

## ESTUDO DO EFEITO DOS SEMISSINTÉTICOS ÉTER ETIL DILAPIOL E ÉTER N-BUTIL DILAPIOL EM CROMOSSOMOS DE *Aedes (Stegomyia) albopictus*, SKUSE, 1894, DE MANAUS, ESTADO DO AMAZONAS

Sabrina da Fonseca MEIRELES<sup>1</sup>; Pedro Rael Cândido DOMINGOS<sup>2</sup>; Míriam Silva RAFAEL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; <sup>2</sup>Bolsista Mestrado-GCBEv/INPA-FAPEAM; <sup>3</sup>Orientador CSAS/INPA

### 1. Introdução

*Aedes (Stegomyia) albopictus*, Skuse, 1894 é um mosquito com grande importância para a saúde pública, devido a sua competência vetorial para cerca de 26 arbovírus (Gratz 2004; Paupy *et al.* 2009). Dentre estes, os de maior importância no Brasil são os vírus da dengue, febre amarela e Chikungunya. A dengue acomete mais de 50 milhões de pessoas todos os anos em diversos países, com elevada morbidade (Organização Mundial de Saúde, 2010). Apesar de não haver relatos do envolvimento de *A. albopictus* em surtos de dengue no Brasil, essa espécie possui grande importância epidemiológica na transmissão dessa virose na Ásia e na África (Guzmán e Kourí 2001; Ross 2010), sendo um vetor em potencial (*Stegomyia) albopictus*, Skuse, 1894 em outros continentais.

O *A. albopictus* é originário da Ásia e começou sua dispersão pelo mundo, a partir de 1980 (Gomes 1999). O primeiro relato da sua ocorrência no Brasil foi em 1986, no Rio de Janeiro (Forattini 1986), sendo registrado na região amazônica pela primeira vez em 1996 (Fundação Nacional de Saúde - FUNASA). É encontrado em regiões peri-urbanas, relacionado geralmente às áreas com vegetação e, devido a sua competência vetorial e, ainda, pela inserção de populações nessas áreas, o risco de surtos causados por esse mosquito se torna mais propício (Forattini 2002).

Nos serviços de controle de mosquitos vetores são utilizados inseticidas sintéticos de diferentes classes, como os organofosforados e piretróides (Luna *et al.* 2004). No entanto, há relatos de casos de resistência de mosquitos vetores de doenças aos inseticidas comumente utilizados em campanhas de combate a mosquitos (Braga *et al.* 2007). Compostos naturais à base de plantas, óleos essenciais ou seus derivados aparecem na atualidade como uma nova alternativa para o controle de vetores de importância médica. O dilapiol, obtido do óleo essencial do *Piper aduncum*, é um exemplo de sucesso dentre os extratos vegetais utilizados no controle de insetos vetores, servindo também como base para síntese de semissintéticos com potencial inseticida melhorado (Belzile *et al.* 2000; Pinto 2008).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citogenotóxico de dois compostos semi-sintéticos derivados do dilapiol, extraído do óleo essencial do *Piper aduncum*, em *A. albopictus*, de Manaus, Amazonas, para compreender os efeitos tóxicos e atividade genotóxica dessas substâncias nesse mosquito.

### 2. Material e Métodos

*Aedes albopictus* na forma imatura foi capturado no bairro Aleixo, Manaus-AM, utilizada para a formação de colônias (F1 e F2) em insetário, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS – INPA), com temperaturas entre 26 e 28 °C e 70% de umidade. Esses mosquitos foram expostos a dois semissintéticos de origem vegetal derivados do dilapiol o éter etil dilapiol (1KL39-B) e éter n-butil dilapiol (1KL43-C) em concentrações diferentes.

Os ensaios toxicológicos consistiram na exposição de larvas e ovos de *A. albopictus* aos derivados semissintéticos 1KL39-B e 1KL43-C, para determinar a concentração letal (CL) para 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>). Quanto ao potencial larvicida, um total de 50 larvas de 3º estágio, divididas em cinco réplicas de 10 larvas, foi utilizado para cada tratamento/concentração utilizados. Para cada composto foram utilizadas cinco concentrações, nas quais as larvas foram expostas por 24 horas. A avaliação do potencial ovicida de ambos semissintéticos foi realizada nos mesmos padrões utilizados na avaliação do potencial larvicida.

Os ensaios genotóxicos, para determinação dos efeitos deletérios a nível cromossômico, foram realizados utilizando-se 40 larvas de 3º estágio da geração F1, divididas em cinco réplicas, expostas a diferentes concentrações de cada composto (1KL39-B a 70 e 80 µg/ml; 1KL43-C a 20 e 30 µg/mL), durante quatro horas. Em seguida, larvas foram utilizadas na preparação de dez lâminas de gânglios cerebrais (cromossomos mitóticos), pelo método de espalhamento (Imai *et al.* 1988). As demais larvas foram transferidas para água potável, para atingirem a fase adulta. Dos mosquitos adultos emergidos foram utilizadas as fêmeas após 24 horas do primeiro repasto sanguíneo para confecção de lâminas citológicas de ovários (cromossomos meióticos). De machos e fêmeas adultos foram formados casais, para produzir a geração F2, que foi utilizada nos ensaios genotóxicos, por meio do mesmo procedimento previamente descrito para a geração F1.

### 3. Resultados e Discussão

No ensaio toxicológico ficou estabelecida uma  $CL_{50}$  para larvas de 3º estágio submetidas ao 1KL39-B e 1KL43-C, durante 24 horas, de  $81,22 \pm 6,82 \mu\text{g/mL}$  e  $38,06 \pm 9,69 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As  $CL_{90}$  foram de  $110,75 \mu\text{g/mL}$  e  $92,48 \mu\text{g/mL}$ , para o 1KL39-B e 1KL43-C, respectivamente. A mortalidade dos ovos, após 24 horas de exposição, foi de 100% nas menores concentrações utilizadas para o 1KL39-B ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) e para o 1KL43-C ( $12,5 \mu\text{g/mL}$ ).

A genotoxicidade verificada para os dois compostos seguiu alguns parâmetros estabelecidos (micronúcleos, brotamentos, células polinucleadas, más-formações, quebras cromossômicas, pontes anafásicas) em neuroblastos e ovócitos.

A frequência de anomalias em núcleos interfásicos de neuroblastos encontradas nos tratamentos com 1KL39-B ( $70$  e  $80 \mu\text{g/mL}$ ), foi de  $1,53 \pm 0,31\%$  e  $1,31 \pm 0,42\%$ , nas gerações F1 e F2;  $2,06 \pm 0,45\%$  F1 e  $1,1 \pm 0,40\%$  F2, respectivamente. A frequência verificada para o 1KL43-C ( $20$  e  $30 \mu\text{g/mL}$ ) foi  $1,61 \pm 0,24\%$  F1,  $1,66 \pm 0,46\%$  F2;  $3,38 \pm 0,51\%$  F1 e  $1,62 \pm 0,31\%$  F2, respectivamente. Enquanto que o controle foi de  $0,62 \pm 0,11\%$  F1 e  $0,68 \pm 0,09\%$  F2.

A frequência de anomalias encontradas em núcleos interfásicos de ovócitos expostas ao composto 1KL39-B ( $70$  e  $80 \mu\text{g/mL}$ ) foi de  $0,93 \pm 0,15\%$  F1 e  $1,28 \pm 0,17\%$  F2;  $1,23 \pm 0,12\%$  F1 e  $1,26 \pm 0,19\%$  F2, respectivamente. Já o segundo composto 1KL43-C ( $20$  e  $30 \mu\text{g/mL}$ ) foi  $0,83 \pm 0,24\%$  F1 e  $0,96 \pm 0,13\%$  F2;  $1,25 \pm 0,12\%$  F1 e  $0,9 \pm 0,18\%$  F2, respectivamente. Enquanto que o controle foi de  $0,8 \pm 0,68\%$  F1 e de  $0,75 \pm 0,19\%$  F2. Não houve alteração em núcleos metafásicos de neuroblastos e ovócitos expostos aos dois compostos (Figura 1).

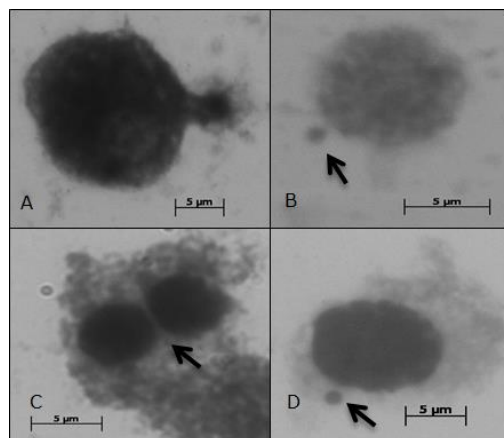


Figura 1: Núcleos interfásicos de neuroblastos (A e B) e ovócitos (C e D) de *Aedes albopictus* (geração F1- A e F2- B,C e D) corados com *Giemsa* (pH 5,8) e *orceína-lacto-acética* (2%). A – núcleo interfásico brotamento nuclear; B – micronúcleo (seta), (respectivamente de 1KL43-C); C – célula polinucleada; D – micronúcleo (seta) (respectivamente de 1KL39-B. Aumento: 1000x.

Testes de mortalidade utilizando bioensaios é rotina na busca por novos bioinseticidas (Pinto 2008). Utilizando o dilapiol (Rafael et al. 2008) observaram mortalidade de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* nas concentrações  $200$  e  $400 \mu\text{g/mL}$  ( $67\%$  e  $53\%$ ), respectivamente, durante 72 horas. Domingos (2012) utilizando o éter etil dilapiol e o éter n-butil dilapiol observou mortalidade de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* em duas concentrações diferentes, onde obteve  $83,75\%$  e  $100\%$ , respectivamente,

### 4. Conclusão

Os semissintéticos 1KL39-B e 1KL43-C causaram elevados índices de mortalidade em *A. albopictus*, observados por meio de efeitos tóxicos sobre as larvas e a genotoxicidade dos mosquitos emergidos a um nível nuclear, o que comprometeu a sua sobrevivência e a compreensão de um possível processo de desenvolvimento de resistência a esses compostos. A partir de um pequeno aumento na frequência de anormalidades nucleares para ambos os tratamentos, justifica-se o estudo de 1KL39-B e 1KL43-C sobre os seus mecanismos de ação em mais gerações de *A. albopictus*, para diminuir dúvidas acerca do potencial efeito alternativo desses compostos no combate a esse mosquito.

### 5. Referências Bibliográficas

Belzile, A.S.; Majerus, S.L.; Podeszinski, C.; Guillet, G.; Durst, T.; Arnason, J.T. 2000. Dilapiol Derivatives as Synergists: Structure-Activity Relationship Analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 33-40.

Braga, I.A.; Vale, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismo de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4): 279-293.

Domingos, P.R.C. 2012. *Avaliação do potencial genotóxico de dois derivados semi-sintéticos do fenilpropanóide dilapiol contra núcleos de Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae), Manaus, Amazonas, Brasil.* Dissertação

- de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 62 pp.
- Forattini, O.P. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública*; 20: 244-5.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicinae: Aedini in Culicidologia Médica*. vol. 2. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 403-484.
- Gomes, A.C.; Bittencourt, M.D.; Natal, D.; Pinto, P.L.S.; Mucci, L.F.; Paula, M.B.; Urbinatti, P.B.; Barata, J.M.S. 1999. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. *Rev Saúde Pública*, 33: 95-7.
- Guzmán, M.G.; Kourí, G. 2001. Dengue: an update. *Lancet Infectious Diseases*, 2: 33-42.
- Gratz, N.G. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology*, 18(3): 215-227.
- Imai, H.T.; Taylor, R.W.; Crosland, M.W.J.; Crozier, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.*, 63: 159-185.
- Luna, J. E. D.; Martins, M. F.; Dos Anjos, A. F.; Kuwabara, E. F.; Navarro-Silva, M. A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil, *Rev Saúde Pública*, 38: 842-843.
- Paupy, C.; Delatte, H.; Bagny, L.; Corbel, V.; Fontenille, D. 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infect.*, 11(14-15): 1177-1185.
- Pinto, A.C.S. 2008. *Desenvolvimento de substâncias semi-sintéticas e bioativas a partir de 4-nerolidilcatechol e dilapiol*. Tese de Doutorado. Biotecnologia, área de Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 296 pp.
- Rafael, M.S.; Hereira-Rojas, W.J.; Roper, J.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research*, 7(3): 772-781.
- Ross, T.M. 2010. Dengue Vírus. *Clin Lab Med*, 30: 149-160.
- World Health Organization-WHO. 2010. Dengue transmission research in WHO Bulletin. TDR: For research on diseases of poverty. Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/news-events/news/dengue-transmission>.