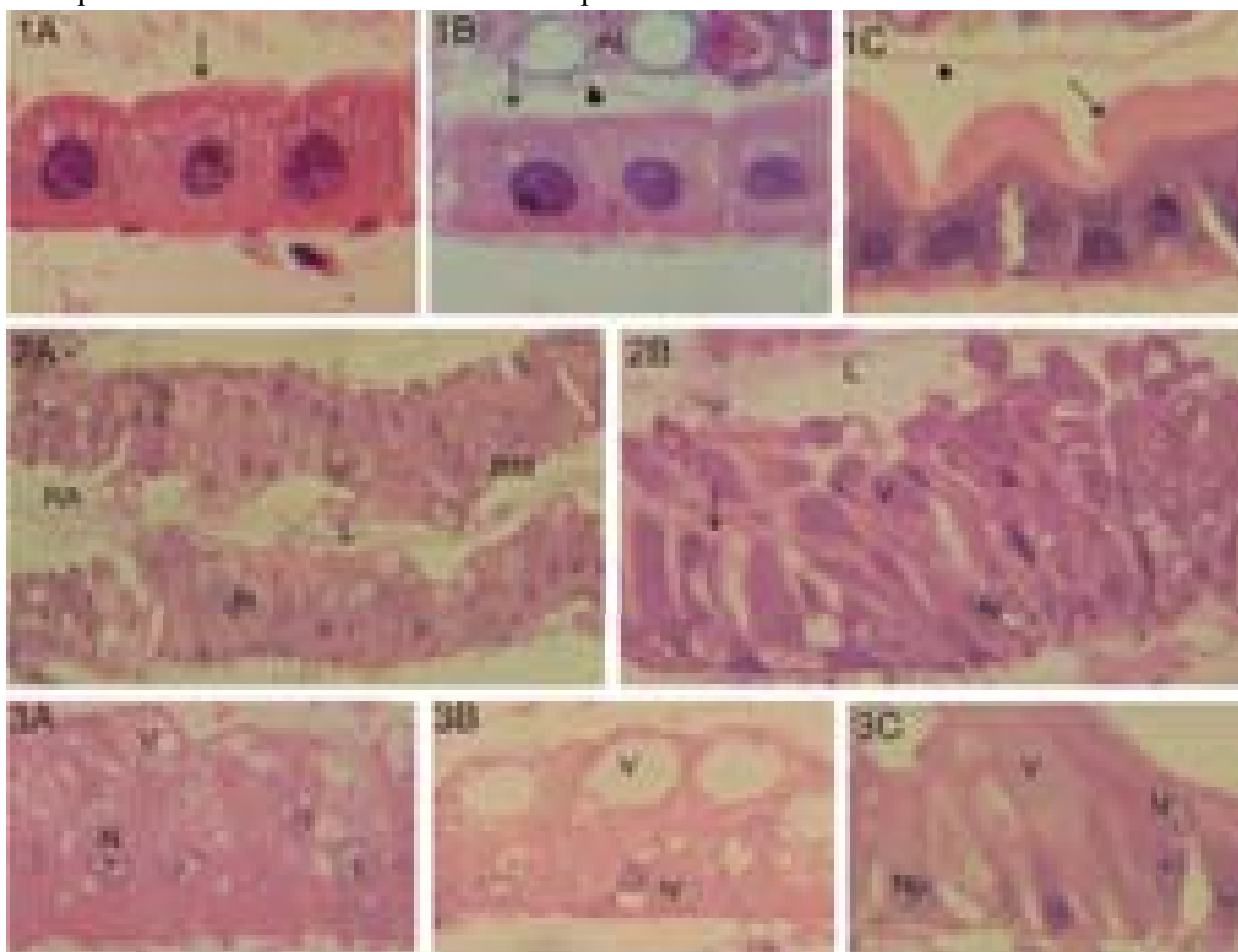
A Figura 1D evidencia toda a região anterior e mediana do mesêntero das larvas após 3 h de tratamento. Notar as características hipertróficas das células com formação de vesículas na região apical e citoplasma vacuolizado.

Na Figura 1E, o epitélio da região posterior destas mesmas larvas mostrou-se com início de estratificação, com núcleos em diferentes alturas perdendo a característica de um epitélio colunar simples. As células apresentaram-se com formação

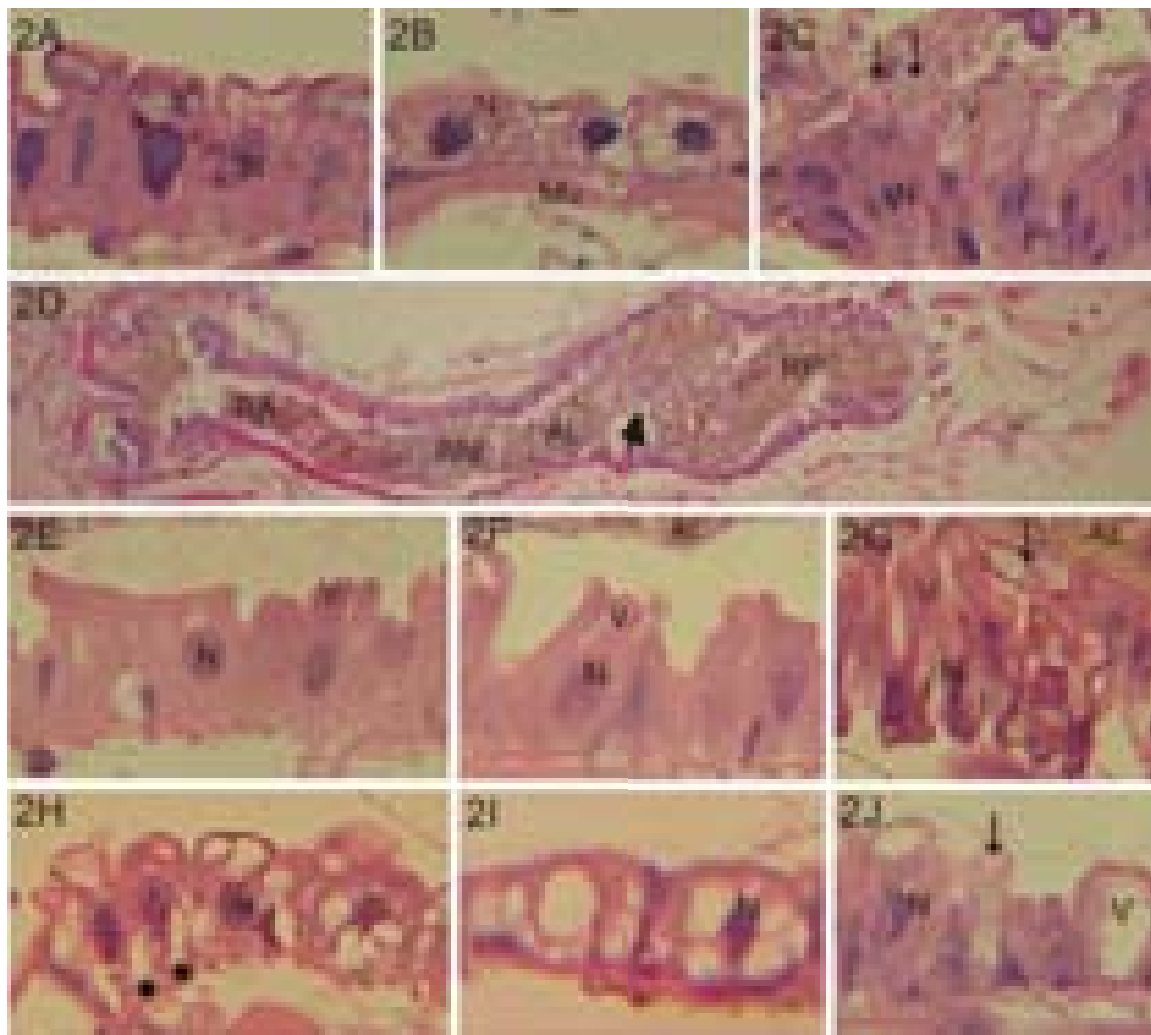
vesicular, alta basofilia e com células desta região ainda com bordo em escova, quando a maioria delas possui esta estrutura destruída.

A Figura 1F evidencia alterações celulares na região anterior do mesêntero tratadas por 9 h. O citoplasma se apresenta com grandes vacúolos, também observados na região mediana (Figura 1G), com formação vesicular apical e hipertrofia celular. As células da região posterior (Figura 1H) apresentaram-se com intensa atividade secretora e todo o conteúdo citoplasmático parece estar sendo expelido para o espaço subperitrófico. Notou-se a presença de células num estágio final de lise (Figura 1H).

As larvas tratadas por 15 h demonstraram alterações similares às dos tempos anteriores com um avançado estado de destruição. As células da região anterior (Figura 2A) apresentaram-se com uma concentração do seu material citoplasmático na região apical formando uma grande vesícula para expulsão deste material. As células da região mediana apresentaram-se com citoplasma altamente vacuolizado (Figura 2B). Na região posterior notou-se a estratificação do epitélio, os núcleos dessas células perderam sua forma arredondada e apresentaram-se de várias formas. Percebeu-se



Figuras 1 A, B e C. Fotomicrografias de secções em historesina, de larvas 3^o estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle, coradas em hematoxilina-eosina. **A.** Região anterior constituída por um epitélio colunar com células evidenciando um fino bordo em escova (seta). 400X. **B.** Região mediana - células com aspectos de normalidade com fino bordo em escova (seta) e presença da matriz peritífica (cabeça de seta) 400X. **C.** Região posterior com células com maior basofilia e um espesso bordo em escova. 400X. **Figuras 1D e E.** Fotomicrografias de secções em historesina, de larvas 3^o estágio de *Aedes aegypti* tratadas por 3h, coradas em hematoxilina-eosina. **1D.** Região anterior e mediana do mesêntero evidenciando a formação vesicular apical em todo o epitélio. **1E.** Região posterior do mesêntero onde se percebe maior basofilia celular e vesículas apicais. Apenas em algumas células há presença do bordo em escova (seta). **Figuras 1F,G e H.** Fotomicrografias de secções em historesina, de larvas 3^o estágio de *Aedes aegypti* tratadas por 9h. **1F.** Região anterior do mesêntero com células vacuolizadas. **1G.** Região mediana com grandes vacúolos no citoplasma dessas células. **1H.** Região posterior com células liberando conteúdo granular do citoplasma para a luz intestinal em processo de lise celular. Abreviações: RA=região anterior, RM= região mediana, N=núcleo, Nu=nucléolo, V=vesícula secretora, L=luz intestinal, AL = alimento.



Figuras 2A, B e C. Fotomicrografias de secções em historesina, do mesêntero de larvas 3^o estágio de *Aedes aegypti* tratadas por 15h. **2A.** Região anterior com formação de vesículas na região apical das células e núcleos disformes. 400X. **2B.** Região mediana, alta vacuolização citoplasmática 400X. **2C.** Região posterior com estratificação do epitélio, vesículas apicais em processo de lise celular através da liberação de conteúdo granular no luz intestinal. 400X. **Figuras 2D, E, F e G.** Fotomicrografias de secções em historesina, do mesêntero de larvas 3^o estágio de *Aedes aegypti* expostas por 18 h, coradas em hematoxilina-eosina (HE). **2D.** Vista geral evidenciando grande dobra na matriz peritrófica (cabeça de seta). 400X. **2E.** Região anterior com formação de vesículas na porção apical das células. 400X. **2F.** Região mediana com vesícula apicais e núcleos disformes. **2G.** Região posterior com células altamente destruídas (seta) e núcleos disformes. 400X. **Figura 2H, I e J.** Fotomicrografias de secções em historesina, do mesêntero de larvas 3^o estágio de *Aedes aegypti* expostas por 24h, coradas em hematoxilina-eosina (HE). **2H.** Região anterior - células com grandes vacúolos citoplasmáticos. Ocorre um deslocamento das células da membrana basal (*). 400X. **2I.** Região mediana com grandes vacúolos citoplasmáticos. **2J.** Região posterior - células com vesículas apicais e em processo de lise celular (seta), núcleos alterados. Abreviações: RA=região anterior, RM= região mediana, RP=região posterior, N=núcleo, V=vesícula secretora, L=luz intestinal, AL = alimento, Mu=músculo.

As características de destruição celular se prolongaram por 24 h. As regiões anterior e mediana do mesêntero dessas larvas apresentaram células com citoplasma altamente destruído, com grandes vacúolos e núcleos irregulares (Figuras 2H e 2I). Na região posterior as células apresentaram formação de grandes vacúolos apicais com intensa atividade de extrusão citoplasmática com núcleos irregulares e lise celular (Figura 2J).

DISCUSSÃO

As larvas de *A. aegypti* do grupo controle apresentaram morfologia com aspectos normais onde, no mesêntero, foram reconhecidas três regiões: anterior, mediana e posterior. As células da região anterior mostraram-se cúbicas, com citoplasma esponjoso e com superfície apical coberta por um fino bordo em escova indicando se tratar de células absorptivas (Figura 1A). A região mediana apresentou-se com um epitélio cilíndrico e com um bordo em escova um pouco mais espesso que o das células da região anterior (Figura 1B). A região posterior evidenciou uma maior basofilia celular e um espesso bordo em escova com grande quantidade de microvilosidades (Figuras 1C). Em Lepidoptera estas microvilosidades têm a função de absorção de nutrientes (Levy 2004). Estas características do mesêntero das larvas de *A. aegypti* foram idênticas às descritas em diversos trabalhos (Snodgrass 1993; Arruda *et al.* 2003, Barreto *et al.* 2006; Abed *et al.* 2007).

Também nas larvas controle observou-se a presença de uma matriz peritrófica envolvendo todo o conteúdo alimentar no tubo digestório dessas larvas. A matriz peritrófica é secretada por células especializadas da região anterior do mesêntero e tem

a função de proteger o intestino dos alimentos e patógenos (Snodgrass 1993; Chapman 1998; Beerntsen *et al.* 2000).

As alterações deletérias causadas pelo diterpeno (C₂₂H₃₄O₄) foram observadas em todas as três regiões do mesêntero das larvas de *A. aegypti* e ocorreram de forma progressiva conforme se aumentava o tempo de exposição das larvas. Os principais efeitos tóxicos foram a alta vacuolização citoplasmática, hipertrofia celular e nuclear, degeneração do bordo em escova, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático das células, estratificação do epitélio e dobras na matriz peritrófica. Estes resultados são semelhantes aos obtidos na literatura pertinente a esse assunto (Rey *et al.* 1999, David *et al.* 2000; Gusmão *et al.* 2002; Arruda *et al.* 2003; Barreto *et al.* 2006; Abed *et al.*, 2007).

Alterações similares para o mesmo estágio e espécie foram encontradas com óleo-resina da mesma planta estudada neste trabalho (Abed *et al.* 2007). Entretanto, estudos realizados com *M. pubescens* mostraram as alterações, principalmente, na região anterior do mesêntero (Arruda *et al.* 2003). No entanto, estudos com a toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* evidenciaram as alterações mais importantes na região posterior do mesêntero (Ruiz *et al.* 2004).

Rey *et al.* (1999), ao estudarem os efeitos histopatológicos do ácido tânico no mesêntero de algumas larvas de Diptera, relataram a presença de vacuolização e hipertrofia celular na região anterior após 12 h de tratamento e após 36 h ocorreu o deslocamento da membrana basal. Já a região posterior só demonstrou alterações após 48 h de tratamento com a degeneração da porção apical das células. David *et al.* (2000) estudaram a toxicidade de folhas de *Alnus glutinosa*, *Populus nigra* e *Quercus robur* para larvas de *A. aegypti*, *A. albopictus*, *Culex pipiens*, *Simulium varigatum* e *Chironomus annularis*. As principais alterações observadas por estes autores foram

edema apical, vacuolização citoplasmática, ruptura da membrana basal e liberação do conteúdo citoplasmático para o lúmen intestinal. Estas observações são compatíveis com as apresentadas neste trabalho.

Estudos realizados por Arruda *et al.* (2003) em larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato da planta *M. pubescens*; Ruiz *et al.* (2004) em larvas de *A. aegypti*, *A. albimanus* e *C. quinquefasciatus* expostas à toxina Cry11Bd de *B. thuringiensis* sub. *medellin*, Gusmão *et al.* (2002) em larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato de *Derris urucu* e Barreto *et al.* (2006) em larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato da planta *Sapindus saponaria* também evidenciaram diversas alterações deletérias ocorridas no mesêntero das larvas como alta vacuolização do citoplasma, hipertrofia celular, degeneração do bordo em escova e hipersecreção pelas células epiteliais. Estas alterações, também relatadas neste trabalho, demonstram como estes agentes promovem a degeneração celular acelerando a processo de lise das células epiteliais.

Snodgrass (1993), relatou que as células digestivas do mesêntero de insetos em geral possuem participação ativa nos processos de secreção e absorção e que o processo de degeneração dessas células ocorre através do acúmulo de material granular na porção apical da célula e a liberação desse material na luz intestinal do inseto. Este processo é perfeitamente observado neste trabalho através das formações vesiculares apicais evidenciadas em todo mesêntero das lavas tratadas, algumas com total expulsão do conteúdo citoplasmático para o lúmen intestinal.

Outro aspecto das alterações celulares causadas pelo diterpeno foram dobras ocorridas na matriz peritrófica que isolam o conteúdo alimentar presente no lúmen intestinal das larvas tratadas. Estudos realizados por Abed *et al.* (2007) mostraram que o mesmo ocorreu com larvas de *A. aegypti* expostas ao óleo-resina de *C. reticulata*.

Trata-se de um mecanismo de defesa da larva que isola o conteúdo alimentar na tentativa de evitar maiores danos aos seus tecidos.

As alterações provocadas pelo diterpeno ácido 3-acetoxi-labdano-8(17)13-dien-15-oico ($C_{22}H_{34}O_4$), isolado da planta *C. reticulata* relatam o potencial tóxico deste composto e sua capacidade de atuar como um eficiente controle para larvas de *A. aegypti*. Diante dos resultados aqui obtidos, se fazem necessários estudos aprofundados para elaboração comercial deste produto e sua implementação nas medidas de controle ao *A. aegypti*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed, R. A.; G. M. Cavasin; H. H. G. Silva & I. G. Silva. 2007. 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). **Revista de Patologia Tropical** 36: 87-95.
- Arruda, W.; G. M. C. Oliveira & I. G. Silva. 2003. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 17-25.
- Barreto, C. F.; G. M. Cavasin; H. H. G. Silva & I. G. Silva. 2006. Estudos das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical** 35: 37-57.
- Beerntsen, B. T.; A. A. James & B. M. Christensen. 2000. Genetics of mosquito vector competence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64: 115-137.

- Borges, R. A.; G. M. Cavasin; I. G. Silva; W. Arruda; E. S. F. Oliveira; H. H. G. Silva & F. Martins. 2004. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical** **33**: 91-104.
- Braga, I. A.; J. B. P. Lima; S. S. Soares & D. Valle. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temefos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas - Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**: 199-203.
- Carvalho, M. S. L.; E. D. Caldas; N. Degallier; P. T. R. Vilarinhos; L. C. K. R. Souza; M. A. C. Yoshizawa; M. B. Knox & C. Oliveira. 2004. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefos no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública** **38**: 623-629.
- Cavalcanti, E. S. B.; S. M. Moraes; M. A. A. Lima & E. W. P. Santana. 2004. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**: 541-544.
- Chapman, R. F. 1998. **The insects: structure and function**. Cambridge University Press. The alimentary canal . 749 p.
- Cunha, M. P.; J. B. P. Lima; W. G. Brogdon; G. E. Moya & D. Valle. 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **100**: 441-444.
- David, J. P.; R. Delphine; M. P. Pautou & J. C. Meyran. 2000. Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. **Journal of**

Invertebrate Pathology 75: 9–18.

Donalísio, M. R. & C. M. Glasser. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia** 5, 259-272.

Figueiredo, L. T. M. 2006. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39: 203-210.

Filipe, M. I. & B. D. Lake. 1983. **Histochemistry in Pathology**. New York: Churchill Livingston. 349 p.

Furtado, R. F.; M. G. A. Lima; M. Andrade Neto; J. N. S. Bezerra & M. G. V. Silva. 2005. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology** 34:843-847.

Gabe, M. 1976. **Histological Techniques**. Paris. Masson. 1106 p.

Geris, R.; I. G. Silva; H. H. G. Silva; A. Barison; E. Rodrigues-Filho & A. G. Ferreira. 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 50: 25-28.

Gusmão, D.S.; V. Páscoa; L. Mathias; I. J. C. Vieira; R. Braz-Filho & F. J. A. Lemos. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 371-375, 2002.

Levy, S. M.; A. M. F. Falleiros & E. A. Gregório. 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal Biology** 64: 633-638.

- Lima, M. G. A.; I. C. C. Maia; B. D. Sousa; S. M. Morais & S. M. Freitas. 2006. Effect of stalk and leaf extracts from euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **48**: 211-214.
- Luna, J. E. D.; M. F. Martins, A. F. Anjos, E. F. Kuwabara & M. A. Navarro-Silva. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **38**: 846-853.
- MS – Ministério da Saúde. 1999. **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela – Brasília**, FUNASA, 60 p.
- MS - Ministério da Saúde. 2005. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde, 6a. ed. Brasília, Ministério da Saúde, 816 p.
- Pearse, A. G. E. 1985. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. London, J & A Churchill Ltda. 998 p.
- Penna, M. L. F. 2003. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. **Caderno de Saúde Pública** **19**: 305-309.
- Pohlit, A. M.; E. L. J. Quignard; S. M. Nunomura; W. P. Tadei; A. F. Hidalgo; A. C. S. Pinto; E. V. M. Santos; S. K. R. Morais; R. C. G. Saraiva; L. C. Ming; A. M. Alecrim; A. B. Ferraz; A. C. S. Pedroso; E. V. Diniz; E. K. Finney; E. O. Gomes; H. B. Dias; K. S. Souza; L. C. P. Oliveira; L. C. Don; M. M. A. Queiroz; M. C. Henrique; M. Santos; O. S. Lacerda Júnior; P. P. Souza; S. G. Silva & Y. R. Graça. 2004. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazônica** **34**: 97– 105.

- Polanczyk, R. A.; M. O. Garcia & S. B. Alves. 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública** **37**: 813-816.
- Prata, A. 2000. Yellow Fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **95**: 183-187.
- Rey, D.; M. P. Pautou & J. C. Meyran. 1999. Histopathological Effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae. **Journal of Invertebrate Pathology** **73**: 173–181.
- Ribeiro, A. F.; G. R. A. Marques; J. C. Voltolini & M. L. F. Condino. 2006. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública** **40**: 671-676.
- Ruiz, L.M.; C. Segura; J. Trujillo & S. Orduz. 2004. In vivo binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**:73-79.
- Serufo, J.C.; V. Nobre; A. Rayes; T.M. Marcial & J.R. Lambertucci. 2000. Dengue: uma nova abordagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **33**: 465-476.
- Silva, H.H.G.; I.G. Silva & K.S. Lira. 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical** **27**: 53-63.
- Silva, H.H.G.; I.G. Silva; R.M.G. Santos; E. Rodrigues Filho & C.N. Elias. 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil.

- (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37: 396-399.
- Silva, H.H.G.; R. Geris; E. Rodrigues Filho; C. Rocha & I.G. Silva. 2007. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40: 264-267.
- Silva, L. J. & R. Richtmann. 2006. Vaccines under development: group B streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. **Jornal de Pediatria** 82, 115-124.
- Simas, N.K.; E.C. Lima; R.M. Kuster; C.L.S. Lage & A. M. Oliveira Filho. 2007. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40: 405-407.
- Snodgrass, R.E. 1993. **Principles of insects morphology**. Cornell University Press. The alimentary canal. 647 p.
- Vasconcelos, P.F.C. 2003. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 275-293.
- Vasconcelos, P. F. C. 2002. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Revista Brasileira de Epidemiologia** 5, 244-258.
- WHO - World Health Organization. 1997. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2a. edition. Geneva.

WHO - World Health Organization. 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> Fact sheet, N°117, Revised April 2002, 22/01/2008.

Artigo III – submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno isolado da *Copaifera reticulata* (Leguminosae) e ao tanino catéuico da *Magonia pubescens* (Sapindaceae)

Ultrastructural alterations on larvae of *Aedes aegypti* subject to diterpene isolated from *Copaifera reticulata* (Leguminosae) and the catechist tannins *Magonia pubescens* (Sapindaceae)

RESUMO

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública causado por um arbovírus. Sua transmissão ocorre através da picada da fêmea do *Aedes aegypti*, este possui grande capacidade de se adaptar ao ambiente antrópico. Na busca de alternativa para o controle desse mosquito, apresenta-se pela primeira vez as alterações ultraestruturais causadas pelo diterpeno extraído da planta medicinal *Copaifera reticulata* e do tanino catéuico extraído da *Magonia pubescens* em larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, com a finalidade de evidenciar o mecanismo de ação dessas substâncias. Os experimentos foram realizados em solução de 9 ppm do diterpeno e de 37 ppm do tanino catéuico, onde permaneceram por 22 h. As larvas que atingiram estado letárgico foram coletadas e dissecadas e seus tubos digestórios fixados em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2 e pós fixado em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0.1M. Em seguida foram contrastados com acetato de uranila a 1%, desidratados, emblocados e polimerizados. Cortes ultrafinos foram feitos, contrastados com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo e levados ao microscópio eletrônico. As principais alterações ultraestruturais provocadas pelo diterpeno sobre larvas de *A. aegypti* foram: vacuolização, morte por autofagia, presença de grandes vacúolos, desorganização celular, formação de vesículas de secreção e mudança estrutural dos microvilos. As alterações ultraestruturais causadas pelo tanino catéuico foram a degeneração celular, vacuolização citoplasmática, alteração dos microvilos, núcleos irregulares e deslocamento das células da lâmina basal.

Palavras-chaves: *Aedes aegypti*. *Copaifera reticulata*. *Magonia pubescens*. Controle. Ultraestrutura.

ABSTRACT

Dengue is an important public health problems caused by an arbovirus. Its transmission occurs through the bite of female *Aedes aegypti*, it has great capacity to adapt to man-made environment. In the search for alternatives to control of this mosquito, is the first time that is showed the ultrastructural alterations caused by diterpene extracted from the medicinal plant *Copaifera reticulata* and the catechist tannin extracted from the *Magonia pubescens* in the 3rd stage larvae of *A. aegypti*, with the aim of demonstrating the mechanism of action of these substances. The experiments were performed in solution containing 9 ppm of diterpene and 37 ppm of catechist tannin, where they remained for 22 h. Larvae that reached lethargic state were collected and dissected and their gut fixed in 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 3% sucrose in sodium buffer cacodilate 0.1 M pH 7.2 and post fixed in osmium tetroxide at 1% in cacodilate sodium 0.1 M. Were then contrasted with uranyl acetate 1%, dehydrated, embedded and polymerized. Ultrathin cuts were made, mixed with uranyl acetate 3% and lead citrate and taken to the electron microscope. The main ultrastructural alterations caused by the diterpene on larvae of *A. aegypti* were: vacuolation, cellular aging, presence of large vacuoles, cell disruption, formation of vesicles of secretion and structural change of microvilli. The ultrastructural alterations caused by catechist tannin were the cell degeneration, cytoplasmic vacuolation, alteration of microvilli, irregular nuclei and displacement of cells in the basal lamina.

Key-words: *Aedes aegypti*. *Copaifera reticulata*. *Magonia pubescens*. Control. Ultrastructure.

A dengue está entre as mais importantes arboviroses do mundo. A transmissão ocorre através da fêmea *Aedes aegypti*, infectada por um dos sorotipos do vírus (Den1, 2, 3, 4). O controle desse mosquito é a base de todo programa para combater essa doença. Suas manifestações clínicas variam de uma síndrome viral inespecífica até um quadro grave e fatal por hemorragia ou choque^{14 22 28 29 37}.

No mundo há cerca de 50 a 100 milhões de novos casos anuais de dengue^{21 33 47}. O *A. aegypti* é o mosquito mais adaptado ao meio urbano^{17 30 32 36 48 49} e encontra-se espalhado por extensas áreas de todos os continentes, com exceção da Europa³³.

A principal estratégia de controle do *A. aegypti* tem sido o uso intensivo de inseticidas^{15 31 38}. O uso prolongado desses inseticidas vem sendo questionado quanto à sua real eficiência e quanto aos danos ambientais que podem causar. Durante a vigência de uma epidemia, a aplicação espacial de inseticida em ultrabaixo-volume pode ser uma medida valiosa no extermínio do vetor, porém pouco efetiva na manutenção de baixos índices de infestação predial. Além disso, o uso freqüente de inseticidas tem levado ao aparecimento de resistência do mosquito a estes compostos^{7 8 11 27}.

Em busca de novas alternativas para o controle do vetor da dengue, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de encontrar um inseticida eficaz com menor impacto ambiental^{3 10 18 20 25 34 40 43 44 45 47}. Neste contexto, substâncias larvicidas de *Copaiifera reticulata* e *Magonia pubescens* foram isoladas e purificadas, posteriormente, testadas e as alterações ultraestruturais no intestino em larvas de *A. aegypti*, são apresentadas em eletromicrografia de transmissão, com a finalidade de esclarecer o mecanismo de ação^{23, 26, 41, 42, 50}.

MATERIAL E MÉTODOS

Bioensaios - larvas de *A. aegypti* foram obtidas de uma colônia permanente, mantida a $28\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80\pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 h³⁹. Os experimentos foram separados em três grupos: um com diterpeno, outro com tanino catéquico e último (controle) em água destilada. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Utilizaram-se 20 larvas em cada frasco de plástico com as soluções de cada substância, deixadas por 22 h, sendo coletadas apenas as larvas em estágio de letargia.

Secções - as larvas coletadas foram dissecadas sob estereomicroscópio (MZS-250), em uma gota do fixador apropriado e seus tubos digestórios retirados e fixados para microscopia eletrônica de transmissão, em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0.1 M pH 7.2.

Após esta fixação, o material foi lavado no tampão cacodilato de sódio (2 lavagens de 30 min) e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0.1M, por 2 h, a 4°C . Depois submetido a duas lavagens de 30 min com o tampão

cacodilato de sódio 0.1M. Em seguida foram colocados em álcool 10% como preparativo para a contração em bloco. Esta foi feita com acetato de uranila a 1%, em álcool 10% a temperatura ambiente “overnight”. O material foi lavado com água destilada e submetido ao processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool a 70, 80, 90, 95, 100% (3x), álcool + óxido de propileno (volume/volume), óxido de propileno por 15 min cada. Após a desidratação os tubos digestórios foram deixados em óxido de propileno+spurr (volume/volume), e spurr puro, por 1 h. Este último procedimento foi repetido por 3 vezes, e em seguida deixado em spurr por mais 24 h, embocado e polimerizado por 24 h a 70°C^{5 6 19 46}.

Os blocos foram seccionados em ultramicrotomo Leica Ultracult UCT, transferidos para lâminas e corados com azul de toluidina para rastreamento das alterações em microscopia de luz. Em seguida cortes ultrafinos foram colocados em telinhas de cobre recobertas com colódio/carbono, contrastadas com acetato de uranila a 3%, por 30 min e solução de citrato de chumbo, por 10 min à temperatura ambiente. Após a secagem, os cortes foram levados ao microscópio eletrônico de transmissão para serem examinados e eletromicrografados.

RESULTADOS

O intestino médio ou mesêntero de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* apresenta três partes distintas: anterior, mediana e posterior. As células da região anterior (Figura 1A) apresentaram-se cúbicas com núcleo esférico evidenciando áreas de eurocromatina e heterocromatina e nucléolo distinto. No citoplasma destas células foi possível observar uma grande quantidade de mitocôndrias de formatos irregulares (Figura 1A e B). A região apical destas células demonstrou a presença de curtas microvilosidades (Figura 1C).

A região mediana também apresentou-se formada por um epitélio cilíndrico (Figura 1D) com a presença de inúmeras pregas na lâmina basal destas células, indicando a realização de trocas iônicas nesta região (Figura 1E). A região apical destas células mostrou microvilosidades mais altas que as da região anterior (Figura 1F). O núcleo apresentou-se grande e com cromatina descondensada, mostrando características de intensa atividade celular (Figura 1E).

A região posterior apresentou-se formada por células colunares (Figura 1G), com inúmeros vacúolos digestivos e figuras mielínicas no seu interior na porção basal

(Figura 1H). As microvilosidades apicais nesta região mostraram-se longas e finas (Figura 1I).

Mudanças morfológicas nas células do mesêntero das larvas foram notadas com 22 h de exposição ao diterpeno. Na região anterior as células apresentaram-se mais baixas que as do grupo controle (Figura 2A), com região basal e apical demonstrando certo grau de conservação (Figuras 2B e 2C). Notar o aspecto de integridade das mitocôndrias desta região (detalhe da Figura 2B).

As células da região mediana (Figura 2D) apresentaram alto grau de destruição, com evidente desorganização celular e notável formação de vacúolos digestivos (Figura 2E), além disso a presença de inúmeros vacúolos secretores, de variados tamanhos, localizados na região apical celular (Figura 2F). As microvilosidades da porção apical eram pouco desenvolvidas, irregulares e praticamente destruídas.

Na região posterior (Figura 2G) a membrana citoplasmática basal mostrou grandes dobras (Figura 2H) e o citoplasma altamente vacuolizado. Também houve a formação de vesículas secretoras por todo o citoplasma, com aspecto de expelir para a luz intestinal. No interior dessas vesículas ocorreu a formação de grandes e vários vacúolos digestivos (Figura 2I), com restos celulares observados no interior dos mesmos.

Larvas submetidas ao tanino catéquico, após 22 h, apresentaram diversas alterações ultraestruturais, evidenciando grande destruição celular. A região anterior apresentou-se com grande quantidade de vacúolos digestivos, núcleo com cromatina descondensada (Figura 3A). A célula em geral apresentou-se sem forma definida e com aparência de degeneração. Na região basal celular notou-se a presença de grande quantidade de mitocôndrias em diversas formas, tamanhos e eletrodensidade (detalhe da Figura 3A), além de pregas na lâmina basal com espaços evidentes entre as dobras desta membrana (Figura 3B). A região apical celular apresentou maior concentração de vacúolos digestivos, de vários tamanhos e formas (Figura 3C). As microvilosidades desta região apresentaram-se menores e parcialmente destruídas (Figura 3C).

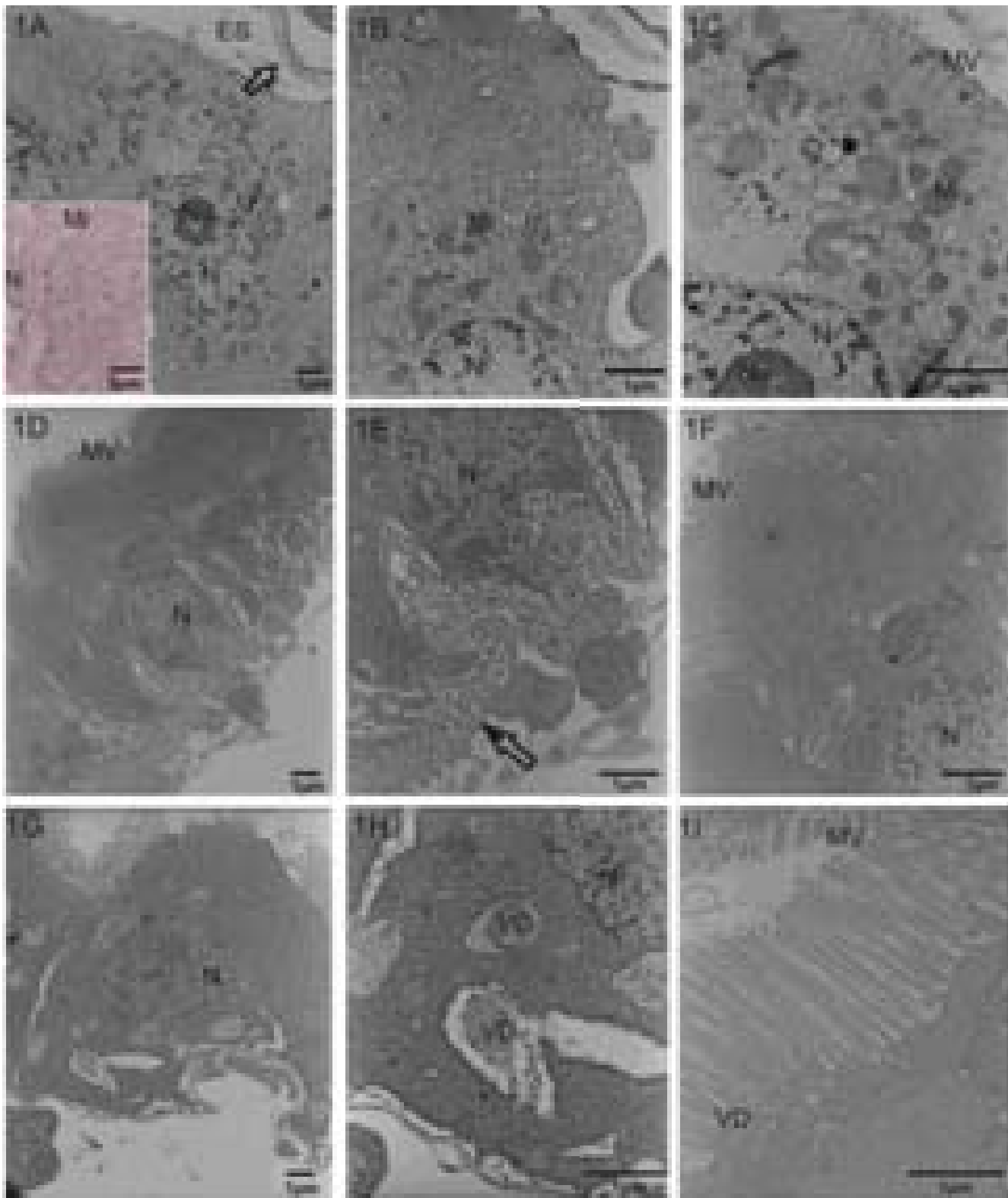


Figura 1. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. **1A:** vista geral das células epiteliais da região anterior do mesêntero. Notar a presença de inúmeras mitocôndrias (detalhe) e da matriz peritrófica (seta). **1B:** detalhe da região basal, evidenciando a presença de mitocôndrias e dobras da membrana plasmática. **1C:** Notar a presença de vacúolos e microvilosidades na região apical destas células. **1D:** vista geral das células epiteliais da região mediana do mesêntero. **1E:** aspecto da região basal, destacando as dobras da membrana plasmática basal, indicando trocas iônicas (seta). **1F:** detalhe da região apical destas células evidenciando as microvilosidades e vacúolos digestivos de mitocôndria. **1G:** vista geral das células epiteliais da região posterior do mesêntero. **1H:** detalhe da região basal com vacúolos digestivos. **1I:** detalhe da região apical destas células, evidenciando a presença de longas microvilosidades de vacúolos digestivos com presença de figuras mielínicas. Nu=nucléolo, N=núcleo, ES= espaço subperitrófico, Mi=mitocôndria, MV=microvilosidades, VD=vacúolo digestivo.

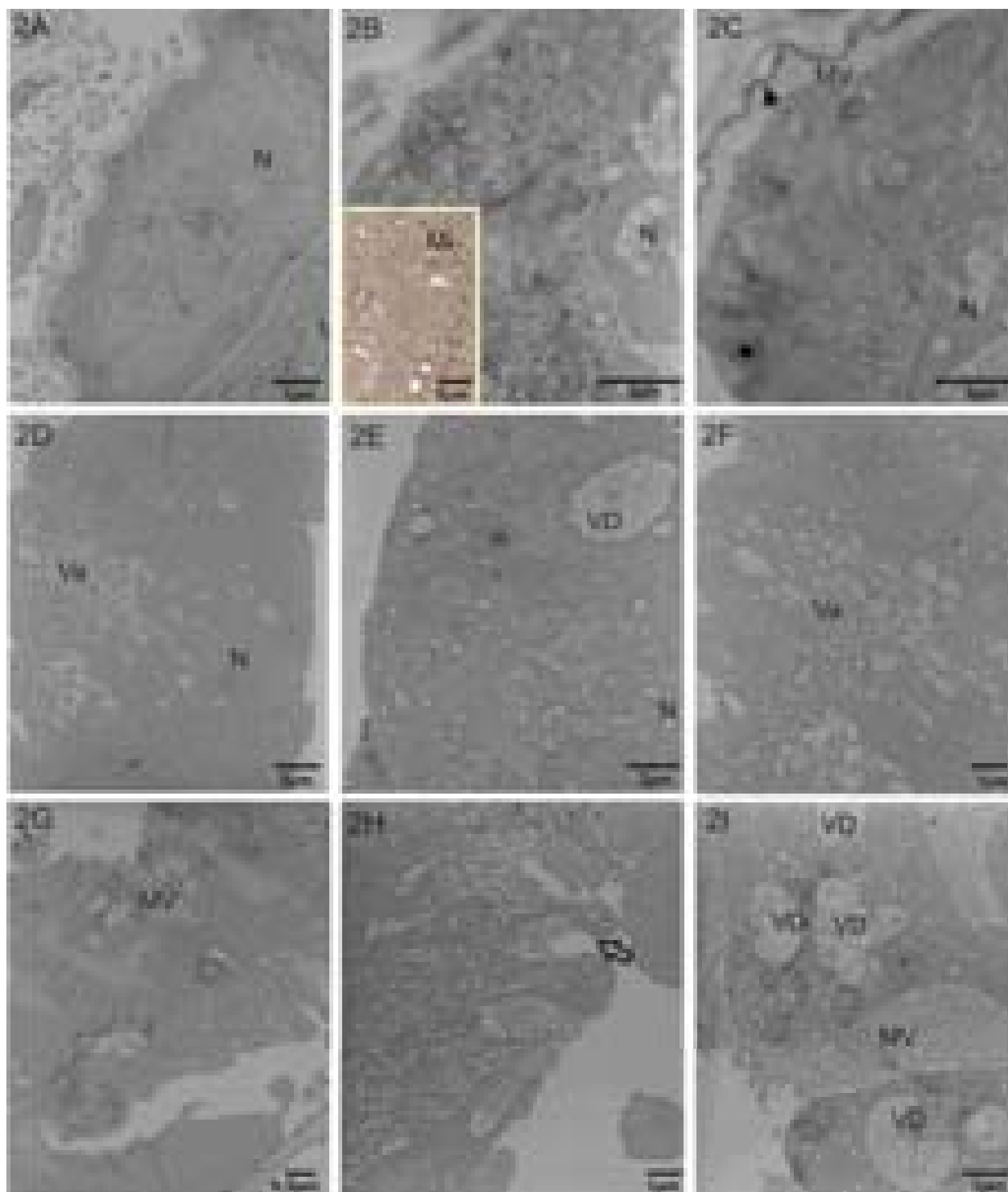


Figura 2. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 24 h ao diterpeno da *Copaifera reticulata*. **2A:** vista geral das células da região anterior do mesêntero. **2B:** detalhe da região basal destacando presença de mitocôndrias (detalhe). **2C:** detalhe da região apical, evidenciando a matriz peritrófica (cabeça de seta). **2D:** vista geral das células da região mediana do mesêntero. **2E:** região basal celular evidenciando a lâmina basal e vacúolo digestivo. **2F:** região apical celular com intensa vacuolização. **2G:** vista geral das células da região posterior do mesêntero. **2H:** região basal celular com dobras da membrana plasmática basal (seta). **2I:** detalhe da região apical celular evidenciando grande quantidade de microvilosidades e a formação de grandes vesículas secretoras. Nu=nucléolo, N=núcleo, ES= espaço subperitrófico, Mi=mitocôndria, MV=microvilosidades, VD=vacúolo digestivo, Va=vacúolos.

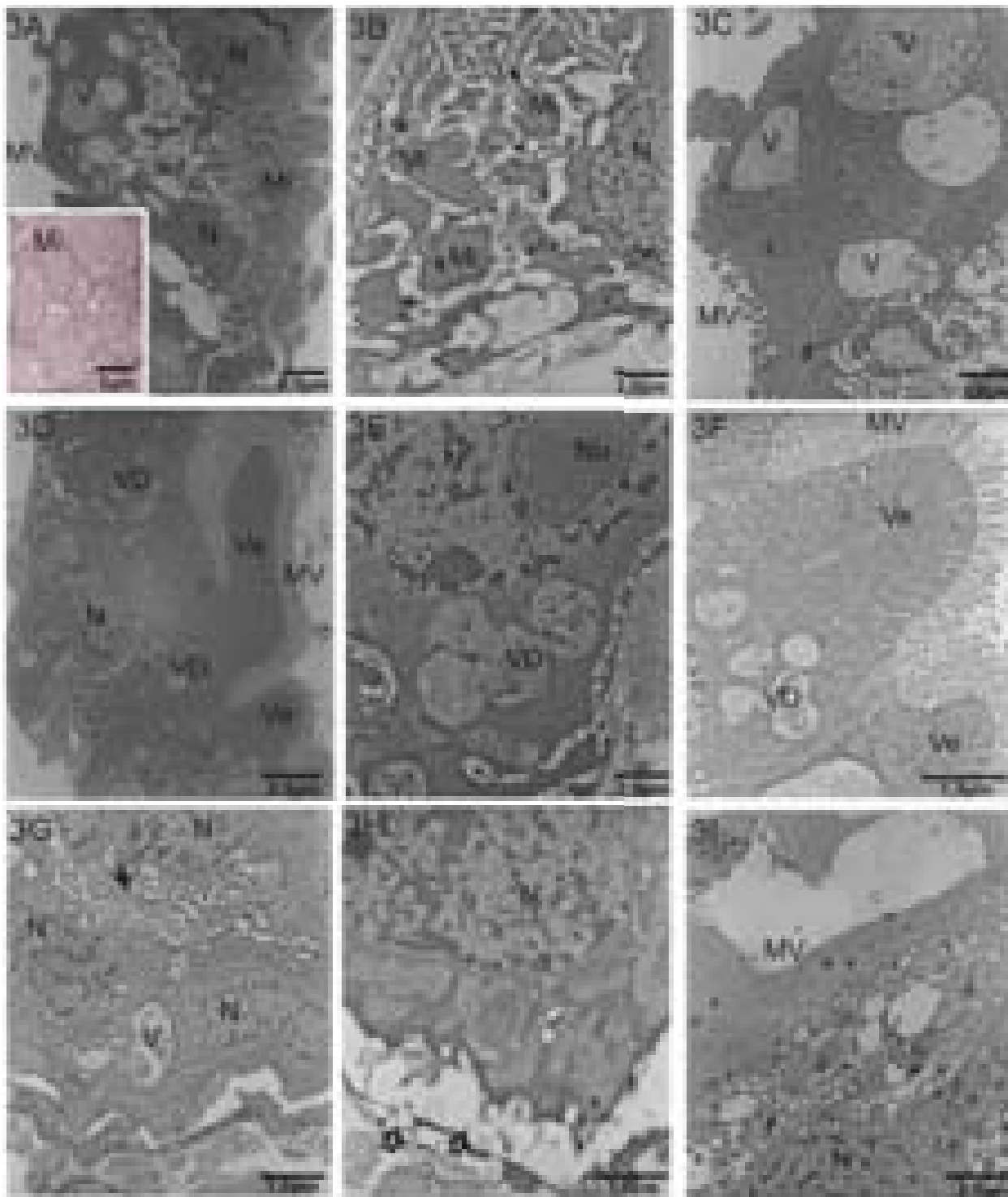


Figura 3. Eletromicrografias das células epiteliais do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* submetidas por 24 h ao tanino catéquico de *Magonia pubescens*. **3A:** vista geral das células da região anterior do mesêntero, evidenciando o alto grau de destruição celular. Notar no detalhe a presença de mitocôndrias. **3B:** detalhe da região basal celular com grande quantidade de mitocôndrias e de dobras da membrana plasmática basal. **3C:** detalhe da região apical celular com a presença de grandes vacúolos. **3D:** vista geral das células da região mediana do mesêntero. **3E:** detalhe da região basal celular destacando a presença de vacúolos digestivos. **3F:** detalhe da região apical celular evidenciando os vacúolos digestivos e a formação de projeções apicais secretoras. **3G:** vista geral das células da região posterior do mesêntero com a presença de vacúolos digestivos e núcleos irregulares. **3H:** detalhe da região basal evidenciando o descolamento da célula da membrana basal (setas). **3I:** detalhe da região apical celular evidenciando de vacúolos. Nu=nucléolo, N=núcleo, ES= espaço subperitrófico, Mi=mitocôndria, MV=microvilosidades, VD=vacúolo digestivo, Ve=vesículas, V=vacúolos.

A região mediana diferiu-se do controle, pela destruição celular (Figura 3D), citoplasma com uma grande quantidade de vacúolos digestivos, de vários tamanhos e formas, núcleo com cromatina condensada e nucléolo evidente (Figura 3E). Foi possível observar a formação de vesículas secretoras na porção apical, onde o conteúdo citoplasmático se projeta para o meio externo (Figura 3F). As microvilosidades não apresentaram alterações evidentes.

Na região posterior, o epitélio apresentou-se estratificado, células com citoplasma heterogêneo, núcleos irregulares e com presença de vacúolos (Figura 3G). Na região basal houve um deslocamento celular da lâmina basal, formando um isolamento entre a célula epitelial e o restante do conteúdo da larva. Notou-se a lâmina basal celular destruída (Figura 3H). A região apical apresentou-se com microvilosidades mais curtas e citoplasma altamente vacuolizado (Figura 3I).

DISCUSSÃO

Estudos ultraestruturais das células do mesêntero de insetos em estágios larvais são bastante escassos. As observações sobre a ultraestrutura normal das células do mesêntero das larvas de 3º estágio de *A. aegypti* realizadas neste trabalho coincidiram com as observações descritas em outros trabalhos^{1 4}. Estes autores diferenciaram três regiões distintas do mesêntero (anterior, mediana e posterior). Também descreveram a presença de mitocôndrias grandes e irregulares e microvilosidades na porção apical nas células do mesêntero associadas a função de absorção. Neste trabalho, as microvilosidades foram observadas nas três regiões do mesêntero, sendo maiores e mais espessas na região posterior (Figuras 1C, 1F e 1I) destacando assim a maior capacidade absorptivas das células.

Estudos descritivos sobre os tipos de células encontrados nos insetos relataram a associação de grandes dobras da membrana plasmática basal com mitocôndrias, fato também observado neste trabalho que indica a realização de transporte de água e íons por esta membrana⁹ (Figura 1E).

Os efeitos do diterpeno sobre as células do mesêntero das larvas de *A. aegypti* incluíram intensas modificações citoplasmáticas como vacuolização, morte por autofagia, presença de grandes vacúolos de forma variadas, desorganização celular, formação de vesículas de secreção e mudança estrutural dos microvilosidades.

Os efeitos do tanino catéquico causaram como principais alterações deletérias a degeneração celular, vacuolização citoplasmática, alteração das microvilosidades, núcleos irregulares e deslocamento das células da lâmina basal.

Estudos sobre a toxicidade das plantas *Alnus glutinosa*, *Populus nigra* e *Quercus robur* em larvas de Diptera relataram a presença de intensa degeneração citoplasmática com vacuolização, destruição das organelas, além de degeneração das microvilosidades¹².

Análises histopatológicas dos efeitos do diterpeno e do tanino sobre o mesêntero de larvas de Diptera, detectaram a presença de formações vesiculares na região apical celular semelhantes as vesículas secretoras descritas no presente trabalho¹³. Tal reação seria conseqüência da intoxicação celular causada pelo tanino levando a formação de vesículas e a lise celular. Nestas análises também foi relatado a ocorrência de vacuolização do citoplasma, degeneração de microvilosidades e deslocamento das células da lâmina basal.

A vacuolização citoplasmática se mostrou como uma alteração marcante no presente estudo que indicou o estado avançado de lise destas células provocado pela ação larvicida do diterpeno e do tanino catéquico, corroborando alguns trabalhos^{12 13}. Esta alteração também foi relatada em experimento que testava ação larvicida do extrato bruto etanólico da planta *M. pubescens* sobre larvas de *A. aegypti*⁴ e também em estudos sobre as alterações morfohistológicas provocadas pelo óleo-resina da planta *C. reticulata* em larvas de *A. aegypti*¹. Nestes estudos também foram observadas a presença de grandes vacúolos conforme relatados nesta pesquisa.

A formação de vesículas secretoras na porção apical das células analisadas, indica que o conteúdo citoplasmático celular está sendo expelido para a luz intestinal como forma de defesa à ação do diterpeno e do tanino catéquico. A presença dessas vesículas, associada à intensa vacuolização citoplasmática demonstra a aceleração do processo de lise celular provocado pelo efeito tóxico das substâncias analisadas. Estudos ultraestruturais sobre larvas de *A. aegypti* tratadas com *Bacillus thuringiensis* relataram a presença dessas mesmas alterações além de deformidades no núcleo destas células com mudança na forma e formação de mais poros no envelope nuclear¹⁶. Nas larvas tratadas com o tanino catéquico (*M. pubescens*) as células apresentaram núcleos irregulares, e não foi observado aumento no número de poros no envelope nuclear.

O mesêntero é o principal órgão responsável pela absorção de nutrientes pelos insetos em geral^{24 35}. Vários trabalhos sobre o efeito larvicida de diversas substâncias

em Diptera, relatam que as principais alterações morfohistológicas ocorrem no mesêntero, desta forma, fica claro o importante papel desta porção do tubo digestório no processo de absorção^{1 2 3 4 12 13 16 35}. As alterações provocadas por estas substâncias, independente se são de origem química ou biológica, são sempre semelhantes. Isto comprova que estas alterações são respostas das células diante da intoxicação sofrida.

Todas as alterações histopatológicas relatadas no presente trabalho comprovam a ação larvicida dos compostos aqui estudados. Tanto o diterpeno extraído e purificado da planta *C. reticulata* quanto o tanino catéquico da planta *M. pubescens* mostraram-se altamente tóxicos para as larvas de *A. aegypti*, provocando alterações nas células do mesêntero que acabam levando a morte das mesmas, sendo portanto indicado para a utilização como larvicida. Entretanto outras pesquisas a respeito de dosagem para utilização em campanhas contra a dengue são recomendadas. E, diante da, praticamente estabelecida, resistência do inseto aos inseticidas químicos atualmente utilizados, a descoberta de um larvicida eficiente e de origem botânica é de grande importância para as ações de controle e prevenção de uma doença que faz milhares de vítimas todos os anos.

REFERÊNCIAS

1. Abed RA. Avaliação morfohistológica de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) submetidas à ação do óleo-resina da planta *Copaifera reticulata* Ducke. [Tese de Mestrado em Biologia], Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2003.
2. Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA – CPAC. 129-135, 1998.
3. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36: 17-25, 2003.
4. Arruda W, Oliveira GMC, 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). Revista de Patologia Tropical 37: 255-267, 2008.

5. Benchimol M, Attias M, Silva NLC, Carvalho TMU. Métodos de Estudo da Célula. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF, 1996, 143 p.
6. Bozzola JJ, Russel LD. Electron Microscopy: principles and techniques for biologist. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992.
7. Braga IA, Lima JBP, Silva SS, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99: 199-203, 2004.
8. Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. Revista de Saúde Pública 38: 623-629, 2004.
9. Cavalcante VM, Cruz-Landim C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. Naturalia 24: 19-40, 1999.
10. Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99: 541-544. 2004.
11. 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100: 441-444, 2005.
12. David JP, Delphine R, Pautou MP, Meyran JC. Differential Toxicity of Leaf Litter to Dipteran Larvae of Mosquito Developmental Sites. Journal of Invertebrate Pathology 75: 9–18, 2000.
13. Delphine R, Pautou MP, Meyran JP. Histopathological Effects of Tannic Acid on the Midgut Epithelium of Some Aquatic Diptera Larvae. Journal of Invertebrate Pathology 73: 173–181, 1999.
14. Derouich M, Boutayeb A, Twizell EH. A model of dengue fever. Biomedical

- Engineering Online 19: 2-4, 2003.
15. Donalísio MR, Glasser CM. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 5: 259-272, 2002.
 16. Flores JG, Lamorena MB. Ultrastructure study of *Bacillus thuringiensis* – treated *Aedes aegypti* larvae. *Acta Manila* 39: 25-29, 1991.
 17. Forattini OP, Brito M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública* 37: 676-677. 2003.
 18. Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MG. V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* 34: 843-847, 2005.
 19. Glauert AM. Fixation, dehydration and embedding of biological Specimens. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1975. 207p.
 20. Gusmão DS, Páscoa V, Mathias L, Vieira IJC, Braz-Filho R, Lemos FJA. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 371-375, 2002.
 21. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3: 621-627, 1996.
 22. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 3: 376-396, 1990.
 23. Joly AB. Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo: Ed. Nacional, 1993. p. 428-430.
 24. Levy SM, Falleiros AMF, Gregório EA. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Brazilian Journal of Biology* 64: 633-638, 2004.
 25. Lima MGA, Maia ICC, Sousa BD, Morais SM, Freitas SM. Effect of stalk and leaf

- extracts from euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 48: 211-214, 2006 .
26. Lorenzi H. Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Piracicaba, Plantarum, 1992.
 27. Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. Revista de Saúde Pública, 38: 842-843, 2004.
 28. Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America 91: 2395-2400, 1994.
 29. MS – Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica/Fundação Nacional de Saúde, Brasil, 2002.
 30. MS – Ministério da Saúde. Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela – Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 1999. 60 p.
 31. MS – Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue 22/01/2008.
 32. Neves DP. Parasitologia Humana. 11 edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2005. 355- 368 p.
 33. OMS – 2002. - Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever Prevention and Control. New Delhi, WHO Regional Office for South-East Asia; 33p.
 34. Pohlit AM, Quignard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Santos EVM, Moraes SKR, Saraiva RCG, Ming LC, Alecrim AM, Ferraz AB, Pedrosa ACS, Diniz EV, Finney EK, Gomes EO, Dias HB, Souza KS, Oliveira LCP, Castro Don L, Queiroz MMA, Henrique MC, Santos M, Lacerda Júnior OS, Pinto PS, Silva SG, Graça YR. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. Acta Amazonica 34: 97 – 105, 2004.

35. Rey D, Pautou MP, Meyran JC. Histopathological Effects of Tannic Acid on the Midgut Epithelium of Some Aquatic Diptera Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 173–181, 1999.
36. Ribeiro AF, Marques GRAM, Voltolini JC, Condino MLF. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. *Revista de Saúde Pública*, 40: 671-676, 2006.
37. Schatmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 179-181, 2000.
38. Serufo JC, Nobre V, Rayes A, Marcial TM, Lambertuccil JR. Dengue: uma nova abordagem. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 465-476, 2000.
39. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Revista de Patologia Tropical* 27: 53-63, 1998.
40. Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 396-399, 2004.
41. Silva HHG. Atividade larvicida e caracterização molecular dos princípios ativos isolados de *Magonia pubsecens* St. Hil. (Sapindaceae) e *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), visando ao controle de *Aedes aegypti*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2004.
42. Silva IG, Zanon VOM, Silva HHG. Larvicidal Activity of *Copaifera reticulata* Ducke Oil-Resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* 32: 729-732, 2003.
43. 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-Caesalpinioideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40: 264-267, 2007.

44. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Filho AMO. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova* 27: 46-49, 2004.
45. Simas NK, Lima EC, Conceição SR, Kuster RM, Filho AMO. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 405-407, 2007.
46. Souza W. Manual sobre técnicas básicas em Microscopia Eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 1998. 179p.
47. Souza W. Manual sobre técnicas básicas em Microscopia Eletrônica. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 1989. 105p.
48. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cadernos de Saúde Pública* 17: 99-102, 2001.
49. Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 18: 867-871, 2002.
50. Veiga Junior VF, Ângelo CP. O gênero *Copaifera* L. *Química Nova* 25: 273-286. 2002.