

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

Sabrina da Fonseca MEIRELES¹
Pedro Rael Cândido DOMINGOS²
Míriam Silva RAFAEL³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM; ²Doutorando PPGBIOTEC/Capes; ³Orientador INPA/CSAS.

INTRODUÇÃO

Aedes (Stegomyia) albopictus, Skuse, 1894, é um mosquito de grande importância para saúde pública, devido a sua competência vetorial de cerca de 26 arbovírus (Gratz 2004; Paupy *et al.* 2009). Dentre estes, os de maior importância no Brasil são os vírus da dengue e febre amarela (Alencar *et al.* 2008). A dengue acomete mais de 50 milhões de pessoas todos os anos em diversos países, sendo responsável por uma elevada morbidade dentre os enfermos (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 nos continentes asiático e africano (Guzmán e Kourí 2001; Ross 2010).

O *A. albopictus* é originário da Ásia e teve sua dispersão pelo mundo registrada a partir de 1980 (Gomes 1999). O primeiro registro da ocorrência desse mosquito no Brasil foi no Rio de Janeiro em 1986 (Forattini 1986), e na região Amazônica em 1996 (Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, 1996). Este é encontrado em regiões peri-urbanas, relacionadas geralmente a áreas com vegetação. Devido a sua competência vetorial, além da inserção de pessoas nessas áreas, o risco de surtos causados por esse mosquito se torna mais preocupante (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 aos inseticidas comumente utilizados nas campanhas (Braga *et al.* 2007). Compostos naturais à base de plantas, óleos essenciais ou seus derivados têm demonstrado bons resultados e podem ser alternativas para o controle desses vetores de importância médica. O dilapiol, obtido a partir 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 (Pinto *et al.* 2012).

Este trabalho teve como objetivo de estudar efeito citogenotóxico de dois semissintéticos derivados do dilapiol, extraído de óleo essencial do *Piper aduncum*, em *A. albopictus* capturados em Manaus – AM, a fim de avaliar a atividade genotóxica dessas substâncias em diferentes fases de desenvolvimento desse mosquito.

MATERIAL E MÉTODOS

Aedes albopictus, na forma imatura, foi capturado no bairro Aleixo, município de Manaus (AM), para obtenção de espécimes para formação de colônia de mosquito em insetário, da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS – INPA), onde foram mantidos em temperatura e umidade conhecidas (26-28 °C e 70%). As amostras foram identificadas segundo a chave de identificação taxonômica de Consoli-e-Lourenço de Oliveira (1994). A progênie obtida dessa colônia foi denominada de geração F1, a qual foi utilizada nos bioensaios e, também, na obtenção de nova geração (F2). Os bioensaios foram realizados por quatro gerações consecutivas. Os bioensaios consistiram da exposição de larvas destes mosquitos aos semissintéticos éter etil dilapiol (1KL39-B) e éter n-butil dilapiol (1KL43-C) em diferentes concentrações 50 e 70 µg/mL de 1KL39-B e 12,5 e 20 µg/mL de 1KL43-C.

Os ensaios genotóxicos, para avaliação dos efeitos dos compostos em nível cromossômico, foram realizados utilizando-se 200 larvas de 3º estágio (geração F1), divididas em cinco réplicas, para cada tratamento, e expostas a diferentes concentrações de cada composto (1KL39-B a 50 e 70 µg/mL; 1KL43-C a 12,5 e 20 µg/mL), e o controle recebeu tratamento apenas com DMSO (1%) e água potável, durante quatro horas. Logo após a exposição 30 larvas foram utilizadas na preparação de lâminas de gânglios cerebrais (cromossomos mitóticos), pelo método de espalhamento proposto por Imai *et al.* (1988). As demais larvas foram transferidas para água potável para emergirem os mosquitos adultos, dos quais amostras de fêmeas (n=30) após 24 horas do primeiro repasto sanguíneo foram utilizadas para confecção de lâminas citológicas de

ovários (cromossomos meióticos) e o restante, juntamente com os machos, foram utilizados para os cruzamentos até a produção da geração F2. Os procedimentos de exposição cumulativa aos bioinseticidas e para as amostras controles foram repetidos nas gerações posteriores F3 e F4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros determinados para avaliar a ocorrência de genotoxicidade foram os mesmos utilizados por Domingos (2012), onde a ocorrência de micronúcleos, brotamentos, células polinucleadas, más-formações, quebras cromossômicas ou pontes anafásicas, em neuroblastos ou ovócitos, após exposição aos derivados do dilapiol (1KL39-B e 1KL43-C) foi considerado como um marcador de efeito tóxico.

No presente trabalho, a frequência média de anomalias observadas em núcleos interfásicos, neuroblastos e ovócitos, após tratamento com 1KL39-B (50 e 70 µg/mL) e 1KL43-C (12, 5 e 20 µg/mL) está detalhada nas **Tabelas 1 e 2**.

A Tabela 1 mostra variação significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos com 50 e 70 µg/mL de 1KL39-B e 12,5 e 20 µg/mL de 1KL43-C nas gerações F1, F2, F3 e F4 em relação ao controle negativo, segundo ANOVA e teste de Tukey.

Tabela 1. Frequência média das anomalias em núcleos interfásicos de neuroblastos de *A. albopictus* em porcentagem (%), 1KL39-B (50 e 70 µg/mL) e 1KL43-C (12, 5 e 20 µg/mL).

Tipo celular	Tratamento	F1	F2	F3	F4
Neuroblasto	Controle	0.58 ± 0.08	0.66 ± 0.08	0.82 ± 0.19	0.54 ± 0.43
	50 µg/mL	1.08 ± 0.54	1.54 ± 0.32	2.02 ± 0.44	3.50 ± 0.78
	70 µg/mL	1.50 ± 0.33	1.36 ± 0.15	1.14 ± 0.32	2.46 ± 0.50
	12. 5 µg/mL	1.46 ± 0.29	1.96 ± 0.55	2.32 ± 0.57	2.30 ± 0.41
	20 µg/mL	1.68 ± 0.21	1.74 ± 0.48	2.66 ± 0.40	2.12 ± 0.48

Na Tabela 2, geração F1 exposta a 20 µg/mL de 1KL43-C e 70 µg/mL de 1KL39-B, os núcleos interfásicos de ovócitos não mostraram variação significativa em comparação às gerações F2, F3 e F4 (variação foi significativa, $p < 0.05$) em relação ao controle, segundo ANOVA e teste de Tukey.

Tabela 2. Frequência média das anomalias em núcleos interfásicos de ovócitos de *A. albopictus* em porcentagem (%), 1KL39-B (50 e 70 µg/mL) e 1KL43-C (12, 5 e 20 µg/mL).

Tipo celular	Tratamento	F1	F2	F3	F4
Ovócito	Controle	0.66 ± 0.05	0.74 ± 0.21	0.50 ± 0.32	0.96 ± 0.42
	50 µg/mL	7.66 ± 2.40	4.80 ± 2.00	4.48 ± 2.38	2.68 ± 0.99
	70 µg/mL	0.86 ± 0.20	1.34 ± 0.11	3.36 ± 0.83	2.70 ± 0.30
	12. 5 µg/mL	4.12 ± 1.33	4.68 ± 1.13	4.70 ± 0.52	5.04 ± 1.55
	20 µg/mL	0.90 ± 0.20	0.94 ± 0.13	2.40 ± 0.63	2.94 ± 0.61

A frequência média de anomalias cromossômicas observada em neuroblastos e ovócitos após o tratamento com os compostos 1KL39-B e 1KL43-C não foi significativa em relação ao controle. Esse resultado foi comprometido pelo baixo número de núcleos em metáfase obtido nas preparações citológicas.

Os parâmetros genotóxicos mais observados em núcleos interfásicos foram brotamentos seguidos de micronúcleos, e más-formações. Enquanto que as observadas nas poucas amostras de núcleos metafásicos foram quebras cromossômicas, seguidas de micronúcleos e pontes anafásicas e, também, más-formações (**Figuras 1 e 2**).

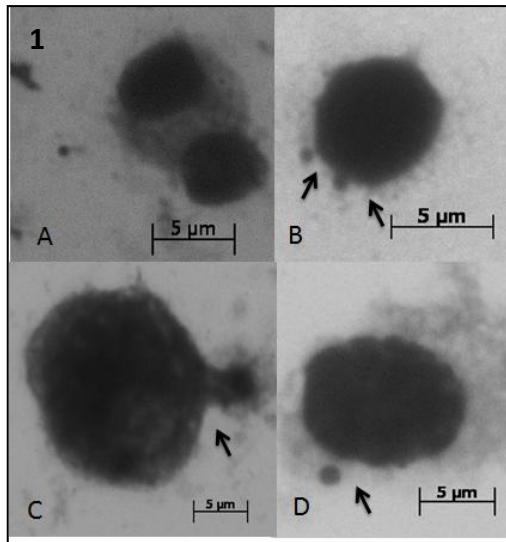


Figura 2 Preparações citológicas de neuroblastos e ovócitos corados com *Giemsa* (pH 5,8) e *orceína-lacto-acética* (2%). A – núcleo interfásico normal (F1 - Controle); B e D - micronúcleos em núcleos interfásicos de neuroblastos (F4 e F3 - 20 µg/mL de 1KL39-B), respectivamente (setas); C – Brotamento em núcleo interfásico de ovócito (F2 - 20 µg/mL de 1KL43-C). Aumento: 1000 e 1600x.

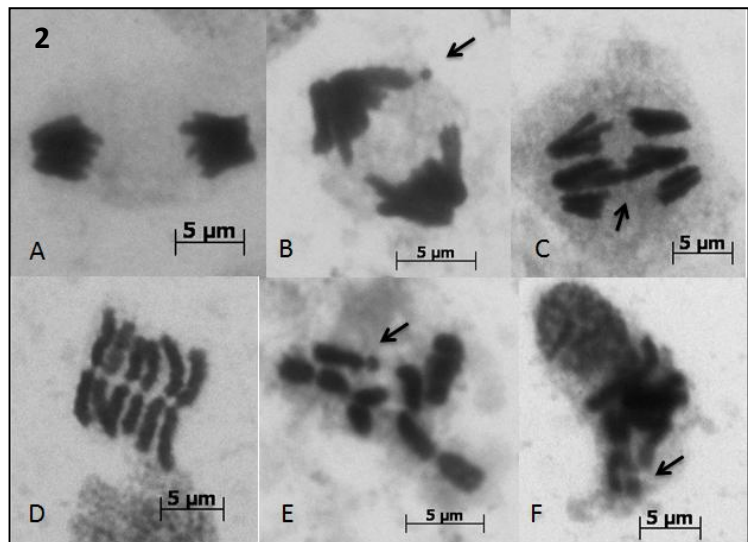


Figura 1 Preparações citológicas de neuroblastos corados com *Giemsa* (pH 5,8) e *orceína-lacto-acética* (2%). A – anáfase normal (Controle); B - micronúcleo em anáfase (F3 - 70 µg/mL de 1KL39-B) (seta); C – ponte nuclear anafásica (F4 - 12, 5 µg/mL de 1KL43-C); D – núcleo metafásico normal (controle); E - quebra cromossômica intersticial (F1 - 50 µg/mL de 1KL39-B) (seta); F - quebra cromossômica intersticial (F3 - 12, 5 µg/mL de 1KL43-C). Aumento: 1000 e 1600x.

Dados na literatura sobre os efeitos genotóxicos causados por bioinseticidas em mosquitos vetores são escassos. Este é um trabalho pioneiro em evidenciar o potencial efeito cumulativo de semissintéticos sobre larvas e fêmeas adultas de *A. albopictus*. A ação genotóxica dos compostos 1KL39-B (50, 70 e 80 µg/mL) e 1KL43-C (20, 25 e 30 µg/mL) sobre larvas e fêmeas adultas do *A. aegypti*, por quatro gerações consecutivas, foi estudada por Domingos (2012). Este autor registrou a presença de anormalidades nucleares interfásicas e metafásicas em *A. aegypti* e, inferiu que o aumento na frequência das mesmas deveu-se ao aumento das concentrações testadas nas amostras expostas a esses compostos, por 4 horas.

O dilapiol, composto base da síntese dos derivados do presente estudo, foi estudado por Rafael *et al.* (2008). Os autores observaram alterações nucleares em larvas e pupas de *A. aegypti* quando foram expostos a concentrações de 200 e 400 µg/mL, por 72 horas. Os autores evidenciaram, ainda, acúmulo dos efeitos genotóxicos (núcleos interfásicos - micronúcleo e brotamento) e núcleos em metáfase - quebras cromossômicas e outras más formações nas gerações F1, F2, F3 e F4 de *A. aegypti*.

Em nosso estudo foram utilizadas as concentrações de 50 e 70 µg/mL (1KL39-B) e de 12, 5 e 20 µg/mL (1KL43-C) em *A. albopictus*, durante 4 horas. Este apresentou maior susceptibilidade a tais tratamentos mesmo em baixas concentrações como estas, evidenciada em danos causados em núcleos interfásicos, quando comparados aos resultados dos tratamentos com 1KL39-B (50, 70 e 80 µg/mL) e 1KL43-C (20, 25 e 30 µg/mL) em *A. aegypti* (Domingos 2012). Na literatura não foram encontrados registros sobre a resposta de *A. albopictus* ao dilapiol ou de seus derivados. Porém, em *A. aegypti* foi evidente a necessidade do uso de concentrações e tempo de exposição maiores do dilapiol (Rafael *et al.* 2008) e dos derivados do dilapiol, 1KL39-B e 1KL43-C (Domingos 2012), para provocar maior susceptibilidade de *A. aegypti* a estes bioprodutos.

CONCLUSÃO

Efeitos citogenotóxicos (micronúcleos, brotamentos, células mono e polinucleadas, quebras cromossômicas, ponte anafásica e outras más formações) foram observados em *A. albopictus* tratados com os compostos 1KL39-B e 1KL43-C, nas gerações F1, F2, F3 e F4, e evidenciaram que este mosquito é susceptível a esses semissintéticos. A partir desses dados, fazem-se necessários estudos mais aprofundados, para esclarecimento dos mecanismos específicos de ação desses compostos diretamente no campo, com efeito no combate ao *A. albopictus*, transmissor da dengue.

REFERÊNCIAS

- Alencar, C.H.M.; Albuquerque, L.M.; Aquino, T.M.F.; Soares, C.B.; Júnior, A.N.R.; Lima, J.W.O.; Pontes, R.J.S. 2008. Potencialidades do *Aedes albopictus* como vetor de arboviroses no Brasil: Um desafio para a atenção primária. *Rev. APS*, 11(4): 459-467.
- Braga, I.A.; Vale, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismo de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4): 279-293.
- Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R.L. 1994. *Classificação e principais espécies de importância sanitária in Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. 1ª edição. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro- RJ.
- Domingos, P.R.C. 2012. *Avaliação do potencial genotóxico de dois derivados semi-sintéticos do fenilpropanóide dillapiol 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. 2002. *Culicinae: Aedini in Culicidologia Médica*. São Paulo: editora da Universidade de São Paulo, 2: 403-484.
- Forattini, O.P. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública*; 20: 244-5.
- 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.; Nogueira, K.L.; Chaves, F.C.M.; Silva, V.S.; Tadei, W.P.; Pohlit, A.M. 2012. Adulticidal Activity of Dillapiol and Semi-synthetic Derivatives of Dillapiol against *Aedes aegypti* (L.) (Culicidae). *Journal of Mosquito Research*, 2(1): 1-7.
- 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>.