
ATIVIDADE LARVICIDA DO ÁCIDO 3-B-ACETOXYLABDAN-8(17)-13-DIEN-15-ÓICO ISOLADO DA PLANTA MEDICINAL *Copaifera reticulata* (LEGUMINOSAE) SOBRE *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE) EVIDENCIADA PELAS ALTERAÇÕES MORFOHISTOLÓGICAS

*Cleyde Ferreira Barreto Valotto*¹, *Gláucia Cavasin*², *Heloisa Helena Garcia da Silva*¹, *Regina Geris*³ e *Ionizete Garcia da Silva*¹

RESUMO

O principal mecanismo de controle do dengue tem sido por meio da eliminação do *Aedes aegypti*, seu transmissor mais competente. Este mecanismo consiste, principalmente, na destruição dos criadouros potenciais, na educação sanitária e no uso de inseticidas sintéticos. Estes 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, apresentam-se os mecanismos da atividade larvicida do ácido 3-β-acetoxylabdan-8(17)-13-dien-15-oico, extraído da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), sobre larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. As larvas foram submetidas a uma solução do ácido a 9ppm, por até 24 horas. Aquelas que atingiram estado letárgico foram coletadas e fixadas em paraformaldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio 0.1M pH 7.2, incluídas em resina, e as lâminas, coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia de luz. O ácido causou a morte das larvas pela destruição celular do intestino médio, por meio de vacuolização citoplasmática, hipertrofia celular e nuclear, degeneração do bordo em escova, formação vesicular apical com liberação de conteúdo citoplasmático, estratificação do epitélio e dobras na matriz peritrófica.

DESCRITORES: Histologia; morfologia; dengue; febre amarela; produtos naturais.

-
- 1 Laboratório de Biologia, Fisiologia de Insetos/Bioatividade de Plantas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil.
 - 2 Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, UFG, Goiânia, GO, Brasil.
 - 3 Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

Endereço para correspondência: Ionizete Garcia da Silva, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Rua 235 esquina com 1ª. s/n. Setor Universitário. CEP 74605-050. Goiânia, Goiás, Brasil.

Endereço para correspondência: E-mail: profionizete@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 7/4/2014. Revisto em: 30/6/2014. Aceito em: 11/7/2014

ABSTRACT

Larvicidal activity of 3- β -acetoxylabdan-8(17)-13-dien-15-óic acid isolated from the medicinal plant *Copaifera reticulata* against *Aedes aegypti* shown by morphohistological changes.

The main mechanism of control of dengue has been through the fight against *Aedes aegypti*, the most competent vector. The fight primarily consists of elimination of its potential breeding sites, health education and use of synthetic insecticides. These insecticides are effective but are highly toxic to vertebrates and the environment. With the emergence of resistance of mosquitoes to them, insecticides of botanical origin are being explored. This study looks at the larvicidal activity of a solution of a solution of 3- β -acetoxylabdan-8(17)-13-dien-15-óico acid extracted from the medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) on the 3rd stage larvae of *Ae. aegypti*. Larvae were subjected to 9 ppm acid for up to 24 h. Those that reached lethargic state were collected and fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodilate buffer, pH 7.2, included in resin and the slides stained with the hematoxylin-eosin technique and examined by light microscopy. This acid caused the death of the *Ae. aegypti* larvae by cell destruction in the midgut, by the high cytoplasmic vacuolation, cell and nuclear hypertrophy, degeneration of the brush edge, apical vesicular formation with release of cytoplasmic contents of cells, stratification of the epithelium and folds in the peritrophic matrix.

KEY WORDS: *Aedes aegypti*; *copaifera reticulata*; natural products; control.

INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* tem causado grande preocupação à saúde pública dos países tropicais e subtropicais do mundo. Primeiro, por se tratar do mosquito transmissor do dengue e segundo, por ser o transmissor da febre amarela urbana (14, 22, 31).

O 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 para o homem ocorre por meio da picada da fêmea do *Ae. aegypti* infectada com o vírus. Esta doença apresenta um período de incubação de 5 a 6 dias. Clinicamente, manifesta-se de forma assintomática ou pelos sintomas de febre elevada, cefaleia intensa, dor retro-orbital, mialgia e exantema, podendo evoluir para um quadro grave com hemorragia, choque e óbito (20, 31). Até o momento, várias pesquisas estão em andamento para a produção de uma vacina que induza a imunidade contra os quatro sorotipos, mas nenhuma se encontra em fase de comercialização (2, 17, 32).

Aproximadamente, 40% da população mundial estão 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 (20, 31).

A febre amarela urbana é transmitida pelo *Ae. aegypti* e a silvestre, por espécies dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Esta doença é causada por um vírus do mesmo gênero do vírus do dengue que, acredita-se, tenha sido introduzido no Brasil vindo da África. A incubação é, em média, de 3 a 6 dias e a maioria dos casos é oligossintomática, com febre, calafrios, cefaleia intensa, mialgia generalizada,

anorexia, náuseas, vômitos, bradicardia, hemorragia gengival e/ou epistaxe. Cerca de 10% dos casos se expressam na forma grave e com elevada letalidade, associados à icterícia e à hematogênese (11, 19, 22, 30, 31).

O controle de insetos vetores enfrenta muitas dificuldades quando as espécies estão adaptadas ao meio urbano, associadas às condições socioambientais ou à ausência de serviços básicos de saúde. O controle do dengue, que ainda não tem vacina disponível (2, 17, 32), é feito com base na eliminação de larvas e de adultos de *Ae aegypti* (6, 9, 23, 28).

Diante do desenvolvimento da resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas (4, 6, 7, 13) e da grande diversidade de plantas existentes no Brasil, surge uma alternativa de produtos naturais como candidatos a inseticidas (1, 3, 10, 12, 14, 16, 18, 21, 25, 26, 29).

O ácido 3-acetoxi-labdano-8(17)13-dien-15-oico ($C_{22}H_{34}O_4$) foi isolado e purificado da planta medicinal *Copaifera reticulata*. Esta substância apresentou o maior potencial inseticida dentre aquelas já testadas no Laboratório Biologia e Fisiologia de insetos/Bioatividade de Plantas, da Universidade Federal de Goiás (15). Neste trabalho, a ação inseticida desta substância foi elucidada por meio das alterações morfológicas ocorridas no intestino das larvas de *Ae. aegypti* submetidas a diferentes concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

As larvas de *Ae. aegypti* foram obtidas da criação do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do IPTSP/UFG, Goiás, Brasil. A criação do mosquito se processou numa câmara biológica climatizada com temperatura de $28 \pm 1^\circ C$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas (25). Para cada experimento, foram utilizadas larvas de terceiro estágio imediatamente após a muda.

O isolamento e a purificação do diterpeno, ácido 3-acetoxi-labdano-8(17)13-dien-15-oico ($C_{22}H_{34}O_4$) do óleo-resina de *C. reticulata*, foram feitos de acordo com metodologia já estabelecida (14), e as concentrações letais foram determinadas para larvas de terceiro estágio de *Ae. 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 terceiro 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 morfo-histológicas.

Para as larvas controle, utilizou-se apenas água destilada. Todos os grupos foram alimentados com ração para gato, triturada até atingir fina granulometria. As larvas foram deixadas nas soluções por diferentes tempos, sendo coletadas em intervalos de 3 horas, até completar 24 horas e examinadas em estereomicroscópio Dimex MZS 250. As larvas mortas foram descartadas e as que se encontravam

em estado letárgico e as usadas como 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), em temperatura ambiente, por um período de, no mínimo, duas horas. Depois de fixadas inteiras, as larvas foram lavadas no mesmo tampão e submetidas à desidratação por meio de soluções com concentrações crescentes de etanol por dez minutos em cada solução. Após a desidratação, as larvas foram colocadas em resina de embebição *Leica Historesin Embedding Kit*, por 12 horas em temperatura ambiente, segundo as especificações do fabricante. Para isso, foram utilizados moldes de silicone.

Após a polimerização, os blocos foram seccionados com navalha de vidro, em micrótomo, com espessura de 3 mm e, em seguida, as seções foram coradas com hematoxilina e eosina.

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

RESULTADOS

Algumas mudanças no comportamento das larvas tratadas com o diterpeno ($C_{22}H_{34}O_4$) 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 três horas do início dos testes e ficaram imóveis após seis horas. 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 divide-se em três regiões distintas, assim denominadas: anterior, mediana e posterior (3). 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, encontrou-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 espesso bordo em escova, levemente acidófilo, representando a grande quantidade de microvilosidades existentes nesta região.

O epitélio intestinal das larvas de *Ae. aegypti* tratadas com o diterpeno apresentou várias alterações e as mais significativas ocorreram nos tempos de 3, 9, 15, 18 e 24 horas.

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

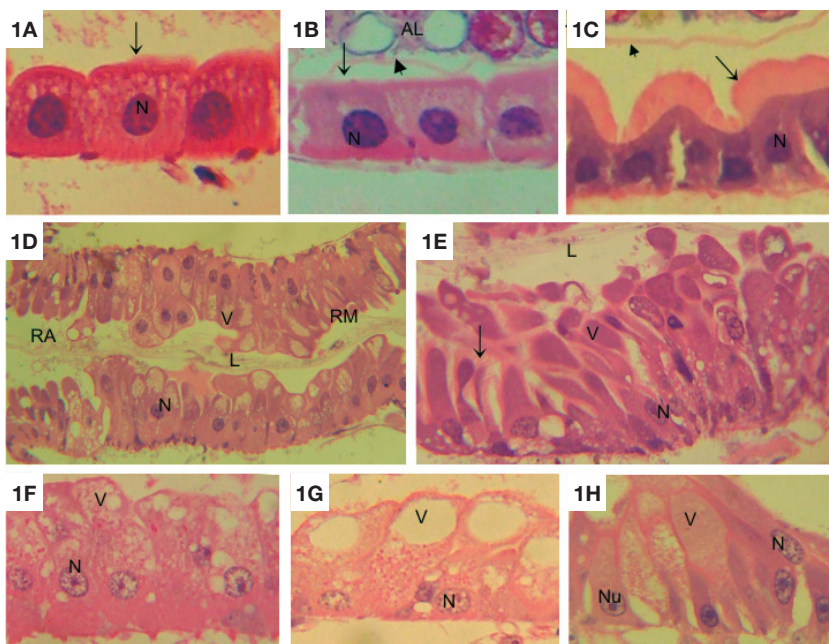
Na Figura 1E, o epitélio da região posterior destas mesmas larvas mostrou-se com início de estratificação, com núcleos em diferentes alturas perdendo a característica de um epitélio colunar simples. As células apresentaram formação vesicular, alta basofilia e células desta região ainda com bordo em escova, quando a maioria delas possui esta estrutura destruída.

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

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

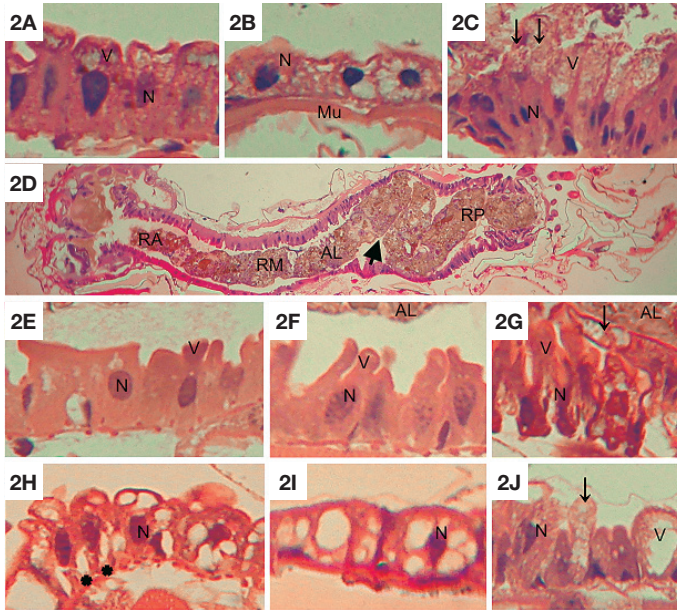
As Figuras 2D, 2E, 2F e 2G evidenciam as alterações ocorridas no mesêntero após 18 horas. Neste tempo, ocorreu a formação de uma grande dobra na matriz peritroífica (Figura 2D). As regiões anterior e mediana do mesêntero apresentaram vesículas apicais mais densas e evidentes (Figuras 2E e 2F) e núcleos picnóticos, o que demonstra menor atividade celular. A região posterior apresentou estratificação com células sem definição citoplasmática, citoplasma vacuolizado e núcleos irregulares (Figura 2F).

As características de destruição celular se prolongaram por 24 horas. 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).



Abreviações: RA=região anterior, RM= região mediana, N=núcleo, Nu=nucléolo, V=vesícula secretora, L=luz intestinal, AL = alimento.

Figuras 1 A, B e C. Fotomicrografias de seções em historesina, de larvas de terceiro 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 peritrófica (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 seções em historesina, de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*, tratadas por três horas, 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 seções em historesina, de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas por nove horas. 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, RP=região posterior, N=núcleo, V=vesícula secretora, L=luz intestinal, AL= alimento, Mu=músculo.

Figuras 2 A, B e C. Fotomicrografias de seções em historesina, do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* tratadas por 15 horas. 2A. Região anterior com formação de vesículas na região apical das células e núcleos disformes. 400X. 2B. Região mediana com alta vacuolização citoplasmática 400X. 2C. Região posterior com estratificação do epitélio, vesículas apicais em processo de lise celular por meio da liberação de conteúdo granular na luz intestinal. 400X. **Figuras 2D, E, F e G.** Fotomicrografias de seções em historesina, do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*, expostas por 18 horas, 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 vesículas apicais e núcleos disformes. 2G. Região posterior com células altamente destruídas (seta) e núcleos disformes. 400X. **Figura 2H, I e J.** Fotomicrografias de seções em historesina, do mesêntero de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*, expostas por 24 horas, 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.

DISCUSSÃO

As larvas de *Ae. aegypti* do grupo controle apresentaram morfologia com aspectos normais. 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 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 (Figuras 1C). Estas características do mesêntero das larvas de *Ae. aegypti* foram idênticas às descritas em outros trabalhos (1, 3, 29).

Também nas larvas do grupo controle se observou a presença de uma matriz peritrófica envolvendo todo o conteúdo alimentar no tubo digestório. 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 (8, 25, 27).

As alterações deletérias causadas pelo diterpeno ($C_{22}H_{34}O_4$) foram observadas em todas as três regiões do mesêntero das larvas de *Ae. aegypti* e ocorreram de forma progressiva conforme se aumentava o tempo de exposição das larvas. Os principais efeitos tóxicos foram: 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 este assunto (1, 3, 29).

Alterações similares encontradas neste trabalho para o mesmo estágio e espécie foram encontradas com óleo-resina da mesma planta estudada neste trabalho (1). Estudos realizados com *M. pubescens* mostraram as alterações, principalmente na região anterior do mesêntero (3). No entanto, estudos com a toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* evidenciaram as alterações mais importantes na região posterior do mesêntero (24).

Alterações semelhantes às encontradas neste trabalho foram observadas por vários autores (1, 3, 5, 24, 29) que 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.

Há também relato de 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 pelo acúmulo de material granular na porção apical da célula e a liberação desse material na luz intestinal do inseto (8, 27). Este processo foi claramente observado neste trabalho por meio das formações

vesiculares apicais evidenciadas em todo o mesêntero das larvas tratadas, algumas com expulsão total do conteúdo citoplasmático para o lúmen intestinal.

Outro aspecto das alterações celulares causadas pelo diterpeno ($C_{22}H_{34}O_4$) foram dobras ocorridas na matriz peritrófica que isolam o conteúdo alimentar presente no lúmen intestinal das larvas tratadas e, posteriormente, a extrusão desse material. Isso também ocorreu com larvas de *Ae. aegypti* expostas ao óleo-resina de *C. reticulata* e ao extrato de *Magonia pubescens* (1, 3). 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 ($C_{22}H_{34}O_4$), isolado da planta *C. reticulata*, evidenciam potencial tóxico deste composto na eliminação de larvas e sinalizam suas potencialidades como candidato ao controle de *Ae. aegypti*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Abed AA, Cavasin GM, Silva HHG, Geris R, Silva IG. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). *Rev Patol Trop* 36: 75-86, 2007.
2. Amaku M, Coudeville L, Massad E. Designing a vaccination strategy against dengue. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 54: 18-21, 2012.
3. Arruda W, Cavasin GM, Silva IG. Estudo ultra-estrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (St.Hil.), no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Patol Trop* 37: 255-267, 2008.
4. Beserra EB, Fernandes CRM, Queiroga MFC. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. *Neotrop Entomol* 36: 303-307, 2007.
5. Borges RA, Arruda W, Oliveira ESF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. *Rev Patol Trop* 41: 223-232, 2012.
6. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saude* 16: 279-293, 2007.
7. Carvalho GH, Silva HHG, Cunha LC, Silva IG. Atividade inseticida do extrato bruto etanólico de *Persea americana* (Lauraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Patol Trop* 40: 348-361, 2011.
8. Chapman RF. *The insects: structure and function*. Cambridge University Press. The alimentary canal. 1998. 749 p.
9. Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444, 2005.
10. Dias CN, Moraes DF. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res* 113: 565-592, 2014.
11. Figueiredo LTM. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 203-210, 2006.
12. Furtado RF, Lima MGA, Andrade Neto MJ, Bezerra NS, Silva MG. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 34: 843-847, 2005.

13. Gambarra WP, Martins WF, Lucena Filho ML, Albuquerque IM, Apolinário OK, Besera EB. Spatial distribution and esterase activity in populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temephos. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 178-184, 2013.
14. Geris R, Ribeiro PR, Brandão MS, Silva HHG, Silva IG. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector dengue e. In: Atta-ur-Rahman, FRS (Org). Studies in natural products chemistry, 37 ed. Amsterdã, Elsevier, 2012. 277-377 p.
15. Geris R, Silva IG, Silva HHG, Barison A, Rodrigues Filho E, Ferreira AG. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med trop S Paulo* 50: 25-28, 2008.
16. Guissoni ACP, Silva IG, Geris R, Cunha LC, Silva HHG. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. *Rev Bras Pl Med* 15: 363-373, 2013.
17. Lang J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent vaccine. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 54: S15-S17, 2012.
18. Lima GP, Souza TM, Paula Freire G, Farias DF, Cunha AP, Ricardo NM, Morais SM, Carvalho AF. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton species* against *Aedes aegypti* L. *Parasitol Res* 112: 1953-1958, 2013.
19. Mascheretti M, Tengan CH, Sato HK, Suzuki A, Souza RP, Maeda M, Brasil R, Pereira M, Tubaki RM, Wanderley DM, Fortaleza CM, Ribeiro AF. Yellow fever: reemerging in the state of Sao Paulo, Brazil, 2009. *Rev Saúde Pública* 47: 881-889, 2013.
20. Ministério da Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Secretaria de Vigilância em Saúde, 6a. ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2005. 816p.
21. Pohlit AM, Quignard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Santos EVM, Morais SKR, Saraiva RCG, Ming LC, Alecrim AM, Ferraz AB, Pedrosa ACS, Diniz EV, Finney EK, Gomes EO, Dias HB, Souza KS, Oliveira LCP, Don LC, Queiroz MMA, Henrique MC, Santos M, Lacerda Júnior OS, Souza PP, Silva SG, Graça YR. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amaz* 34:97-105, 2004.
22. Prata A. Yellow Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:183-187, 2000.
23. Ribeiro AF, Marques GRA, Voltolini JC, Condino MLF. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. *Rev Saúde Pública* 40: 671-676, 2006.
24. Ruiz LM, Segura C, Trujillo J, Orduz S. In vivo binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73-79, 2004.
25. 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). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 264-267, 2007.
26. Simas NK, Lima EC, Kuster RM, Lage CLS, Oliveira Filho A M. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 405-407, 2007.
27. Snodgrass RE. *Principles of insects morphology*. Cornell University Press. The alimentary canal. 1993. 647p.
28. Souza SS, Silva IG, Silva HHG. Associação entre a incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti*, no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 152-155, 2010.
29. Valotto CFB, Silva HHG, Cavasin G, geris G, Rodrigues Filho E, Silva IG. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae) e uma fração rica em tanino de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev Soc Bras Trop* 44: 194-200, 2011.
30. Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 275-293, 2003
31. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition, Geneva, 2009. 160p. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf/> (acessado em abril de 2014).
32. Yauch LE, Shresta S. Dengue virus vaccine development. *Adv Virus Res* 88: 315-372, 2014.