

---

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)

---

Rosângela Addad Abed,<sup>1</sup> Gláucia Maria Cavasin,<sup>1</sup> Heloísa Helena Garcia da Silva,<sup>2</sup> Regina Geris<sup>3</sup> e Ionizete Garcia da Silva<sup>2</sup>

## RESUMO

O óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke foi utilizado para verificar sua toxicidade e as alterações morfológicas estruturais provocadas em larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. A partir de 15 minutos de contato da larva com a solução a 30 ppm, houve diminuição em sua mobilidade e após 20 horas, destruição total ou parcial das células, elevada vacuolização citoplasmática, aumento do espaço intercelular e da liberação de secreções celulares e alterações nos nervos periféricos, nas microvilosidades, no núcleo, nucléolo e no epitélio que sofre pavimentação e estratificação. Este estudo elucidou os mecanismos de ação do óleo-resina de *C. reticulata* sobre larvas de *A. aegypti*. As CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> foram de 8,9 e 59,4 ppm, respectivamente. Tais concentrações evidenciam o potencial larvicida da planta, ampliando as possibilidades de seu uso no controle deste mosquito.

DESCRITORES: *Aedes aegypti*. *Copaifera reticulata*. Morfohistologia. Toxicidade. Controle.

## INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é o vetor mais importante de dengue e febre amarela na Ásia, África e Américas (18, 24). Adaptado ao ambiente urbano, este mosquito vive em contato com um terço da população mundial, sendo permanente o risco de transmissão de dengue na área cosmotropical (24).

---

1 Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), UFG.

3 Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Endereço para correspondência: Dr. Ionizete Garcia da Silva, Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, IPTSP/UFG, Caixa Postal 131, CEP: 74001-970. Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: ionizete@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 17/11/2006. Revisto em 20/3/2007. Aceito em 26/3/2007.

A *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) ocorre na região tropical da América Latina, com larga distribuição na Amazônia brasileira. Através de fendas na casca ou no caule, esta planta exsuda um óleo-resina, sendo por esse fato conhecida como pau-d'óleo. As populações da Amazônia têm utilizado esse exsudado como recurso terapêutico para diversas indicações etnofarmacológicas (7, 17).

Sem uma vacina disponível para os quatro sorotipos de vírus do dengue, seu controle tem sido feito mediante ações antivetoriais, sendo priorizadas aquelas com inseticidas sintéticos, cujo uso prolongado trouxe como conseqüência o aparecimento de mosquitos resistentes (4, 6, 8, 9, 14, 16). Esse fato, associado à necessidade de preservação ambiental, suscitou pesquisas de novos princípios ativos de baixo impacto. Vários métodos de controle com baixa toxicidade vêm sendo avaliados, dentre esses os de origem botânica (11, 15, 21, 23).

Este estudo elucidou, pela primeira vez, o mecanismo de ação do óleo-resina de *C. reticulata* na mortalidade do *A. aegypti*, por meio de estudos morfohistológicos e de toxicidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nos bioensaios para verificar a atividade larvicida do óleo-resina, foram utilizadas larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, obtidas de colônia cíclica mantida há mais de dez anos no 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  $28\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$  de umidade relativa e fotofase de 12h.

O óleo-resina *in natura* foi coletado no município de Jacundá-PA, Brasil, através de uma incisão com trado a uma altura de 70 cm do tronco da árvore. Terminada a coleta, o orifício foi vedado com argila para impedir a infestação da árvore por fungos ou cupins. O óleo foi acondicionado em frasco de cor âmbar e trazido ao laboratório, onde foi pesado, pré-solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), acrescentando-se água destilada para obtenção de uma solução-mãe a 500 ppm. A partir dessa solução foram retiradas alíquotas, às quais adicionou-se água destilada em volumes diferenciados, até serem obtidas as concentrações desejadas. Foram utilizadas 20 larvas para cada concentração, e os bioensaios foram realizados com cinco réplicas em câmara climatizada similarmente à da criação.

O estudo morfohistológico constou de quatro experimentos com a solução de óleo-resina, cada um com 20 larvas de 3º estágio do *A. aegypti*. Para o controle utilizou-se o mesmo número de experimentos e de larvas em solução de DMSO e água destilada. As larvas foram individualizadas em frascos com a solução do óleo-resina. Cada experimento foi dividido em quatro grupos de 20 larvas assim distribuídos: grupo 1 – larvas na solução do óleo-resina com alimento; grupo 2 – larvas na solução do óleo-resina sem alimento;

grupo 3 – controle com alimento e grupo 4 – controle sem alimento. O alimento utilizado foi ração para gato (22). As larvas permaneceram na solução do óleo-resina por 20 horas, posteriormente foram coletadas e imediatamente fixadas, desidratadas, embebidas e incluídas em resina (2).

Os estudos morfohistológicos foram realizados em microscopia de luz, conforme técnica já estabelecida (1, 2, 10, 19). Após a fixação as larvas foram desidratadas, incluídas em resina, seccionadas em micrótomo, montadas em lâminas, coradas pela hematoxilina-eosina e documentadas fotograficamente em microscópio Zeiss MC80.

As concentrações letais e os intervalos de confiança foram determinados pela interpolação dos dados, em análise de Probit, pelo Sistema para Análises Estatísticas (SAEG).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

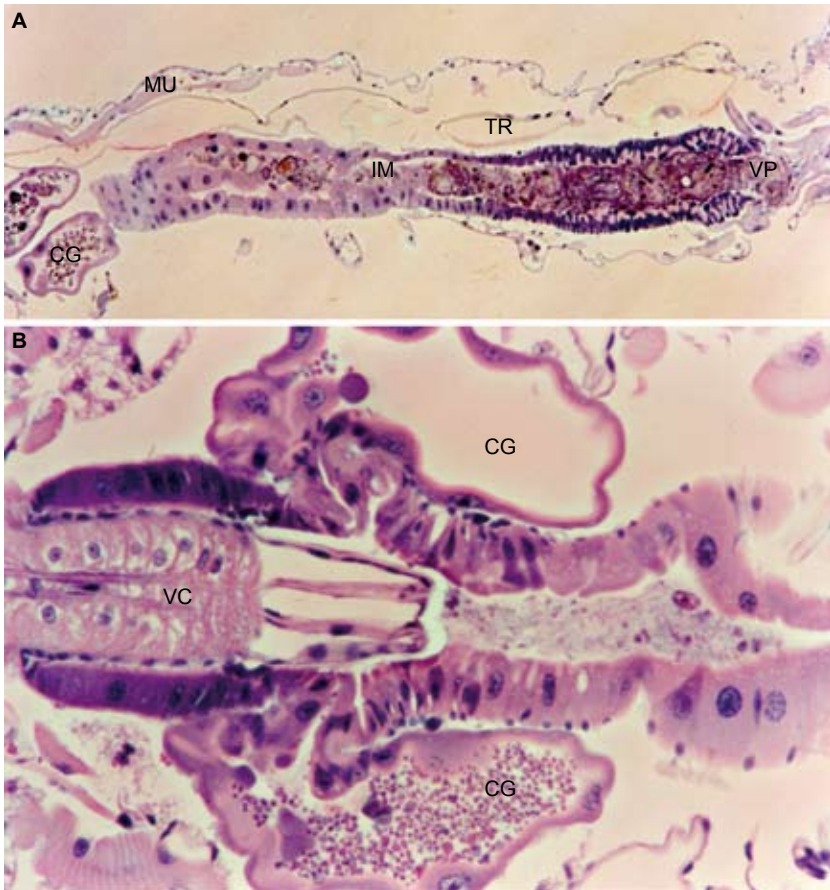
As alterações morfohistológicas mais importantes que causaram a mortalidade das larvas de 3º estágio de *A. aegypti* foram observadas, em primeiro lugar, na região média do mesêntero.

As larvas do grupo controle mostraram aspecto alongado e vermiforme, com o corpo bem definido nos três segmentos - cabeça, tórax e abdômen. A cabeça e o tórax apresentavam aspecto globoso e mais robusto, com maior quantidade de quitina, e abdômen mais fino, liso e flexível, constituído por nove segmentos que exibiam grande mobilidade de aspecto sinuoso. As secções histológicas mostraram morfologia normal no estomodeo. Na área de confluência com o mesêntero, o proventrículo, os cecos gástricos e a válvula cárdia apresentavam o epitélio de revestimento formado por células cilíndricas perfeitamente preservadas (Figuras 1A, B). Essas características na larva de *A. aegypti* mostraram-se idênticas às descritas por outros autores (1, 2, 5).

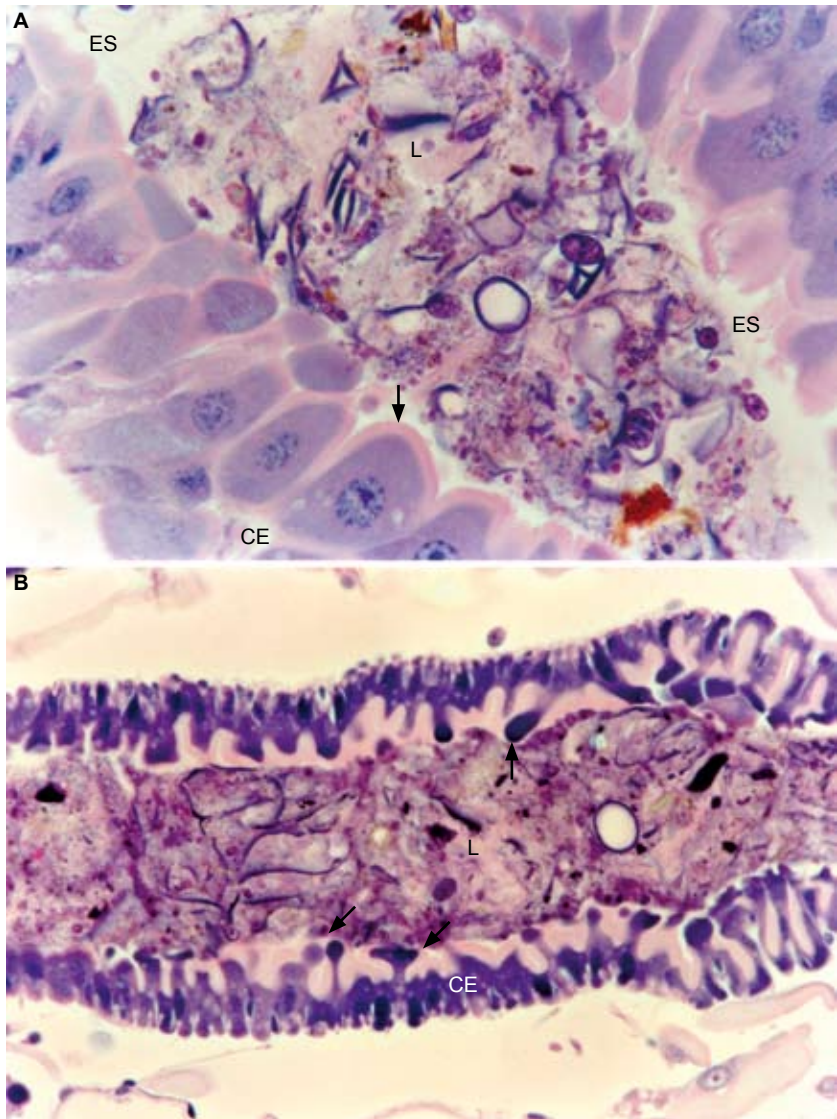
As larvas do grupo tratado com óleo-resina de *C. reticulata*, com ou sem alimento, apresentaram-se com aspecto frágil, pouco resistentes, com pouca mobilidade e superfície corporal toda enrugada. Entre 17 e 20 horas de contato com a solução, as larvas tornavam-se letárgicas, paradas no fundo do recipiente, movendo-se apenas quando tocadas com estilete de cabelo ou com leves batidas no frasco. Após 20 horas ocorria a perda total de qualquer movimento e as larvas eram fixadas antes do escurecimento da cápsula cefálica, para não interferir nos resultados da destruição celular pós-morte.

No mesêntero, foi observada a presença de apenas uma camada de células cilíndricas coradas heterogeneamente no citoplasma e na região apical com borda em escova, representada por uma delgada linha rósea, núcleo basal esférico bem evidente com áreas de hetero e eucromatina; no lúmen do intestino, era possível notar a presença de uma matriz peritrófica que envolvia todo o conteúdo alimentar. Estes resultados são concordantes com outros trabalhos (20) sobre a mesma espécie

de mosquito (Figura 2 A). Na parte posterior do mesêntero, as células apresentavam núcleos basais e citoplasma mais basófilos (Figura 2B). A grande atividade secretora das células das regiões mediana e posterior do mesêntero pode ser observada, na Figura 2B, pela presença de vesículas de secreção, fortemente coradas e basófilas, destacando-se do restante do citoplasma. O resto de alimento, observado nas Figuras 3 A, B do grupo em jejum, era do estágio anterior. Os grupos controle, com ou sem alimento, apresentaram morfologia similar.

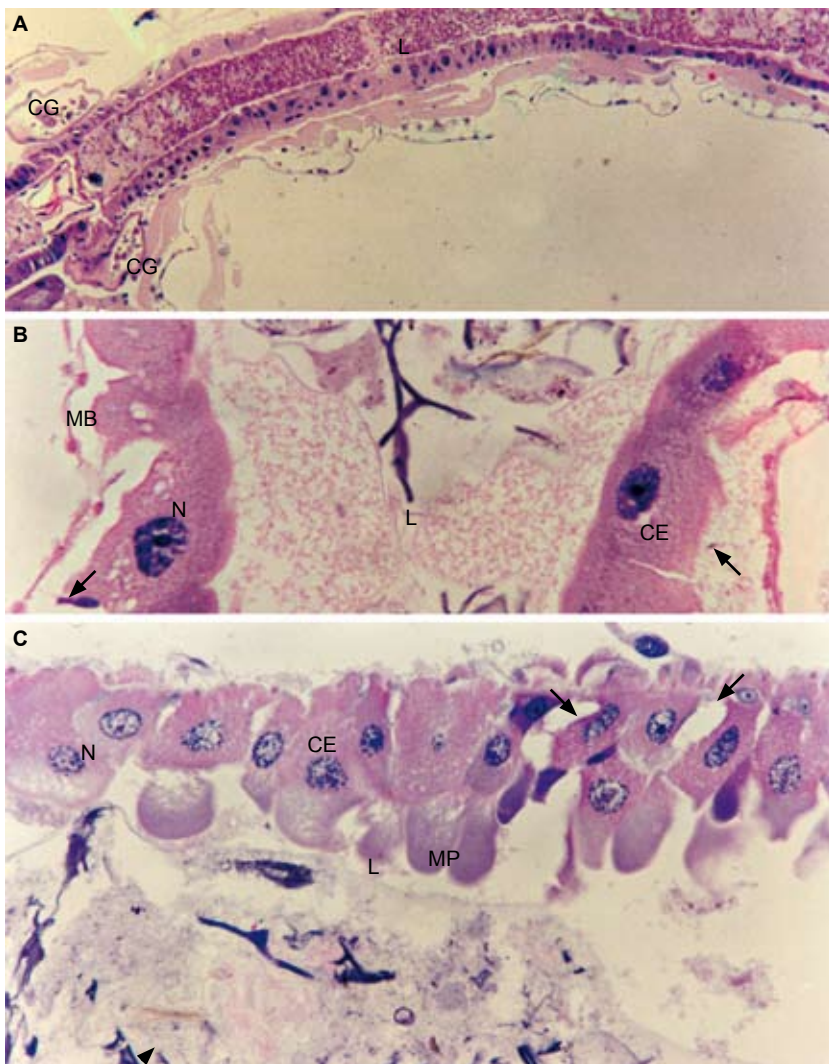


**Figura 1.** Fotomicrografias do tubo digestivo de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle mantidas com alimento, coradas em HE, corte longitudinal. A. Vista geral. Basofilia ao longo do epitélio intestinal (CE). Cecos gástricos (CG), intestino médio (IM), músculo (MU), traquéia (TR), válvula pilórica (VP). 100X. B. Detalhe da válvula cárdia (VC) e cecos gástricos (CG). Células do estomodeo perfeitamente conservadas. 100X.



**Figura 2.** Fotomicrografias do tubo digestivo de larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle mantidas com alimento, coradas em HE, corte longitudinal. A. Células epiteliais basófilas(CE) do mesêntero com bordo em escova (seta), espaço subperitrófico (ES), luz do mesêntero (L). 400x. B. Basofilia de células epiteliais (CE), secreção no ápice das células do mesêntero (seta), luz da parte posterior do mesêntero (L). 400X.





**Figura 3.** Fotomicrografias do mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mantidas com alimentos e tratadas com óleo-resina de *Copaifera reticulata*, coradas em HE, corte longitudinal. A. Corte longitudinal, cecos gástricos (CG), luz intestinal (L). 400x. B. Alteração basal de células epiteliais (seta), Membrana basal (MB), luz intestinal (L), núcleo (N). 400X. C. Liberação apical (cabeça de seta), vacúolos e espaçamento intercelular (setas), célula epitelial (CE), luz do mesêntero (L), matriz peritrófica (MP), núcleo (N). 400X.

Para a realização deste experimento, vários testes prévios foram realizados com intenção de se conhecer melhor o produto e as concentrações mais adequadas a serem utilizadas. Um gradiente de concentração foi realizado para se verificar qual delas afetava significativamente as larvas, tanto de DMSO como do próprio óleo-resina, a fim de se chegar a uma concentração não tão elevada que provocasse morte imediata, nem tão diluída que provocasse morte tardia. Isso faria com que a larva, num processo de defesa, diminuísse o tempo do terceiro estágio, mudando mais rapidamente, na tentativa de chegar à fase adulta e, conseqüentemente, sobreviver à ação do óleo-resina antes que ela fosse irreversível. Os dois extremos seriam ruins para este tipo de experimento, que teve como objetivo verificar as alterações celulares provocadas pela ação do óleo-resina. O gradiente de concentração revelou que a melhor foi a de 30 ppm.

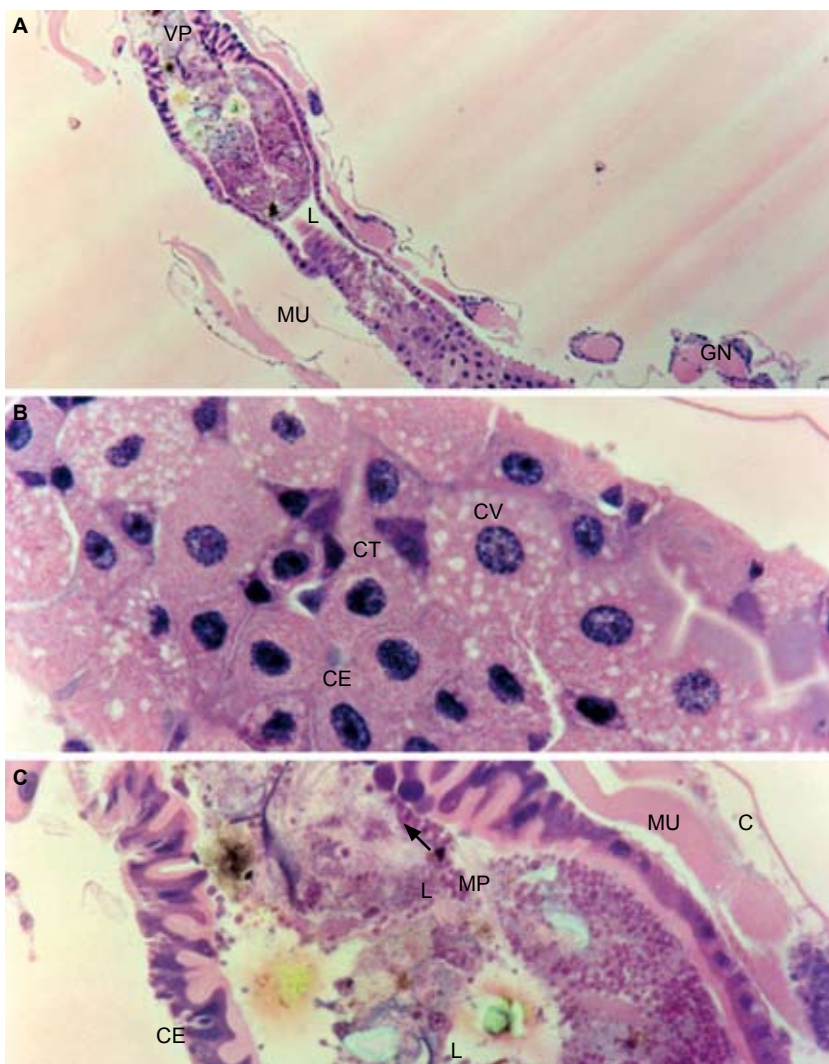
No grupo tratado, as alterações morfológicas no tubo digestivo das larvas foram observadas em corte longitudinal (Figura 4A), mostrando as células mais achatadas e com aspecto danificado. Mudanças na matriz peritrófica foram observadas: aspecto mais espesso e inúmeras dobras que isolavam o alimento em diferentes compartimentos (Figura 4B). As microvilosidades mais baixas, heterogêneas, apresentavam sinais de destruição. Além disso, destruição da região basal, nunca observada, impedia as trocas iônicas e provocava a separação do epitélio do tubo digestivo.

Na transição do mesêntero, as células se apresentaram com maior basofilia do que as do intestino médio anterior e mostraram, na porção apical, grandes vesículas de secreção, indicando a liberação de boa parte do conteúdo celular. Nessa mesma porção, a Figura 4C mostra a presença de grandes espaços intercelulares que não deveriam existir.

Nas larvas mantidas sem alimento, as mesmas características foram observadas: o epitélio do mesêntero tornou-se mais achatado e células normais circundadas por células totipotentes indiferenciadas eram visíveis em corte tangencial do tubo digestivo. Estas células de aspecto normal apresentavam grande quantidade de pontuações acidófilas, caracterizando a presença de mitocôndrias. Ao redor desse grupo de células normais, foram observadas células epiteliais muito vacuolizadas. Os vacúolos de diversos tamanhos distribuíam-se por toda a célula. Notou-se também maior fragilidade nas junções celulares e espaços intercelulares maiores (Figuras 5A, 5B).

Um tipo de alteração freqüentemente observada nos experimentos foi o achatamento do epitélio do tubo digestivo. Na região anterior do mesêntero, as células eram muito planas com características do mesotélio desprovidas de microvilosidades, indicando a ausência de absorção.

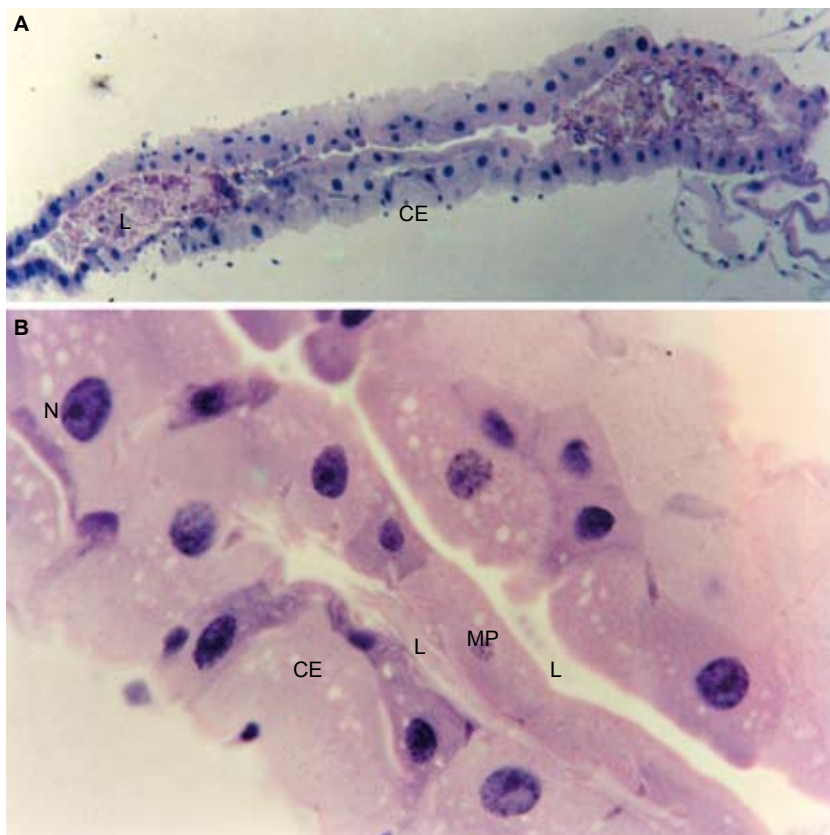
As alterações deletérias nas células do mesêntero provocadas pelo óleo-resina incluíram várias mudanças histopatológicas, como destruição total ou parcial das células, alta vacuolização do citoplasma e aumento do espaço subperitrófico com acúmulo de material acidófilo no seu interior. Várias destas



**Figura 4.** Mesêntero de larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *Aedes aegypti* em jejum e tratadas com óleo-resina de *Copaifera reticulata*, coradas em HE, corte longitudinal. A. Corte longitudinal, gânglios nervosos (GN), luz intestinal (L), músculo (MU), válvula pilórica (VP). 100x. B. Células epiteliais vacuolizadas (CV), células totipotentes (CT), 400X. C. Região posterior do mesêntero com células secretando (seta), cutícula (C), célula epitelial (CE), luz do mesêntero (L), Matriz peritrófica (MP), músculo (MU). 400X.

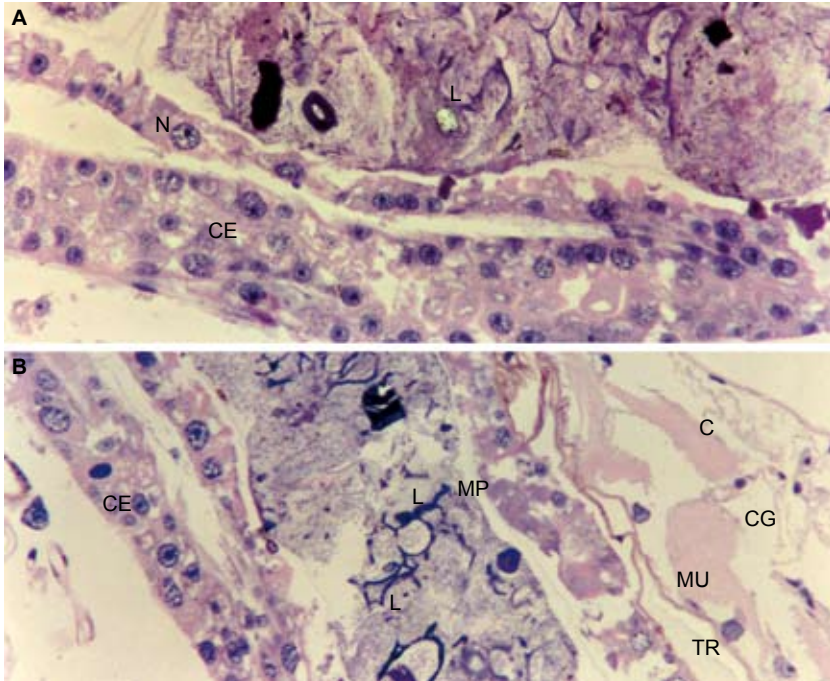


alterações se opõem às observações histológicas visualizadas principalmente na região anterior e posterior do mesêntero causadas por agentes de controle biológico (12, 13), dentre elas, a separação das células epiteliais da membrana basal, desintegração da borda em escova, completos danos na matriz peritrófica, hipersecreção pelas células epiteliais, lise celular, destruição completa da camada epitelial e vacuolização celular. Por outro lado, estudos da histopatologia de larvas de *A. aegypti* parasitadas por *Reesimermis nielsenii* (Nematoda) revelaram poucas diferenças entre os tecidos controle e infectado; nenhuma alteração foi encontrada nas células do mesêntero (3).



**Figura 5.** Mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mantidas com alimento por 20h e tratadas com óleo-resina de *Copaifera reticulata*, coradas em HE, corte longitudinal. A e B. Proliferação atípica do epitélio intestinal, célula epitelial (CE), luz do mesêntero (L), matriz peritrófica (MP), núcleo (N). 200X e 400X, respectivamente.

Outro aspecto das alterações celulares observado pela primeira vez, porém com menor frequência, foi a transformação de um epitélio cilíndrico simples em epitélio estratificado (Figuras 5A e B), ou seja, novas camadas celulares evidenciaram a reposição celular de um sofisticado sistema de defesa. As Figuras 6A e B mostram que as células não possuem um aspecto tão vacuolizado, mas passam a estratificar-se, evidenciando a ocorrência de defesa ou consequência de lesão, raramente observada por outros autores (12, 13).



**Figura 6.** Mesêntero de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mantidas com alimentos por 20h, tratadas com óleo-resina de *Copaifera reticulata* e coradas em HE, corte longitudinal. A e B. Estratificação do epitélio e vacuolização celular, cutícula (C), células epiteliais (CE), corpo gorduroso (CG) luz do mesêntero (L), músculo (MU), traquéia (TR). 400X.

Os efeitos tóxicos do óleo-resina de *C. reticulata* sobre o *A. aegypti* foram observados primariamente na região média do mesêntero, diferentemente do que ocorreu em larvas de *Simulium vittatum* e *Culiseta incidens* infectadas pelo *B. thuringiensis*, nas quais as alterações histopatológicas (12, 13) foram mais evidenciadas nas regiões anterior e posterior do mesêntero.

## AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro: OPAS, FUNAPE.

## ABSTRACT

Histomorphological alterations in larvae of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) caused by the larvicidal activity of the oil-resin of the medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae)

The resin-oil of *Copaifera reticulata* Ducke (copaiba), was used in the study to evaluate morphological and structural alterations in 3<sup>o</sup> instar of *Aedes aegypti* larvae. After 15 minutes of contact with a 30 ppm oil-resin solution, decreased larval mobility was noticed. Studies revealed that oil-resin affects primarily the digestive tract, particularly medium intestine. After 20 hours, the main alterations observed were the partial or total cell destruction, high cytoplasmic vacuolization, increased intercellular space, release of cellular secretion, total vacuolization of the apical region of secretory cells, peripheral nerve alterations, disorganized cell projections of nucleus and nucleoli, and epithelial changes such as pavement and stratification. This study elucidates the mechanisms of action of the oil-resin on *A. aegypti* larvae and LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, 8,9 and 59,4 ppm, respectively, that show the potential larvicidal effect of that plant, enlarging the possibilities of use in the control of this mosquito.

**KEY WORDS:** *Aedes aegypti*. *Copaifera reticulata*. Histomorphological. Toxicity. Control.

## REFERÊNCIAS

1. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens*. *Entomol Vect* 10: 47-60, 2003a.
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, 2003b.
3. Bailey CH, Gordon R. Histopathology of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae parasited by *Reesimermis nielsenii* (Nematoda: Mermithidae). *J Invertebr Pathol* 23: 435-411, 1973.
4. 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: 99-203, 2004.
5. Brown MR, Raikhel AS, Lea AO. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Cell Tiss* 17: 709-721, 1985.
6. Campos J, Andrade CFS. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Pública* 37: 523-527, 2003.
7. Corrêa MP. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Vol. V, Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, 1984. 687 pp.
8. Failloux AB, Ung A, Raymond M, Pasteur N. Insecticide susceptibility in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from French Polynesia. *J Med Entomol* 31: 639-644, 1994.

9. Gabe M. *Histological Techniques*. Masson, Paris. 1976.
10. Green MM, Singer JM, Sutherland DJ, Hibben CR. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 282-286, 1991.
11. Kellen WR, Clark TB, Lindegren JE, Ho BC, Rogoff MH, Singer S. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J Invertebr Pathol* 7: 442-448, 1965.
12. Lacey LA, Federici BA. Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J Invertebr Pathol* 33: 171-182, 1979.
13. Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos, RP, Valle D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333, 2003.
14. Macêdo ME, Consoli RAGB, Grandi TSM, Anjos AMG, Oliveira ABO, Mendes NM, Queiróz RO, Zani CL. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 565-570, 1997.
15. Macoris ML, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708, 2003.
16. Paiva LA, Alencar-Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phyt Res* 16: 737-739, 2002.
17. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 50: 161-169, 1997.
18. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sabin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*: American Registry of Pathology, Washington, 1992.
19. Richards AG, Richards PA. The peritrophic membranes of insects. *An Rev Entomol* 22: 219-240, 1977.
20. Schwartz AM, Paskewitz SM, Orth AP, Tesch MJ, Toong YC, Goodman WG. The lethal effects of *Cyperus iria* on *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 78-82, 1998.
21. Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), em laboratório. *Rev Patol Trop* 27: 53-63, 1998.
22. Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Rodrigues-Filho E, Elias CN. Atividade larvicida de taninos isolados da *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399, 2004.
23. World Health Organization. *Dengue/dengue haemorrhagic fever prevention and control*. Regional Office for South-East Asia, 1-33, 2003.
24. Zhuzhikov DP. Permeability of the peritrophic membrane in the larvae of *Aedes aegypti*. *J Insect Phys* 16: 1193-1202, 1970.