

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos
Naturais

**EFEITO GENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Piper aduncum* L. (dilapiol) EM
BIOMARCADORES NUCLEARES, MICRONÚCLEOS E CROMOSSOMOS DE
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE), MANAUS, AMAZONAS**

Walfran Jose Hereira Rojas

MANAUS – AM

Maio, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

WALFRAN JOSE HEREIRA ROJAS

**EFEITO GENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Piper aduncum* L. (dilapiol) EM
BIOMARCADORES NUCLEARES, MICRONÚCLEOS E CROMOSSOMOS DE
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE), MANAUS, AMAZONAS**

Míriam Silva Rafael

Orientadora

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS – AM

Maior, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

H 542 **Hereira Rojas, Walfran Jose**

Efeito genotóxico do extrato de *Piper aduncum* L. (dilapiol) em biomarcadores nucleares, micronúcleos e cromossomos de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), Manaus, AM/ Walfran Jose Hereira Rojas

63 p.: il

Dissertação (mestrado)—INPA, UFAM, Manaus, 2007.

Orientador: Rafael, Miriam Silva

Área de concentração: Genética, , Conservação e Biologia Evolutiva

1. *Aedes aegypti*. 2 Dilapiol. 3 Micronúcleos. 4 Anomalias cromossômicas. I. Título

CDD 591.1592

Sinopse:

Estudou-se o extrato de *Piper aduncum* L. sobre o mosquito *Aedes aegypti*, para determinar o seu efeito genotóxico nesse mosquito por meio de testes de toxicidade, frequência de micronúcleos, anormalidades nucleares e anomalias cromossômicas.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Genotoxicidade, Dilapiol, Micronúcleos.

**Dedico este trabalho,
À Deus
Ao meu filho, Santiago
Aos meus pais, Jose e Leonor
À minha esposa, Danelly**

"Somos o que fazemos, mas
somos, principalmente, o que
fazemos para mudar o que
somos"

Eduardo Galeano

Agradecimentos

A Deus pela minha vida e saúde.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT)/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela infra-estrutura e apoio cedidos, para a realização desta dissertação.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV -INPA), pelo aprendizado de excelente qualidade e, pela oportunidade de conviver com excelentes pesquisadores, professores, funcionários e amigos.

À Dra. Míriam Silva Rafael pela orientação, pela amizade dispensada, pela confiança depositada e por tornar possível a realização deste estudo.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida, tornando possível a realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde – (CPCS -INPA) pela atenção deliberada durante a realização das atividades no Laboratório de Malária e Dengue.

Ao Dr. Wanderlei Pedro Tadei, co-orientador, pela confiança depositada, pelo apoio logístico que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio e pelo amor nos momentos difíceis.

À minha esposa por me motivar nos momentos em que nem eu mesmo acreditava que podia dar certo.

Ao Dr. Sérgio Nunomura, do Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais pelo fornecimento do óleo essencial (dilapiol).

À família Schneider pela colaboração desinteressada e pelo companheirismo.

Ao Msc. Ricardo dos Passos pela ajuda, nas análises estatísticas iniciais.

Ao Msc. Flávio Augusto (Guto), pela preciosa ajuda na análise estatística dos dados deste trabalho.

Aos companheiros do mestrado Aline, Eduardo, Fátima, Raymundo, Luciano e Tatiane pela ajuda nos momento em que precisei.

Ao Dr. Eloy Castellón, por acreditar, pelo apoio oferecido e pela grande amizade.

Ao Dr. Alonso Villa Nunes pela ajuda nos momentos difíceis, pela amizade, discussões e alegrias.

À Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos pelas discussões científicas e amizade dispensada.

À Emith, Alonso Andrés e Daniela pelos incontáveis momentos de alegria brindados.

A todos os funcionários do Laboratório de Vetores da Malária e Dengue: Carlos e ao Juraci, pelo pronto auxílio esclarecendo dúvidas sobre identificação de mosquitos e a caracterização de propriedades físico-químicas das substâncias utilizadas nos experimentos. Ao Bastos, Henrique e Elias nas coletas de campo, Adelina, Zilá, Caroline, Suze, Fabio (paraíba), Yuri, Rodrigo, Waleria, Gilson, Ketlen e Melina pelo companheirismo; à Erika pelo apoio ao experimento do insetário e, em especial, à Letícia pelas discussões científicas nesses dois anos de trabalho.

Ao Msc. Luis Eduardo Sarmiento Lozano, pela ajuda com diversos ensinamentos.

Aos meus familiares, que mesmo distantes sempre me enviaram energias positivas, rezaram e nunca perderam a Fé em Deus de que ao final todo sacrifício valeria a pena.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Brasil por ter me acolhido como a um filho, durante estes dois anos de convívio.

RESUMO

Aedes aegypti transmite os quatro sorotipos do vírus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) e da febre amarela urbana em diversas partes do mundo. O controle desse mosquito é realizado com inseticidas sintéticos, principalmente, os organofosforados e piretróides, aos quais o *A. aegypti* tem apresentado resistência. Novas alternativas de controle com extratos vegetais mostraram atividade larvicida em insetos, como o fenilpropanoide (dilapiol), obtido da planta *Piper aduncum* L, da família Piperaceae. Este trabalho visou determinar, pela primeira vez, o efeito genotóxico do óleo essencial dilapiol, da Amazônia, em *A. aegypti*, por meio da análise de teste do micronúcleo (MNT), anormalidades nucleares e anomalias cromossômicas. Larvas e pupas foram coletadas nos bairros Japiim, Cidade nova e Puraquequara, Manaus, estado do Amazonas. Analisou-se a toxicidade do dilapiol nas concentrações de 200µg/mL e 400µg/mL (CL₅₀) em ovos, larvas e pupas, durante quatro gerações sucessivas. Água de poço artesiano foi utilizada em indivíduos para controles negativo. O dilapiol mostrou efeito significativo ANOVA ($p < 0,05$) na mortalidade e oviposição, quando os indivíduos testados nas concentrações de 200µg/mL e 400µg/mL foram comparados aos seus grupos controle. Dos indivíduos que sobreviveram ao experimento, fêz-se preparações citológicas de gânglios cerebrais de larva de 4º estágio e de ovários de pupas. As lâminas foram submetidas aos métodos de coloração com orceína lacto-acética 2% e impregnação com nitrato de prata. Micronúcleos foram encontrados em metáfases mitótica diplóide e tetraplóide de larvas e em intérfase, metáfase e telófase de pupas. A frequência de micronúcleos dos indivíduos expostos 200µg/ml (n=202) e 400µg/mL (n=210) foi comparada àquela dos indivíduos controles negativo (n=183), pelo teste de Kruskal Wallis, a 5% de significância. O mesmo número de indivíduos foi analisado para registrar células interfásicas mononucleada e com alterações nucleares (binucleada, polinucleada e com broto). Quebras, atrasos cromossômicos e pontes anafásicas foram presentes em larvas e pupas, cujo aumento foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) entre as larvas expostas a 200µg/ml e 400µg/ml (n= 215) e pupas submetidas a 200µg/ml e 400µg/ml (n= 173) quando foram comparadas aos seus controles negativos, larvas (n=89) e pupas (n=94). Porém, entre os indivíduos submetidos ao dilapiol nas duas concentrações (200µg/ml e 400µg/mL), não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no número de anormalidades nucleares, anomalias cromossômicas e frequência de micronúcleos. *A. aegypti* mostrou ausência de resistência ao potencial bioinseticida do dilapiol. Os resultados do efeito genotóxico do dilapiol mostram que esse óleo essencial é um bioindicador alternativo natural, para o controle de larvas e pupas de *A. aegypti*.

ABSTRACT

Aedes aegypti transmits the four sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) of the dengue virus and the urban yellow fever in several parts of the world. This mosquito's control is made by synthetic insecticides, mainly the organophosphorades and pyrethroids, to which the *A. aegypti* have shown resistance. New alternatives of control with vegetal extract have been showing larvicidal activity in insects, such as with the fenilpropanoid (dilapiol), gotten from the plant *Piper aduncum* L, of the Piperaceae family. This assay aimed to determine, for the first time, the genotoxic effect of the essential oil dilapiol, from Amazonia, in *A. aegypti*, trough the nuclear abnormalities analysis, frequency of micronuclei and chromosome abnormalities. Larvae and pupae were collected in the following neighborhoods: Japiim, Cidade Nova and Puraquequara, Manaus, Amazonas. Dilapiol's toxicity was analyzed in the concentrations of 200µg/mL and 400µg/mL (CL₅₀) in eggs, larvae and pupae, during four successive generations. Water of artesian well was used in individuals for negative control. Dilapiol showed significant effect ANOVA ($p < 0,05$) in mortality and oviposition, when the tested individuals in the concentrations of 200µg/mL and 400µg/mL were compared with their control groups. From the surviving individuals of the experiment, cytological preparations of cerebral ganglia in the fourth instar larvae and ovary of pupae were made. The blades had been submitted to the stain methods with lacto-acetic-orcein 2% and impregnation with silver nitrate. Micronuclei had been found in mitotic metaphases diploid and tetraploid of larvae and in interphase, metaphase and telophase of pupae. The frequency of micronuclei in the individuals exposed to 200µg/ml (n=202) and 400µg/mL (n=210) was compared to that one of the negative control individuals (n=183), by means of the Kruskal Wallis test, significance of 5%. The same number of individuals was analyzed to register interphase and single nucleus cell and with nuclear alterations (binucleated, polinucleated and with sprout). Breakings chromosomic delays and anaphase bridges had been present in tested larvae and pupae with dilapiol, which had indicated significant statistical increase ($p < 0,05$) between the displayed larvae 200µg/ml and 400µg/ml (n= 215) and pupae submitted 200µg/ml and 400µg/ml (n= 173) when compared to its negative control, larvae (n=89) and pupae (n=94). However, between individuals submitted to dilapiol in the two concentrations (200µg/ml e 400µg/mL), there were no significant statistical differences ($p > 0,05$) in the number of alterations (nuclear alterations, chromosomic alterations and frequency of micronuclei) found. The results of the genotoxic effect of dilapiol show that this essential oil is a natural alternative bioindicator, for the control of larvae and pupae *A. aegypti*.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Aspectos epidemiológicos	1
1.2 Distribuição geográfica e aspectos biológicos.....	3
1.3 Bioinseticidas e genotoxicidade.....	5
1.4 Teste do micronúcleo (MNT)	7
1.4.1 Princípio da detecção de micronúcleos (MN).....	7
1.5 Abordagem citogenética	8
1.6 Objetivos	11
Gerais.....	11
Específicos	11
2. Material e Métodos	12
2.1 Áreas de estudo.....	12
2.2 Coleta e manutenção de <i>A. aegypti</i>	13
2.3 Bioensaio toxicogenômico	14
2.4 Preparações citológicas.....	15
2.4.1 Coloração convencional.....	16
2.4.2 Impregnação por nitrato de prata	16
2.5 Análise de alterações nucleares, freqüência de micronúcleos e anomalias cromossômicas	16
2.6 Microfotografias	16
2.7 Análise estatística	17
3. Resultados	18
3.1 Efeito do dilapiol na mortalidade de <i>A. aegypti</i>	18
3.2 Efeito do Dilapiol na oviposição de <i>A. aegypti</i>	19
3.3 Potencial genotóxico do dilapiol em <i>A. aegypti</i>	20
3.3.1 Anormalidades nucleares	20
3.3.2 Freqüência de micronúcleos.....	23
3.4 Anomalias cromossômicas em <i>A. aegypti</i>	27
3.4.1 Anomalias cromossômicas em larvas	29
3.4.2 Anomalias cromossômicas em pupas	31
4. Discussão	34
5. Conclusões	39
6. Referências Bibliográficas	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química do dilapiol (Souto,2006).	6
Figura 2. Cariótipo de <i>A. aegypti</i> (fonte: Hereira & Rafael, 2007).....	9
Figura 3. Mapa da cidade de Manaus por zona e bairros, com a localização dos pontos de coletas. Fonte: ASTEC/FVS/AM – INPA 2006.....	12
Figura 4. Armadilha de pneu para coleta dos imaturos de <i>A. aegypti</i>	14
Figura 5. Mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> expostas ao dilapiol (Controle, 200 µg/mL e 400 µg/mL), nos intervalos de 24, 36, 48 e 72 horas.	18
Figura 6. Oviposição (número médio de ovos) das fêmeas expostas às concentrações de dilapiol (200µg/mL e 400µg/mL) e grupos controle, durante as quatro gerações sucessivas, nas três localidades.....	19
Figura 7. Larvas de <i>A.aegypti</i> . Impregnação por nitrato de prata. Célula interfásica mononucleada de individuo controle (A). Célula binucleada exposta a 200µg/mL de dilapiol (B). Célula polinucleada exposta a 400µg/mL de dilapiol (C). Célula com broto exposta a 400µg/mL de dilapiol (D)..	21
Figura 8. Média e desvio padrão da freqüência de células polinucleadas e com broto em larvas de <i>A. aegypti</i> . 1= controle, 2= 200µg/mL, 3= 400µg/mL. FrCPoli : Freqüência de células polinucleadas. FrCBr: Freqüência de células com brotos.....	21
Figura 9. Impregnação por nitrato de prata. Pupas de <i>A. aegypti</i> . Células binucleadas e polinucleadas expostas ao dilapiol 200µg/mL. Coloração convencional em célula de pupa exposta a 400µg/mL. Impregnação por nitrato de prata em <i>A. aegypti</i> , mostrando célula de ovário com broto exposta a dilapiol na concentração de 400µg/mL.....	22
Figura 10. Média e desvio padrão da freqüência de células polinucleadas e células com broto em pupas de <i>A. aegypti</i> expostas ao dilapiol e seus controles negativo..	23

Figura 11. Coloração convencional em larva de <i>A. aegypti</i> . Célula interfásica com micronúcleo exposta a 200 µg/mL de dilapiol. Metáfases de células diplóides e tetraplóide com micronúcleo em indivíduo exposto ao dilapiol 400 µg/mL. Célula com alteração morfológica de amostra exposta ao dilapiol a 200 µg/mL.....	24
Figura 12. Média e desvio padrão das freqüências de células com presença de micronúcleos e alterações nucleares em larvas expostas ao dilapiol e seus controles negativos	25
Figura 13. Coloração convencional em pupa de <i>A. aegypti</i> . Micronúcleo em ovário de pupa controle e exposta a 200 µg/mL de dilapiol. Micronúcleo em célula de ovário exposta ao dilapiol em concentração de 400 µg/mL. Micronúcleo de célula de ovário exposta ao dilapiol a 200 µg/mL.....	26
Figura 14. Média e desvio padrão das freqüências de células com presença de micronúcleos e alterações nucleares em pupas expostas ao dilapiol e seus controles negativos..	27
Figura 15. Coloração convencional em larvas de <i>A. aegypti</i> . Anáfase normal em larva controle. Ponte anafásica e quebra cromossômica em indivíduos expostos a dilapiol 200 µg/mL. Anáfase com atraso cromossômico em indivíduo exposto a 400 µg/mL de dilapiol. Quebra cromossômica em anáfase de larva exposta a 400 µg/mL. Quebra cromossômica em metáfase de indivíduo exposto ao dilapiol 400 µg/mL. ..	30
Figura 16. Coloração convencional em ovário de pupas de <i>A. aegypti</i> . Anáfase em indivíduo controle. Pontes anafásicas em pupas expostas ao dilapiol a 200µg/mL e 400µg/mL. Atraso cromossômico anafásico de indivíduo exposto ao dilapiol a 400 µg/mL. Paquíteno de célula de ovário com quebra no cromossomo 2, tratado com dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL.	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Preparações citológicas dos indivíduos das três localidades, submetidas aos métodos de coloração convencional e de Ag-NOR 20
- Tabela 2.** Anomalias cromossômicas em células de larvas e pupas de *A. aegypti*, dos bairros Japiim, Cidade nova e Puraquequara, submetidas aos métodos de coloração convencional e de impregnação pelo nitrato de prata. 28
- Tabela 3.** Frequência de anomalias cromossômicas (ponte anafásica, atraso cromossômico, quebras cromossômicas) em gânglios cerebrais de larvas analisadas pelo teste de Kruskal Wallis. 31
- Tabela 4.** Frequência de anomalias cromossômicas (ponte anafásica, atraso cromossômico, quebras cromossômicas) em ovários e testículos de pupas analisadas, pelo teste de Kruskal Wallis. 33

1. Introdução

1.1 Aspectos epidemiológicos

A. aegypti, subgênero *Stegomyia*, é o principal vetor do vírus da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas e em diversas partes do mundo. Apresenta elevada endofilia e antropofilia e transmite também a febre amarela urbana, (Forattini, 2002). Nas Américas, a dengue é uma doença de aspecto principalmente urbano e os agentes etiológicos fazem parte do ciclo que envolve o mosquito *A. aegypti* e o ser humano (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1996).

A dengue é uma virose de ocorrência mundial, que atinge cerca de 60 milhões de pessoas e causa em torno de 30.000 mortes por ano (WHO, 2003).

Nas regiões tropicais, as condições climáticas caracterizadas pelas precipitações atmosféricas e temperaturas elevadas, em geral mostram relação positiva com a transmissão da dengue. Contudo, têm sido registrados surtos da doença em períodos de seca durante o ano (Kuno, 1995). Há evidências de que em temperaturas ao redor de 30°C o período de incubação abrevia-se ao máximo. Mas, abaixo dos 20 °C a transmissão tende ao decréscimo (Forattini, 2002).

O processo de transmissão do dengue ocorre por meio do mosquito fêmea *de A. aegypti*, que adquire o vírus por meio da picada em um indivíduo infectado. O vírus entra no sistema digestivo e se dissemina para outros órgãos do mosquito, incluindo a glândula salivar, de onde é transmitido a outro indivíduo, na próxima picada, durante a ingestão de sangue (Halstead, 1988). Os agentes causadores dessa virose são arbovírus da família Flaviviridae. São vírus de RNA e constituem-se em um complexo antigênico do gênero *Flavivirus*. Existem quatro sorotipos distintos: dengue tipo 1 (DEN-1), dengue tipo 2 (DEN-2), dengue tipo 3 (DEN-3) e dengue tipo 4 (DEN-4), segundo Westaway *et al.* (1985) *apud* Barbosa (1996).

Os primeiros registros do vírus dengue ocorreram em 1635 (Gubler, 1998) e a primeira epidemia fora do sudeste asiático ocorreu em Cuba em 1981, e a segunda na Venezuela (1984) com 158 mortes e 73 óbitos, respectivamente (MS/FNS, 1996). Na década de 50, a dengue ocorreu em 1953 nas Filipinas e em 1958 na Tailândia, onde foram registrados os primeiros casos da forma hemorrágica (Gubler, 1998). Nessa mesma década a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) desenvolveu uma campanha que diminuiu a incidência do mosquito *A. aegypti* de grande parte das Américas do Sul e Central. A partir da década de 70, no entanto, a

descontinuidade dos programas de erradicação pelos Estados Unidos, Venezuela e Ilhas do Caribe, contribuiu para a reintrodução do vetor e o reaparecimento do dengue (Gubler, 1998). Nas décadas de 80 e 90 continuaram a ocorrer epidemias nos países da América, (OMS, 1990). Em 1987, 18 países nas Américas tinham confirmado casos de febre hemorrágica (OMS, 2003; Gubler, 2002).

O Brasil permaneceu por mais de 20 anos sem a ocorrência de dengue, desde a "erradicação" do *A. aegypti* do território brasileiro em 1955. A reintrodução dos vírus dengue no país ocorreu por meio de países vizinhos em 1981, com uma epidemia ocasionada pelos sorotipos 1 e 4, em Boa Vista, estado de Roraima (Osanai, 1983; Travassos da Rosa *et al.*, 1998). Posteriormente, o dengue reapareceu no estado do Rio de Janeiro, com uma grande epidemia causada pelo sorotipo 1, em 1987 (Figueiredo *et al.*, 1998). Da região sudeste o dengue expandiu-se pelo Nordeste, causando epidemias entre os anos de 1986 e 1993 (Vasconcelos *et al.*, 1995). Os sorotipos 2 e 3 da dengue foram diagnosticados, pela primeira vez, no estado do Rio de Janeiro em 1990 e 2001, respectivamente (MS, 2001). Expandiram-se pelo Brasil, e em 2004, o DENV 3 ocorria em 23 estados (MS, 2004). A introdução dos diversos sorotipos do vírus e a manutenção da doença em muitas regiões do mundo vem ocorrendo devido à urbanização descontrolada nos trópicos, aumento demográfico, evolução dos meios de transporte, condições climáticas favoráveis para a proliferação dos vetores, deteriorização dos programas de saúde pública e, finalmente em decorrência de problemas econômicos e sociais (Barbosa, 1996). São Paulo é o estado brasileiro com o maior número de casos da doença, mais especificamente nas regiões de São José do Rio Preto e de Ribeirão Preto (MS, 2006).

Em Manaus, os primeiros focos de dengue ocorreram em 1996, nos bairros Praça 14 e São José, de onde o mosquito se dispersou por todo o centro da cidade, atingindo em dezembro de 1997 um total de 15 bairros. Em maio de 1998, encontrava-se em 21 bairros, onde foi registrada a primeira epidemia de dengue, com cerca de 14.000 casos, clinicamente diagnosticados (FUNASA, 1996). Os dados estatísticos mostraram 3.763 casos em 2003. Em 2004 houve uma redução de 80.1% (347 casos) em comparação a 2003 (MS, 2005). Em 2005 foram registrados 45 óbitos pelo dengue (FUNASA, 2006).

A literatura registra dificuldade para desenvolver vacina contra o dengue, porque os 4 sorotipos podem causar ambas as doenças (dengue clássico e febre

hemorrágica do dengue -FHD) e não existe imunidade entre os diferentes sorotipos. Vacinas contra o vírus da dengue ainda não estão disponíveis para uso geral, embora pesquisas promissoras tenham sido desenvolvidas na Universidade de Mahidol, Tailândia e inclusive uma vacina contra o vírus DEN-2, já tenha sido testada em voluntários americanos (Vaughn *et al.*, 1996). Até que uma vacina eficiente contra os sorotipos do vírus da dengue seja desenvolvida, a única maneira de prevenir epidemias dessa doença é por meio do controle dos mosquitos que transmitem o vírus (Duque, 2004).

Novas estratégias de controle em laboratório estão sendo consideradas, incluindo a alteração genética de mosquitos vetores, para evitar a rápida proliferação do vírus do dengue nas glândulas salivares de *A. aegypti*. Como demonstrado por (Olson *et al.*, 1996), da Universidade do Estado do Colorado (USA). Porém, mais estudos serão necessários para saber se esse mosquito sobrevive em seu ambiente selvagem sem transmitir o vírus da dengue.

1.2 Distribuição geográfica e aspectos biológicos

Aedes aegypti é originário da região afrotropical (Belkin, 1962). Ocorre nas regiões tropicais e subtropicais compreendidas entre os paralelos (latitudes) 45° norte e 35° sul ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermais de 20° centígrados (Consoli & Oliveira, 1994). É raramente encontrado acima de 1200m de altitude, mas foi encontrado a 1700 mts, no México (Herrera-Basto *et al.*, 1992) e a 2200 mts, na Colômbia (Nelson, 1985 *apud* Marzochi, 1994).

No Brasil é amplamente distribuído e está restrito às vilas e cidades, sempre ligado ao peridomicílio e ao domicílio humano. Nas cidades é encontrado nos locais de maior concentração humana e raramente em ambientes semi-silvestres (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994).

Pinheiro & Tadei (2000), inspecionando recipientes disponíveis em 2.700 imóveis em área urbana da cidade de Manaus, registraram 13.931 recipientes artificiais propícios ao desenvolvimento de *A. aegypti*. Do total de recipientes pesquisados, apenas em 1,6% foram coletadas larvas desse mosquito. Um trabalho recente realizado em Manaus (AM), sobre a detecção do vírus em *A. aegypti*, evidenciou que de 82 *pools* analisados, 17,1% foram positivos para o DENV3, provendo uma taxa mínima de infecção de 2,1% do total de fêmeas estudadas de diferentes áreas da cidade (Pinheiro *et al.*, 2002).

Os culicídeos possuem metamorfoses completa, cuja forma juvenil passa por larva e pupa. Estas vivem em habitats aquáticos como lagoas poças e recipientes artificiais. A larva se alimenta diferencialmente dos adultos (Clements, 1992). Considerando a biologia de desenvolvimento o *A. aegypti*, encontra-se em ambientes sempre que contenham água limpa não turva, pobre em matéria orgânica em decomposição e em sais (Forattini, 2002). Os seus criadouros são na maioria recipientes artificiais. Tanto os abandonados pelo homem a céu aberto como aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico.

As fêmeas ovipõem de 50 a 500 ovos de uma só vez, depositando-os na superfície da água ou nas paredes rugosas, escuras e úmidas dos recipientes (Forattini, 1996). Isso explicaria o porquê de oviposições preferenciais em pneus usados (Thiratapsakun *et al.*, 1981; Chadee *et al.*, 1995). O ritmo de atividade de oviposição das fêmeas de *A. aegypti* obedece a ciclo diurno bimodal, com um pico matutino das 6:00 horas às 8:00 horas; e outro, vespertino, das 16:00 às 18:00.

Em um período variável de 48 horas até um mês, desenvolve-se uma larva completamente formada em condições se tornarem viáveis (Clements, 1992). A eclosão do ovo ocorre em um período aproximado de 48 a 72 horas mas poderá ser protelada por 6 meses ou mais dependendo de situações adversas como a falta de umidade ou a baixa temperatura o que causa a diapausa dentro do ovo (Forattini, 1996). As larvas precisam de oxigênio atmosférico para respiração. Em cerca de sete dias elas completam o seu ciclo de desenvolvimento composto de quatro estádios. Alimentam-se de microorganismos aquáticos, pólen e outros detritos orgânicos (Jones, 1978). O estágio final da metamorfose (pupa) pode ocorrer em dois dias, se a temperatura for suficientemente alta (Clements, 1992)

Após a emergência do adulto, os machos procuram alimentar-se de néctar e outros líquidos vegetais e as fêmeas precisam de sangue, necessário para a maturação do embrião. É durante a estação chuvosa que a população de *A. aegypti* alcança níveis elevados e de importância para transmissão de patógenos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

1.3 Bioinseticidas e genotoxicidade

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo, especialmente na agricultura. O uso destes pesticidas tem dobrado a cada 10 anos desde 1945, causando danos às plantações bem como para outros organismos expostos (Macoris *et al.*, 2003).

As ações de controle sobre o vírus dengue, um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil, transmitida pelo *A. aegypti*, datam de 1967 e foi intensificada em 1986 com o surto de dengue ocorrido no Rio de Janeiro, que se espalhou para outras regiões (Barbosa *et al.*, 2003). Embora avanços importantes tenham surgido no desenvolvimento de medidas alternativas para o controle de mosquitos de importância epidemiológica, os inseticidas químicos ainda se mantêm como parte vital dos programas de controle integrado (Camargo *et al.*, 1998). Casos de resistência têm sido registrados para espécies de mosquitos vetores, dentre esses o *A.aegypti* (Campos, 2001). O controle de suas formas imaturas é realizado principalmente com organofosforados e dos adultos com piretróides (Duque, 2004).

A resistência de mosquitos a inseticidas sintéticos é definida pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1957) como a capacidade de um organismo de tolerar doses de agentes tóxicos que são letais para a maioria dos indivíduos de determinada população.

Tem sido demonstrado que pesticidas e outros agentes genotóxicos nocivos ao ambiente são capazes de alterar o perfil genético de algumas populações naturais (Klekowski, 1982). Nesse sentido, estimativas de significância do potencial genotóxico de um agente devem envolver métodos estatísticos de avaliação, identificando ao máximo possível as variáveis e parâmetros utilizados (Lau, 1998). É conhecida a crescente resistência de *A. aegypti* a produtos químicos sintéticos, como o temefós, cipermetrina e deltametrina (Andrade, 1991; MS, 2004; Duque, 2004), que causam efeitos residuais tóxicos ao meio ambiente.

Em decorrência disso, nos últimos anos, estudos em busca de novas alternativas de controle desse mosquito têm aumentado consideravelmente (Bernard, 1995). Laranja *et al.*(2003, 2006) utilizou cafeína para determinar o potencial desse composto como alternativa no controle biológico de imaturos de *A.aegypti* do estado de São Paulo. Extratos de cerca de 300 espécies de plantas (Cyperaceae, Dichapetalaceae, Piperaceae) têm se mostrado ótimas fontes de

atividade larvicida natural para o controle de mosquitos vetores no Brasil (Sharma *et al.*, 1998).

Estudos da atividade de extratos da família Piperaceae foram utilizados para o controle de espécies de larvas de *Aedes* em diversas partes do mundo (Bergeron *et al.*, 1996). Como na Argentina, a Bolívia, o Brasil e Peru, onde foi verificada a atividade larvicida desse gênero contra *A. aegypti* (Chantraine, 1998).

Piper aduncum, da família Piperaceae, é uma planta encontrada naturalmente na Amazônia, cuja folha fornece extrato com atividade larvicida. Os constituintes químicos mais comuns do gênero *Piper* são as amidas, as isobutilamidas, piperidina e pirrolidina (Segupta & Raí 1987). Outro grupo de compostos potencialmente ativos e não menos importantes, que estão presentes neste gênero em proporções consideráveis, são os fenilpropanoides, incluindo-se os monolignolides como o apiol, miristicina, eugenol, safrol, dímeros de fenilpropanoides e dilapiol (Bernard., *et al* 1995). Esses autores compararam o extrato alcoólico de folhas de dezesseis espécies de *Piper* apontando o óleo essencial dilapiol, extrato de *P. aduncum*, como a de maior atividade inseticida em larvas de *A. aegypti*, com 92% de eficiência no controle desses imaturos. O dilapiol (**Figura 1**) é um extrato metanólico que aparece como principal constituinte no óleo essencial de *P. aduncum*, variando de 58% a 88,4% (Smith & Kassim, 1979, Gottlieb. *et al.*, 1981).

O dilapiol tem mostrado atividade larvicida fungicida e antimicrobiana de interesse para a indústria química e farmacêutica. Quando foi associado aos piretróides sintéticos (cipermetrina e deltametrina) também mostrou efeito sinérgico positivo contra larvas de *A. aegypti* (Pohlit *et al.*, 2004).

A falta de estudos do efeito genotóxico do dilapiol em *A. aegypti* nos levou a estudar, pela primeira vez, o seu potencial genotóxico em larvas e pupas para fornecer dados úteis às estratégias de controle de *A. aegypti*, visando a melhoria da qualidade de vida das populações humanas, especialmente da Amazônia.

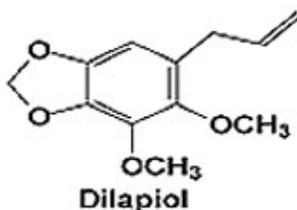


Figura 1. Fórmula química do dilapiol (Souto,2006).

1.4 Teste do micronúcleo (MNT)

Estudos para detecção de micronúcleos podem ser empregados para determinar o potencial genotóxico de produtos químicos sobre alguns organismos, permitindo conhecer os efeitos em nível genético desses agentes. A literatura relata que as anormalidades cromossômicas são resultados de danos causados na molécula de DNA. Perdas de cromossomos, ou partes deles são causados por defeitos nas fibras do fuso, na região centromérica ou em função do grau de condensação cromossômica (Carrasco, 1990).

A avaliação de aberrações cromossômicas é uma parte essencial da Genética Toxicológica, comumente observada por meio de métodos citogenéticos clássicos. Porém, em meados da década de 1960, a obtenção e análise de metáfases em linfócitos humanos consumia muito tempo e requeria pessoal altamente treinado para análise das mesmas. Com isso, surgiu a proposta do método do micronúcleo, por Carter (1967) em camundongo, *in vivo*, cujas células apresentavam sua citocinese inibida pela citocalasina B sem que houvesse bloqueio da mitose. A citocalasina B (CtB) é um inibidor da polimerização da proteína actina requerida para a formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas (Citocinese) (Carter, 1967). Leva ao bloqueio da citocinese, em um tempo mínimo de 6 horas, mas não da divisão nuclear, resultando no acúmulo de células binucleada, a partir de células que passaram apenas por um ciclo de divisão. A citocalasina B passou a ser utilizada por Fenech & Morley (1985), para marcar as células que passaram por um ciclo de divisão, o que veio a ser aplicado nos testes do micronúcleo *in vitro* mais tarde.

1.4.1 Princípio da detecção de micronúcleos (MN)

O micronúcleo se constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separado do núcleo principal. São formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o material nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas (Albertini *et al.*, 2000). São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal e permanecem no citoplasma. Os MNs representam a perda de cromatina (fragmentos), normalmente muito pequenos, em consequência de dano cromossômico estrutural (Fenech *et al.*, 1997).

Estudos demonstram os efeitos de substâncias que provocam quebras cromossômicas ou afetam o fuso da região centromérica, causando o aparecimento de micronúcleos (Heddle *et al.*, 1973). Esses são conhecidos como clastogênicos ou aneugênicos. Os primeiros, referem-se a danos no cromossomo e seus componentes, especialmente no DNA. O segundo, refere-se a eventos que causam danos no fuso e outros componentes envolvidos na separação dos cromossomos (Albertini *et al.*, 2000).

Os micronúcleos têm sido amplamente utilizados na identificação de aumento de frequência de mutações em células expostas a vários agentes genotóxicos (Fenech *et al.*, 1997). Em ratos foi analisada a correlação da frequência MNs e de aberrações cromossômicas a partir do composto Trenimon (Matter & Schmith, 1971). Em peixes, estudos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (bagre) determinaram o potencial genotóxico de diversos produtos resultantes das indústrias têxteis em rios do estado de São Paulo, mediante a análise da frequência de micronúcleos (Matsumoto *et al.*, 1991). Diversos autores apontam a presença de micronúcleos em peixes como biomarcadores cito-genotóxicos, causados por efeitos químicos em efluentes observados, principalmente, nos estágios iniciais de desenvolvimento (Carrasco *et al.*, 1990).

Estudos sobre a ocorrência de micronúcleos em insetos são escassos. Em *Melipona scutellaris* (abelhas) foi estudada a frequência de micronúcleos ao expor esse organismo ao Clorhidrato de Doxorrubicina, a fim de utilizar essa abelha como bioindicador do grau de poluição ambiental, no município de Uberlândia, estado de Minas Gerais, (Borges, 2006).

1.5 Abordagem citogenética

Aedes aegypti tem sido objeto de pesquisas no campo da citogenética. As facilidades de manutenção em condições de laboratório, aliadas à importância epidemiológica desse mosquito, têm contribuído para estimular tais estudos.

Em contraste com a maioria dos grupos de insetos, o cariótipo de aproximadamente 2.500 espécies de mosquitos culicídeos é bastante conservado, consistindo de $2n=6$ cromossomos, como em *A. aegypti* (**Figura 2**). Apresenta cromossomos sexuais (par I), de menor tamanho e dois autossomos, sendo o par II formado por cromossomos metacêntricos, de maior tamanho, e o par III de cromossomos submetacêntricos, de tamanho intermediário é portador de uma

constricção secundária no terço distal do braço longo (Mc Donald & Raí, 1970). Estes cromossomos apresentam pareamento somático, fenômeno em que a associação entre os cromossomos homólogos é íntima, durante as divisões mitóticas (Raí, 1970).



Figura 2. Cariótipo de *A. aegypti* (fonte: Hereira Rojas & Rafael, 2007)

Pesquisas são realizadas em *A. aegypti* por sua alta importância epidemiológica seu baixo número cromossômico, ampla distribuição geográfica e variabilidade genética (Forattini, 2002). Considerando os estudos cromossômicos em *A. aegypti* os seus núcleos politênicos que são extraídos de diferentes tecidos (glândulas salivares, estômago, reto) foram observados por Gillham (1957). Devido à interrupção em vários pontos de quebra nos braços cromossômicos e dificuldade de espalhamento, estes tiveram sua estrutura pouco analisada (Sharma, 1998).

O método de impregnação das regiões organizadoras nucleolares com nitrato de prata (Ag-NOR) tem sido utilizado para marcar as regiões organizadoras do nucléolo (RONs), caracterizando regiões cromossômicas que contêm genes ribossomais (DNAr) em cluster. Essas regiões podem ser detectadas por métodos citogenéticos tais com o método Ag-NOR e por hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescence in situ hybridization*- FISH). Além desse método, a RON tem sido detectada em espécies do gênero *Aedes* (Lima-Catelani, 1994), e nos cromossomos mitóticos e politênicos de *Anopheles darlingi*, *Anopheles nuneztovari* e do complexo *Anopheles albitarsis*, com sonda de DNAr por meio da técnica de Rafael *et al.*(2003).

Estudos citogenéticos usando AG-NOR foram realizados em populações de *A. aegypti* de São Paulo, revelando anomalias cromossômicas que foram atribuídas ao uso de inseticidas (Lima-Catellani, 1994).

A genética toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e aneuploidias (Richard, 1994). Citam-se experimentos sobre alterações genéticas para evitar a proliferação do vírus da dengue nas glândulas salivares de *Aedes* (Olson *et al.*, 1996) e danos ao DNA (nucleolares e cromossômicos) de espécies de

Drosophila, peixes e humanos (Carrasco *et al.*, 1990). No presente estudo, o dilapiol foi utilizado pela primeira vez, para avaliar o seu potencial em nível do DNA cromossomal em *A. aegypti*.

1.6 Objetivos

Gerais

- 1 - Determinar o efeito cito-genotóxico do óleo essencial dilapiol de *Piper adundum* (dilapiol) em núcleos e micronúcleos de *A. aegypti*.
- 2 - Investigar a ocorrência de danos nucleares em larvas e pupas de *A. aegypti*, de três bairros da cidade de Manaus (AM), utilizando o dilapiol.

Específicos

- 1 - Implantar no Laboratório de Malária e Dengue do INPA o estudo de genotoxicidade de extrato de óleo natural em espécies de *Aedes*.
- 2 – Determinar o potencial larvicida do dilapiol em *A. aegypti*, em concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL nas gerações F1, F2, F3, F4.
- 3 – Detectar o efeito do dilapiol sobre a oviposição de fêmeas expostas às concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL de dilapiol.
- 4 - Investigar a frequência de anormalidades nucleares (NA).
- 5 - Avaliar a frequência de células com micronúcleos em *A. aegypti* expostas às concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL do dilapiol.
- 6 - Caracterizar anomalias em cromossomos de *A. aegypti* expostos ao dilapiol.

2. Material e Métodos

2.1 Áreas de estudo

A cidade de Manaus está situada no encontro dos rios Negro e Amazonas, na Amazônia central (3° 08'07" latitude sul, 60° 01'34" longitude oeste) numa área de 11.485 Km², com uma população estimada de 1.405.835 habitantes (IBGE, 2005).

Manaus tem crescido na sua periferia, por ocasião de invasões, acarretando o surgimento e o crescimento de áreas urbanizadas em ambientes, até então, naturais. Nestas áreas, a falta de serviços de saneamento básico e a precariedade das residências nas proximidades da mata propiciam o acúmulo de artefatos de uso humano no ambiente, contribuindo para proliferação de mosquitos aumentando, assim, o contato homem-vetor, favorecendo a transmissão de diversas doenças (Tadei, 2001).

Em locais, com essas condições na cidade de Manaus, foram obtidas larvas e pupas para a realização do presente estudo. Os imaturos foram coletados em dois bairros da área urbana: Japiim, nos meses de julho a setembro de 2005; Cidade Nova, de outubro a dezembro de 2005 e, em um bairro de área peri-urbana: lago Puraquequara, de janeiro e fevereiro de 2006 e de fevereiro a março de 2007.

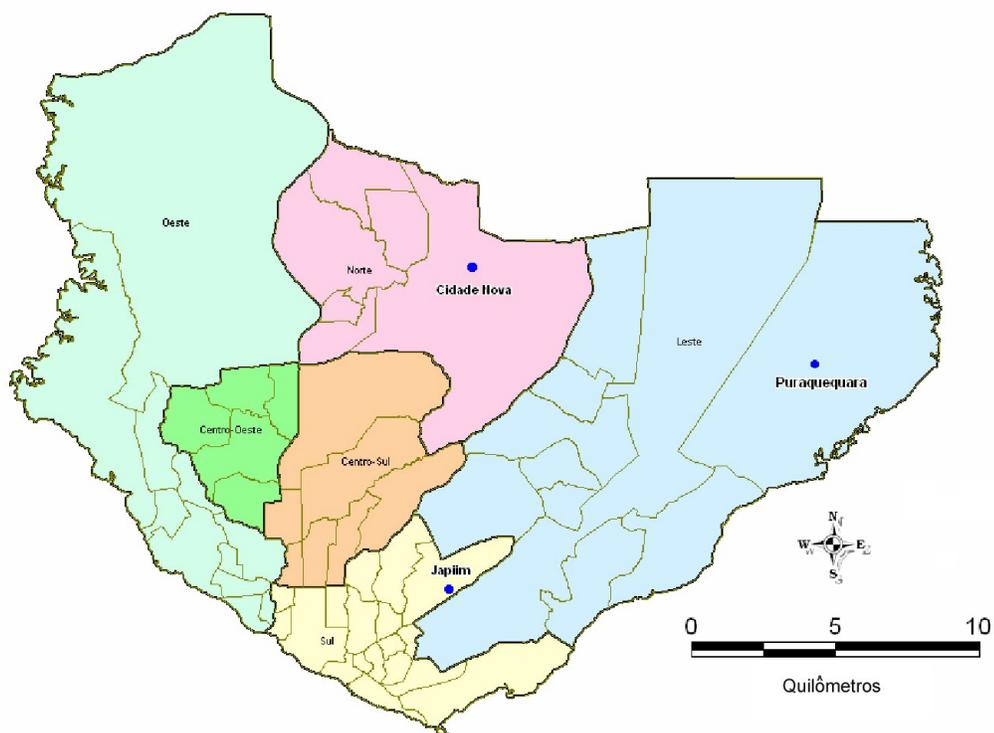


Figura 3. Mapa da cidade de Manaus por zona e bairros, com a localização dos pontos de coletas. Fonte: ASTEC/FVS/AM – INPA 2006.

O bairro Japiim (S -03° 07'05'' W -59° 58'37''), localiza-se na zona Sul de Manaus, com uma população de 56.669 habitantes (IBGE, 2001). O Igarapé do Quarenta possui alto índice de poluição de suas águas, por detritos orgânicos e outros materiais descartados. Ao longo desse córrego foram instaladas armadilhas no intradomicílio de residências.

O bairro Cidade Nova (S -03° 01'00'' W -59° 58'13''), situa-se na zona Norte de Manaus, com uma população de 95.350 habitantes. Neste bairro as armadilhas foram colocadas em residências localizadas em áreas distantes da mata. Entre as áreas do presente estudo, esse bairro é o mais populoso. Nele ocorrem os mais altos índices de casos de dengue.

O bairro Puraquequara (S -03° 06' 08'' W -059° 54' 59''), localiza-se na Zona Leste, a 30 quilômetros do centro da cidade de Manaus. É considerada uma área de atração turística, onde ocorrem atividades comerciais e de lazer. Tais atividades têm acarretado a poluição do lago Puraquequara em toda a sua extensão.

2.2 Coleta e manutenção de *A. aegypti*

Durante as coletas, montou-se quatro armadilhas, sendo uma em cada residência de cada área estudada, para captura das formas imaturas. As armadilhas são pneus cortados, horizontalmente, e preenchidos com água em 2/3 de sua capacidade, em cuja superfície interna da parede ocorreu as desovas (SUCEN, 1997; Braga *et al.*, 2000) (**Figura 4**). Manteve-se entre as armadilhas uma distância mínima de 220 metros, devidamente identificada. Foram instaladas a uma altura de 1 metro do solo próximas ao abrigo de *A. aegypti* (SUCEN, 1997).

Os imaturos capturados nos pneus foram coletados semanalmente com peneira plástica de 10cm de diâmetro e conta gotas, transferidos para frascos de boca larga e transportados em uma caixa térmica de poliestireno ao Insetário do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde (CPCS), do INPA, Manaus-AM. Os imaturos foram mantidos em cubas esmaltadas de 10 cm de diâmetro, por seis centímetros de altura, cobertas com filó preso por um elástico, até a emergência dos adultos. Os mosquitos coletados foram identificados com as chaves para a família Culicidae (Forattini, 1962).

Os exemplares adultos (um macho e uma fêmea) foram transferidos para um copo parafinado coberto com filó, para cruzamento. Os machos se alimentaram com

solução glicosada e as fêmeas com sangue de *hamster* (*Mesocricetus aureatus*), até a oviposição. A obtenção das desovas, larvas, pupas e adultos foi de acordo com procedimentos previamente estabelecidos no Laboratório de Vetores da Malária/Dengue do INPA.



Figura 4. Armadilha de pneu para coleta dos imaturos de *A. aegypti*

2.3 Bioensaio toxicogênômico

Estudos com extrato de dilapiol em imaturos de *A. aegypti* ainda são escassos. Os bioensaios foram realizados com um delineamento inteiramente aleatório, para registrar a mortalidade em ovos, larvas e pupas e danos genotóxicos em larvas e pupas de *A. aegypti*. Durante quatro gerações sucessivas (F1, F2, F3 e F4) foi testado o potencial do dilapiol sobre a oviposição dos mosquitos fêmeas. Utilizou-se o extrato dilapiol, fornecido pelo Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN), do INPA, que foi obtido por Pimentel *et al.* (1998).

Todos os bioensaios foram realizados em condições controladas no Laboratório de Vetores da Malária e Dengue do INPA a uma temperatura média de 26° a 30° graus centígrados. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas a cada 48 horas com farinha de peixe e pó de fígado. Um macho e uma fêmea foram acondicionados em copos parafinados de 500 mL, formando casais da mesma linhagem. A partir dos ovos postos pelas fêmeas, estabeleceram-se as gerações F1, F2, F3 e F4.

Cerca de 3.000 ovos de *A. aegypti*, contados sob estereomicroscópio, de cada localidade foram expostos a três tratamentos. O primeiro com água de poço artesiano (controle negativo), o segundo com dilapiol a 400µg/mL, uma concentração letal 50 (CL₅₀), segundo Pohlit *et al.* (2004) e o terceiro na

concentração de 200µg/mL. Um total de 40 ovos foram adicionados em copo de 40 mL, perfazendo um total de cinco réplicas para cada geração. A mortalidade dos ovos e das larvas expostos ao óleo dilapiol foi registrada nos intervalos de 24, 36, 48, e 72 horas. Também, registrou-se o número de ovos postos pelas fêmeas expostas e seus controles negativos.

Cerca de 2.400 ovos eclodiram e em torno de sete e dez dias atingiram os estágios de pupa e adulto, respectivamente. Em cada geração foram utilizados cerca de 120 ovos expostos ao dilapiol nas concentrações de 200µg/mL e 400µg/mL. No teste com indivíduos controle, utilizou-se igual quantidade de ovos em copos contendo água de poço artesiano.

2.4 Preparações citológicas

As preparações citológicas foram obtidas a partir de gânglios cerebrais de larvas de 4º estágio, e ovários de pupas gerações das F1, F2, F3 e F4, segundo as técnicas de esmagamento (French *et al.*,1962; Kumar & Collins,1994; Rafael, 2001, com modificações).

As larvas e pupas foram removidas das bandejas, colocadas em água destilada e transferidas para uma lâmina de vidro, sob estereomicroscópio. Com a ajuda de dois micro-estiletos os órgãos foram dissecados em uma gota de fixador I (Carnoy e água destilada 1:5), durante 30 segundos. Em seguida foi adicionado o fixador II (carnoy e água destilada 1:1), por um minuto e o fixador III (ácido acético, ácido láctico e água destilada 1: 1: 1), por 5 minutos. As preparações citológicas foram, então, cobertas com lamínula e esmagadas. As lâminas destinadas à técnica de impregnação pelo nitrato de prata (Ag-NOR) foram secas ao ar e armazenadas em refrigerador a 4º C.

O método de coloração convencional com orceína lacto-acética, que evidencia a organização da cromatina, é uma ferramenta útil para identificar cromossomos normais e anomalias cromossômicas associadas a algum problema patológico, ou mesmo para fins comparativos em estudos evolutivos. Já a impregnação pelo nitrato de prata é um método que detecta proteínas ribossômicas específicas presentes nas regiões organizadoras nucleolares (RONs), que estiveram ativas na intérfase precedente e a mecanismos relacionados à expressão gênica (Goodpasture & Boom, 1975; Howell & Black, 1980).

Neste trabalho, utilizou-se a coloração convencional e impregnação por nitrato de prata em *A. aegypti* não como métodos comparativos, mas para avaliar os danos ocasionados no DNA pelo dilapiol, empregando-se metodologias complementares, as quais foram utilizadas com sucesso em *A. aegypti*.

2.4.1 Coloração convencional

As lâminas contendo material celular preparadas, previamente, foram utilizadas para coloração convencional. Adicionou-se uma gota deorceína lactoacética (2%), onde permaneceram por um minuto. O material foi coberto com lamínula e esmagado. As lamínulas foram vedadas com esmalte incolor e as lâminas foram armazenadas a -20°C.

2.4.2 Impregnação por nitrato de prata

As preparações citológicas obtidas previamente foram submetidas ao método de Ag-NOR (Howell & Black, 1980), com modificações (Rafael, 2003). Utilizou-se uma gota da solução reveladora coloidal A (1 g de gelatina 50 ml de água milli-Q e ácido fórmico 1%) e duas gotas da solução B (1 g de Ag NO₃ e 2ml de água milli-Q). A lâmina foi coberta com lamínula, transferida para câmara úmida e esta colocada em estufa à 58°C, por 8 minutos. Foram imediatamente lavadas em água milli-Q, coradas com Giemsa 2% em tampão fosfato (pH 6,8), e secas ao ar.

2.5 Análise de alterações nucleares, freqüência de micronúcleos e anomalias cromossômicas

A análise da freqüência de micronúcleos foi a partir de 1.000 células em cada preparação citológica, sob microscópio de luz. Utilizou-se sete indivíduos para as concentrações de 200 µg/mL, 400 µg/mL de dilapiol e grupos controle, totalizando 84 amostras durante quatro gerações, em cada localidade estudada.

A freqüência de anormalidades nucleares (células polinucleadas e com broto) e de anomalias cromossômicas (pontes anafásicas e falhas e quebras cromossômicas), foram analisadas a partir de 600 preparações citológicas entre células de gânglios cerebrais e ovários, respectivamente.

2.6 Microfotografias

Os núcleos, micronúcleos e cromossomos foram analisados e fotografados em microscópio de contraste de fase *Axioplan Zeiss*. As microfotografias foram

obtidas com objetiva de imersão 100x e optovar 1x, 1,25x e 1,6x. As películas foram reveladas com revelador *Kodak Dektol* e os negativos copiados em papel *Kodabromide Print*.

2.7 Análise estatística

A mortalidade das larvas assim como a oviposição pelas fêmeas expostas ao dilapiol e daquelas pertencentes aos grupos controle foram analisadas estatisticamente, por meio do teste ANOVA fatorial (3x4x3), para determinar a interação entre os fatores analisados: local de coleta, gerações F1, F2, F3, F4 e tratamento. Esse teste consiste na combinação de vários fatores ou conjuntos de tratamentos com as respectivas interações. Neste caso, refere-se aos fatores A (3) B (4) e C(3) testados de modo isolado e combinados.

A análise estatística das alterações nucleares, frequência de micronúcleos e anomalias cromossômicas em *A. aegypti* foi realizada, usando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis (1993), considerando as interações onde foi realizada a variável tratamento (dilapiol a 200µg/mL e 400µg/mL).

Os tratamentos que apresentaram diferenças significativas foram submetidos ao teste pós-ANOVA de Tukey, a 5% de significância. Valores de frequência foram transformados em Arco-seno (raiz quadrada de x) (x=freqüência), e foram considerados normais pelo teste de Levine.

3. Resultados

3.1 Efeito do dilapiol na mortalidade de *A. aegypti*

O efeito dos tratamentos com dilapiol nas concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL sobre a mortalidade das larvas de *A. aegypti* ocorreu em intervalos de 24, 36, 48, e 72 horas, em cada uma das quatro gerações, dos bairros Japiim, Cidade Nova e Puraquequara.

Na mortalidade das larvas expostas ao dilapiol foi observada diferença estatisticamente significativa quando estas foram comparadas àqueles indivíduos controles negativo (8%), segundo o teste χ^2 ($p < 0,05$), em cada uma das localidades. O maior índice de mortalidade de *A. aegypti* exposto ao dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL foi de 38% e 44%, respectivamente, no período de 36 horas, ao longo das quatro gerações (**Figura 5**).

O índice de mortalidade não apresentou diferença significativa quando os indivíduos expostos à concentração de 200 µg/mL foram comparados com aqueles tratados com dilapiol a 400 µg/mL, χ^2 ($p > 0,05$), nem quando estes foram comparados entre as três localidades (Cidade Nova, Japiim, Puraquequara). Ainda, os valores estatísticos para mortalidade obtidos nas quatro gerações (F1, F2, F3, F4) não apresentaram diferença significativa, segundo o teste χ^2 ($p > 0,05$).

Quanto à longevidade dos indivíduos adultos ($n=2.426$), que sobreviveram aos experimentos (56,3%) não foi registrada diferença significativa, segundo o teste χ^2 ($p > 0,05$) dos indivíduos expostos ao dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL, das três localidades.

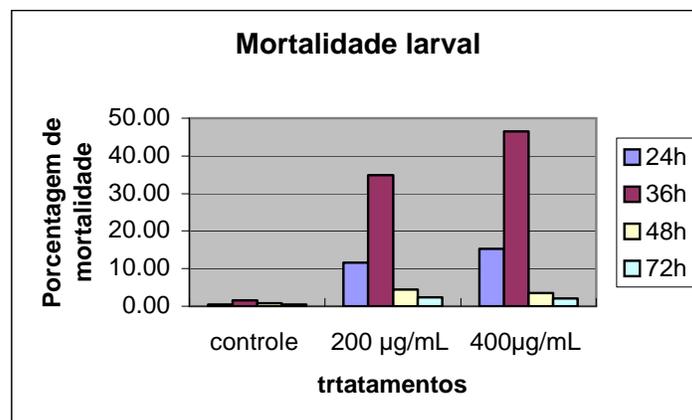


Figura 5. Mortalidade de larvas de *A. aegypti* expostas ao dilapiol (Controle, 200 µg/mL e 400 µg/mL), nos intervalos de 24, 36, 48 e 72 horas.

3.2 Efeito do Dilapiol na oviposição de *A. aegypti*

Registrou-se o número de ovos de fêmeas de *A. aegypti* expostas às concentrações de dilapiol (200 µg/mL e 400 µg/mL), n= 5867 e n= 6238 respectivamente. A taxa de oviposição foi comparada com o número de ovos postos pelas fêmeas do grupo controle (n= 12158) tratada com água de poço artesiano, durante as gerações F1, F2, F3, F4. Observa-se na **Figura 6**, que apenas nos grupos expostos ao dilapiol ocorreu diminuição estatisticamente significativa, segundo o teste ANOVA ($p < 0.05$). Mas, não houve diferença significativa entre os grupos expostos a esse óleo essencial (200 µg/mL e 400 µg/mL), segundo o teste ANOVA, ($p > 0,05$), nos indivíduos estudados das três localidades.

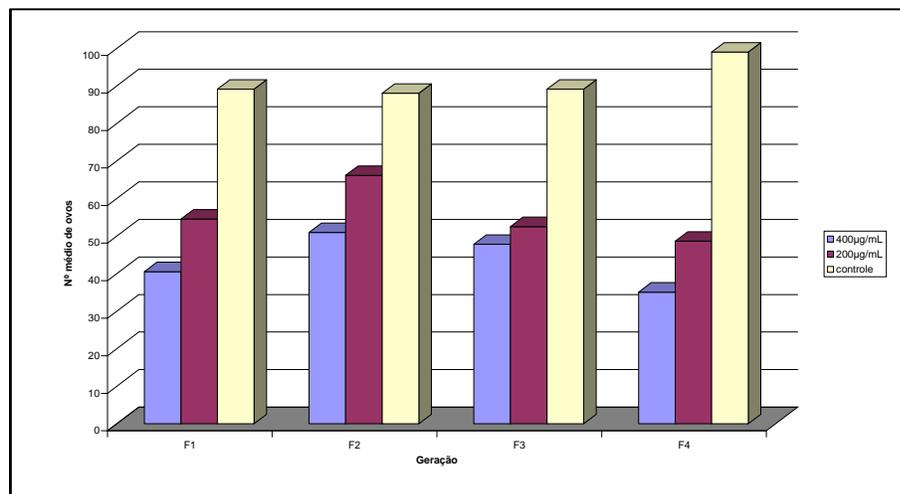


Figura 6. Oviposição (número médio de ovos) das fêmeas expostas às concentrações de dilapiol (200µg/mL e 400µg/mL) e grupos controle, durante as quatro gerações sucessivas, nas três localidades.

3.3 Potencial genotóxico do dilapiol em *A. aegypti*

Analisou-se preparações citológicas de gânglios cerebrais de larvas e de ovários de pupas de *A. aegypti*, das três localidades, com os métodos de coloração convencional e de impregnação por nitrato de prata (**Tabela 1**).

Tabela 1. Preparações citológicas dos indivíduos submetidos aos métodos de coloração convencional e de Ag-NOR, das três localidades.

Bairros	Órgão	Técnica de coloração					
		Orceína			Nitrato de Prata		
		Controle	200µg/mL	400µg/mL	Controle	200µg/mL	400µg/mL
Japiim	Cérebro	21	35	27	11	9	11
	Gônada	28	31	35	9	3	5
	Total	49	66	62	19	12	16
Cidade Nova	Cérebro	12	17	13	13	12	17
	Gônada	13	14	17	16	13	14
	Total	31	31	30	28	25	31
Puraquequara	Cérebro	15	16	26	17	17	15
	Gônada	12	19	20	16	21	20
	Total	27	35	46	33	38	35

3.3.1 Anormalidades nucleares em *A. aegypti*

Os gânglios cerebrais de larvas de 4^o estágio dos indivíduos expostos ao dilapiol a 200µg/mL e 400µg/mL e seus controles negativo foram analisados quanto à frequência de anormalidades nucleares (**Figura 7**). Registrou-se a presença de células mononucleada (**Figura 7A**), binucleada e polinucleada expostas ao dilapiol a 200µg/ml (**Figura 7B,C**) e com broto expostas ao dilapiol a 400µg/mL (**Figura 7D**).

A frequência de anormalidades nucleares de larvas expostas ao dilapiol a 200µg/mL e 400µg/mL e seus controles negativo foi analisada pelo teste de Kruskal Wallis (1993). A **Figura 8** mostra diferença significativa ($p < 0,05$) nas frequências de células com anormalidades nucleares. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dessas alterações ($p > 0,05$) quando os grupos expostos às concentrações de 200µg/mL e 400µg/mL das quatro gerações foram comparados entre si, nas três localidades. O resultado foi similar para a presença de células com brotos.

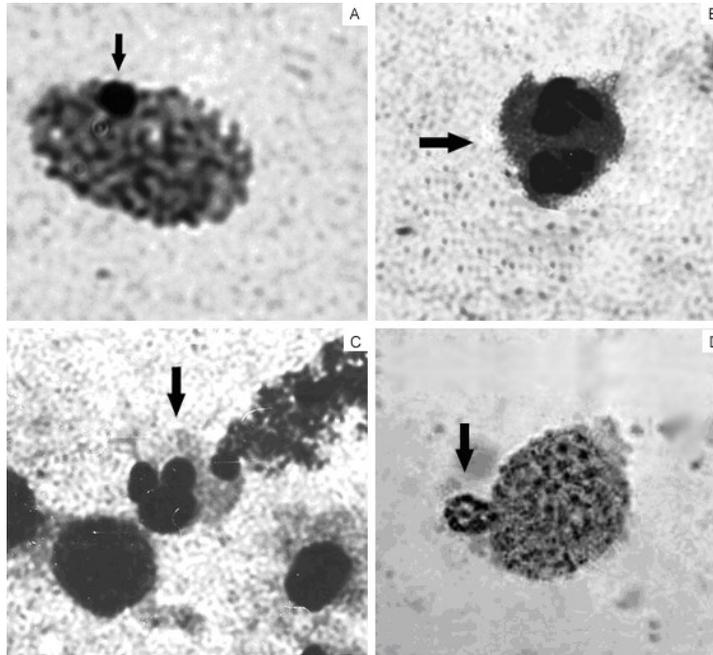


Figura 7. Larvas de *A.aegypti*. Impregnação por nitrato de prata. Célula interfásica mononucleada de indivíduo controle (A). Célula binucleada exposta a 200µg/mL de dilapiol (B). Célula polinucleada exposta a 400µg/mL de dilapiol (C). Célula com broto exposta a 400µg/mL de dilapiol (D). x.1,600.

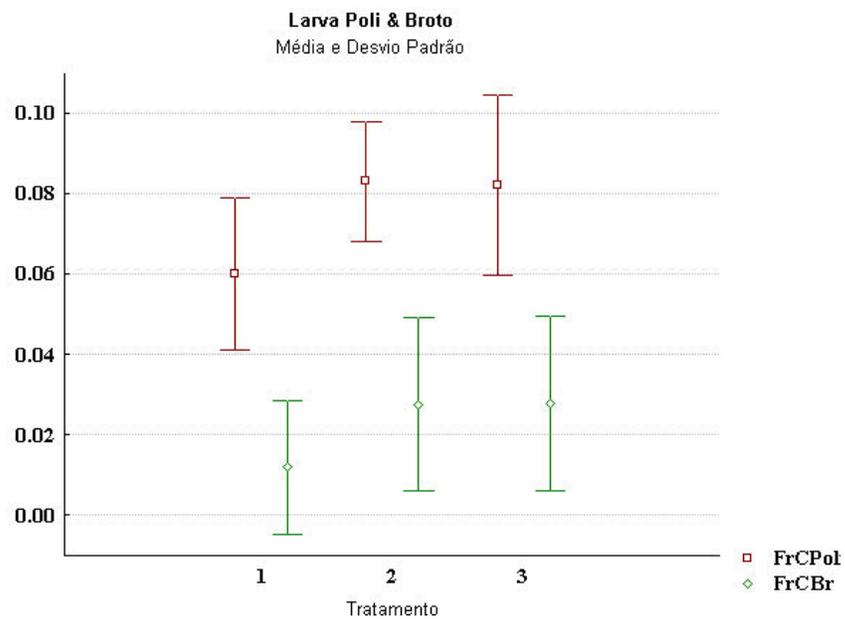


Figura 8. Média e desvio padrão da frequência de células polinucleadas e com broto em larvas de *A. aegypti*. 1= controle, 2= 200µg/mL, 3= 400µg/mL. FrCPoli: Frequência de células polinucleadas. FrCBr: Frequência de células com brotos.

Em pupas foi detectada a presença de células binucleadas (**Figura 9A**), polinucleadas (**Figura 9B**) e com brotos (**Figura 9C, D**) expostas ao dilapiol a 200µg/mL e 400µg/mL.

Aumento estatisticamente significativo nas anormalidades nucleares de *A. aegypti* ($p < 0,05$) foi observado, mediante o teste de Kruskal Wallis quando os indivíduos expostos ao dilapiol (200µg/mL e 400µg/mL) foram comparados aos grupos controle. Porém, quando apenas os indivíduos expostos ao dilapiol foram comparados entre si não houve diferença significativa nas freqüências das alterações nucleares. O resultado foi similar para a presença de células com brotos.

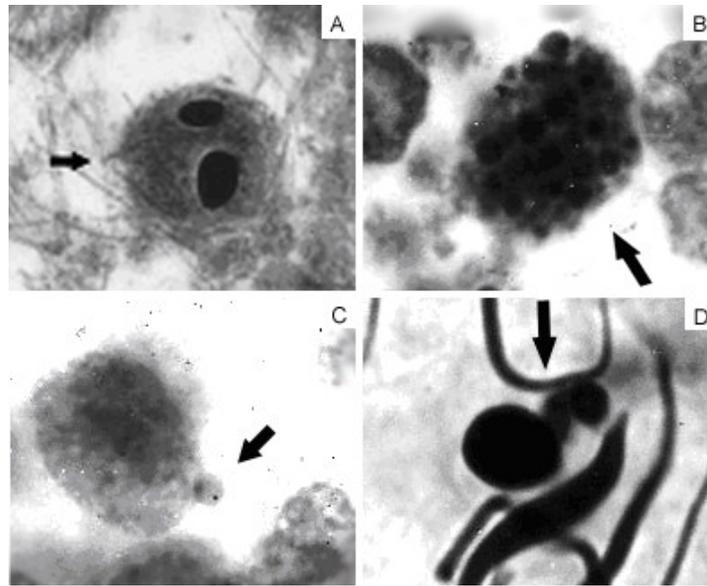


Figura 9. Impregnação por nitrato de prata. Pupas de *A. aegypti*. Células binucleadas e polinucleadas de ovário expostas ao dilapiol 200µg/mL, bairro Japiim (A,B). Coloração convencional em *A. aegypti*, mostrando célula com broto em ovário de pupa exposta a 400µg/mL de dilapiol, Puraquequara (C). Impregnação por nitrato de prata em *A. aegypti*, mostrando célula de ovário com broto em pupa exposta ao dilapiol na concentração de 400µg/mL, Cidade Nova (D). x1,600.

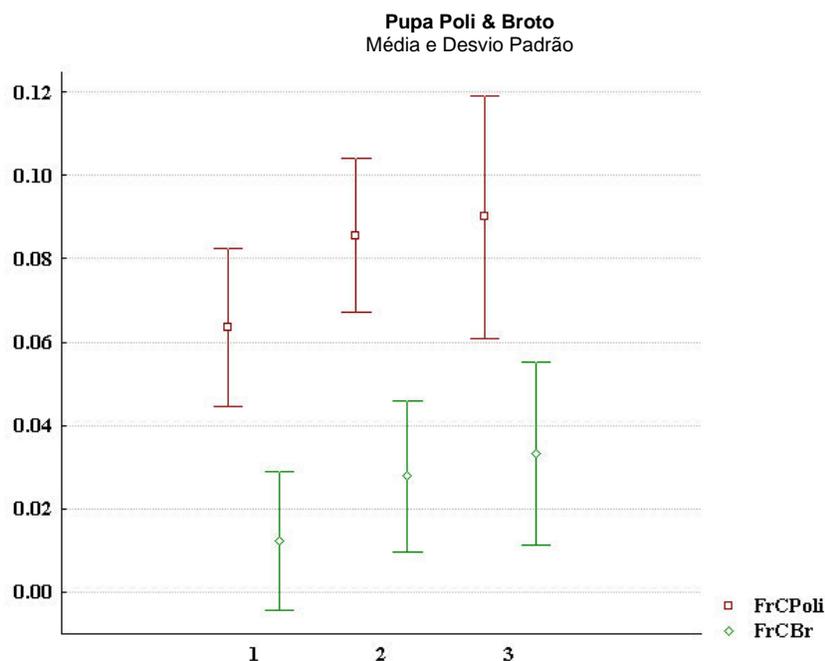


Figura 10. Média e desvio padrão da freqüência de células polinucleadas e células com broto em pupas de *A. aegypti*. 1= controle; 2= 200µg/mL; 3= 400µg/mL. FrCPoli: Freqüência de células polinucleadas. FrCBr: Freqüência de células com brotos.

3.2.2 Freqüência de micronúcleos em *A. aegypti*

Em células de gânglios cerebrais de larvas de *A. aegypti* analisou-se a presença, de micronúcleos em núcleos interfásicos de indivíduos expostos a 200 µg/mL de dilapiol (**Figura 11A**). Verificou-se, também, micronúcleos em metáfases mitóticas diplóides e tetraplóides (**Figura 11B,C**), respectivamente.

Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na freqüência de micronúcleos de larvas foi registrada por meio do teste de Kruskal Wallis (1993), a 5% de significância em indivíduos expostos ao dilapiol a 200µg/mL (0,016) e 400µg/mL (0,017), quando estes foram comparados com seus controles negativo (0,004). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses tratamentos (**Figura 12**).

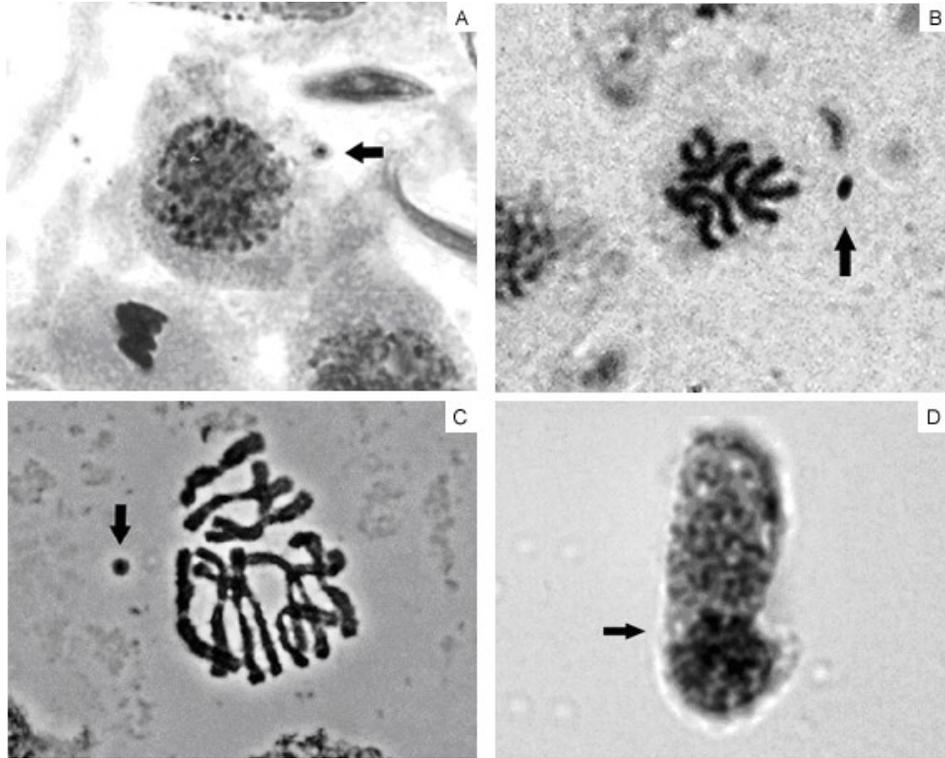


Figura 11. Coloração convencional em larva de *A. aegypti*. Célula interfásica com micronúcleo exposta a 200 µg/mL de dilapiol (A). Metáfases de células diplóide e tetraplóide com micronúcleo em indivíduo exposto ao dilapiol 400 µg/mL (B,C), respectivamente. Célula com alteração morfológica de amostra exposta ao dilapiol a 200 µg/mL (D).x.1,600.

Larva Micronúcleos & Alterações nucleares
Média e Desvio Padrão

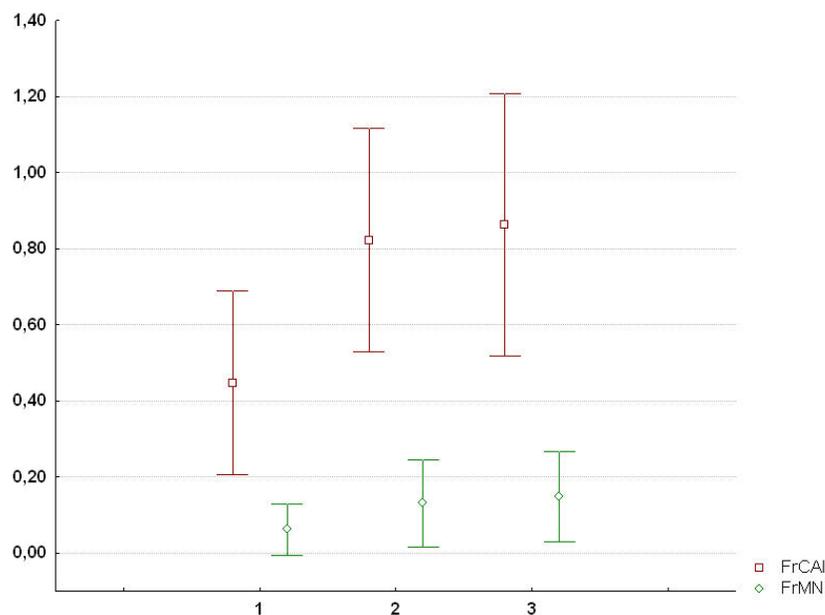


Figura 12. Média e desvio padrão das frequências de células com presença de micronúcleos e alterações nucleares em larvas expostas ao dilapiol e seus controles negativos. 1= controle; 2= 200µg/mL; 3= 400µg/mL. FrCAI: Frequência de células com alteração nuclear. FrMN: Frequência de células com micronúcleos.

Em pupas foram observados micronúcleos de células em intérfase (**Figura 13 A, B**), metáfase (**Figura 13C**) e telófase (**Figura 13D**). Em indivíduos expostos ao dilapiol a 200µg/mL e 400µg/mL, a frequência estatística foi significativa para alterações nucleares (0,091 e 0,092) e micronúcleos (0,025 e 0,027) respectivamente, ao ser comparados com seus controles negativo (0,045 e 0,018), por meio do teste de Kruskal Wallis (1993), a 5% de significância (**Figura 14**).

Os dados estatísticos comparativos entre os indivíduos expostos às duas concentrações de dilapiol (200µg/mL e 400µg/mL) não mostraram diferença significativa na frequência de alterações nucleares e frequência de micronúcleos.

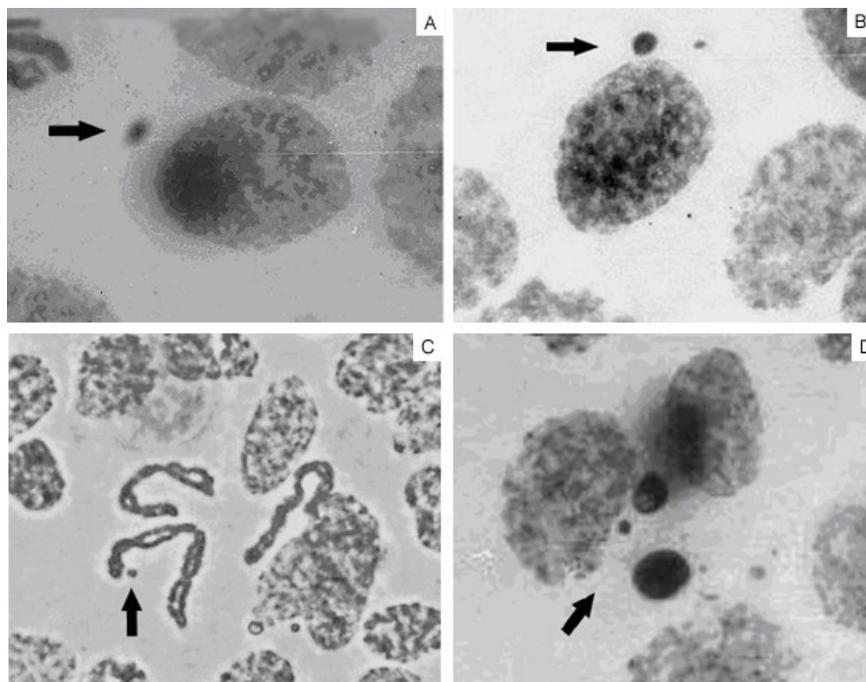


Figura 13. Coloração convencional em pupas de *A. aegypti*. Micronúcleo em ovário de pupa controle exposta a 200 µg/mL de dilapiol, bairro Cidade Nova (A, B). Micronúcleo em célula de ovário exposta ao dilapiol em concentração de 400 µg/mL, bairro Japiim (C). Micronúcleo de célula de ovário exposta ao dilapiol a 200 µg/mL, bairro Japiim (D). x1,600.

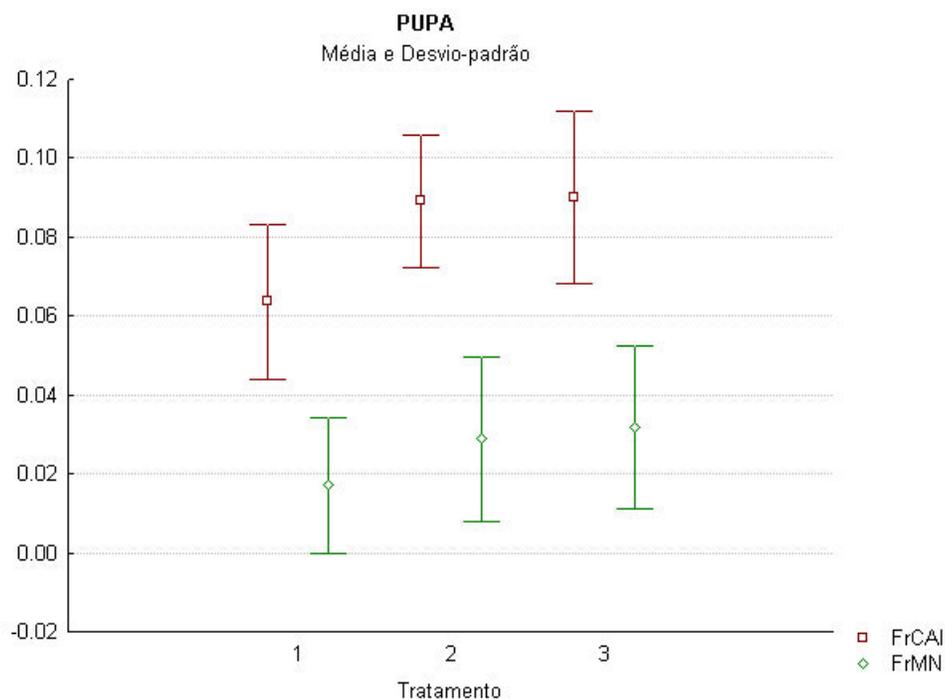


Figura 14. Média e desvio padrão das frequências de células com presença de micronúcleos e alterações nucleares em pupas expostas ao dilapiol e seus controles negativos. 1 (controle); 2 (200µg/mL); 3 (400µg/mL).

3.4 Anomalias cromossômicas em *A. aegypti*

Analisou-se 30 células em divisão de cada larva e pupa de *A. aegypti* dos bairros Japiim, Cidade Nova e Puraquequara. A **Tabela 2** mostra as anomalias cromossômicas (quebras e atrasos cromossômicos e pontes anafásicas) e o número de indivíduos, de cada geração estudada.

Os dados comparativos das anomalias cromossômicas dos indivíduos das três localidades por não terem apresentado diferença estatística foram agrupados entre si.

Tabela 2. Anomalias cromossômicas em células de larvas e pupas de *A. aegypti*, dos bairros Japiim, Cidade nova e Puraquequara, submetidas aos métodos de coloração convencional e de impregnação pelo nitrato de prata, durante quatro gerações.

Estágio	Tratamento	Geração	N° Ind	Cel/divisão	Quebras Cromossômicas	Atraso Cromossômico	Ponte Anafásica
Larva	Controle	1	16	480	0	0	0
		2	18	508	2	0	1
		3	18	546	4	0	1
		4	16	480	0	0	2
		Subtotal	68	2014	6	0	4
		Freq (%)			0.30	0.00	0.20
	200µg/ml	1	16	496	2	0	1
		2	18	537	7	0	3
		3	18	535	10	1	6
		4	18	536	9	2	8
		Subtotal	70	2104	28	3	18
		Freq (%)			1.33	0.14	0.86
400µg/ml	1	18	534	3	0	0	
	2	17	517	9	0	6	
	3	19	569	12	0	7	
	4	18	547	11	4	14	
	Subtotal	72	2167	35	4	27	
	Freq (%)			1.62	0.18	1.25	
Pupa	Controle	1	19	564	0	0	0
		2	18	529	2	0	1
		3	16	487	2	0	2
		4	14	431	0	0	0
		Subtotal	67	2011	4	0	3
		Freq (%)			0.20	0.00	0.15
	200µg/ml	1	16	490	2	0	2
		2	20	600	11	0	5
		3	19	591	12	1	10
		4	16	482	10	2	8
		Subtotal	71	2163	35	3	25
		Freq (%)			1.62	0.14	1.16
400µg/ml	1	16	482	3	0	4	
	2	18	551	15	0	5	
	3	22	923	18	2	15	
	4	20	613	17	3	10	
	Subtotal	76	2569	53	5	34	
	Freq (%)			2.06	0.19	1.32	

3.4.1 Anomalias cromossômicas em larvas de *A. aegypti*

A análise dos neuroblastos de larvas de quarto estágio de *A. aegypti* (indivíduo controle) mostrou anáfase normal (**Figura 15A**). Nos indivíduos submetidos ao dilapiol a 200 µg/mL, registrou-se ponte anafásica e falha cromossômica (**Figura 15B, C**), respectivamente. Nos indivíduos tratados com dilapiol a 400 µg/mL, observou-se anáfase com atraso cromossômico (**Figura 15D**) e quebras cromossômicas (**Figura 15E, F**).

As aberrações cromossômicas em larvas de *A. aegypti* foram analisadas pelo teste de Kruskal Wallis ao nível de significância a 5%. Registrou-se diferença estatisticamente significativa no número de pontes anafásicas e quebras cromossômicas ($p < 0,05$) nos indivíduos expostos ao dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL em comparação aos grupos controle (**Tabela 3**). Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de atrasos cromossômicos ($p > 0,05$) entre os indivíduos expostos ao dilapiol.

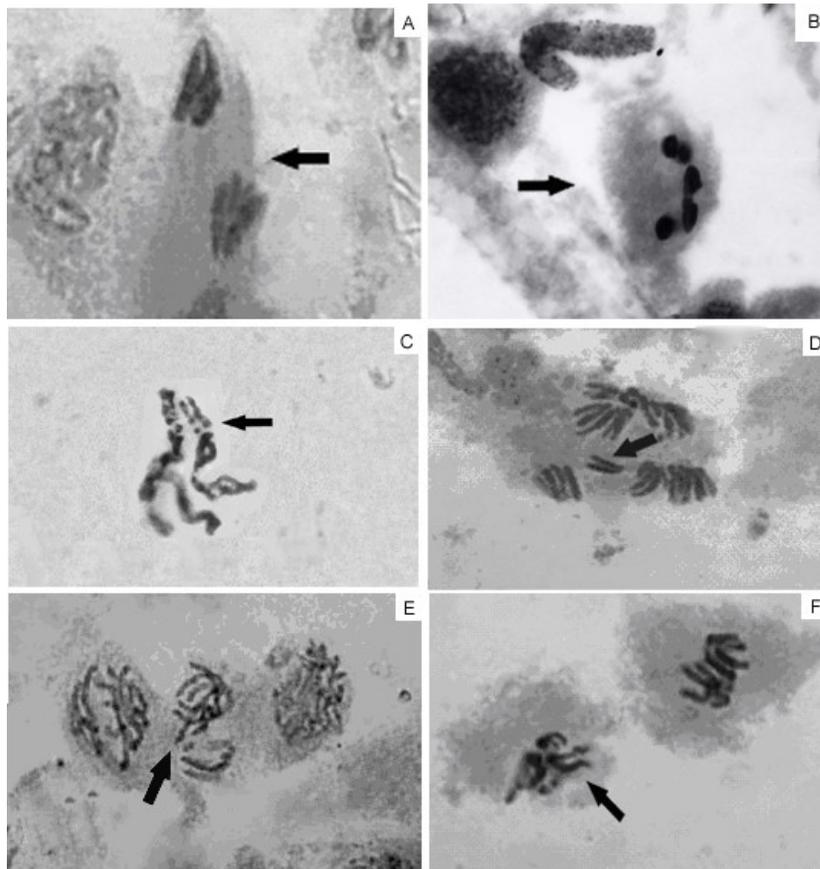


Figura 15. Coloração convencional em larvas de *A. aegypti*. Anáfase normal em larva controle (A). Ponte anafásica (B) e quebra cromossômica (C) em células de indivíduos expostos a dilapiol 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Anáfase com atraso cromossômico em indivíduo exposto a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dilapiol (D). Quebra cromossômica, durante a anáfase de larva exposta a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E). Quebra cromossômica durante a metáfase em indivíduo exposto ao dilapiol 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F). Aumento: x1,600.

Tabela 3. Frequência de anomalias cromossômicas (ponte anafásica, atraso cromossômico, quebras cromossômicas) em gânglios cerebrais de larvas analisadas pelo teste de Kruskal Wallis (1993), a 5% de significância. As letras (^a e ^b) na mesma linha indicam diferença significativa para o Teste de Kruskal-Wallis (1933).

Anomalias cromossômicas	Tratamentos			p
	Controle	200µg/mL	400µg/mL	
Ponte anafásica	5122,5 ^a	6392,5 ^b	7013 ^b	0,001
Atraso cromossômico	5984 ^a	6271,5 ^a	6272,5 ^a	0,214
Quebras cromossômicas	4890 ^a	6423,5 ^b	7214,5 ^b	0,000

3.4.2 Anomalias cromossômicas em pupas de *A. aegypti*

Observou-se em pupas pontes anafásicas (**Figura 16B, C**) entre os indivíduos expostos ao dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL e seus controles negativo (**Figura 16A**). Atraso cromossômico em anáfase (**Figura 16D**) e presença de quebra cromossômica em paquíteno de ovário exposto ao dilapiol (**Figura 16E, F**) foram registrados.

A detecção de diferenças na frequência de anormalidades cromossômicas em indivíduos de *A. aegypti* expostos ao dilapiol e seus controles negativo foi detectada pelo teste de Kruskal Wallis, que mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme a **Tabela 4**.

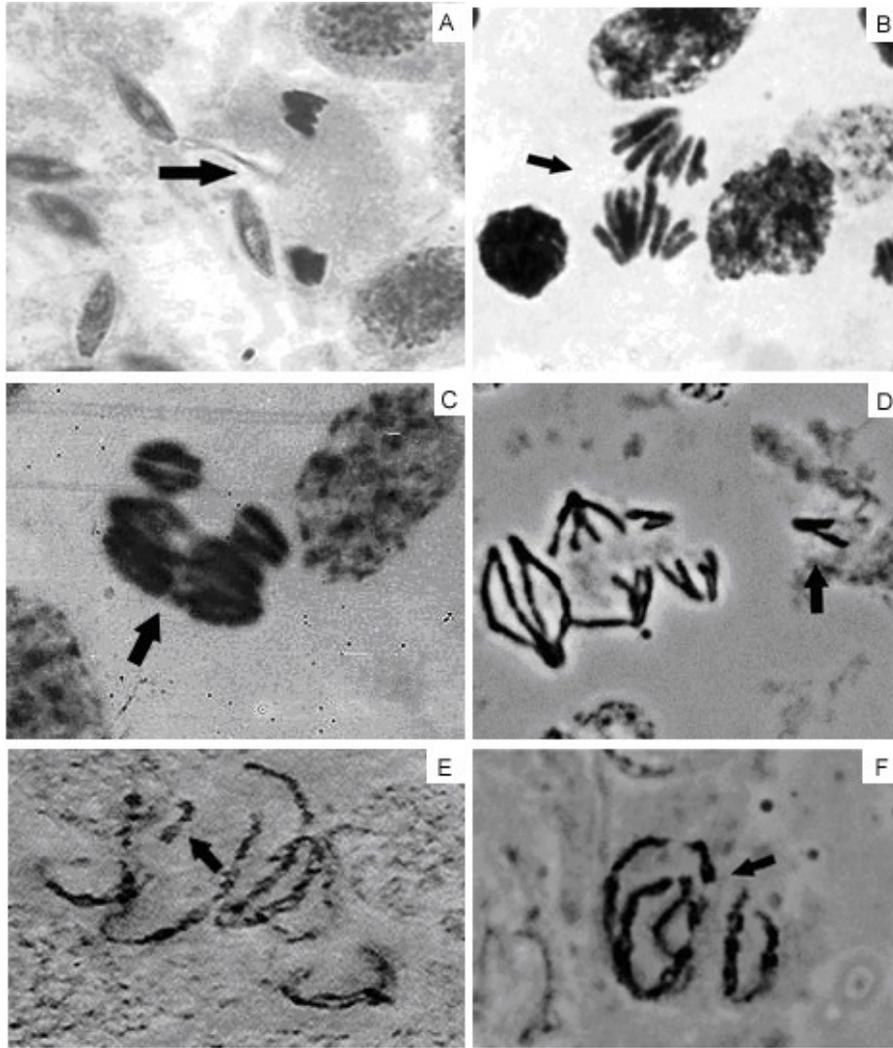


Figura 16. Coloração convencional em células ovarianas de pupas de *A. aegypti*. Anáfase normal em indivíduo controle, bairro Cidade Nova (A). Pontes anafásicas em pupas expostas ao dilapiol a 200µg/mL e 400µg/mL, bairro Japiim (B,C). Atraso cromossômico anáfase de indivíduo exposto ao dilapiol a 400 µg/mL (D). Paquíteno de célula de ovário com quebra no cromossomo 3, tratado com dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL (E, F), respectivamente, bairro Japiim). x2,000.

Tabela 4. Frequência de anomalias cromossômicas (ponte anafásica, atraso cromossômico, quebras cromossômicas) em ovários de pupas analisadas, pelo teste de Kruskal Wallis (1993) a 5% do nível de significância. As letras (^a e ^b) na mesma linha indicam diferença significativa para o referido teste.

Anomalias cromossômicas	Tratamentos			<i>p</i>
	Controle	200µg/mL	400µg/mL	
Ponte anafásica	3668 ^a	5109,5 ^b	5418,5 ^b	0,000
Atraso cromossômico	4508 ^a	4760,5 ^a	4927,5 ^a	0,084
Quebra cromossômica	3486 ^a	5229 ^a	5481 ^a	0,000

4. Discussão

A toxicidade de extratos de plantas é uma fonte de atividade larvicida natural que vem sendo testada para o controle de espécies de mosquitos do gênero *Aedes* em diversas partes do mundo (Sharma & Faruqi, 1998). A cafeína (*Caffeine* (CAFF – 1,3,7 – trimethylxanthina; $C_8H_{11}N_4O_2$), um componente natural do café, chá, guaraná e chocolate foi estudada para conhecer o seu efeito em aspectos biológicos e seu possível uso como alternativa de controle de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, São Paulo (Laranja *et al.*, 2003). Registraram-se que a cafeína bloqueia o desenvolvimento de *A. aegypti* na fase larval, inibindo a produção de adultos. Laranja *et al.* (2006) testaram, novamente, a cafeína para mostrar o seu potencial na mortalidade de larvas e pupas e na oviposição ao longo de 9 gerações sucessivas de *A. aegypti*, de São José do Rio Preto. Em atividade larvicida ocorreu redução crescente da produção de adultos nas concentrações de 200µg/mL e 500µg/mL, mas os dados foram estatisticamente significativos no experimento a 200µg/mL, cujo resultado foi interpretado como ausência de resistência a esse produto ao longo das gerações.

Consoli *et al.* (1989) estudaram a influência de 25 extratos vegetais brutos, etanólicos, hexânicos, liofilizados, tais como *Allium sativum*, *Jatropha curcas*, *Mikania schenkii*, *Poinciana regia*, *Spatodea campanulata* sobre o comportamento de oviposição das fêmeas de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Díptera: Culicidae) em laboratório. Os extratos tiveram efeito repelente ($p < 0,05$) para as fêmeas na concentração de 100 ppm. Componentes naturais de plantas das famílias Piperaceae e Menispermaceae, da Argentina, Bolívia, Brasil e Peru foram testados para verificar a sua atividade inseticida e larvicida sobre *A. aegypti*, sendo os extratos de plantas da família Piperaceae, com grupos monoterpênicos na sua composição, os que apresentaram maior atividade larvicida (95%) (Chantraine, 1998).

Outros extratos de plantas da família Piperaceae, tais como, *P. divaricatum*, *Piper aduncum*, *P. marginatum* variedade *anisatum*, *P. callosum*, *P. marginatum* variedade *marginatum*, foram utilizados em testes de letalidade em larvas de *A. aegypti* e do vetor da malária *Anopheles marajoara* (Souto, 2006), que mostraram atividade larvicida com *Piper aduncum* de 73% e 75% nos intervalos de 24 e 48 horas, respectivamente. Em nosso trabalho, a mortalidade de *A. aegypti*, segundo o teste do X^2 ($p > 0,05$) não mostrou diferença significativa ao longo das quatro

gerações (F1, F2, F3 e F4) quanto ao seu grau de longevidade e nem quando foram comparados os indivíduos ($p > 0,05$) dos bairros Japiim, Cidade Nova e Puraquequara.

Estudos para determinar a genotoxicidade de extratos de plantas são escassos. O efeito do óleo essencial de *Piper aduncum* foi testado para avaliar a mortalidade de adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae), por Fazolin *et al.* (2005). Esse extrato nas concentrações $CL_{50} = 0,06 \text{ ml de óleo/cm}^2$ e $DL_{50} = 0,02 \text{ ml de óleo/cm}^2/\text{mg}$ foi letal para esse besouro. Espósito *et al.* (2005) realizaram testes para determinar se o extrato etanólico de *Hypericum brasiliense*, uma planta amplamente utilizada na área de medicina tem atividade genotóxica, utilizando a análise da frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas em mamíferos roedores, nas concentrações de 50, 150 e 300 mg/Kg de peso corporal. Esse estudo mostrou ausência de atividade genotóxica desse extrato nesses organismos.

No presente estudo, utilizou-se o extrato dilapiol para detectar o seu nível de toxicidade e genotoxicidade em *A. aegypti* das três localidades estudadas. A mortalidade dos indivíduos de *A. aegypti* expostos às concentrações de dilapiol (200 µg/mL e 400 µg/mL) e seus controles negativo foi significativa ($p < 0,05$) nas localidades quando estas foram comparadas entre si. Porém, os dados não foram significativos entre as concentrações (200 µg/mL e 400 µg/mL) nas três localidades. Esses resultados suportam os de Pohlit *et al.* (2004), que registraram efeito sinérgico positivo do óleo dilapiol em larvas de *A. aegypti*. A toxicidade do dilapiol está provavelmente relacionada a sua composição rica em safrol, lignina e sarisan (Huang & Ho, 1999), cujos compostos agem inibindo a monooxigenase dependente de citocromo P450, ocasionando acumulação de metabólitos tóxicos nesse mosquito (Bernard, 1990).

Os dados de oviposição em fêmeas de *A. aegypti* do presente estudo, mostraram efeito do dilapiol como agente redutor da sobrevivência e no número de ovos, cujo maior índice de mortalidade ocorreu durante o período de 36 horas. Esse resultado suporta a premissa de Souto (2006), que observou uma maior atividade larvicida do dilapiol (73% e 75%) nos intervalos de 24 e 48 horas, em larvas de *A. aegypti* e *Anopheles marajoara*, respectivamente. Em nossos resultados, a diminuição do índice de mortalidade observado, imediatamente após 36 horas, prolongando-se até 48 horas não suportam os dados de Fazolin *et al.* (2005), os

quais observaram que pequenas mudanças na concentração do dilapiol produzem grandes diferenças no índice de mortalidade. O óleo de *Piper aduncum* é rico em lignina, cuja ação possui uma vida média curta e, pelo seu caráter volátil, este sofre rápida degradação em presença de luz, calor, umidade (Simões *et al.*, 1999). As características próprias desse extrato, podem ter causado o decréscimo da sua atividade em *A. aegypti* após 36 horas de exposição.

Apesar dos nossos resultados terem sido obtidos em condições laboratoriais, a possibilidade de o dilapiol promover incremento na resistência de *A. aegypti* expostos a esse produto não deve ser descartada. Esses dados indicam que o dilapiol é uma fonte alternativa promissora no controle de *A. aegypti*, que carece da continuidade do seu estudo.

Considerando os cromossomos de mosquitos do gênero *Aedes*, estes possuem cariótipo $2n=6$ cromossomos. São úteis para o estudo de aberrações cromossômicas, pois apresentam baixo número e pequeno tamanho (Mc Donald & Raí, 1970). Na literatura existem poucos estudos utilizando micronúcleos e aberrações cromossômicas no campo da genética toxicológica, como mecanismos avaliadores de genotoxicidade em insetos.

Os micronúcleos, também chamados de “satélites” ou elementos cromossômicos extras, têm sido bastante estudados em roedores e peixes. Em eritrócitos jovens de roedores foram observadas correlações entre o aparecimento de micronúcleos (MNs) e de aberrações cromossômicas, quando foram tratados com o composto Trenimon, para teste de mutagenicidade (Matter & Schmid, 1971). Relataram-se o efeito mutagênico do mercúrio em eritrócitos de *Prochilodus nigricans* (detritivoro), *Mylossoma duriventris* (omnivoro) e *Hoplias malabaricus* (piscivoro) dos rios Madeira e Solimões, da bacia amazônica, pelo teste do micronúcleo (MNT) (Porto *et al.*, 2005). Os resultados mostraram alta frequência de micronúcleos em peixes do rio Madeira em comparação a uma baixa frequência encontrada nas mesmas espécies do rio Solimões. Para os autores, o MNT pode ser útil para indicar a genotoxicidade do mercúrio nesses peixes em rios da Amazônia.

Matsumoto *et al.* (2006) avaliou a genotoxicidade e mutagenicidade de água contaminada com crômio, utilizando o teste de micronúcleo em peixe (*Oreochromis niloticus*) e raiz de cebola, em córrego de Bagres, em Franca, estado de São Paulo. Os autores registraram forte efeito genotóxico desse metal em células eritrocíticas de *Oreochromis niloticus* e em raiz de cebola expostos com altos níveis de crômio

(0.01mgL⁻¹). Foram encontradas aberrações cromossômicas, micronúcleos, irregularidades anafásicas e células binucleadas.

Por meio de estudos de citogenética clássica, micronúcleos foram registrados em mosquitos dos grupos *Orthopodomyia* e *Toxorhynchites* (Breland, 1961; Kitzmiller, 1963), *Aedes atropalpus* (Raí, 1963), *Aedes vittatus* (Raí, 1966), *Psorophora signipennis* (Mukherjee *et al.*, 1970), *A. aegypti* (Lima-Catelani & Bicudo, 1994) e *Aedes fluviatilis* (Lima-Catelani & Bicudo, 1995). Breland (1961) inferiu que os micronúcleos desapareceriam após a prófase, devido à condensação dos cromossomos em metáfase. Porém, os micronúcleos foram encontrados em telófase de *A. aegypti*, por Lima-Catelani & Bicudo (1994).

No presente estudo, em *A. aegypti* detectou-se micronúcleos em células interfásicas, metafásicas diplóide e tetraplóide e em anáfase. Observou-se, também, um ou mais núcleos (cromatina condensada), anormalidades nucleares, cromossomos fragmentados e retardatários, pontes anafásicas, quebras cromossômicas. O dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL pode ter causado dano cromossômico estrutural (fragmento) ou no aparelho mitótico de *A. aegypti*, evidenciado pela diferenças significativas na frequência de micronúcleos, anormalidades nucleares, células polinucleadas, pontes anafásicas, atraso cromossômico em anáfase e quebras cromossômicas ($p < 0,05$) entre os indivíduos expostos ao Dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL comparados aos indivíduos controle. Não foi encontrado na literatura o número de MNs que possa ocorrer por ação induzida de agentes genotóxicos derivados de plantas neste inseto.

Quebras cromossômicas observadas em *A. aegypti* aparentemente estão associadas à constrição secundária do cromossomo 3 (Bianchi *et al.*, 1972; Lima-Catelani & Bicudo, 1994), cujo sítio é considerado frágil. Mesmo com a falta de estudos do extrato de dilapiol em abordagem citogenética em mosquitos, infere-se que o seu potencial genotóxico pode ter ocorrido por diferentes causas nesses indivíduos, levando à desespiralização e quebras da molécula de DNA nuclear, evidenciadas na produção de fragmentos acêntricos (micronúcleos), anormalidades nucleares e aberrações cromossômicas estruturais.

Os nossos resultados suportam essa premissa já que nas concentrações de dilapiol a 200 µg/mL e 400 µg/mL foram mantidos os padrões de anormalidades nucleares, frequência de micronúcleos e anomalias cromossômicas. Esse resultado

foi interpretado como ausência de resistência de *A. aegypti* exposto a esse produto ao longo de quatro gerações.

Além da continuidade, sugere-se o aprofundamento de estudos do dilapiol em *A. aegypti* por meio de ferramentas da biologia molecular, para entender melhor o seu efeito genotóxico, nesse mosquito transmissor do vírus dengue.

5. Conclusões

- A mortalidade de *A. aegypti* (gerações F1, F2, F3, F4) nas concentrações de dilapiol 400µg/mL e 200µg/mL, foi de 44% e 42%, respectivamente.
- Determinou-se que o dilapiol reduziu a oviposição em *A. aegypti* nas concentrações de 200µg/mL e 400µg/mL em relação aos indivíduos controle.
- Detectou-se o potencial genotóxico do dilapiol como agente indutor de micronúcleos, anormalidades nucleares e anomalias cromossômicas (quebras cromossômicas, pontes anafásicas, atrasos anafásicos) em células de cérebro de larva e ovário de pupa de *A. aegypti*.
- O teste do micronúcleo mostrou-se útil para indicar a genotoxicidade do dilapiol em *A. aegypti*.
- Ausência de resistência ao dilapiol foi observada em *A. aegypti* ao longo de quatro gerações.
- O efeito do dilapiol em *A. aegypti* mostrou que esse mosquito é um bioindicador útil, para estudos da genotoxicidade e biomonitoramento ambiental, considerando a sua importância como vetor do vírus dengue.

6. Referências Bibliográficas

- Albertini, R. J. Anderson, D. Douglas, G. R. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogen in human. *Mutation Research- Reviews in Mutation Research*. 463: 111- 172.
- Andrade, C. F. S.; Modolo, M. 1991. Suceptibility of *Aedes aegypti* larvae to Temephos and *Bacillus thuringiensis* in integrated control. *Rev de Saúde Pública*,(25): 184-187.
- Bahia, A. Mo, L. 1997. Lê potentiel genotoxique du mercure. Mutation HPRT et effects cytogenetiques. *Chemosphere*, (2): 165-169.
- Barbosa, M. L. 1996. Dengue: Revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1): 27-45.
- Belkin, J. N. 1962. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). *Berkeley, university of California Press*. Vol. 2.
- Bergeron, C.; Vasques, R. 1996. Screening of plants used by North American Indians for antifungal, bactericidal, larvicidal, and molluscicidal activities. *Intl. J. Pharmacog*. 34(4): 233-242.
- Bernard, C. B; Arnaston, J. T. 1990. In vivo effect pf ,ixture of allelochemicals on the life cycle of the European corn borer, *Ostrinia nubilis*. *Entomol. Exp. Appl*. 57: 17-22.
- Bernard, C. B. 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.*, 21(6): 801-814.
- Borges, P. G; Silva, A. C; Bonetti, A. M. 2006. Detecção de micronúcleo em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Revista Horizonte Científico*, 1:(6).Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica>>. Acesso em 10 maio 2007.

- Breland, O. P. 1961. Studies on the chromosomes of mosquitoes. *Ann. Ent. Soc. Am.* V 54: 360-375.
- Brown, A. W. A. 1958. Insecticide resistance in Arthropods. WHO. 148p.
- Camargo, M. F.; Santos, A. H.; Oliveira, A. W. S. 1998. Avaliação da ação residual do larvicida Temefós sobre o *Aedes aegypti* (*Diptera culicidae*) em diferentes tipos de recipientes. *Rev. patologia tropical*, 37(4): 66- 70.
- Campos, J.; Andrade, C. 2001. Larval susceptibility to chemical insecticides of two *Aedes aegypti* populations. *Rev. Saúde Pública*, 35(3): 232-236.
- Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L.; Myers, M. S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat.*, 47: 2123- 2136.
- Cerutti, F.; Lazzari, S. M. 2003. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. *Rev. Bras. Entomol.*, 47 (3): 447-453.
- Chadee, D. D. 1995. Proportion of eggs laid by *Aedes aegypti* on different substrates within an ovitrap in Trinidad, West Indies. *Med. Vet. Entomol.* Vol 9 p 60-70
- Chantraine, J. M.; Shultes, E. L. 1998. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. *Phytother. Res.*, 12(5): 350- 354.
- Clements, A. N. 1992. *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction*. London Chapman & Hall. Vol 1. 509p.
- Consoli, R. A. G. B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro. 225 p.
- Duque L. J.; Martins, M. F. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 38(6): 842-843.

- Espósito, A. B; Pereira, D. M. V; Rocha, L.M. 2005. Evaluation of the genotoxic potencial of the *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) extract in mammalian cell system *in vivo*. *Genetics and Molecular Biology*. 28 (1): 152-155.
- Fazolin, M.; Estrela, J.L.V. 2004. Determinação do nível de dano econômico de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleóptera: Chrysomelidae) em *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola. *Neotrop. Entomol.* 33: 1-7
- Fenech, M. Holland, N. 1997. The human micronucleus project – International collavorative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat res.* (428) 271-283.
- Figueiredo, L. T. M. 1998. History, present and future of Dengue Fever in Brazil. *In*: Travassos da Rosa, A. P. A.; Vasconcelos, P. F. C.; Travassos da Rosa, J. F. S. (Eds). *An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Instituto Evandro Chagas, Belém, PA. 154-163p.
- Figueiredo, R. M. P.; Bastos, M. S.; Lima, M. J. L. 2002. Dinâmica da sorologia e isolamento viral na epidemia de dengue em Manaus (1998- 2001). *Rev Soc. Brás. Méd. Trop.*, 35 (Supl I): 94.
- Fisher, R. A. 1993. *Statistical Methods Experimental Desing and Scientific Inference*. Oxford University Press. 25p.
- Forattini, O. P. 1962. *Entomologia médica*.Vol.I. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 662 p.
- Forattini, O. P. 1965. *Entomologia Médica*. Vol. II. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 506 p.
- Forattini, O. P. 2002. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 860 p.

- French, W. L.; Baker, R. H.; Kitzmiller, J. B. 1962. Preparation of mosquito chromosomes. *Mosq. News.*, 22. 377 - 383.
- Goodpasture, C.; Bloom, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Gillham, N. W. 1957. Genetic studies in *Aedes*. I- The distribution of polytene chromosomes in *Aedes aegypti*. *Am. Nat.* 91(859): 265-268.
- Gottlieb, O.R.M; Koketsu, M.T; Magalhães, J.G.S; Maia, P.H; Mendes, A.I. Rocha, M.L. 1981. Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazon*, 11:143-148.
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:480- 496.
- Gubler, D. J. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.*, 10(1): 100-103.
- Halstead, S. B. 1998. Pathogenesis of Dengue: Challenges to molecular biology. *Science*, 239 (4839): 476-481.
- Heddle, J. A. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18: 307- 317.
- Herrera, B. E. 1992. First reported outbreak of classical dengue fever at 1700 meters above sea level in guerrero state, Mexico, June 1988. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46 (6): 649-653.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

- Huang, Y.S.H; Ho, M. 1999. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) *J. Econ. Entomol.* 92: 676-683.
- Jones, J. C. 1978. The feeding behavior of mosquitoes. *Sci. Am.* 238:112-120
- Kitmiller, J.B. 1963. Mosquito cytogenetics. A review of the literature, *Bull. W. H. O.* 29: 345-355.
- Klekowski, E. J. 1982. Using components of the native flora to screen environments for mutagenic pollutants. *In: Klekowski, E. J. Ed: Environmental mutagens, carcinogens, and plant biology.* 12: 91- 114.
- Kumar, V.; Collins, F. H. 1994. A technique for nucleic acid *in situ* hybridization to polytene chromosomes of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol. Biol.*, 3(1): 41-47.
- Kuno, G. 1995. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiol Rev.* 17 : 321-335.
- Laranja, A. T. Manzato, A. J. 2003. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genet Mol Biol.* 23: 419-429
- Laranja, A. T. Manzato, A. J. 2006. Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública.* 40 (6): 1112- 1117
- Lau, A. H. 1998. Dissertação de Mestrado. Testes de Genotoxicidade em Planárias – Análise de Aberrações Cromossômicas e Teste Cometa. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular_ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- RS.

- Lima-Cattelani, A.R.; Campos, H.E.M.1994. Chromosome studies in two Brazilian population of *Aedes aegypti*. The faculty press Cambridge, *Great Britain*. 79: 241-251.
- Macoris. M.; Andrighetti. M. T. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of são Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 98(5): 703-708.
- Marzochi, K. B. F. 1994. Dengue in Brazil – situation, transmissión and control – A proposta for ecological control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.89(2): 235-245.
- Matsumoto, C.T; Mantovani, M.S; Malagutti, M.I.A; Dias, A.L. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated wiht tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay usig the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tip. *Genetics and Molecular Biology*. 29(1): 148-158.
- Matter, B; Schimid, W. 1971. Treninon induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalians species, evaluated by the micronucleus test. *Mut, Res*. 12: 417-425.
- Mc Donald, P. T.; Rai, K. S. 1970. Correlations of linkage groups with chromosomes in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Genetics*, 66: 475-485.
- Ministério da Saúde, 2001. *Plano de Intensificação das Ações de Controle do Dengue*. Brasília, 231p.
- Ministério da Saúde - SVS, 2004. *Dengue – Boletim da semana 16/2004*. Brasília. 13p.
- Ministério da Saúde - SVS, 2005. *Dengue – Boletim da semana 14/2005*. Brasília 13p.

Ministério da Saúde - SVS, 2006. *Dengue – Boletim da semana 15/2006*. Brasília 18p.

Ministerio da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2006. *Manual de dengue – Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente*. DEOPE, Brasília. 79p.

Mukherjee, A. B; Rees, D. M. 1970. Spermatogenesis in the mosquito, *Aedes dorsalis* (Meigen). *Cytologia*. (35): 213-219.

Olson , K. E. 1996. Genetically engineered resistance to Dengue-2 virus transmission in mosquitoes. *Science*. 272: 884- 886.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. 1991. *Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas*.15p. Washington, DC.

Osanai, C.H.; Travassos da Rosa, A. P. A.; Tang, A.T. ; Amaral, R.S.; Passos, A.C.; Tauil, P.L. 1983. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Rev. Inst. Méd. Trop.* São Paulo, 25(1): 53- 54.

Pimentel, F.A.; Cabral, W.G.; da Silva M.R. 1998. Processo de secagem de biomassa de pimenta longa (*Piper hispidenervum*). Rio Branco, Embrapa – CPAF/AC, 2p.

Pinheiro, V. C. S. 2000. *Dengue em Manaus (AM): Recipientes preferenciais de Aedes aegypti (Linnaeus, 1962) (Díptera: culicidae) e avaliação das medidas de controle temefós e termonebulização*. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Amazonas – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Pinheiro, V.C.S; Tadei, W.P. 2002. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred container in the city of Manaus, Amazonas, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 44(5): 245-250.

Pohlit, A. M. 2004. Screening of plants in the state of amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonica*, 34(1): 97- 105.

- Rafael, M.S. 2003. Mapeamento físico dos genes ribossomais e *hsp70* em cromossomos politênicos e mitóticos de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 e *Anopheles (N.) nuneztovari* Gabaldón, 1940 (Diptera, culicidae), Amazônia, Brasil.
- Simões, C. M. O; Sptzer. V. 1999. Óleos voláteis. In C. M. O. Simões, Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis, UFRS/UFSC, 416p.
- Sharma, N.;Faruqi, S. 1998. Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephansi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. *Pharm. Biol.*, 36 (1): 3-7.
- Smith, R.M; Kassim, H. 1979. The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. *N.Z. Sci.* 22: 127-128.
- Souto, P.R.M. 2006. Atividades repelente e inseticida de óleos essenciais de *Piper* spp Linneus da Amazônia em *Anopheles marajoara* Galvão e Damasceno, *Stegomyia aegypti* Linneaus (Diptera: Culicidae) e *Solenopsis saevissima* Fr. Smith (Hymenoptera: Formicidae). Tese, Universidade Federal do Pará. Belém, PA. 248pp.
- Superintendência de Controle de Endemia (SUCEN). 1997. *Manual de vigilância entomológica de Aedes aegypti*. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.
- Tadei, W. P. 2001. *Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia*. 7ª . Reunião Especial da SBPC. (CD ROM). Manaus: Sociedade Brasileira para o Progressão da Ciência, p. 1-6.
- Vasconcelos, P. F. C.; Lima, J. W. O.; Travassos da Rosa, A. P. A.; Timbó, M.J.; Travassos da Rosa, E. S.; Lima, H.R.; Rodrigues, S. G.; Travassos da Rosa, J.F.S. 1995. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. *Rev. Saúde Pública*, 32:447-54.

Vaughn, D. W. 1996. Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (stain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine*. vol. 14, ,n.4 p. 329-336.

WHO – World Health Organization. 1957. Epidemiology of dengue fever dengue hemorrhagic fever. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 65(14): 104-106.

WHO – World Health Organization. 1990. Epidemiology of dengue fever dengue hemorrhagic fever. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 65(14): 104-106.

WHO - World Health Organization. 2003. *TDR strategic direction: Dengue*. Geneva, Switzerland. Disponível em: www.who.int/tdr .

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)