
**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFO-HISTOLÓGICAS
EM LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE)
SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE
Sapindus saponaria Lin (SAPINDACEAE)**

Cleyde Ferreira Barreto,^{1 e 2} Gláucia Maria Cavasin,² Heloísa Helena Garcia da Silva¹ e Ionizete Garcia da Silva¹

RESUMO

Dengue é hoje a arbovirose mais importante no mundo e seu controle está restrito, basicamente, ao combate ao principal vetor, o *Aedes aegypti*. As ações têm como foco a aplicação de inseticidas químicos sintéticos que possuem ação rápida e eficaz no combate, porém são altamente tóxicos para os mamíferos e o meio ambiente. Seu uso tem induzido ao desenvolvimento de resistência do mosquito. Produtos naturais provenientes de plantas poderão representar alternativas às medidas de controle em razão de sua baixa toxicidade para os mamíferos e da ausência de impacto ambiental. Neste estudo, são apresentadas as alterações morfo-histológicas e a atividade larvicida do extrato bruto etanólico (e.b.e.) da casca do fruto de *Sapindus saponaria* sobre o *A. aegypti*, visando ao controle desse mosquito. Larvas de terceiro estágio foram submetidas a diferentes concentrações do e.b.e., obtido da casca do fruto de *S. saponaria*, previamente solubilizado em água, onde permaneceram por até 48 horas. As larvas que atingiram estado letárgico foram coletadas e fixadas em paraformaldeído, incluídas em resina, seccionadas e as lâminas coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia de luz. A CL₉₉ do e.b.e. da casca do fruto de *S. saponaria* sobre larvas de *A. aegypti* foi de 134,1 ppm. Os efeitos tóxicos desse e.b.e. foram observados em concentrações subletais e as três regiões do mesêntero apresentaram várias alterações histopatológicas: destruição total ou parcial das células, alta vacuolização do citoplasma, hipersecreção das células epiteliais e

1 Laboratório de Biologia, Fisiologia de Insetos/Bioatividade de Plantas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFG.

Endereço para correspondência: Ionizete Garcia da Silva, Rua 235, esq. com a 1ª Avenida, Setor Universitário. CEP 74605-050, Goiânia, Goiás. E-mail: ionizete@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 30/9/2005. Revisto em 27/1/2006. Aceito em 6/2/2006.

pavimentação do epitélio. Essas alterações celulares evidenciam o mecanismo de ação do e.b.e. de *S. saponaria* sobre larvas de *A. aegypti*.

DESCRITORES: *Aedes aegypti*. *Sapindus saponaria*. Larvicida. Controle.

INTRODUÇÃO

A dengue constitui hoje a mais importante doença viral humana transmitida por mosquitos, cujo agente é um *Flavivirus*, com quatro sorotipos conhecidos (Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4) que podem causar a dengue clássica (DC) e a febre hemorrágica da dengue (FHD). Esta última pode evoluir para uma forma mais severa conhecida como síndrome do choque da dengue (SCD). A infecção por um sorotipo provê imunidade vitalícia para aquele vírus, mas a proteção cruzada para outro sorotipo é apenas passageira, o que torna possível ocorrer uma infecção seqüente por outro sorotipo (Henchal & Putnak, 1990; Monath, 1994; Schatzmayr, 2000; Derouich et al., 2003).

A transmissão da dengue ao homem ocorre através da picada da fêmea de *Aedes aegypti* infectada com um dos quatro sorotipos do vírus. Após 8 a 12 dias da infecção ocorrem a incubação, a replicação e a disseminação do vírus por todo o corpo do mosquito. A fêmea pode passar por ciclos de reprodução durante o período de incubação e replicação do vírus, dando a ele a oportunidade de entrar no ovo e de ser passado para a prole pela transmissão vertical (Monath, 1994).

O *A. aegypti* apresenta hábitos antropofílicos e as fêmeas realizam a hematofagia em período diurno, com maior pico no período entre 16 h e 18 h (Silva et al., 2002). As fêmeas realizam a oviposição em criadouros artificiais, geralmente em pequenas coleções de água limpa e parada, localizadas nas proximidades das casas. Contudo, Silva et al. (1999) demonstraram que o *A. aegypti* também se desenvolve em água poluída. Nesse caso a oviposição é feita nas paredes dos recipientes, imediatamente acima da superfície da água, onde os ovos podem ser vistos como pequenos pontos escuros. O desenvolvimento do mosquito ocorre por metamorfose completa, passando pelas seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Marzochi, 1994; Gubler, 1998; Silva et al., 1998; Silva et al., 1999; Silva et al., 2002; Forattini & Brito, 2003).

O *A. aegypti* encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis à sua rápida propagação como, por exemplo, a crescente urbanização, as deficiências no fornecimento, tratamento e armazenamento de água e o uso intensivo de materiais descartáveis. Uma das conseqüências dessa situação tem sido o aumento do número de criadouros potenciais para o mosquito vetor (Guzman & Kouri, 1996; Tauli, 2001).

A dengue se dissemina conforme a expansão do *A. aegypti*, que hoje ocupa praticamente toda a faixa cosmotropical da terra. No Brasil, a partir de 1986 se desencadearam epidemias de dengue, sempre relacionadas com a introdução de um novo sorotipo do vírus que se dissemina para as unidades federadas (Uribe, 1983;

Serufó et al., 1993; Marzochi, 1994; Monath, 1994; OPAS, 1997; Gubler, 1998; Schatzmayr, 2000; Tauli, 2001; FUNASA, 2002).

Até o momento, não há uma vacina pronta para uso contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, embora pesquisas estejam em andamento (Whitehead et al., 2003; Rothman, 2004). A opção para combater a dengue continua sendo o controle do *A. aegypti* por meio de inseticidas químicos sintéticos usados nas campanhas nacionais. Contudo, têm surgido problemas significativos como o aparecimento de resistência (OPAS, 1997; FUNASA, 2002; Campos & Andrade, 2001; Carvalho et al., 2004; Luna et al., 2004).

Formas alternativas de controle de vetores vêm sendo avaliadas. Merece destaque o controle biológico com o *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), com possibilidade de uso integrado com os produtos sintéticos (Andrade & Modolo, 1991; Polanczyk et al., 2003; Praça et al., 2004). Nessa busca por novas alternativas de combate aos insetos vetores, substâncias extraídas de plantas têm recebido especial atenção. Vários estudos vêm sendo realizados com plantas como forma de controle desse mosquito (Pizarro et al., 1999; Aguilera et al., 2003; Silva et al., 2003; Silva et al., 2004; Cavalcanti et al., 2004; Simas et al., 2004).

Assim, procurou-se, através da prospecção em plantas, substâncias potencialmente capazes de exercer controle sobre o *A. aegypti*, buscando elucidar o seu mecanismo de ação através de estudos morfohistológicos de toxicidade.

Estudos morfológicos que esclarecem os efeitos tóxicos de extratos de plantas sobre larvas de *A. aegypti* auxiliam na compreensão das diversas formas de ação desses produtos (Gusmão et al., 2002, Arruda et al., 2003a, b). A demonstração do local de atuação e da forma de ação tem grande importância para a potencialização de seus efeitos e para o desenvolvimento do produto inseticida.

A *Sapindus saponaria* (Figura 1A) é uma planta que se encontra distribuída nas Américas Central e Sul, desde a mata luxuriante até o Cerrado. No Brasil, ocorre do Pará ao Rio Grande do Sul. Sua madeira é amplamente utilizada na indústria, na construção civil, no reflorestamento de áreas degradadas e na confecção de brinquedos e caixotaria. As sementes (Figura 1C) são usadas no artesanato. A casca, a raiz e o fruto (Figura 1C) são utilizados na medicina popular como calmante, adstringente, diurético, expectorante, tônico, depurativo do sangue e contra tosse. A árvore é bastante ornamental, principalmente por sua copa globosa, sendo amplamente empregada no paisagismo urbano (Lorenzi, 2004).

Estudos com o extrato da folha (Figura 1B) de *S. saponaria* demonstraram que a planta apresentou atividade neutralizadora de hemorragia provocada por serpentes do gênero *Bothrops* em animais de laboratório (Castro et al., 1999). Este extrato é constituído por flavonóides capazes de inibir atividade plaquetária e antitrombótica. Outros estudos demonstraram propriedades cicatrizantes para úlceras provocadas pelo estresse em ratos (Albiero et al., 2002). A administração dos extratos reduziu significativamente o número de ulcerações severas e moderadas nos ratos, além de apresentarem atividade anti-secretora e citoprotetora.



Figura 1. Planta *Sapindus saponaria*. Figura A – Árvore. Figura B – Folhas. Figura C – Frutos maduros e sementes.

A partir de uma seleção de plantas com propriedades larvicidas para *A. aegypti*, realizada no Laboratório de Bioatividade de Plantas e Entomologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), a *S. saponaria* apresentou potencial, despertando o interesse por conhecer seu mecanismo de ação em larvas do mosquito.

Produtos naturais provenientes de plantas podem representar alternativas às medidas de controle por apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos e pouco impacto ambiental.

Neste estudo, são apresentadas a atividade larvicida e as alterações morfo-histológicas do extrato bruto etanólico (e.b.e.) de *S. saponaria* sobre o *A. aegypti*, visando esclarecer os mecanismos de ação sobre as larvas desse mosquito.

Estudos realizados com inseticidas botânicos demonstraram que sua principal ação ocorre no nível do mesêntero das larvas, motivo pelo qual este trabalho focalizou nesta região do tubo digestivo as análises morfo-histológicas (Abed, 2003, Arruda et al., 2003a, b, Borges et al., 2004).

MATERIAIS E MÉTODOS

A *S. saponaria* foi coletada em 12 de setembro de 2004 e, após sua identificação botânica, partes da planta foram guardadas no herbário da UFG com o nº 28.528. Frutos dessa planta foram coletados na região central da cidade de Goiânia (GO) e processados no Laboratório de Bioatividade de Plantas e Entomologia do IPTSP/UFG. O material foi colocado em estufa de fluxo de ar forçado a 40°C para secagem. Feita a separação da casca e da semente, ambas foram moídas separadamente até atingirem baixa granulometria. Em seguida, os produtos foram percolados a frio, colocando-se cerca de 1 litro do pó em um béquer,

ao qual se acrescentou etanol até atingir aproximadamente 4 centímetros acima do produto. O béquer foi coberto com papel alumínio e permaneceu em repouso por 72 horas. Após a percolação, o filtrado foi recolhido e concentrado em evaporador rotativo. O extrato bruto etanólico (e.b.e.) obtido foi transferido para placas de vidro e dessecado em uma capela de exaustão, com o auxílio de jato de ar quente até a completa evaporação do solvente e, posteriormente, armazenado em dessecador até a utilização nos testes de atividade larvicida.

As larvas do mosquito *A. aegypti* foram obtidas da criação do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos 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 horas de acordo com a metodologia de Silva et al. (1998). Cartelas de papel de filtro contendo ovos de *A. aegypti* foram colocadas em bacias plásticas com água proveniente da rede pública de abastecimento. À medida que ocorriam as eclosões, as larvas eram retiradas e separadas em outras bacias para dar continuidade ao ciclo. As larvas foram alimentadas com ração para gato triturada. Para o experimento, foram utilizadas larvas de terceiro estágio, imediatamente após a muda, por se tratarem de larvas mais resistentes para tais estudos (Silva et al., 1998; Silva et al., 2003).

Utilizou-se concentração máxima de 100 ppm. Para tanto, foi feita a pesagem de 0,05 g do extrato em balança analítica de precisão e, em seguida, foi dissolvido em 500 mL de água destilada. A concentração de 100 ppm foi, posteriormente, diluída em concentrações menores de 75 ppm e 50 ppm. Essas soluções foram colocadas em frascos de 25 mL e em cada frasco foram colocadas 25 larvas. Os experimentos foram feitos em duplicata, utilizando-se em cada um deles o total de 200 larvas de terceiro estágio. Os grupos experimentais utilizados foram: Grupo I = larvas em e.b.e. de 100 ppm; Grupo II = larvas em e.b.e. de 75 ppm; Grupo III = larvas em e.b.e. de 50 ppm; Grupo IV = larvas controle.

As larvas usadas como controle foram submetidas às mesmas condições do teste, utilizando-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 no e.b.e por tempos variados, sendo coletadas a cada três horas, durante um período de 48 horas para a verificação das alterações.

Para verificar a letalidade, foram observadas a mobilidade das larvas e sua reação 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 modelo MZS 250 e coletadas apenas as que se apresentavam em estado letárgico. As mortas foram descartadas. Após serem retiradas das soluções para teste e controle, as larvas foram imediatamente colocadas em fixador.

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

Experimentos foram realizados para se obter o fixador que melhor conservaria a integridade celular. Dois fixadores foram testados: a) Solução aquosa de paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2; b) mistura de Bouin. Optou-se pelo fixador A, visto que as células apresentaram melhor estado de preservação.

As larvas foram fixadas em temperatura ambiente por um período de, no mínimo, duas horas, segundo metodologia utilizada por Arruda et al. (2003a). Depois de fixadas, foram lavadas no mesmo tampão e submetidas à desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) por um período de dez minutos em cada solução. Após a desidratação, as larvas foram embebidas em resina (resina básica + ativador) “Leica Historesin Embedding Kit”, por um período de 12 horas em temperatura ambiente. Após a embebição, o material foi incluído em resina (resina de embebição + catalisador), pertencente ao mesmo kit (soluções preparadas segundo especificações do fabricante), utilizando-se para isso moldes de silicone que possibilitaram a colocação das larvas na posição desejada. Os moldes com o material foram deixados em temperatura ambiente por, aproximadamente, 12 horas para total polimerização da resina.

Após a polimerização, os blocos de resina foram montados em suportes de madeira com cola araldite e, posteriormente, seccionados com navalha de vidro, em micrótomos modelo Leitz 1512 adaptado para cortes semifinos, com espessura de 3 µm. Os cortes foram distendidos em uma cuba contendo água em temperatura ambiente e transferidos para lâminas de vidro; em seguida, corados em hematoxilina e eosina (HE), segundo Pearse (1972).

As lâminas foram fotomicrografadas em Fotomicroscópio modelo MC80, do laboratório de Botânica do Departamento de Biologia Geral da UFG, utilizando-se filmes de 35 mm coloridos.

RESULTADOS

O e.b.e. da casca do fruto de *S. saponaria* apresentou aparência pastosa e escura, sendo facilmente dissolvido em água. Embora a CL₉₉ tenha sido de 134,1 ppm (IC = 93,8 – 223,8), foram utilizadas concentrações subletais para evitar interferências da decomposição na análise histológica.

Na concentração de 100 ppm, obteve-se uma letalidade de 100% das larvas tratadas nas 48 horas em que se realizou o experimento; em 75 ppm, obteve-se 70% de letalidade e, em 50 ppm, apenas 40% das larvas morreram.

Durante os bioensaios algumas mudanças foram observadas no comportamento das larvas. Houve diminuição gradativa dos movimentos larvais quando comparados aos do grupo controle. As larvas dos grupos I e II começaram a apresentar movimentos mais lentos após 30 minutos do início dos testes e tornaram-se lentas ou imóveis após três horas. As do grupo III, a partir de duas horas, apresentavam-se mais lentas e depois de seis horas algumas já estavam imóveis. Algumas larvas já entravam em estado letárgico, permanecendo imóveis mesmo

quando estimuladas por toque. As larvas mortas, caracterizadas pelo escurecimento da cápsula cefálica, foram descartadas.

A Figura 2 A mostra a morfologia do tubo digestivo das larvas de *A. aegypti* do grupo controle. O proventrículo apresenta-se em perfeito estado de conservação. Internamente, observa-se a válvula cárdia revestida por uma camada quitinosa e, em sua base, os cecos gástricos associados às células do mesêntero. Há também parte do ramo traqueal em volta da superfície externa do tubo digestivo. No mesêntero identificam-se três regiões distintas denominadas de anterior, mediana e posterior.

A região anterior (Figura 2B) caracteriza-se por células epiteliais cilíndricas, com algumas mais fracamente coradas que as outras, citoplasma heterogêneo, acidofilia moderada, superfície apical com um fino bordo em escova, núcleo esférico e basal com alta atividade, apresentando um ou mais nucléolos. Nesta região, observa-se uma fina membrana refringente à luz que envolve todo o conteúdo alimentar, denominada matriz peritrófica.

A região mediana (Figura 2C) apresenta células epiteliais cilíndricas altas, com citoplasma evidenciando áreas mais e outras menos acidófilas, núcleo esférico e nucléolos evidentes. Algumas células estão agrupadas e com maior basofilia, o bordo em escova mostra-se mais espesso e mais corado do que o encontrado na região anterior. A matriz peritrófica é tão evidente quanto na região anterior (Figura 2B).

A região posterior (Figuras 2D, E) apresenta células cilíndricas, intensa basofilia e núcleo esférico basal. A superfície apical mostra-se com espesso bordo em escova, levemente acidófilo, que provavelmente representa a grande quantidade de microvilosidades existentes nesta região. O espaço subperitrófico apresenta-se maior e preenchido por substância acidófila, tornando difícil a delimitação entre ele e o bordo em escova. Na parte distal dessa região (Figura 2E), nota-se uma intensa atividade secretora, na qual as células cilíndricas liberam sua porção apical em forma de grandes vesículas.

As larvas de *A. aegypti* tratadas com o e.b.e. da *S. saponaria* mostraram várias alterações. As análises basearam-se na concentração e no tempo de exposição. Na concentração de 50 ppm, as alterações celulares mais relevantes foram observadas com 9 horas; de 75 ppm, com 3 e 12 horas e de 100 ppm, com 3 e 20 horas.

A Figura 3A mostra secções completas do mesêntero de larvas expostas durante nove horas ao e.b.e. de 50 ppm, evidenciando a presença de grandes dobras na cutícula e basofilia na região mediana mais intensa do que na anterior e na posterior. Nas Figuras 3B, C, D e E observam-se: estratificação do epitélio, pouca vacuolização celular na região anterior, alta basofilia, estratificação do epitélio com intensa atividade secretora e formação de grandes vesículas na superfície apical celular na região mediana. Verifica-se também um encolhimento do tubo digestivo através da luz intestinal que se projeta em dobra (Figura 3D). A transição de epitélio cilíndrico para pavimentoso ocorre da região mediana para a posterior do mesêntero. Essa transição é acompanhada de um estreitamento do tubo digestivo na região posterior do mesêntero com aparência recurvada (Figura 3E).

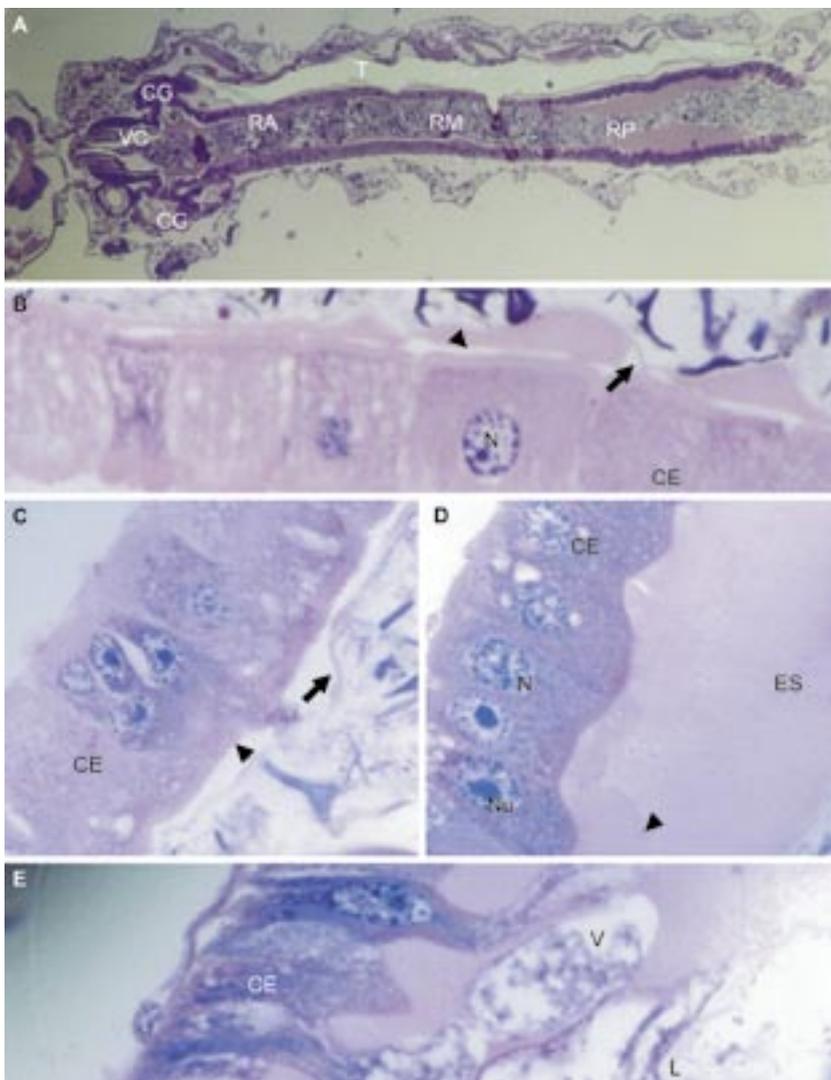


Figura 2. Fotomicrografias de seções em historesina, coradas em Hematoxilina-Eosina (HE), de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* do grupo controle. A. Vista geral. 50X. B. Região anterior (RA). 400X. C. Região mediana (RM). 1000X. D. Região posterior (RP). 1000X. E. Região posterior evidenciando grande atividade secretora. 1000X. CG = cecos gástricos, VC = válvula cárdia, T = traquéia, CE = célula epitelial, N = núcleo, seta = matriz peritrófica, cabeça de seta = bordo em escova, Nu = nucléolo, ES = espaço subperitrófico, V = vesícula secretora.

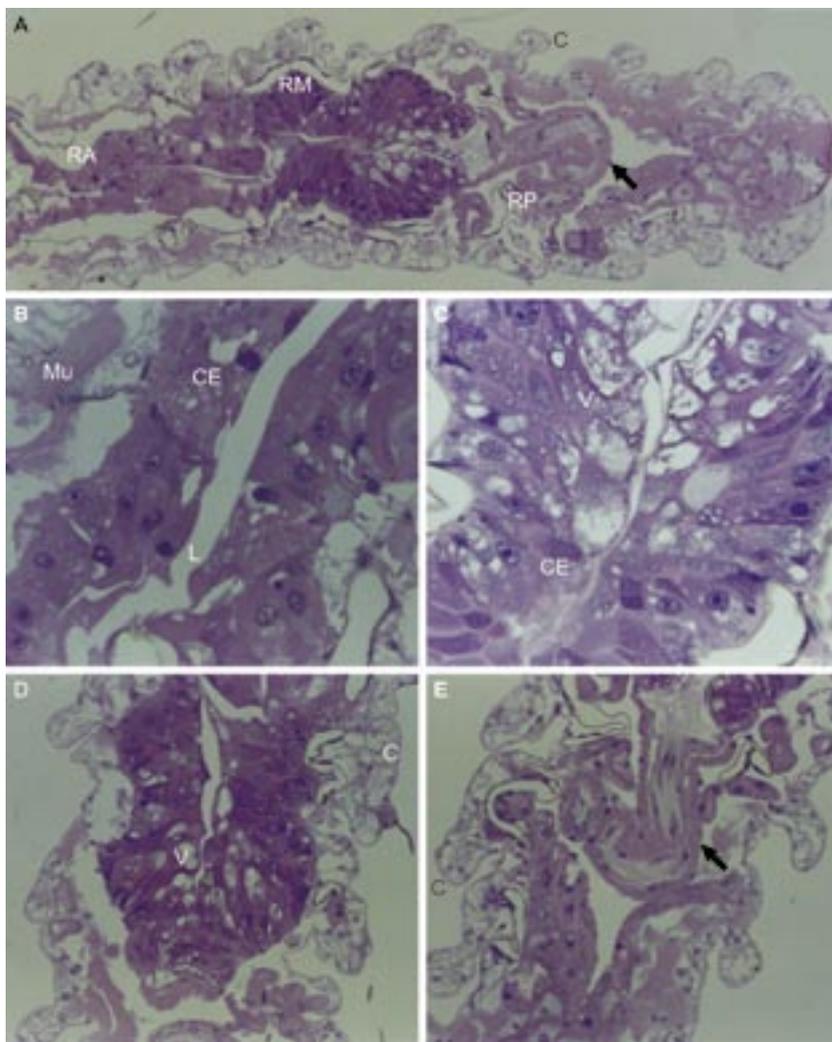


Figura 3. Fotomicrografias de seções em historesina, coradas em HE, de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mantidas por 9 h em solução do e.b.e. de *Sapindus saponaria* a 50 ppm. A: Vista geral.100X. B. Região anterior (RA) com aparente estratificação do epitélio. 100X. C e D. Região mediana (RM) em intensa atividade secretora e luz intestinal (L) que se projeta em dobra em consequência do encolhimento do tubo digestivo. 400X. E. Detalhe do estreitamento na região posterior do mesêntero com aparência recurvada (seta). 400X. RP = região posterior, C = cutícula, CE = célula epitelial, Mu = músculo, V = vesícula secretora.

Na Figura 4A, observa-se a região anterior do mesêntero de larvas submetidas a 3 horas de tratamento em concentração de 75 ppm. Verifica-se a formação de constrição nessa região, onde as células se mostram cilíndricas e com formações vesiculares apicais (Figura 4B). Além disso, essa figura mostra a transição entre a região anterior e a mediana. As células da região mediana (Figura 4C) são pavimentosas, com citoplasma íntegro e núcleo de aspecto normal, evidenciando seu estado de conservação. A região posterior apresenta células epiteliais com aspecto similar ao controle.

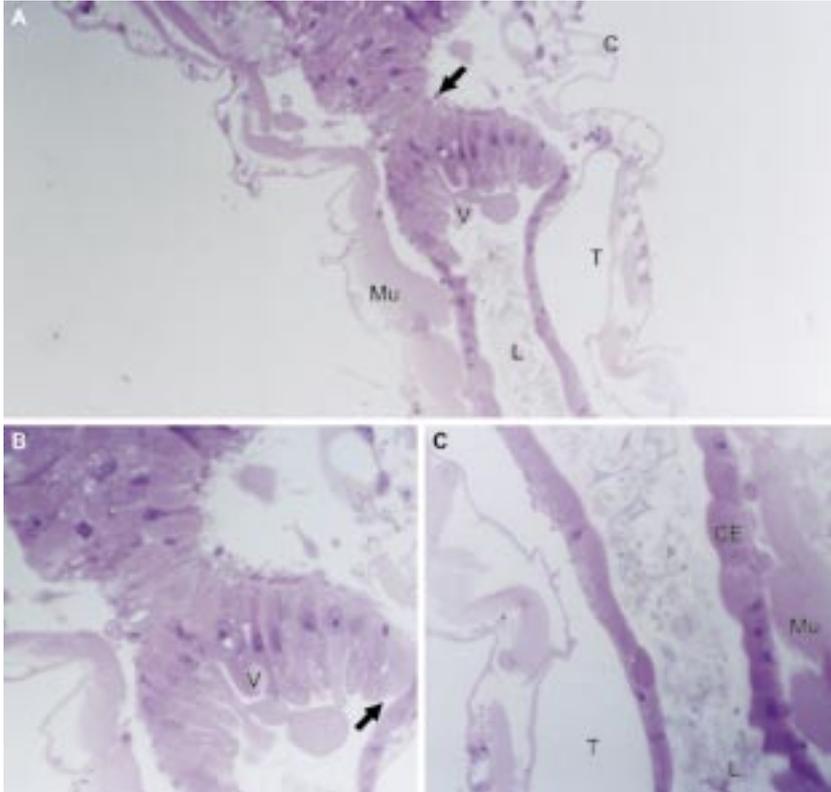


Figura 4. Fotomicrografias de secções em historesina, coradas em HE, de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mantidas por 3 h em solução do e.b.e. de *Sapindus saponaria* a 75 ppm. A. Região anterior do mesêntero mostrando constrição (seta). 200X. B. Detalhe da constrição evidenciando células epiteliais com vesículas apicais (V). 400X. Notar a transição entre epitélio colunar para plano (seta). 200X. C. Região mediana formada por epitélio pavimentoso. 400X. C = cutícula, T = traquéia, L = luz intestinal, Mu = músculo, CE = células epiteliais.

A Figura 5A mostra secções completas do mesêntero da larva submetida ao e.b.e. de 100 ppm, por 3 horas. Nota-se, claramente, a divisão das regiões do mesêntero separadas por constrições. As células da região anterior (Figura 5B) mostram-se mais basófilas que as demais, com o citoplasma vacuolizado, núcleo basal e nucléolos evidentes e liberação de conteúdo citoplasmático através das vesículas apicais. A constrição que a separa da segunda região parece fechar a luz intestinal. A segunda e a terceira região (Figuras 5A e 5C) são formadas por um epitélio pavimentoso no qual as células epiteliais apresentam-se muito baixas, sem formação de vesículas e sem bordo em escova aparente. Entre as duas últimas regiões, há a formação de uma outra constrição (Figura 5C), com aspecto mais alongado que a primeira, porém ambas apresentam as mesmas características morfológicas.

A Figura 6A mostra um aspecto geral do intestino de larvas submetidas ao e.b.e. em concentração de 75 ppm, por 12 horas, evidenciando o aspecto encolhido e as intensas dobras da cutícula. A região anterior do mesêntero (Figura 6B) mostra-se sinuosa acompanhando essas dobras.

Na Figura 7A vê-se todo o mesêntero da larva submetida ao e.b.e. de 100 ppm, por 20 horas de tratamento. A região anterior (Figura 7B) apresenta-se com células epiteliais altamente vacuolizadas e com vesiculação apical (Figura 7C). Esta figura mostra também a vacuolização do citoplasma, núcleos mais claros, porém com aspecto de alta atividade. Outra alteração que merece destaque é a transição de um epitélio cilíndrico simples (região anterior) para um epitélio pavimentoso (região mediana e posterior do mesêntero), similar ao que se observa nos indivíduos com três horas de exposição (Figuras 5A). Na transição entre as duas últimas regiões, verifica-se a formação de uma dobra no mesêntero com obstrução intestinal (Figura 7E).

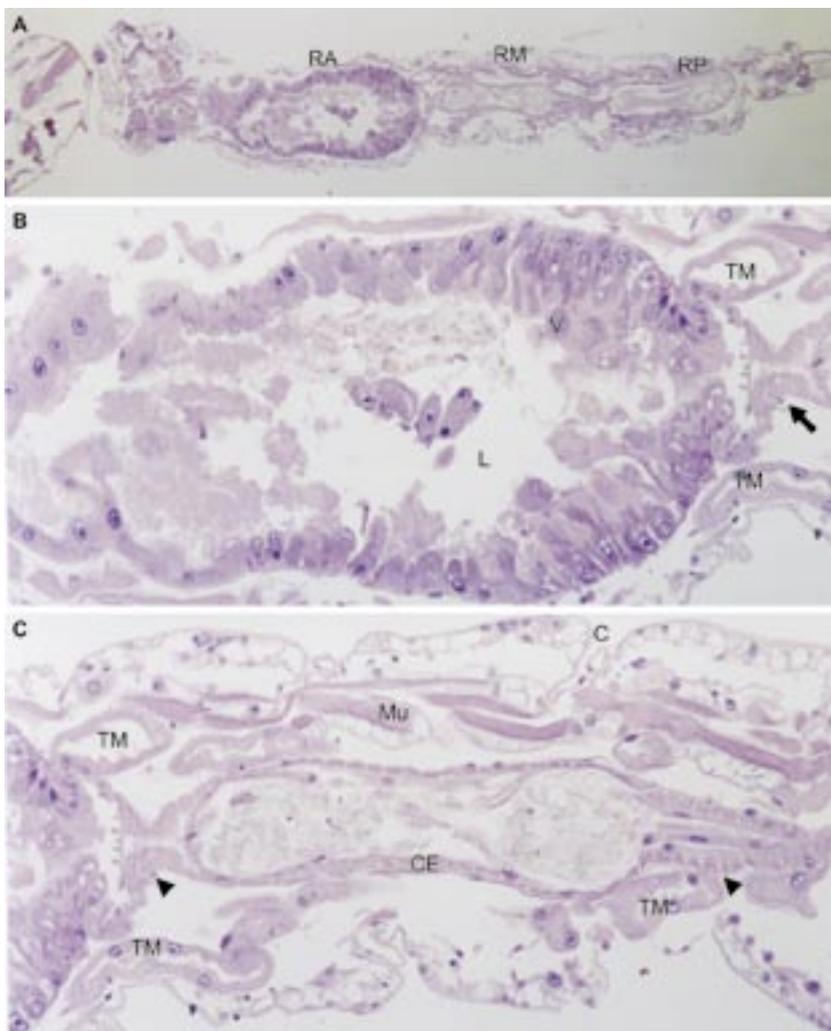


Figura 5. Fotomicrografias de secções em historesina, coradas em HE, de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mantidas por 3 h em solução do e.b.e. de *Sapindus saponaria* a 100 ppm. A: Vista geral evidenciando a divisão do mesêntero através de constrições. 50X. B: Região anterior com células epiteliais vesiculadas (V) e constrição formada logo após essa região (seta). 200X. C: Região mediana formada por epitélio pavimentoso e detalhe das duas constrições (cabeça de seta). 200X. RA = região anterior do mesêntero, RM = região mediana, RP = região posterior, TM = túbulos de Malpighi, Mu = músculo, C = cutícula, CE = células epiteliais, L = lúmen intestinal.

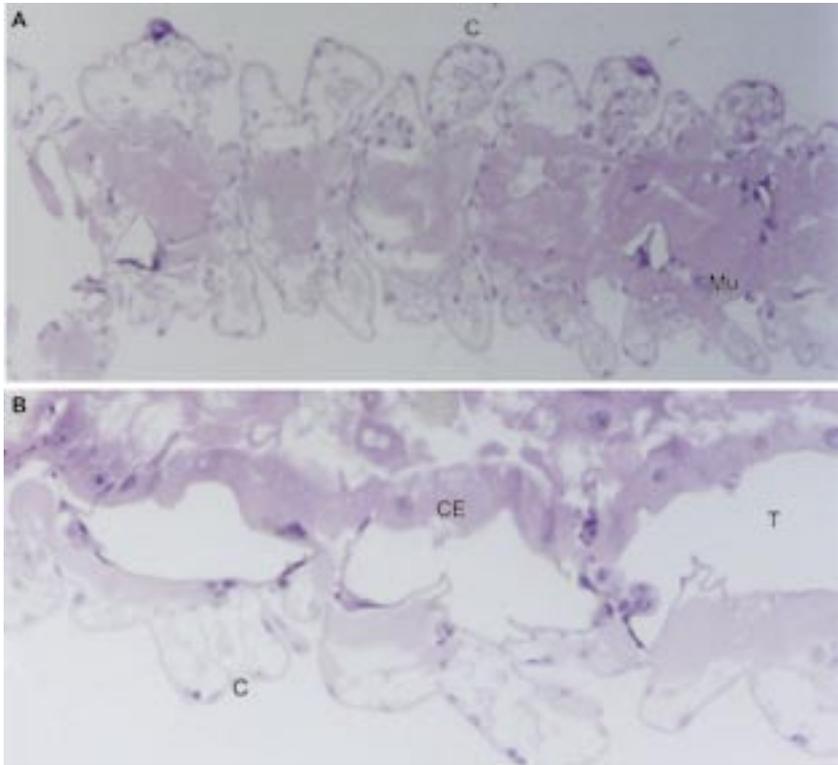


Figura 6. Fotomicrografias de secções em historesina, coradas em HE, do mesêntero de larvas de 3ºestádio de *Aedes aegypti* mantidas por 12 h em solução do e.b.e. de *Sapindus saponaria* a 75 ppm. A: Vista geral da larva evidenciando o aspecto encolhido da larva observado através das intensas dobras formadas na cutícula (C). 100X. B. Região anterior. Notar as curvas formadas na parede celular que acompanham as dobras da cutícula. 200X. Mu = músculo, CE = células epiteliais, T = traquéia, C = cutícula.

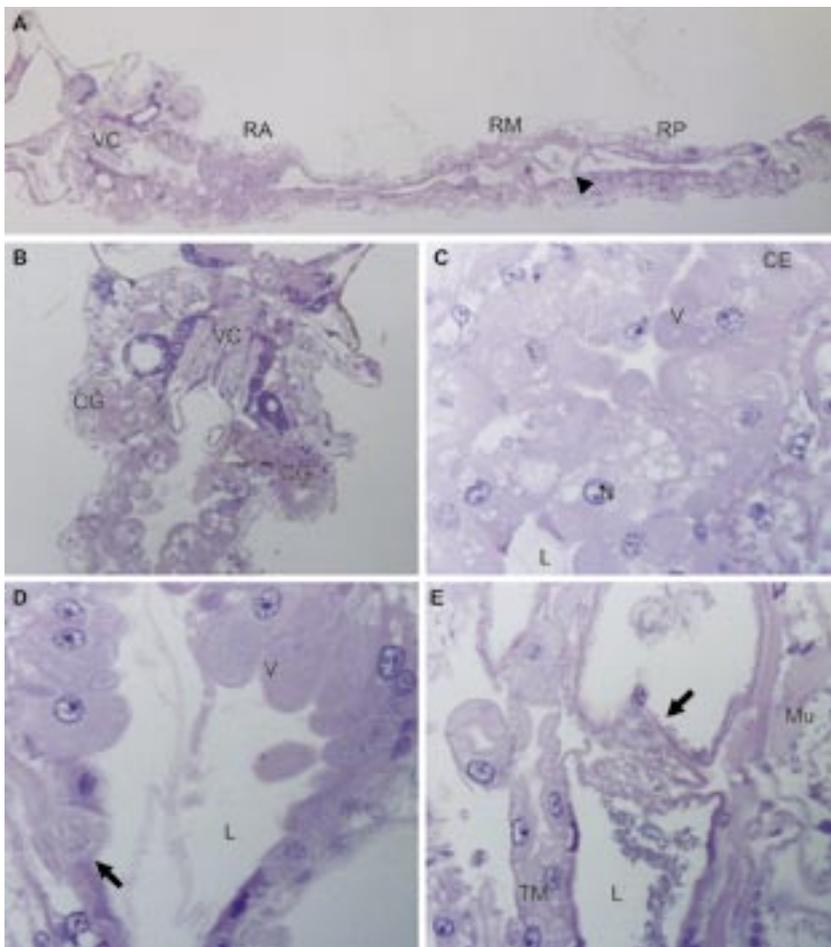


Figura 7. Fotomicrografias de seções em historesina, coradas em HE, de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* mantidas por 20 h em solução do e.b.e. de *Sapindus saponaria* a 100 ppm. A. Vista geral mostrando a transição entre a região anterior (RA), mediana (RM) e posterior (RP) do mesentéro. Notar a presença de constrição na região posterior (seta). 50X. B. Região anterior. 100X. C. Detalhe da vacuolização citoplasmática e da formação de vesículas (V) nas células da região anterior. 400X. D. Transição entre epitélio cilíndrico e pavimentoso (seta). 400X. E. Detalhe da obstrução na luz intestinal na região posterior causada pela ocorrência de dobra no mesentéro. 400X. VC = válvula cárdia, CG = cecos gástricos, CE = célula epitelial, N = núcleo, L = luz intestinal, V = vesículas secretoras, Mu = músculo, TM = túbulos de Malpighi.

DISCUSSÃO

Neste estudo, constatou-se a perda da atividade larvicida do extrato conforme se prolongava seu tempo de armazenamento, indicando uma degradação da parte ativa do e.b.e.

A primeira alteração causada pelo e.b.e. da planta *S. saponaria* nas larvas de *A. aegypti* está relacionada com sua movimentação. As larvas do grupo controle apresentaram grande mobilidade e sua locomoção em meio líquido realizou-se através das contrações do corpo e da movimentação das escovas, reagindo rapidamente a qualquer toque, o que está de acordo com Forattini & Brito (2003). Porém, nas larvas submetidas ao e.b.e. na concentração de 50 ppm, a perda da mobilidade teve início com duas horas de tratamento e o estado letárgico foi estabelecido após seis horas de exposição. Mas as larvas submetidas às concentrações de 75 ppm e 100 ppm começaram a apresentar diminuição de seus movimentos com 30 minutos de exposição e ficaram totalmente letárgicas com três horas.

A redução da mobilidade das larvas de *A. aegypti*, resultado obtido neste trabalho, está de acordo com os de Arruda et al. (2003b) em relação à *Magonia pubescens*. O mesmo fato também ocorreu com larvas de *Culex nigripalpus* infectadas por um baculovirus, que se tornaram letárgicas após 72 horas (Moser et al., 2001); com *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* após meia hora de exposição ao *Bacillus thuringiensis* e com larvas de *Anopheles albimanus*, após duas horas. Esses trabalhos evidenciam que a redução da mobilidade larval é o primeiro sinal da atividade larvicida (Ruiz et al., 2004).

As larvas tratadas neste estudo apresentaram-se menores e mais escuras que as larvas utilizadas como controle. O aspecto encolhido pode ser notado através das grandes dobras da cutícula. Resultados semelhantes foram descritos por Salvador (2002), que evidenciou em larvas de *A. aegypti*, expostas ao temephos, uma redução de cerca de 50% no comprimento e o escurecimento causado pela sobreposição das cutículas dos segmentos abdominais. Borges et al. (2004), utilizando o inibidor de crescimento diflubezuron em larvas desse mosquito, encontraram um tamanho menor e aspecto alterado em razão do acúmulo de mudas incompletas.

Nas análises histopatológicas aqui realizadas, larvas do grupo controle apresentaram três regiões distintas no mesêntero, denominadas anterior, mediana e posterior. Essas observações são compatíveis com as descritas por Snodgrass (1935), Arruda et al. (2003a, b) e Borges et al. (2004).

Nas preparações em resina coradas por HE, todo o mesêntero apresentou-se revestido por um epitélio cilíndrico simples. As células da região anterior mostraram-se com citoplasma esponjoso e com superfície apical coberta por um fino bordo em escova, indicando se tratar de células absorptivas. Observou-se a presença de células coradas mais fracamente que as outras dessa região. Observações semelhantes foram feitas por Shahabuddin & Pimenta (1998) com adultos de *A. aegypti*. A presença de células claras no mesêntero de larvas desse mesmo mosquito

foi também observada por Arruda et al. (2003a), que, embora tenham realizado estudos histoquímicos, não confirmaram uma função endócrina dessas células, já que somente estudos específicos poderão esclarecer sua funcionalidade.

A região mediana apresentou características de transição entre a região anterior e a posterior do mesêntero, o que está de acordo com Snodgrass (1935). A região posterior evidenciou maior basofilia celular e um espesso bordo em escova. Algumas células dessa região apresentaram uma intensa atividade secretora com formação de vesículas apicais e liberação de parte do citoplasma para a luz intestinal. De acordo com Snodgrass (1935), as células digestivas do mesêntero dos insetos em geral participam ativamente nos processos de secreção e absorção e o processo de degeneração dessas células ocorre através do acúmulo de material granular na porção apical da célula e da liberação desse material na luz intestinal do inseto. Na região apical das células de todo o mesêntero de larvas de *A. aegypti*, foi observado um fino bordo em escova, provavelmente com função de absorção de nutrientes, como já foi demonstrado por Levy et al. (2004) em larvas de Lepidoptera.

Observou-se uma matriz peritrófica envolvendo todo o conteúdo alimentar no tubo digestivo das larvas controle. Snodgrass (1935) afirma que em Diptera ela é secretada por células especializadas da porção final da região anterior do mesêntero. Contudo, Beerntsen et al. (2000) mencionam que a matriz peritrófica dos mosquitos vetores funciona como um filtro semipermeável para as enzimas digestivas e que a mesma possui função de proteção contra os alimentos ingeridos e contra patógenos.

Os efeitos tóxicos do e.b.e. da casca de *S. saponaria* foram observados em todo o mesêntero de larvas de *A. aegypti*, que se mostrou afetado, entretanto as alterações nas regiões anterior e mediana foram mais evidentes. Nos estudos realizados por Arruda et al. (2003a), as alterações causadas pelo extrato de *M. pubescens* no mesêntero de larvas do mesmo mosquito atingiram principalmente a região anterior, tornando-se progressivas para as outras regiões. Estudos histopatológicos de larvas de Diptera submetidas ao biolarvicida *B. thuringiensis medellin* (Cry11Bb) mostraram que o mesêntero posterior e os cecos gástricos são os principais sítios de localização dessa toxina (Ruiz et al., 2004). Larvas de *Culex nigripalpus* infectadas com um baculovirus também apresentaram os cecos gástricos e a região posterior do mesêntero com maiores alterações citopatológicas (Moser et al., 2001).

As alterações deletérias causadas nas células do mesêntero incluíram várias mudanças histopatológicas: alta vacuolização do citoplasma, desintegração do bordo em escova, hipersecreção pelas células epiteliais, lise celular, pavimentação do epitélio e aumento do número de camadas epiteliais de forma irregular. O aumento dessas camadas pode ter ocorrido em virtude da proliferação de células regenerativas, dando, assim, origem a novas células que também manifestaram aspecto morfológico alterado.

Várias dessas alterações também foram observadas por Shahabuddin & Pimenta (1998) quando estudaram células do mesêntero de adultos de *A. aegypti*

infectado por *P. gallinaceum*. Estas não apresentaram as densas microvilosidades comumente encontradas nas células colunares, o retículo endoplasmático mostrou-se escasso e sem grânulos de secreção elétron-densos. Foi observado um grande número de vacúolos claros localizados principalmente na porção apical celular. Moser et al. (2001), em análises histológicas de larvas de *C. nigripalpus* infectados por um baculovirus, relataram como sinais de infecção: presença de células arredondadas, citoplasma granular e denso, hipertrofia do núcleo e alta vacuolização citoplasmática das células epiteliais do mesêntero dessas larvas. Essas alterações são similares aos resultados encontrados no presente estudo.

Em estudos ultra-estruturais realizados em larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato de *Derris urucu*, Gusmão et al. (2002) observaram que a mortalidade larval estava relacionada com o rompimento da estrutura da matriz peritrófica e com a desintegração das células do mesêntero. Estas apresentaram alterações de coloração, com células menos coradas e algumas separadas da lâmina basal. Os autores também relataram a presença de células colunares do mesêntero expulsando o conteúdo citoplasmático no lúmen intestinal. De fato, neste trabalho, alterações celulares também foram notadas nas larvas submetidas à *S. saponaria*.

Arruda et al. (2003a), estudando larvas de *A. aegypti* submetidas ao extrato da planta *M. pubescens*, descreveram várias alterações deletérias provocadas nas células do mesêntero, como alta vacuolização do citoplasma, aparente aumento do número de camadas do epitélio, hipertrofia das células, desintegração do bordo em escova e hipersecreção pelas células epiteliais, o que também foi observado, em diferentes graus, pela ação do extrato da planta *S. saponaria*. Por outro lado, Arruda et al. (2003b), em suas observações, ainda evidenciaram a extrusão da matriz peritrófica, junto com o conteúdo alimentar do tubo digestivo, indicando um processo de defesa da larva ao tentar eliminar do seu interior agentes tóxicos do extrato, fato que não foi notado neste estudo.

Ruiz et al. (2004), em estudos realizados em larvas de *A. aegypti*, *A. albimanus* e *C. quinquefasciatus* expostas à toxina Cry11Bd de *B. thuringiensis medellin*, descreveram sérias mudanças histopatológicas, como vacuolização do citoplasma, hipertrofia das células epiteliais e de seus núcleos, deterioração do bordo em escova e desintegração celular e formação de vesículas apicais que liberavam seu material no lúmen intestinal. Neste trabalho, o e.b.e. de *S. saponaria* provocou alterações similares.

Outro aspecto observado nas preparações em resina foi a mudança de um epitélio colunar, formado por células cilíndricas com diferentes graus de degeneração celular, para um epitélio pavimentoso desprovido de bordo em escova. Nenhum relato bibliográfico semelhante foi encontrado. A hipótese mais provável é a de que o epitélio original tenha sido lesado pela ação larvívica do extrato e rapidamente outro epitélio foi repostado na tentativa imediata de proteger o tecido conjuntivo, porém as células epiteliais recém-formadas adquiriram apenas a função de proteção e não a de absorção. Talvez por esta razão apresentaram o aspecto

achatado e a ausência das microvilosidades como consequência de uma rápida reação ao e.b.e. e à sua ação destrutiva.

Em algumas larvas tratadas, observou-se o estreitamento do tubo digestivo com formação de constrições que ora separavam as regiões do mesêntero, dando um aspecto segmentado ao mesmo, ora restringiam-se a apenas uma região. Nenhuma referência foi encontrada com relação a constrições formadas; é provável, porém, que se trate de uma reação defensiva da larva na tentativa de impedir um contato maior com o larvicida, ou mesmo da realização de movimentos peristálticos realizados pela larva para a extrusão do agente agressor de seu tubo digestivo, ação similar ao mecanismo relatado por Arruda et al. (2003b).

O isolamento do tubo digestivo em porções separadas por constrições pode indicar um processo de defesa da larva a fim de impedir a passagem dos agentes tóxicos contidos no extrato para as outras porções do mesêntero, assim a destruição celular se limitaria ao início do trato digestivo, diminuindo a letalidade das lesões. Outra hipótese que justificaria a formação das constrições seria o isolamento do extrato larvicida em porções do tubo digestivo. O extrato, então, atingiria um segmento por vez, dando tempo para a recuperação de parte do epitélio antes que outra porção fosse destruída, assim apenas parte do intestino ficaria lesada ao invés de todo o tubo, o que poderia ser fatal para a larva. De qualquer forma, as constrições ao longo do mesêntero larval parecem ser uma tentativa de isolar o conteúdo alimentar nocivo ao inseto, para posterior eliminação, de modo que o menor número de danos celulares sejam provocados neste tubo.

Nas larvas submetidas ao extrato nas concentrações de 100ppm e 75 ppm, a pavimentação do epitélio aparece atingindo o mesêntero médio e posterior, enquanto na concentração de 50ppm essa alteração mantém-se restrita à região posterior do mesêntero, indicando que essa seria a primeira região a ser atingida pela ação do larvicida. Nesta concentração não notamos a formação de constrições no mesêntero das larvas, fato que provavelmente só ocorre em concentrações maiores.

Na literatura, há relatos de modificações ocorridas na estrutura da matriz peritrófica de larvas de *A. aegypti* expostas ao extrato de *D. urucu* (Gusmão et al., 2002), causando rompimento da mesma. Nos trabalhos de Arruda et al. (2003a) foi relatado o espessamento da matriz peritrófica como uma forma de impedir o contato do extrato de *M. pubescens* com as células do mesêntero de larvas de *A. aegypti*, ficando, assim, demonstrada a função de defesa. No presente estudo, porém, não foram verificadas diferenças significantes entre a matriz peritrófica das larvas tratadas e a das larvas utilizadas como controle.

A toxicidade do e.b.e. de *S. saponaria* sobre as larvas de *A. aegypti* foi demonstrada pelo estudo morfohistológico, sendo evidenciada pelos vários danos às células do mesêntero, sinalizando que esse extrato botânico pode representar um larvicida alternativo ao controle do *A. aegypti*.

ABSTRACT

Study of the morphohistological modifications in larvae of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submitted to the pure ethanolic extract of *Sapindus saponaria* lin. (Sapindaceae).

Dengue is reported as the most important virus disease in the world. This disease is controlled by combating the vector *Aedes aegypti* using chemical insecticides. Although chemical insecticides have efficient action against the mosquito *A. aegypti*, they are toxic to humans and the environment and therefore they are not recommended for controlling the mosquito spread. Products of botanic origin may be an alternative to the insecticides to combat the mosquito because they have low toxicity levels for human life and cause less environmental impact. The present study describes the morphological changes and larvicidal activity of the ethanol extract, obtained from the peel of the fruit of *Sapindus saponaria*, against 3rd larval instars of the *A. aegypti*. The larvae were incubated in water solutions of the extract at different concentrations up to 48 hours. The larvae in lethargic stages were collected and fixed in paraformaldehyde and included in resin. The laminas were then stained using hematoxiline eosine method and analyzed through light microscope. The toxic effects of the ethanol extract of *S. saponaria* against larvae of *A. aegypti* were observed in all three mesentery regions with several histopathological changes, such as complete or partial cells destruction, high cytoplasm vacuolization, hyper secretion of epithelial cells, and epithelia pavementation. The cellular changes demonstrate the action mechanism of the ethanol extract of *S. saponaria* against *A. aegypti*.

KEYWORDS: *Aedes aegypti*. *Sapindus saponaria*. Larvicidal. Control.

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. 2003.101 p. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.
2. Aguilera L, Navarro A, Tacoronte JE, Leyva M, Marquetti MC. Efecto letal de myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Trop* 55: 100-104, 2003.
3. Albiero ALM, Sertié JAA, Bacchi EM. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. *J Ethnopharmacol* 82: 41-44, 2002.
4. Andrade CFS, Modolo M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev Saúde Publ* 25: 184-187, 1991.
5. 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, 2003a.
6. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. *Entomol Vect* 10: 47-60, 2003b.

7. Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 115-137, 2000.
8. 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 Patol Trop* 33: 91-104, 2004.
9. Campos J, Andrade CFS. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Pública* 35: 232-236, 2001.
10. Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. *Rev Saúde Pública* 38: 623-629, 2004.
11. Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero, Umaña E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev biol trop* 47: 605-616, 1999.
12. Cavalcanti ESB, Morais 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.
13. Derouich M, Boutayeb A, Twizell EH. A model of dengue fever. Biomedical engineering on line 2: 2003. Disponível em: <www.biomedical-engineering-online.com> Acesso em: 02/02/2005
14. Forattini OP, Brito M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 6: 6-7, 2003.
15. FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. *Boletim Epidemiológico* 23, 2002.
16. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 480-496, 1998.
17. Gusmão DS, Páscoa V, Mathias L, Vieira IJC, Braz-Filho R, Lemos FJA. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 371-375, 2002.
18. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 621-627, 1996.
19. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3: 376-396, 1990.
20. Levy SM, Falleiros AMF, Gregório EA. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz J Biol* 64: 633-638, 2004.
21. Lorenzi H. *Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Piracicaba: Plantarum, 2004.
22. Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev Saúde Pública* 38: 842-843, 2004.
23. Marzochi KBF. Dengue in Brazil- situation, transmission and control – A proposal for ecological control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 235-245, 1994.
24. Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Nat Acad Sci* 91: 2395-2400, 1994.
25. Moser BA, Becnel JJ, White SE, Afonso C, Kutish G. Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *J Gener Virol* 82: 283-297, 2001.
26. OPAS - Organização Panamericana de Saúde. *Re-aparecimento da Dengue nas Américas*. *Boletim Epidemiológico* 18: 1997.
27. Pearse AGE. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. London: J & A Churchill, 1972.
28. Pizarro APB, Filho AMO, Parente JP, Melo MTV, Santos CE, Lima PA. O aproveitamento do resíduo do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Rev. Soc Bras Med Trop* 32: 23-29, 1999.
29. Polanczyk RA, Garcia MO, Alves SB. Potencial de *Bacillus thuringiensis Berliner* no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública* 37: 813-816, 2003.
30. Praça LB, Batista AC, Martins ES, Siqueira CB, Dias DGS, Gomes ACMM, Falcão R, Monnerat RG. Estirpes de *Bacillus thurnigiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq Agropec Bras* 39: 11-16, 2004.
31. Rothman AL. Dengue: defnig protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113: 946-951, 2004.

32. Ruiz ML, Segura C, Trujillo J, Orduz S. In vivo binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73-79, 2004.
33. Salvador ZL. *Avaliação morfohistológica de larvas de Aedes aegypti submetidas ao Temephos*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.
34. Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 179-181, 2000.
35. Serufo JC, Souza AM, Tavares VA, Jammal MC, Silva JG. Dengue in the south-eastern region of Brazil: Historical analysis and epidemiology. *Rev Saúde Pública* 27: 157-167, 1993.
36. Shahabuddin M, Pimenta PFP. *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proc Natl Acad Sci* 95: 3385-3389, 1998.
37. 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.
38. Silva HHG, Silva IG, Oliveira CLNS, Elias CN. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomol Vect* 6: 383-391, 1999.
39. Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindácea) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 396-399, 2004.
40. Silva IG, Silva HHG, Guimarães VP, Elias CN, Lima CG. Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. *Entomol Vect* 9: 15-24, 2002.
41. Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E. Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), em criadouros artificiais. *Rev Patol Trop* 32: 73-86, 2003.
42. 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. *Quim. Nova* 27: 46-49, 2004.
43. Snodgrass RE. *Principles of Insects Morphology*. New York and London, 1935.
44. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Pública* 17: 99-102, 2001.
45. Uribe LJ. El problema del control de *Aedes aegypti* en América. *Bol Of Sanit Panam* 94: 473-481, 1983.
46. Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney JE, Markoff L, Murphy BR. A life, Attenuated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate with a 30-Nucleotide Deletion in the 3' Untranslated Region Is Highly Attenuated and Immunogenic in Monkeys. *J Virol* 77: 1.653-1.657, 2003.

I CONGRESO PANAMERICANO DE ZONOSIS V CONGRESO ARGENTINO DE ZONOSIS II CONGRESO BONAERENSE DE ZONOSIS

10, 11 y 12 de mayo de 2006.
Ciudad de la Plata Buenos Aires Republica Argentina

TEMARIO GENERAL

- Protección de la Salud: Una barrera para las zoonosis.
- Zoonosis bacterianas, virales, parasitarias y micóticas.
- Enfermedades transmitidas por alimentos.
- Infectología humana y animal.
- Enfermedades emergentes.
- Trazabilidad alimentaria.
- Bioseguridad.
- Salud pública y zoonosis.
- Antimicrobianos y antiparasitarios.
- Genética y zoonosis.
- Enfermedades exóticas.
- Laboratorio en la zoonosis.
- Atención Primaria y Control de las Zoonosis rurales
- Animales ponzoñosos y zoonosis.
- Agua y recursos hídricos.
- Biotecnología.
- Normas y control de calidad en la zoonosis.
- Estrategia de educación para la salud y el medio ambiente.
- Zoonosis y animales exóticos.
- El desarrollo local y la evolución de las zoonosis
- El consorcio Intersectorial: Conocimiento y gestión de zoonosis.
- Reunión Internacional de Expertos Organización Panamericana de la Salud/
Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).

ORGANISMOS INTERNACIONALES QUE INTERVENDRAN

- 1 Dr. Schudel, Alejandro (OIE)
- 2 Dr. Belotto, Albino (OPS/OMS)
- 3 Dr. Meslin Françoise-M (Suiza/OMS)
- 4 Dr. Torroba Jorge (RILAA/OPS – Argentina)
- 5 Dr. Vargas Terán Moises (FAO)

LOS TRABAJOS PRESENTADOS CONCURSARÁN POR LOS PREMIOS:

Premio Panamericano de Zoonosis
Premio de la Asociación Argentina de Zoonosis
Premio Fundación Manzullo
Premio Chagas-Mazza
Premio Control e Inocuidad de los Alimentos
Premio Ambiente Saludable

Los trabajos presentados seran publicados en la Revista Acta Bioquimica clinica Latinoamericana.
Fecha limite de recepción de resúmenes 15 de marzo de 2006