



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE – PPGSHMA**

Eliézer Henrique Pires Aciole

**EFEITO TÓXICO-GENÉTICO DOS LARVICIDAS
DILAPIOL E ESPINOSADE EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

**Vitória de Santo Antão
2012**

Eliézer Henrique Pires Aciole

**EFEITO TÓXICO-GENÉTICO DOS LARVICIDAS
DILAPIOL E ESPINOSADE EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Rohde

Co-Orientadora: Profa. Dra. Kenya Silva Cunha

Vitória de Santo Antão

2012

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

A181e Aciole, Eliézer Henrique Pires.
 Efeito tóxico-genético dos larvicidas dilapiol e espinosade em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Eliézer Henrique Pires Aciole. Vitória de Santo Antão: O autor, 2012.
 xvii, 48 folhas; fig.

 Orientador: Cláudia Rohde.
 Co-Orientador: Kenya Silva Cunha.
 Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2012.

 1. Inseticidas. 2. Recombinação mitótica. 3. Saúde Pública I.Rohde, Cláudia. II.Cunha, Kenya Silva. III. Título.

632.951 CDD (21.ed.)

BIBCAV/UFPE-04/2012



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **Elíezer Henrique Pires Acirole** a Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "EFEITO TÓXICO-GENÉTICO DOS LARVICIDAS DILAPIOL E ESPINOSADE EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*", orientada pela Profa. Claudia Rohde e aprovada em 29 de fevereiro de 2012, pela Banca Examinadora composta pelos professores:

Cristiano Aparecido Chagas
Núcleo de Biologia - CAVIUFPE

Mônica Lúcia Adam
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte - CAVIUFPE

Viviane Souza do Amaral
Centro de Biociências - UFRN

Autor

Elíezer Henrique Pires Acirole

Ao meu maior título, presente Divino, a você dedico
esse trabalho meu pequeno e tão grande filho Marcus Henrique.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro de Vitória de Santo Antão da Universidade Federal do Pernambuco pelos ensinamentos e momentos de discussão científica ao longo desses anos.

Aos colegas da minha turma e da primeira turma do Programa pela força e coleguismo durante esses dois anos.

Às secretárias da Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, **Adalva** e **Ana** pela dedicação e disponibilidade de ajuda.

À minha Orientadora, professora **Dra. Cláudia Rohde**, pela oportunidade oferecida, pela orientação e valiosas contribuições ao longo de todas as etapas desse trabalho, e pelo bom convívio ao longo desse tempo de pesquisa.

Um agradecimento especial deve ser feito à **Dra. Kênya Silva Cunha**, minha Co-Orientadora, que não mediu esforços para que a parceria CAV e UFG desse certo. Obrigado pela dedicação em todos os momentos.

À fisioterapeuta e doutoranda **Nilza Nascimento Guimarães** da UFG que contribuiu de forma significativa para o êxito dos experimentos e por sempre ser solícita às chamadas de e-mail.

Aos **Ms. Igor Gomes de Oliveira** e a mestranda **Laíse Rodrigues de Andrade** pelos ensinamentos do teste SMART em minha temporada em Goiânia no Laboratório de Genética Toxicológica do ICB da UFG.

Às pesquisadoras **Dra. Ana Cristina Lauer Garcia** e a doutoranda **Geórgia Fernanda Oliveira** pelas sugestões iniciais na identificação das drosófilas.

Aos colegas do laboratório de genética do CAV, em especial aos colegas do grupo de mutagenese: André S. Silva, Érika M. Amorim, Cícero J. Verçosa, pela agradável convivência e aprendizado conjunto e por serem essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Dr. Sérgio Nunomura**, membro do INPA e colaborador desse trabalho por ter fornecido o óleo essencial Dilapiol. E à Secretária de Saúde do município de Belo Jardim, **Dra. Adriane Maciel** pelo fornecimento das pastilhas do Espinosade.

Às agências financiadoras **CAPES e FACEPE** pelos apoios financeiros.

Aos meus pais por sempre investirem e apoiarem a minha formação.

A minha esposa **Maria Luiza** pelos momentos de paciência, espera por minha volta a casa e dedicação ao nosso maior bem, Marcus Henrique.

A minha sogra **Marinalva** pelas palavras de incentivo, conselhos e amizade.

A todos os familiares e amigos que me apoiaram com a emissão de pensamentos positivos.

E finalmente a **Deus** pelo dom de viver, por inspirar meus pensamentos, guiar meus passos e apaziguar meus sentimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
 CAPÍTULO 1	 1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	4
1.3 Referencial Teórico	5
 CAPÍTULO 2	 20
2. Resultados	20
Ação tóxico-genética dos larvicidas <i>dilapiol</i> e <i>espinosade</i> em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	
2.1 Resumo	21
2.2 Abstract	22
2.3 Introdução	23
2.4 Material e Métodos	25
2.5 Resultados	28
2.6 Discussão	35
2.7 Conclusões	37
2.8 Referências	38
 3. CONCLUSÕES FINAIS	 43
4. PERSPECTIVAS FUTURAS	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO	xiv

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do óleo essencial dilapiol.	8
Figura 2	Estrutura química do espinosade.	9
Figura 3	Cruzamento padrão	13
Figura 4	Aspecto da asa recortada (A) e asa normal (B).	14
Figura 5	Pelo <i>mwh</i> . (B).	15
Figura 6	Pelo <i>flr</i> ³ .	15
Figura 7	Aspecto da mancha de pelos, simples pequena (A), simples grande (B) e mancha gêmea (C) nas asas de <i>D. melanogaster</i> .	16
Figura 8	Seções de leitura na asa (letras A – E).	16

Artigo:

Figura 1.	Número médio de adultos sobreviventes de <i>D. melanogaster</i> submetidos ao teste SMART, após exposição de 48h ao composto dilapiol (A) e espinosade (B) , em duas séries independentes de experimentos.	29
Figura 2.	Distribuição do número de manchas de pelos mutantes, classificadas por classes (1 a > 256) em indivíduos trans-heterozigotos (<i>mwh/flr</i> ³) controle negativos e tratados com diferentes concentrações de dilapiol e espinosade.	32

LISTA DE TABELAS

Artigo:

Tabela 1	Frequência e número de manchas de pelos mutantes em moscas trans-heterozigotas (<i>mwh/flr³</i>) e heterozigotas balanceadoras (<i>mwh/TM3</i>) de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas ao tratamento com dilapiol e espinosade, após cruzamento padrão (ST), e avaliação dos efeitos genotóxicos.	31
Tabela 2	Frequência padronizada de indução de clones <i>mwh</i> por µg/mL de concentração de exposição ao dilapiol e espinosade, e prevalência de eventos recombinogênicos.	34

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
μg	micrograma
mM	milimolar
cm	centímetro
h	hora
%	por cento
p/v	relação peso/volume
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
f	frequência
Σ	somatório
>	maior
n.	número
mL	mililitros
mm	milímetros
x	vezes
<i>m</i>	fator multiplicador

LISTA DE ABREVIATURAS

SMART	<i>somatic mutation and recombination test</i>
ST	Cruzamento Padrão
OMS	Organização Mundial de Saúde
mwh	<i>multiple wing hairs</i>
flr ³	<i>flare</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ppm	partes por milhão
ATP	Adenosina de Trifosfato
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>
RAPD	polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
GABA	ácido gama-aminobutírico

RESUMO

O uso constante de inseticidas em programas de saúde pública tem sido a principal medida para o controle de insetos vetores de doenças epidêmicas em países tropicais e subtropicais. Anualmente toneladas de inseticidas sintéticos, sobretudo os organofosforados, são lançadas ao meio ambiente na tentativa de controlar o crescimento populacional dos vetores. Os larvicidas são compostos capazes de matar larvas que se desenvolvem em reservatórios grandes ou pequenos, naturais ou artificiais de água, muitas vezes própria ao consumo humano. Os compostos dilapiol e espinosade são classificados como larvicidas, sendo o dilapiol um óleo essencial extraído da espécie vegetal *Piper aduncum* e o espinosade uma combinação de dois metabólitos produzidos pela bactéria *Saccharopolyspora spinosa*. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos do dilapiol e do espinosade, por meio do teste de mutação e recombinação somática (SMART) de asa de *Drosophila melanogaster*. Na metodologia foi utilizado o cruzamento padrão, sendo as larvas com 72h de vida submetidas durante 48h à exposição crônica a três diferentes concentrações não letais do dilapiol (3,2, 16 e 80 $\mu\text{m/mL}$) e do espinosade (0,32, 0,96 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$). Para avaliação do efeito genotóxico, as frequências das manchas de pelos mutantes nas asas dos indivíduos tratados foram comparadas com os respectivos controles negativos. Os resultados indicam que ambos compostos tiveram atividade toxico-genética positiva, em todas as concentrações testadas, exceto o espinosade a 0,96 $\mu\text{g/mL}$. A atividade genotóxica se deu, principalmente, à indução de recombinação e, em menor escala, à mutação somática, verificada apenas para o espinosade. Os resultados aqui apresentados contribuem para o conhecimento dos riscos genotóxicos do uso destes dois inseticidas, que merecem ainda mais estudos, feitos em outros modelos experimentais e outras condições e metodologias para que sejam considerados seguros para a saúde humana e o meio ambiente.

Palavras-Chave: SMART, Mutação, Recombinação, Saúde Pública, Inseticidas.

ABSTRACT

The constant use of insecticides in public health programs has been the main measure to control insect vectors of epidemic diseases in tropical and subtropical countries. Each year tons of synthetic insecticides, especially organophosphates, are released into the environment in an attempt to control population growth of the vectors. Very often for human consumption. The compounds dilapiol and spinosad are classified as larvicides, being the dilapiol an essential oil extracted from the vegetal species *Piper aduncum* and spinosad a combination of two metabolites produced by the bacterium *Saccharopolyspora spinosa*. The objective of this study was to evaluate the genotoxic effects of spinosad and dilapiol by means of the somatic mutation and recombination test (SMART) of *Drosophila melanogaster* wing. In the methodology was used the standard crossing and the larvae with 72h of life were submitted during 48h to chronic exposure to three different no lethal concentrations of dilapiol (3,2, 16 and 80 $\mu\text{m/mL}$) and of spinosad (0,32, 0,96 and 1.6 $\mu\text{m/mL}$). To evaluate the genotoxic effect, the frequency of mutant spots on the wings of the treated individuals was compared with the respective negative controls. The results indicate that both compounds had positive toxic-genetic activity at all concentrations tested, except the spinosad at 0.96 $\mu\text{m/mL}$. The genotoxic activity was due mainly to the induction of recombination and to a lesser extent, the somatic mutation, observed only for spinosad. The results presented here contribute to the knowledge of the genotoxic risks of using these two insecticides, which deserve further studies undertaken in other models and other experimental conditions and methodologies to be considered safe for human health and the environment.

Key-words: SMART, Mutation, Recombination, Human health, Insecticides.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

A descoberta do papel dos insetos hematófagos como vetores biológicos de patógenos ao homem colaborou para a criação de programas de controle populacional desses vetores. A partir do surgimento dos inseticidas de síntese (décadas de 1940), enormes volumes de recursos têm sido dirigidos ao uso de milhares de toneladas destas moléculas tóxicas em todo o mundo (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 2001).

A falta de seletividade dos inseticidas sintéticos cursa com agressão ao meio ambiente e surgimento de efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados (DULOUT *et al* 1985; DEGRAEVE *et al* 1984; DEGRAEVE; MOUTSCHEN, 1984; DEFERRARI *et al* 1991; GARRETT, 1992; EYER, 1995; CAVALIERE *et al.*, 1996).

Em face dos danos causados pelo uso dos inseticidas de síntese, assim como, o surgimento da resistência do *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, aos inseticidas químicos utilizados em programas para o seu controle, surgiu à necessidade de se empregar diferentes métodos para o controle de insetos transmissores de doenças, em especial o controle biológico.

A descoberta da ação larvívora de algumas bactérias (GOLDBERG e MARGALIT, 1977), que agem sobre espécies de culicídeos e simulídeos, abriu novas perspectivas para o controle destes insetos. Entre eles se destaca o composto espinosade, desenvolvido a partir da década de 80, quando metabólitos secundários da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* foram usados com sucesso no controle de insetos de várias classes (DeAMICIS *et al.*, 1997; SPARKS *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2003; MANSOUR *et al.*, 2007). Esse composto apresenta uma ampla margem de segurança a outros tipos de insetos não vetores e organismos específicos, sendo considerado como um inseticida seletivo (SCHOONOVER e LARSON, 1995; ELZEN *et al.*, 2000; MANSOUR *et al.*, 2007). Porém sabe-se que seletividade absoluta é algo difícil de ser estabelecida, pois os inseticidas são substâncias tóxicas em maior ou menor grau também para organismos não-alvo, incluindo os seres humanos (ERNEST e PATRICIA, 1997). Para avaliação do risco de toxicidade a

Organização Mundial de Saúde (OMS) enfatiza a necessidade de testes e estudos dos pesticidas formulados.

Os compostos de natureza botânica são fontes potenciais de recursos para a produção de novos inseticidas (HEDIN, 1982; ISMAN, 1995; PARK *et al.*, 2002). Os óleos essenciais e seus componentes têm se mostrado potencialmente ativos como inseticidas botânicos (SINGH e UPADHYAY, 1993; BAKKALI *et al.*, 2008).

O gênero *Piper* contém aproximadamente 1.000 espécies e pertence à família Piperaceae, que está amplamente distribuída entre a vegetação secundária da floresta tropical Amazônica. A população humana costuma utilizar esta espécie para inúmeras finalidades (JOLY, 1981, BARRETT, 1994; SCHULTES e RAFFAUF, 1990).

O óleo essencial dilapiol é extraído da espécie *Piper aduncum* L., e apresenta comprovada ação sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, entre eles fungos (BASTOS, 1997; MORANDIM *et al.*, 2002), bactérias e moluscos (ORJALA *et al.*, 1994). Em outros estudos, esse extrato vegetal apresentou comprovadas ações analgésica e anti-inflamatória com casos de baixos níveis de toxicidade (MONTEIRO *et al.*, 2001, FONTES JÚNIOR *et al.*, 2002, SOUSA *et al.*, 2008). SILVA *et al.*, (2007) comprovaram que tanto os extratos extraídos de folhas como os extraídos de raízes de *P. aduncum* apresentam igual atividade inseticida sobre espécies de cigarrinha (*Aetalion* sp.), um inseto fitófago e praga de interesse econômico no estado do Amazonas.

O extrato dilapiol é o de maior atividade inseticida em larvas de *Aedes aegypti*, vetor da dengue, com 92% de eficiência no controle das formas imaturas (BERNARD *et al.* 1995, BERGERON e VASQUES, 1996, POHLIT *et al.*, 2004, SOUTO, 2006). Extratos de cerca de 300 espécies de plantas (Cyperaceae, Dichapetaceae, Piperaceae) têm se mostrado eficientes fontes larvicidas naturais para o controle de mosquitos vetores no Brasil (SHARMA *et al.*, 1998). Entretanto, poucos são os estudos sobre o efeito genotóxico do dilapiol em *A. aegypti*.

Compostos com atividades biológicas continuam sendo desvendados, principalmente quando se refere às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Cada droga descoberta necessita de testes de genotoxicidade, para estudos detalhados sobre a sua composição química e toxicidade, pois tais fatores interferem no processo de multiplicação celular e algumas substâncias modificam a estrutura de genes específicos ou contribuem para o surgimento de mutações, o que torna útil o uso de testes de genotoxicidade para o rastreamento de possíveis agentes genotóxicos (NEPUCENO e CUNHA, 2011).

O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, descrito por Graf *et al.* (1984), possibilita a avaliação simultânea e *in vivo* dos possíveis efeitos mutagênicos e recombinogênicos. É um teste útil para identificar agentes genotóxicos e antígenotóxicos através do reconhecimento de eventos mutacionais de ponto, deleções, translocações ou recombinação mitótica (GRAF *et al.*, 1984; VOGEL e ZILASTRA, 1987) no modelo experimental *Drosophila*.

A importância das pesquisas com este organismo eucarionte se devem a diversos fatores, entre eles a comprovada conservação genética que existe com o genoma humano, em cerca de 80% (ADAMS *et al.*, 2000; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001) e a conservação de rotas bioquímicas e funções regulatórias relacionadas à saúde humana, como as do ciclo celular, da neurogênese e da biologia do câncer (ARTAVANTIS-TSAKONAS *et al.*, 1995; ST-JOHN e XU, 1997; KORNBERG e KRASMOW, 2000; FEANY e BENDER, 2000; BIER, 2005; RAND, 2010).

Assim, a similaridade entre *Drosophila* e humanos, aliada ao desenvolvimento do teste SMART, permite que uma variedade de produtos químicos comercializados atualmente - da ordem de 80.000 segundo RAND, 2010 – seja estudada do ponto de vista dos riscos genotóxicos, fornecendo informações relevantes, que podem ser extrapolada para os humanos (ARTAVANIS-TSAKONAS, *et al.*, 1995; ST-JOHN e XU, 1997).

1.2 Objetivos

1. Avaliar a toxicidade dos larvicidas dilapiol e espinosade em *D. melanogaster* submetidas ao tratamento em sua fase larval.
2. Avaliar, do ponto de vista qualitativo, os eventos genotóxicos induzidos pelos compostos dilapiol e espinosade, através da presença e contagem de manchas simples (pequenas ou grandes) e manchas gêmeas presentes em asas de *D. melanogaster*;
3. Comparar os resultados obtidos em dois diferentes genótipos (trans-heterozigoto e heterozigoto balanceador *TM3*), a fim de quantificar as possíveis alterações genéticas induzidas: mutação ou recombinação mitótica;
4. Comparar os efeitos tóxico-genéticos do dilapiol e do espinosade entre si, a fim de indicar o composto mais seguro para o uso como larvicida e, conseqüentemente, para a saúde humana e o meio ambiente.

1.3 Referencial Teórico

Inseticidas e saúde humana

A dengue é uma doença viral transmitida como quatro sorotipos (HALSTEAD *et al.* 1963, HALSTEAD, 1992) através de um hospedeiro, o mosquito, que apresenta resistência a pesticidas utilizados nos programas de controle com organofosforados no Brasil (LUNA *et al.* 2004). O aumento crescente com os custos para o combate do vetor transmissor da dengue, o *Aedes aegypti*, tem motivado várias pesquisas com o objetivo de desenvolver uma vacina eficaz contra o vírus da dengue, sendo até então uma prioridade pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, o desenvolvimento dessa vacina tem frustrado a comunidade científica, pois existe uma necessidade dela imunizar contra os quatros tipos de dengue (FIGUEIREDO, 1999). Em quanto a OMS não estabelece essa forma de controle da doença, o uso de larvicidas e outras medidas sanitárias constituem a única forma de minimizar e controlar novos surtos da doença.

O controle químico apesar de suas desvantagens à saúde humana e ambiental ainda consiste em uma importante medida para controlar o desenvolvimento dos insetos transmissores de doenças. A relação entre o uso dessas substâncias e o surgimento de doenças de longo e médio prazo, bem como a resistência dos insetos a esses tipos químicos contribuem para a busca de novas alternativas para o controle populacional dos insetos, sobretudo em sua fase larval (VALLE e BRAGA, 2007).

A falta de seletividade dos inseticidas sintéticos colabora para alterações ao meio ambiente e apresentam uma série de efeitos tóxicos a curto e longo prazo em seres invertebrados e vertebrados. A literatura científica disponibiliza dados resultantes de estudos experimentais em mamíferos, bem como, de estudos epidemiológicos que comprovam que os efeitos crônicos resultantes da exposição prolongada a diferentes moléculas de inseticidas organoclorados e organofosforados, com comprometimentos miotóxicos, neurotóxicos, genotóxicos, imunotóxicos e mutagênicos sobre mamíferos, tem se acumulado (DULOUT, 1985; DEGRAEVE, *et. al.*, 1984; DEGRAEVE; MOUTSCHEN, 1984; DEFERRARI, *et. al.*, 1991; GARRETT, 1992; EYER, 1995; CAVALIERE, *et. al.*, 1996).

Os organofosforados são substâncias químicas extremamente tóxicas, que contêm carbono e fósforo, e podem ser fatais na proporção de alguns miligramas para um homem de cerca de 70 kg. Apesar disso, são amplamente utilizados na agropecuária como inseticidas, e podem ocasionar intoxicações acidentais em animais e humanos. Em

decorrência disso, nos últimos anos, muitos estudos estão tentando buscar novas alternativas seguras para o controle de insetos (produtos larvicidas ou reguladores do desenvolvimento), especialmente aqueles extraídos de plantas (BERNARD *et al.*, 1995).

No período de 1996 a 2000, foram usadas em média, 4.937 toneladas de Temefós por ano. Este organofosforado tem sido aplicado, a intervalos de dois meses, nos criadouros de *Aedes aegypti* em todas as localidades onde é constatada a circulação viral, inclusive em caixas d'água e outros recipientes usados para estocagem de água potável para uso doméstico. O acúmulo de água em recipientes diversos é uma prática comum, em decorrência da distribuição irregular de água para consumo humano. Na maioria das cidades brasileiras estes recipientes tornam-se as principais fontes de criação de larvas do vetor do vírus da dengue. Este fato resulta em exposição humana contínua e prolongada ao organofosforado (ZAIM e GUILLET, 2002).

Em face dos danos causados pelo uso dos inseticidas de síntese, assim como, o surgimento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos utilizados em programas para o seu controle, surgiu a necessidade de se empregar diferentes métodos para o controle de insetos transmissores de doenças, em especial o controle biológico (VALLE e BRAGA, 2007).

O dilapiol

A ampla diversidade biológica, em grande parte ainda inexplorada, principalmente de regiões como a Amazônia, representa um potencial para a pesquisa de novos produtos que poderão vir a substituir os agrotóxicos químicos (SANTOS, 1998). O gênero *Piper* contém aproximadamente 1.000 espécies, pertence à família Piperaceae, e está amplamente distribuída entre a vegetação secundária da floresta tropical Amazônica. A população humana utiliza esta espécie como perfume, óleo, isca de peixe, inseticida, tempero, alucinógeno e também como ornamentação, alimento e remédio (JOLY, 1981; SCHULTES e RAFFAUF, 1990).

Um número de compostos tem sido isolado do gênero *Piper*, como terpenos, fenilpropanóides e uma série de alcalóides (HEGNAUER, 1990; JENSEN *et al.*, 1993). Muitos destes compostos mostram atividades biológicas, particularmente, antimicrobiana. Extratos de plantas da família Piperaceae, tais como, *Piper divaricatum*, *Piper aduncum*, *P. marginatrim* variedade *anisstum*, *P. callosum*, *P. marginatum* variedade *marginatum*, foram utilizados em testes de letalidade em larvas de *Aedes aegypti*, vetor da dengue, e em

larvas de *Anopheles marajoara*, vetor da malária (SOUTO, 2006), e mostraram atividade larvicida em *Piper aduncum* de 73% e 75% nos intervalos de 24 a 48 horas, respectivamente.

Apesar da sua importância, *Piper* tem recebido limitada atenção científica. Este gênero tem sido investigado na Ásia, e espécies indianas de *Piper* têm sido particularmente bem analisadas (como *P. nigrum*, *P. longum*, *P. cubeba*, *P. betle* e *P. methysticum*). A espécie *Piper aduncum* L., também conhecida vulgarmente como pimenta de macaco ou pimenta longa, produz um óleo essencial, chamado *dilapiol* (**Figura 1**), com comprovada ação sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, como fungos (BASTOS, 1997; MORANDIM *et al.*, 2002), bactérias e moluscos (ORJALA *et al.*, 1994). Este óleo essencial de *P. aduncum* foi testado, por exemplo, contra o fungo *Clinipellis pernicioso*, conhecido como "vassoura-de-bruxa", responsável por ataque patogênico ao cacau e ao cupuaçu. Nas concentrações de 50 a 1.000 ppm inibiu em 100% o crescimento e a germinação deste fungo (BASTOS, 1997). Em outros estudos, o extrato de *P. aduncum* apresentou comprovada ação analgésica e antiinflamatória com casos de baixos níveis de toxicidade (MONTEIRO *et al.*, 2001; FONTES JÚNIOR *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2008). SILVA *et al.*, (2007) comprovaram que tanto os extratos extraídos de folhas como os extraídos de raízes de *P. aduncum* apresentam igual atividade inseticida sobre espécies de cigarrinha (*Aetalion sp.*), um inseto fitófago e praga de interesse econômico no estado do Amazonas.

A análise da diversidade genética de *Piper aduncum* presente nas Américas vem sendo feita especialmente na região Amazônica, por análise de marcadores de DNA em coleções de germoplasma (CONTI *et al.*, 2002) e em amostras de populações naturais (GAIA *et al.*, 2004). Do ponto de vista molecular, GAIA *et al.* (2004) caracterizaram dezoito amostras provenientes de quatro locais da Amazônia Brasileira. Os autores examinaram as amostras através do método de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e os resultados evidenciaram a existência de real diversidade entre as populações examinadas, que acompanham os padrões de distribuição geográfica.

Assim, o uso de extrato de *P. aduncum* poderá ser uma alternativa de controle contra insetos fitófagos e, conseqüentemente, viabilizará custos operacionais, ajudando a produzir alimentos mais seguros e protegendo o meio ambiente dos efeitos diversos causados pelos agrotóxicos convencionais, tornando os pequenos agricultores da região Amazônica independentes da aquisição desses produtos (SILVA *et al.*, 2007)

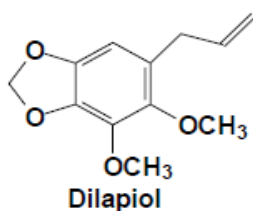


Figura 1. Estrutura química do óleo essencial dilapiol.
Fonte: Fazolin *et al.*, 2005.

O óleo essencial de *P. aduncum* apresenta o éter fenílico *dilapiol* como seu componente majoritário e que é responsável por suas atividades biológicas (BASTOS, 1997; MAIA *et al.*, 1998). Outros constituintes químicos comuns são amidas, isobutil amidas, piperidinas e pirrolidinas (SENGUPTA e RAY, 1987).

O extrato *dilapiol*, especificamente extraído da espécie *Piper aduncum*, é o de maior atividade inseticida em larvas de *Aedes aegypti*, vetor da dengue, com 92% de eficiência no controle das formas imaturas (BERNARD, *et al.*, 1995; BERGERON e VASQUES, 1996; POHLIT, *et al.*, 2004; SOUTO 2006). Extratos de cerca de 300 espécies de plantas (Cyperaceae, Dichapetaceae, Piperaceae) têm se mostrado eficientes fontes larvicidas naturais para o controle de mosquitos vetores no Brasil (SHARMA, *et al.*, 1998). Poucos são, entretanto, os estudos sobre o efeito genotóxico do dilapiol em *A. aegypti*. Destaca-se o trabalho de RAFAEL, *et al.*, (2008) que testou a ação do *dilapiol* sobre larvas e pupas de *A. aegypti* por meio de testes de toxicidade, frequência de micronúcleos, anormalidades nucleares e anomalias cromossômicas.

O espinosade

Na década de 1980 foi descoberta uma nova linha de produtos naturais para o controle de uma variedade de insetos, o *espinosade*. O espinosade, que é composto por duas espinosinas é apenas dois dos 87 metabólitos secundários de uma bactéria com fermentação no solo, a *Saccharopolyspora spinosa* (THOMPSON *et al.*, 1997; CROUSE e SPARKS, 1998; SPARKS *et al.*, 1998, 1999; CROUSE e SPARKS, 1998; THOMPSON *et al.*, 2000). Conforme mostrado na **Figura 2**, o espinosade é um combinado de dois metabólitos secundários ativos, a espinosina A e a espinosina D.

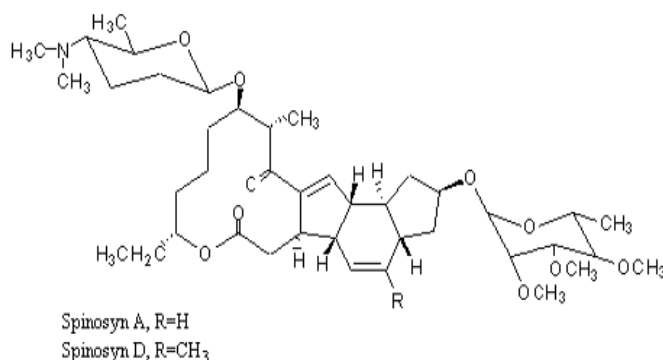


Figura 2. Estrutura química do espinosade.
Fonte: Mansour *et al.*, 2007.

A bactéria *Saccharopolyspora spinosa* foi descoberta por acaso no início da década de 1940 em um barril de rum. As amostras foram levadas ao laboratório para estudo da espécie e da sua atividade. Descobriu-se então tratar-se de uma nova espécie de bactéria com propriedades inseticidas. E ao final dos anos 1980 já eram conhecidos diversos de seus metabólitos ativos. O nome espinosade veio da união do nome espinosa com os dois metabólitos, A e D (espinosa A+D). Em 1995, o espinosade foi classificado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA como um produto de baixo risco de efeito toxicológico e ambiental (SALGADO, 1998; MANSOUR *et al.*, 2007).

Segundo os trabalhos de DeAMICIS *et al.* (1997), SALGADO (1998), SPARKS *et al.* (1999), WILLIAMS *et al.* (2003), MANSOUR *et al.*, (2007) e outros, o espinosade possui atividade seletiva para insetos das classes Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Thysanoptera, e alguns da classe Coleoptera.

De acordo com SALGADO (1998) o modo de ação do espinosade em insetos está associado com a excitação do sistema nervoso, que altera as funções dos canais iônicos. O modo de ação dessa classe de inseticidas ocorre por ação neurotóxica, por agir como agonista colinérgico dos canais iônicos pós-sinápticos (receptores nicotínicos) bem como na função dos canais de cloro GABA (SALGADO, 1998; SALGADO *et al.*, 1998; THOMPSON *et al.*, 2000). Em contato com a água o espinosade atua no sistema nervoso das larvas dos insetos, provocando a transformação dos seus receptores químicos e, conseqüentemente, paralisia e morte do organismo (SALGADO, 1998; SALGADO *et al.*, 1998).

O espinosade é referenciado como um composto de ampla margem de segurança a muitos insetos, portanto, tal composto é considerado como um inseticida seletivo (MANSOUR *et al.*, 2007; SCHOONOVER e LARSON, 1995; ELZEN *et al.*, 2000).

Aspectos gerais da mutação

Qualquer alteração súbita do material genético que não seja explicada pela recombinação capaz de ser transmitida à descendência celular caracteriza-se em uma mutação. A transmissão desse evento genético depende da linhagem celular em que ele ocorra, células germinativas ou somáticas (SNUSTAD e SIMONS, 2000; ROUSE e JACKSON, 2002; SIVIERO e MACHADO-SANTELLI, 2008). As mutações são classificadas em pontuais quando afetam um único par de bases, são consideradas como as principais causas de doenças de origem genética. A ocorrência de eventos mutacionais pode ser aumentada pela exposição do organismo a agentes mutagênicos, a chamada mutação induzida. O potencial ou eficiência desses agentes é avaliado pelo incremento da frequência de mutações em relação ao nível basal, quando se analisa um organismo a ele exposto (SIVIERO e MACHADO-SANTELLI, 2008).

A avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos é feita mediante testes *in vivo* e *in vitro* bem padronizados que utilizam diferentes sistemas biológicos. O principal objetivo dessa avaliação consiste em quantificar o perigo de mutação do material genético e consequentemente transmissão hereditária destas mutações. Esses testes são, na maioria das vezes, empregados para prever o desenvolvimento de câncer (SIVIERO e MACHADO-SANTELLI, 2008).

Os testes de mutagenicidade são empregados como testes de triagem para prever o potencial carcinogênico das substâncias. Entretanto, eles apenas avaliam as substâncias que produzem câncer por mecanismos genotóxicos, isto é, que interagem diretamente com o material genético (ERNEST e PATRICIA, 1997).

Inicialmente testes envolvendo um modelo procarionte, a *Salmonella typhimurium* foram utilizado por AMES (1975) para analisar mutações pontuais em cepas mutantes cultivadas em meio a uma enzima (fosforribosil ATP sintetase) necessária para a síntese da histidina. A partir daí, outros testes foram desenvolvidos em modelos eucariontes (SIVIERO e MACHADO-SANTELLI, 2008).

A *Drosophila* é utilizada pelo fato de ser um modelo experimental com características genéticas conhecidas que possibilita o estudo de mutações pontuais, deleções, translocações, perda cromossômica e não disjunção (RUBIN e LEWIS, 2000).

Atualmente a *Drosophila* possui uma variedade de linhagens, que apresentam diversos marcadores moleculares e outras propriedades que facilitam as manipulações genéticas. A clonagem molecular e a análise funcional dos genes da *Drosophila* tornaram

possível reunir um perfil molecular de muitos processos celulares e de desenvolvimento. Genes clonados em *Drosophila* levaram à identificação de cognatos em mamíferos que apresentam funções intimamente relacionadas. Isto inclui fatores de transcrição e seus reguladores, proteínas estruturais, proteínas cromossomais, canais iônicos e proteínas sinalizadoras. Os genes *homeobox* são alguns dos exemplos da conservação genética entre moscas e outros animais. Mais recentemente, tem sido demonstrada uma alta correlação entre os caminhos que controlam o desenvolvimento dos membros, sistema nervoso, olhos, sistema circulatório, bem como um complexo de interações sistêmicas - como o ritmo circadiano e imunidade inata (RAND, 2010).

O aparato bem desenvolvido de sistemas utilizados para análise genotóxica em *Drosophila melanogaster* tem sido amplamente utilizado para testar também a antigenotoxicidade de vários compostos e misturas complexas (GRAF *et al.*, 1984).

O teste SMART

Dentre as metodologias disponíveis para o estudo de compostos químicos de origem sintética ou natural está o teste para detecção de mutação e recombinação somática – SMART (*somatic mutation and recombination test*) descrito inicialmente por Graf *et al.* em 1984, essa metodologia é realizada com o díptero *Drosophila melanogaster*. O teste é capaz de detectar mecanismos que leva à perda da heterozigose. Estudos sobre os eventos genéticos relacionados com o desenvolvimento de tumores, por exemplo, demonstram a importância da perda da heterozigose. Essa perda se dá por eventos genéticos que levam à homozigose ou hemizigose das células filhas (ANDRADE *et al.*, 2003).

O teste SMART de asa detecta a perda de heterozigose de genes marcadores que determinam fenótipos identificados nas asas de *Drosophila melanogaster*. É um método que utiliza células somáticas e pode ser feito em uma só geração. Pode ser utilizado um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas, misturas complexas e também partículas gasosas. Segundo GRAF *et al.* (1984) e ANDRADE *et al.* (2003) o teste fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário da larva de *Drosophila*, grupos de células (os discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose entre a fase larval e adulta, em estruturas que originam as asas da mosca. Uma vez que estas células sofram danos no DNA, irão traduzir uma mutação fenotípica visível nas células das asas do indivíduo adulto.

O teste SMART de asa faz uso de dois genes marcadores para a forma dos pelos das asas: pelos múltiplos (*mwh*) e pelos cujo formato lembra uma "chama de vela", chamado *flare* (*flr³*), e baseando-se na indução de alterações genéticas que originam a perda de heterozigose em células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos. Quando ocorre uma alteração genética em uma das células que estão se dividindo por mitose, é formado um clone de células mutantes que pode ser detectado fenotipicamente como uma mancha mutante na superfície das asas dos adultos. A análise das mutações induzidas pelo tratamento é feita pela observação de grupos de células que expressam os genes marcadores *flr³* e *mwh*, responsáveis por mudanças na forma dos pêlos ou tricomas (GRAF *et al.*, 1984).

Embora o número total de manchas mutantes forneça dados quantitativos sobre a atividade genotóxica do composto testado, o tipo de mancha pode revelar também quais foram as diferentes mutações envolvidas na origem dos clones. Assim, manchas mutantes simples (pequenas ou grandes), que expressam o fenótipo mutante *flr³* ou *mwh*, indicam a ocorrência de mutações pontuais, alterações cromossômicas ou recombinação mitótica. Já as manchas gêmeas - formadas por células adjacentes *flr³* e *mwh* - têm origem exclusivamente por recombinação, o que significa que este tipo de mancha pode fornecer indicações preliminares sobre a ação recombinogênica do composto testado.

Aspectos metodológicos do teste SMART

Os estoques de *Drosophila melanogaster* são mantidos em frascos de vidro de 300 mL, contendo o meio de cultura padrão feitos com 1.000 mL de água destilada, 70 g de açúcar cristal, 50 g de fermento biológico (Fleischman e Royal Ltda), 7 g de ágar, 0,005 g de nipagin e 100 g de farinha de milho (ANDRADE *et al.*, 2003). Este meio de cultura também é utilizado para os cruzamentos.

Para obtenção de larvas de terceiro estágio utiliza-se também um meio de ovoposição, contendo uma base sólida de ágar-ágar a 2,5% com aproximadamente 1 cm de espessura, coberta por uma camada de aproximadamente 3cm de fermento pastoso (Fleischman e Royal Ltda) - previamente aquecido em banho-maria e fermentado com sacarose na seguinte proporção: 500 g de fermento, 2 colheres de açúcar e 20 mL de água destilada. Os tratamentos das larvas são feitos em tubos plásticos descartáveis contendo 0,9g de meio de cultura instantâneo e hidratado com 3mL de solução-teste.

Todas as culturas de *Drosophila melanogaster* são mantidas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a umidade de 60-70%. São utilizadas duas linhagens de *Drosophila melanogaster*, sendo que cada linhagem possui genes marcadores específicos localizados no braço esquerdo do cromossomo 3, que se expressam fenotipicamente na forma dos pelos das asas. Suas constituições genotípicas encontram-se representadas abaixo:

- **flr³** - *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^S*
- **mwh** - *mwh/mwh*

O cromossomo balanceador *TM3*, presente na linhagem **flr³** é indispensável para a manutenção do gene marcador em heterozigose, pois este gene é um letal zigótico (GARCIA-BELLIDO *et al.*, 1976).

É realizado o cruzamento padrão, onde fêmeas virgens *flr³* são cruzadas com machos também virgens *mwh* (**Figura 3**).

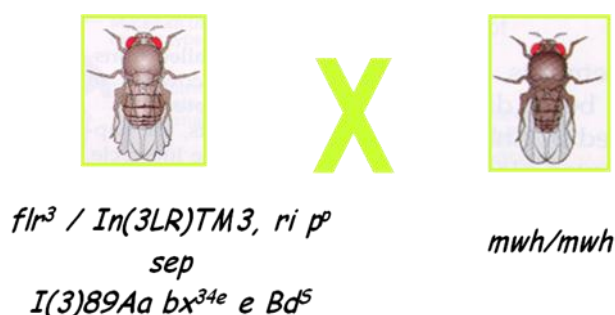


Figura 3. Cruzamento padrão.

Após um período de 3 dias se formarão larvas descendentes com duas constituições genotípicas:

- **mwh + / + flr³** – que serão trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³*, ligados ao cromossomo 3;
- **mwh + / TM3, Bd^S** – que serão heterozigotas para o cromossomo balanceador *TM3*. As asas destes indivíduos adultos tem um padrão recortado (**Figura 4A**), devido à presença

do marcador Bd^S , o que permite diferenciá-los dos indivíduos trans-heterozigotos que apresentam asas com formato normal (**Figura 4B**).

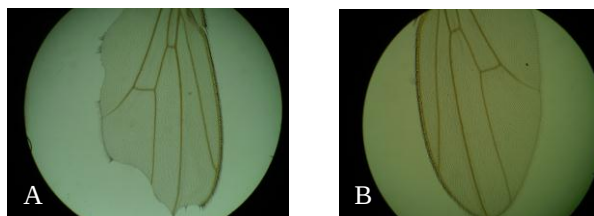


Figura 4. Aspecto da asa recortada (A) e asa normal (B) de *D. melanogaster*.

Tratamentos

O tratamento inicia-se com o cruzamento de fêmeas e machos em vidros, contendo meio de cultura de farinha por um período de 3 dias. Ao término deste tempo os casais são transferidos para vidros contendo meio de ovoposição por um período de 8 horas. Após este período, os casais são descartados, ficando apenas as larvas nos vidros, por 72 ± 4 horas a partir do início da ovoposição. Após o período da ovoposição as larvas em terceiro estágio são contadas em 100 unidades para cada tubo de concentração do composto a ser estudado. Elas são separadas do fermento por flotação em água corrente, sendo transferidas, em seguida, para tubos plásticos descartáveis contendo meio de cultura sintético (0,9 g) hidratado com as soluções de tratamento (3 mL).

As larvas ficam expostas aos tratamentos, com diferentes concentrações dos compostos, por aproximadamente 48 horas (tratamento crônico), sendo que, neste período, as células dos discos imaginais passam por sucessivos ciclos de divisão mitótica (5 a 6 divisões), sob a ação dos inseticidas, até atingirem o estágio de pupa.

Todos os indivíduos adultos nascidos a partir de 10 a 12 dias após a postura dos ovos são conservados em etanol 70%.

Montagem das lâminas

As moscas nascidas são retiradas dos tubos e lavadas em solução fisiológica e estocadas em etanol 70%. Em seguida as asas dos imagos (adultos eclodidos) de fêmeas e machos são separadas do corpo com auxílio de duas pinças de relojoeiro (n.5) e mergulhadas em solução de FAURE (preparada com 30g de goma arábica, 20mL de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50mL de água). Após este procedimento as asas são retiradas da solução e distendidas sobre a superfície de lâminas de vidro, onde são

mantidas por um período de 24 horas para secagem. Posteriormente, são cobertas com lamínulas (24 x 32 mm), contendo uma gota da solução de FAURE, permanecendo por mais 24 horas pressionadas com cubos de metal – com peso total de aproximadamente 400g – visando uma perfeita aderência das asas às lâminas. São montadas lâminas com imagos trans-heterozigotos ou com imagos heterozigotos para o cromossomo *TM3* separadamente, sendo que cada lâmina contém cinco pares de asas de fêmeas e cinco pares de asas de machos.

Análise microscópica

Ao microscópio, são analisados os adultos trans-heterozigotos e heterozigotos para o cromossomo *TM3*, considerando-se o fenótipo dos tricomas presentes nas superfícies dorsal e ventral das asas.

A presença de manchas simples, com um único tipo de fenótipo mutante *mwh* (pelos múltiplos, **Figura 5**) ou *flr³* (pelos de base alargada, **Figura 6**) pode determinar a ocorrência de diferentes eventos mutagênicos, tais como mutação pontual e alterações cromossômicas ou recombinação mitótica.

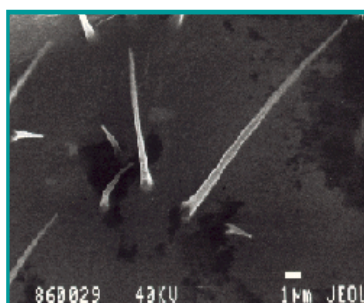


Figura 5. Pelo *mwh*.

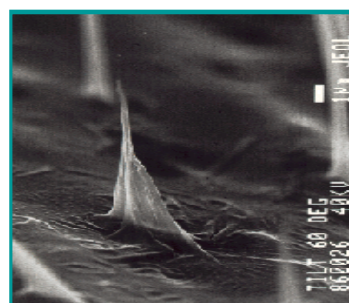


Figura 6. Pelo *flr³*.

Fonte: Andrade *et. al*, (2003).

As manchas com o mesmo fenótipo e com um a dois pelos mutantes são catalogadas como *manchas simples pequenas*. As manchas com três ou mais pelos mutantes catalogadas como *manchas simples grandes*.

As manchas simples pequenas (**Figura 7A**) são oriundas de um a dois ciclos de divisão celular. Já as manchas simples grandes (**Figura 7B**) são características de mais de duas divisões celulares da fase de alimentação larval. E as manchas que apresentaram uma

combinação de fenótipos (*mwh* e *flr*³) são catalogas como manchas gêmeas (**Figura 7C**) e expressam exclusivamente eventos relacionados com a recombinação mitótica.

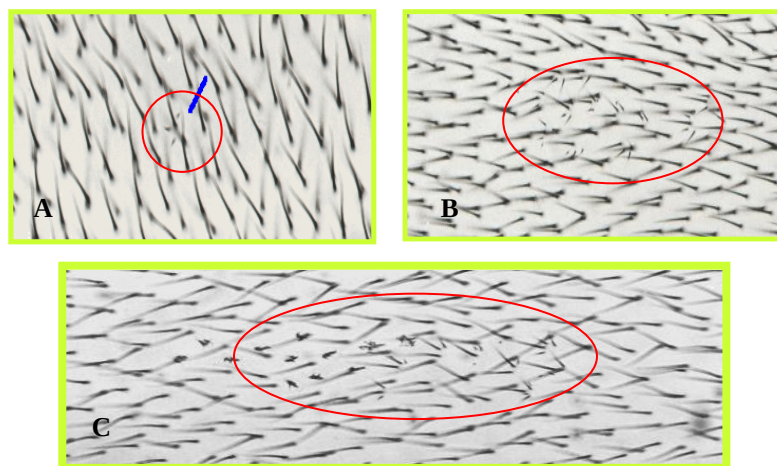


Figura 7. Aspecto da mancha de pelos, simples pequena (A), simples grande (B) e mancha gêmea (C) nas asas de *D. melanogaster*.

Fonte: Andrade *et. al*, (2003).

São analisados os tricomas dos adultos trans-heterozigotos e dos heterozigotos para o cromossomo *TM3* presentes nas regiões ventral e dorsal e nos compartimentos distais das asas. Cada lâmina é montada com cinco indivíduos de cada sexo e as análises são realizadas com ajuda de um microscópio óptico com aumento de 400 vezes. As análises seguem a ordem alfabética da classificação das seções das asas (de A até E) (GARCIA-BELLIDO *et al.*, 1976) conforme **Figura 8**.

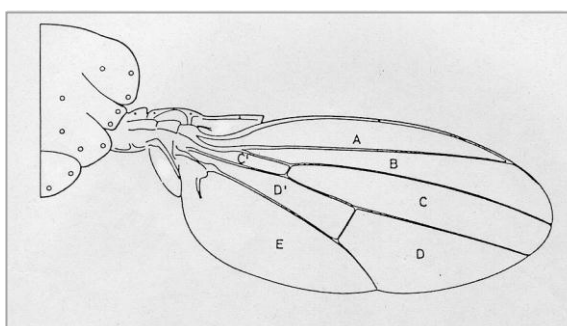


Figura 8. Seções de leitura na asa (letras A – E).

Fonte: Andrade *et. al*, (2003).

Bases genéticas do teste SMART

Adultos trans-heterozigotos

Observando-se a manifestação fenotípica da forma dos pelos presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos, pode-se caracterizar os eventos ocorridos conforme o tipo de mancha mutante encontrada. Sendo assim, **manchas simples** com fenótipo de pelos múltiplos (*mwh*) ou pelos com a base alargada (*flr³*) podem originar-se por mutação gênica, mutação cromossômica e/ou recombinação mitótica.

As **manchas simples** com o fenótipo *mwh* podem ocorrer em consequência de recombinação simples entre os loci *mwh* e *flr³*, ao passo que a ocorrência de duas recombinações simples (entre *flr³* e o centrômero seguida de *flr³* e *mwh*) origina pelos de base alargada.

Desta forma, as manchas simples podem ser produto tanto de eventos mutacionais - incluindo as mutações pontuais e mutações cromossômicas - como também por recombinação mitótica. Já as **manchas gêmeas**, cuja manifestação fenotípica expressa simultaneamente os marcadores *flr³* e *mwh*, são produzidas exclusivamente por eventos de recombinação simples entre *flr³* e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental.

Adultos heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3

A análise das asas de indivíduos adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* revela exclusivamente manchas simples que expressam o fenótipo pelos múltiplos. Além disso, o cromossomo *TM3* possui uma série de inversões em aproximadamente 90% de toda a sua extensão, causando inviabilidade das células que sofrem recombinação mitótica. Consequentemente, células mutantes observadas nestes indivíduos são resultantes de eventos relacionados com mutação gênica e/ou mutações cromossômicas.

Assim, a comparação dos resultados obtidos nos dois genótipos, permite quantificar, separadamente, a porcentagem de eventos mutagênicos e recombinogênicos no total de eventos genotóxicos ocorridos.

Curva de sobrevivência

Após o nascimento dos adultos submetidos aos tratamentos com os compostos e submetidos ao tratamento controle é traçada uma curva de sobrevivência. Essa curva reflete o número de indivíduos nascidos vivos após o experimento.

Através da curva de sobrevivência é possível reconhecer o potencial tóxico de determinadas concentrações escolhidas no experimento. É esperado o nascimento de aproximadamente 100% das larvas submetidas ao tratamento controle, e um decréscimo da sobrevivência à medida que aumentam as concentrações dos compostos testados se o composto testado for tóxico. Na ausência de nascidos vivos, conclui-se que a concentração é letal.

Análise estatística

Em experimentos realizados para avaliação genotóxica de um determinado fármaco, as séries tratadas são comparadas com uma série controle, que geralmente é o solvente. A partir desta análise pode-se calcular o potencial genotóxico do produto testado (ANDRADE *et al.*, 2003).

FREI e WÜRGLER (1988) propuseram duas hipóteses estatísticas que, quando combinadas, permitem distinguir entre as possibilidades de um resultado positivo, fraco positivo, inconclusivo ou negativo.

Na hipótese nula (H_0) assume-se que não existe diferença na frequência de mutações entre as séries tratadas e o controle negativo (frequência espontânea). Considerando uma análise unicaudal, a rejeição da hipótese nula indica que o tratamento resultou em uma frequência de mutações estatisticamente maior que o controle negativo. A hipótese alternativa (H_A) postula *a priori* que o tratamento resultou em uma frequência de mutações m vezes maior quando comparado com a frequência espontânea. O fator multiplicador (m) foi estabelecido empiricamente como $m=2$ para o total de manchas e para as manchas simples pequenas, devido a sua maior frequência espontânea, e $m=5$ para as manchas simples grandes e também para as manchas gêmeas (FREI e WÜRGLER, 1988; 1995). A rejeição de H_A indica que o tratamento não produziu um aumento suficiente de manchas para o composto ser considerado genotóxico.

Para cada hipótese testada existem duas respostas possíveis: (i) aceita-se H ou (ii) rejeita-se H . A combinação entre as respostas obtidas para as duas hipóteses testadas pode ser visualizada, conforme o quadro abaixo:

Resultados possíveis obtidos a partir da combinação das hipóteses H_0 e H_A :

HIPÓTESES	Aceita-se H_0	Rejeita-se H_0
Aceita-se H_A	inconclusivo	positivo
Rejeita-se H_A	negativo	fraco positivo

Para testar as duas hipóteses é utilizado o teste binomial condicional, com um nível de significância igual a 5% (ANDRADE *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 2

2. Resultados

Ação tóxico-genética dos larvicidas *dilapiol* e *espinosade* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

E.H.P. Aciole^a, N.N. Guimarães^b, A.S. Silva^c, E.M. Amorim^c, S.M. Nunomura^d, A.C.L. Garcia^c, K.S. Cunha^b, C. Rohde^{c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

^bLaboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

^cLaboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

^dCoordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

Palavras-chave: SMART, Óleo essencial, Genotoxicidade, Recombinação Mitótica.

*Autor para correspondência: Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bairro Bela Vista, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil, CEP 55608-680. Tel./Fax: +55.81.3523.3351.
E-mail: claudiaUFPE@gmail.com (C. Rohde).

Abreviações:

Autores

E.H.P. Aciole - Eliézer Henrique Pires Aciole;
N.N. Guimarães - Nilza Nascimento Guimarães;
A.S. Silva - André Severino da Silva;
E.M. Amorim - Érima Maria de Amorim;
S.M. Nunomura - Sérgio Massayoshi Nunomura;
K.S. Cunha - Kenya Silva Cunha;
A.C.L. Garcia - Ana Cristina Lauer Garcia,
C. Rohde - Cláudia Rohde.

Trabalho a ser submetido à revista *Food and Chemical Toxicology* (Fator de Impacto 2,6)

2.1 RESUMO

A dengue, atualmente, é uma das mais incidentes doenças transmitidas ao homem por um inseto, o mosquito vetor *Aedes aegypti*. O enfrentamento da situação epidemiológica desencadeada por esta doença tem acarretado um aumento expressivo do uso de inseticidas organofosforados, com comprovados efeitos maléficos à saúde humana e ao ambiente. O controle dos insetos vetores tem motivado a comunidade científica na busca constante de novas formulações químicas que sejam capazes de controlar os insetos e, ao mesmo tempo, causar efeitos tóxico-genéticos mínimos. Novas alternativas incluem os extratos vegetais e metabólitos secundários de organismos procariontes, que têm demonstrado atividade larvicida, como o fenilpropanóide dilapiol, extraído da planta *Piper aduncum*, e as espinosinas A e D obtidas da fermentação da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* e que formam o espinosade. Este trabalho se propôs a investigar o efeito genotóxico dos larvicidas dilapiol e espinosade, buscando caracterizar, quantificar e padronizar por unidade de exposição, os efeitos destes compostos em nível de mutações pontuais, cromossômicas e/ou recombinação mitótica. O efeito toxico-genético dos compostos foi avaliado através do teste para detecção de mutação e recombinação somática (*Somatic Mutation and Recombination Test – SMART*) em asas de *Drosophila melanogaster*. Para tanto, larvas de 72 horas de vida, provenientes do cruzamento padrão (ST), foram submetidas a diferentes concentrações do dilapiol e do espinosade. Água destilada e doxorrubicina (DXR) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente, para comparação com os tratamentos. A análise demonstrou que ambos os compostos testados apresentaram atividade tóxico-genética positiva, principalmente relacionada à indução de eventos recombinogênicos. Esta investigação veio comprovar a necessidade de mais estudos sobre os potenciais riscos do uso de inseticidas, como o dilapiol e espinosade, sendo imprescindíveis novas investigações em outros modelos experimentais e com outras metodologias a fim de garantir o uso seguro para a saúde humana e o meio ambiente.

2.2 ABSTRACT

Dengue is currently one of the most insidious diseases transmitted to humans by an insect, the mosquito *Aedes aegypti*. The coping of the epidemiological situation triggered by this disease has caused a significant increase in the use of organophosphate insecticides, proven to be harmful to human health and the environment. The control of insects has motivated the scientific community in constant search of new chemical formulations, at the same time able to control the insects with minimum genetic toxic effects. New alternatives include vegetable extracts and secondary metabolites of prokaryotes, which have larvicidal activity. They are the phenylpropanoid dilapiol, extracted from the plant *Piper aduncum*, and the spinosyns A and D from fermenting the bacterium *Saccharopolyspora spinosa* which form the spinosad. This work aims to investigate the genotoxic effect of larvicides dilapiol and spinosad, seeking to characterize, quantify and standardize per unit of exposure, the effects of these compounds at the level of mutations, chromosomal and/or mitotic recombination. The toxic-genetic effect of the compounds was evaluated by somatic mutation and recombination test (SMART) in wings of *Drosophila melanogaster*. Larvae of 72 hours of life from standard crosses (ST) were submitted to different concentrations of dilapiol and spinosad. Distilled water and doxorubicina (DXR) were used as negative and positive controls, respectively, for comparison with the treatments. The analysis showed that both compounds tested presented positive toxic-genetic activity, mainly related to the induction of events of mitotic recombination. This investigation has come to prove the need for more studies on the potential risks of using insecticides such as spinosad and dilapiol, and further investigations in other experimental models and other methodologies are essential to ensure the safe use for human health and the environment.

2.3 Introdução

A dengue é uma infecção viral, com quatro sorotipos diferentes, transmitida por insetos do gênero *Aedes*. É considerada uma das maiores preocupações mundiais de Saúde Pública, tendo ampla incidência nos países tropicais e subtropicais. Mesmo assim, populações humanas de todo mundo estão em risco, já que a projeção de infecções anuais está estimada entre 50-100 milhões nos mais de 100 países endêmicos da doença (WHO, 2012). O mosquito *Aedes aegypti* L. é o principal inseto transmissor da dengue nos países tropicais, com frequentes epidemias decorrentes de fatores relacionados não só à biologia e ao comportamento do vetor (i.e., adaptação biológica e resistência), mas também aos problemas típicos dos centros urbanos, que favorecem o desenvolvimento dos organismos (Gadelha e Toda, 1985; Ishak, 1987; Marzochi, 1994; Monath, 1994). Na tentativa de manter o controle dos casos da doença, são destinadas, continuamente, quantias significativas de recursos para programas contra o vetor. O controle feito através do uso de inseticidas, entre eles o *temephos*, *malathion* e *fenitrothion*, constitui a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública. Entretanto, em diferentes partes do mundo (Rawlins e Wan, 1995; Wirth e Georghiou, 1999) e no Brasil (Macoris *et al.*, 2003), tem sido registrada resistência deste díptero aos inseticidas convencionais. A escolha de produtos naturais e/ou biológicos para o controle desse e outros insetos nocivos ao homem é de grande importância para a saúde humana. E entre os produtos naturais candidatos estão os óleos essenciais, efetivos contra uma variedade de bactérias, fungos, protozoários, parasitas, ácaros, moluscos e larvas de insetos.

Tendo em vista a grande diversidade de plantas existentes no Brasil, com um total estimado entre 350 e 550 mil espécies (Sandes e Blasi, 2000), estudos dos seus extratos vegetais oferecem a possibilidade de serem encontradas novas substâncias com propriedades inseticidas e, simultaneamente, seletivas para serem usadas em futuras formulações de produtos comerciais. Diversos estudos comprovam a atividade de extratos vegetais contra diferentes espécies de mosquitos (Daharam Shaktu e Menon, 1983; Consoli *et al.* 1989, Guimarães *et al.* 2001) incluindo o *A. aegypti* (Angerilli, 1980; Silva *et al.* 2004).

Conhecida por pimenta longa, a espécie *Piper aduncum* é responsável pela formação do óleo essencial denominado *dilapiol*. Entre suas comprovadas propriedades está o efeito larvicida, sendo considerado altamente eficaz contra larvas de *A. aegypti* com 92% de eficiência no controle das formas imaturas (Bernard *et al.*, 1995; Bergeron e Vasques, 1996; Pohlit, *et al.*, 2004, Souto, 2006). No entanto, poucos são os estudos acerca dos efeitos mutagênicos deste composto. O termo se refere aos diferentes danos genéticos induzidos

por agentes externos, que são transmitidos tanto pelas células somáticas como pelas germinativas (Davino e Barros, 2008). Uma das maneiras de se prevenir o efeito adverso de certos produtos químicos e substâncias naturais é a triagem de seu potencial genotóxico através de testes rápidos, realizados especialmente com bactéria, drosófila, camundongo ou cultura de células humanas ou de animais. Neste sentido Rafael *et al.*, (2008) avaliaram o efeito do óleo essencial dilapiol sobre pupas e larvas do mosquito *A. aegypti*. Os autores descreveram a ocorrência de mudanças físicas e cromossômicas, entre elas quebras cromossômicas e pontes anafásicas, que foram significativamente superiores aos controles.

O uso de compostos biológicos de natureza microbiológica para o controle de insetos também é uma alternativa viável e merece ser estudada do ponto de vista genotóxico. Um dos compostos atualmente disponíveis em forma comercial é o espinosade, descoberto na década de 1980 (Thompson *et al.*, 1997). A fermentação da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* forma metabólitos secundários denominados de espinosinas e, dentre elas, destacam-se as espinosinas A e D. Juntas, elas formam o espinosade, considerado um inseticida seletivo (Miles e Dutton, 2000), com excelente perfil toxicológico ambiental e em mamíferos (Crouse e Sparks, 1998; Sparks *et al.*, 1998 e 1999; Thompson *et al.*, 2000) e com margem de segurança a outros insetos não vetores e outros organismos (Schoonover e Larson, 1995; Elzen *et al.*, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito tóxico-genético dos larvicidas dilapiol e espinosade através do teste para detecção de mutação e recombinação somática (*Somatic Mutation and Recombination Test – SMART*) em asas de *Drosophila melanogaster*. Esta espécie, conhecida como mosca da fruta, é tida como um modelo experimental ideal para estudos na área de genética, pois possui um sistema enzimático que permite a metabolização de agentes xenobióticos, e diversas vantagens como a facilidade na manutenção, rápida e alta reprodutibilidade e baixo número de cromossomos (Graf *et al.*, 1984). O teste (SMART) em células de asas de *D. melanogaster*, descrito por Graf *et al.* (1984) permite a identificação de atividade mutagênica e/ou recombinogênica ocorridas em loci específicos do cromossomo 3 da espécie. Esse teste foi desenvolvido para identificar a perda de heterozigose de genes ligados à expressão fenotípica dos pelos das asas das moscas.

2.4 Material e Métodos

Larvicidas e diluições

O óleo essencial dilapiol, princípio ativo da espécie *Piper aduncum* (pimenta longa) foi produzido pelo Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). O composto, o mesmo utilizado por RAFAEL *et al.* (2008), foi obtido de extratos de óleos voláteis a partir de folhas secas de *P. aduncum* submetidas à hidro destilação, em um aparato modificado, durante 4 horas. Após a purificação em coluna de cromatografia foi obtido o composto puro (>95%), confirmado por análise de cromatografia de gás.

O larvicida espinosade (Natular™ DT, Laboratório Clarke) foi obtido na forma de pastilha, composta de duas camadas, uma de Espinosina A e outra de Espinosina D. Cada pastilha de 1,35g contém o princípio ativo espinosade a 7,48%. O composto pertencente ao grupo das toxinas de origem biológica, pois é um metabólito secundário da fermentação aeróbia do actinomiceto *Sacchapolyspora spinosa*.

As diferentes concentrações do composto dilapiol testadas foram diluídas em 5% de tween 80 + e 5% de etanol. No caso do espinosade, foi utilizada apenas água destilada estéril como solvente. Para o estabelecimento dos controles negativos dos experimentos, larvas foram transferidas para tubos contendo o mesmo meio de cultivo, hidratado apenas com os respectivos diluentes do dilapiol e do espinosade, sem qualquer traço dos compostos. Como controle positivo foi utilizado o Cloridrato de Doxorrubicina - DXR (Glenmark Farmaceutic Ltda) a 0,2 mM (ou 108.692 µg/mL). As concentrações das soluções empregadas nos experimentos foram obtidas a partir de experimentos pilotos que determinaram a solubilidade máxima dos compostos. A partir da concentração máxima de 50.000 µg/mL de dilapiol foram estabelecidas as demais concentrações, utilizando o fator divisor 5 até a menor concentração (3,2 µg/mL). Para o espinosade, foi preparada uma solução-mãe concentrada a 1.000 µg/mL. E para a preparação das concentrações mais diluídas (200, 40, 8, 1,6 e 3,2 µg/mL) foi utilizado também o mesmo fator de diluição 5, como no dilapiol. Em um segundo experimento, foi preparada uma diluição intermediária adicional de 0,96 µg/mL, três vezes mais concentrada que a menor diluição, de 0,32 µg/mL.

Linhagens utilizadas e cruzamentos

Em todos os experimentos foram utilizadas duas linhagens parentais mutantes de *Drosophila melanogaster* para forma dos pelos das asas, uma portadora do marcador

genético *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e outra portadora do marcador *flare-3* (*flr*³, 3-38,8). Segundo Lindsley e Zimm (1992) a linhagem *mwh* possui o gene marcador recessivo homozigoto para mutações viáveis com expressão fenotípica de 3 ou mais pelos mutantes em uma mesma célula. Já a linhagem denominada *flr*³ resulta em um pelo de asa na forma de vela de barco ou chama de vela. Por possuir alelos no cromossomo 3 que são letais em homozigose, a linhagem *flr*³ se mantém em cultivo através de cromossomos balanceadores, que carregam inversões múltiplas, e de marcadores dominantes denominados *TM3* e *Bd*^S, respectivamente.

Através do cruzamento padrão - ST (Graf *et al.*, 1984), fêmeas *flr*³ com o genótipo balanceador *flr*³/*ln* (3*LR*) *TM3*, *ri p^psep l(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd*^S, foram cruzadas com machos homozigotos *mwh/mwh*. A progênie heterozigota resultante deste cruzamento ST pode ser de dois tipos genotípicos: i) trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr*³ (*mwh* + / + *flr*³) e com fenótipo de asas normais arredondadas; ii) heterozigotas para o cromossomo balanceador *TM3* (*mwh* +/ *TM3*, *Bd*^S), com fenótipo de asas recortadas.

Cultura e tratamentos das linhagens

Fêmeas envolvidas no cruzamento ST permaneceram por 8 horas em frascos de vidro a fim de ovopositar sobre uma camada de 3 cm de fermento pastoso (Fleischman e Royal Ltda) suplementado com sacarose, previamente montado sobre uma base sólida de ágar. Esta base de 1 cm de espessura foi preparada a partir de 5% (p/v) de ágar, diluído em água. Larvas descendentes com 72h ± 4 horas de vida (3º estágio) foram coletadas e separadas do fermento por meio de lavagem e filtragem em peneira de malha fina, sendo transferidas para tubos plásticos descartáveis. Cada tubo continha 1,5 g de purê de batatas instantâneo (YOKI SA), previamente hidratado com 5 mL das diferentes concentrações do dilapiol e de espinosade, separadamente. As larvas se alimentaram deste meio até o restante do seu desenvolvimento (48h). Após a eclosão, os adultos sobreviventes foram coletados e estocados em etanol a 70%. Todos os experimentos foram realizados em ambiente controlado, a 25°C e 65% de umidade relativa.

A partir do número de indivíduos sobreviventes após a eclosão de 100 larvas tratadas em cada concentração, foi traçada uma curva de sobrevivência para cada composto.

Montagem das asas e contagens dos pelos

As asas das moscas estocadas em etanol foram destacadas com auxílio de pinças, depois banhadas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água) e distendidas sobre uma lâmina de vidro, devidamente identificada. Posteriormente, as lâminas foram mantidas na posição horizontal até a secagem, por 24 horas. No final, procedeu-se a montagem das lamínulas, e secagem por mais 48 horas. Foram montadas e analisadas asas dos descendentes *trans-heterozigotos* cujos pelos mutantes resultam de fenômenos de mutação pontual, cromossômica e recombinação mitótica. Já os pelos mutantes encontrados nos adultos *heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3*, expressam apenas eventos mutacionais, pois recombinação mitótica resulta em um produto inviável, neste caso o fenótipo flr^3 não será observado. Para análise dos pelos utilizou-se um microscópio óptico de luz em um aumento de 400x. Foram registrados o número e os tipos de manchas de pelos encontradas: *simples pequenas* quando apresentaram de um a dois pelos com fenótipo mwh ou flr^3 ; *simples grandes* quando apresentar manchas mwh ou flr^3 com mais de três pelos mutantes; ou *manchas gêmeas* com os dois tipos de pelos na mesma mancha. No fim da análise, foram comparadas as frequências de manchas encontradas nas moscas tratadas com cada larvicida estudado e seus respectivos controles negativos.

Análise estatística

A análise estatística se baseou na comparação das frequências de cada tipo de manchas mutantes/indivíduo/concentração testada com a frequência das manchas dos indivíduos dos respectivos controles negativos, segundo o teste condicional binomial de Kastembaum e Bowman (1970). A significância dos resultados foi avaliada segundo o procedimento de decisão múltipla estabelecida por Frei e Würzler (1988), que apresenta quatro diagnósticos diferentes: positivo (+), fraco positivo (f+), negativo (-) e inconclusivo (i). A genotoxicidade total e o potencial mutagênico e/ou recombinogênico dos compostos foi quantificado como uma função das concentrações de exposição dos compostos testados, tomando como a base dois intervalos gênicos do cromossomo 3 de *D. melanogaster*, geneticamente conhecidos. A genotoxicidade foi definida pela regra de que a identificação da toxicidade genética requer que o total de manchas mutantes seja duas vezes maior no tratamento do que no controle, sem que ocorra, necessariamente, uma relação clara entre concentração-resposta (Cunha *et al.*, 2001; Tiburi *et al.*, 2002).

2.5 Resultados

Foi realizado um teste de sobrevivência das larvas de terceiro estágio que foram expostas às diferentes doses de dilapiol e espinosade. De acordo com o gráfico da **Figura 1A**, que indica o número médio de adultos sobreviventes no controle e nos tratamentos com dilapiol, não puderam ser analisados os sobreviventes nascidos do tratamento a 400 µg/mL, devido ao baixo número. Além disso, a Figura também indica que nos tratamentos de 2.000, 10.000 e 50.000µg/mL, o dilapiol apresentou efeito tóxico que causou a morte de quase todos os indivíduos tratados. Já a **Figura 1B** apresenta os resultados do número médio de adultos sobreviventes no controle e nos tratamentos com o composto espinosade. Neste caso, o composto se mostrou tóxico nas concentrações de 8, 40 e 200 µg/mL, com raros adultos sobreviventes.

Os resultados da análise das asas dos adultos descendentes do cruzamento padrão (ST), tratados com dilapiol e espinosade, estão apresentados na **Tabela 1**. Os resultados apresentam os resultados tóxico-genéticos totais para ambos marcadores, trans-heterozigotos (*mwh/flr³*) e heterozigotos balanceadores (*mwh/TM3*), para cada concentração, com número total analisado, frequência de diferentes pelos mutantes, total de manchas encontradas, e as médias das classes de tamanho das manchas e a frequência de indução de manchas por divisão celular. Como observado na tabela as frequências de manchas espontâneas dos indivíduos controles negativos atingiram valores compatíveis com os resultados esperados (Graf *et al.*, 1984). Nos testes com dilapiol foram analisados 165 indivíduos trans-heterozigotos e 136 indivíduos heterozigotos para o marcador TM3. Paralelamente, no experimento com o espinosade, foram analisados 164 indivíduos trans-heterozigotos e 154 indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3.

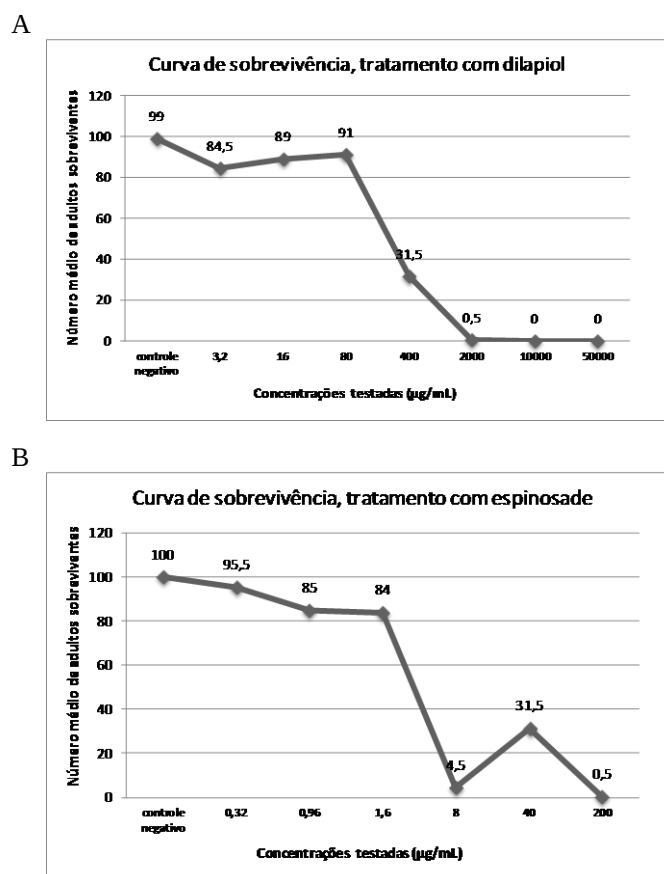


Figura 1. Número médio de adultos sobreviventes de *D. melanogaster* submetidos ao teste SMART, após exposição de 48h ao composto dilapiol **(A)** e espinosade **(B)**, em duas séries independentes de experimentos.

A representação final da genotoxicidade dos compostos foi testada estatisticamente, conforme resultados da **Tabela 1**. Em indivíduos trans-heterozigotos tratados com dilapiol, houve aumento significativo (+) das frequências de manchas simples pequenas e do total de manchas, quando comparados às frequências espontâneas no controle negativo, o mesmo não acontecendo com relação à indução de manchas simples grandes e manchas gêmeas, que apresentaram resultados inconclusivos (i). Para o espinosade, o resultado das análises estatísticas dos indivíduos trans-heterozigotos demonstrou aumento das manchas simples apenas na concentração de 1,6 µg/mL. Este diagnóstico positivo foi também encontrado na análise do total de manchas, em duas concentrações: 0,32 µg/mL e 1,6 µg/mL.

Os resultados positivos da análise do total de manchas nos tratamentos com os larvicidas (**Tabela 1**) indicam que ambos compostos foram capazes de induzir toxicidade genética.

A análise dos efeitos mutacionais induzidos pelo dilapiol e espinosade nas asas dos indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3 demonstrou frequências de indução de manchas maiores ou menores aos valores encontrados no controle negativo, na maioria das concentrações. Isso caracteriza os dados como inconclusivos para um possível efeito indutor de mutação.

A **Figura 2** mostra a distribuição das manchas de pelos mutantes *mwh* em indivíduos trans-heterozigotos tratados com dilapiol e espinosade. As manchas foram organizadas em 10 diferentes classes de tamanho. Nos gráficos apresentados na **Figura 2** pode-se observar que a maior incidência de alterações está representada por manchas com 1 a 2 células mutantes, sendo baixa a incidência de manchas grandes.

Tabela 1. Frequência e número de manchas de pelos mutantes em moscas trans-heterozigotas (*mwh/flr³*) e heterozigotas balanceadoras (*mwh/TM3*) de *Drosophila melanogaster* submetidas ao tratamento com dilapiol e espinosade, após cruzamento padrão (ST), e avaliação dos efeitos genotóxicos.

Genótipos e concentrações dos larvicidas (µg/mL)	Número de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (número de manchas) e diagnóstico estatístico ^a						Total de manchas mwh ^c (n)	Média das classes de tam. manchas mwh ^{c,d} (î)	Frequência (%) de indução de manchas (por 10 ⁵ cél./div. cel.) ^f (n/NC)	
		MSP	MSG	MG	TM						
		(1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	(>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2						
DILAPIOL											
<i>mwh/flr³</i>											
Controle negativo	45	0,36 (16)	0,13 (06)	0,04 (02)	0,53 (24)	24	1,96	1,09			
3,2	36	0,83 (30) +	0,08 (03) -	0,03 (01) -	0,94 (34) +	34	1,62 {1,18}	1,94 {0,84}			
16	42	0,93 (39) +	0,05 (02) -	0,00 (00) -	0,98 (41) +	41	1,29 {0,49}	2,00 {0,91}			
80	42	1,14 (48) +	0,07 (03) -	0,00 (00) -	1,21 (51) +	51	1,33 {0,84}	2,49 {1,40}			
<i>mwh/TM3</i>											
Controle negativo	35	0,40 (14)	0,03 (01)	— ^g	0,43 (15)	15	1,13	0,88			
3,2	32	0,41 (13) i	0,06 (02) i		0,47 (15) i	15	1,53 {5,80}	0,96 {0,08}			
16	32	0,56 (18) i	0,03 (01) -		0,59 (19) i	19	1,42 {2,17}	1,22 {0,34}			
80	37	0,30 (11) -	0,05 (02) i		0,35 (13) -	13	1,62 -{1,06}	0,72 -{0,16}			
ESPINOSADE											
<i>mwh/flr³</i>											
Controle negativo	47	0,51 (24)	0,04 (02)	0,02 (01)	0,57 (27)	27	1,63	1,18			
0,96	40	0,35 (14) -	0,03 (01) -	0,00 (00) -	0,38 (15) -	15	1,33 {2,19}	0,77 -{0,41}			
0,32	41	0,78 (32) i	0,10 (04) i	0,07 (03) i	0,95 (39) +	39	1,69 {1,79}	1,95 {0,77}			
1,6	34	0,85 (29) +	0,09 (03) i	0,06 (02) i	1,00 (34) +	34	1,56 {1,46}	2,05 {0,87}			
<i>mwh/TM3</i>											
Controle negativo	43	0,49 (21)	0,02 (01)	— ^g	0,51 (22)	22	1,23	1,05			
0,96	36	0,31 (11) -	0,00 (00) -		0,31 (11) -	11	1,09 {1,43}	0,63 -{0,42}			
0,32	35	0,60 (21) i	0,03 (01) i		0,63 (22) i	22	1,32 {1,72}	1,29 {0,24}			
1,6	40	0,65 (26) i	0,03 (01) i		0,68 (27) i	27	1,15 {0,90}	1,38 {0,33}			

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würdler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância 0,05. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^dNúmeros entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo. ^eC = 48.800, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo. ^fCalculado de acordo com Frei et al. (1992). ^gApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. MSP: Manchas Simples Pequenas; MSG: Mancha Simples Grande; TM: Total de Manchas.

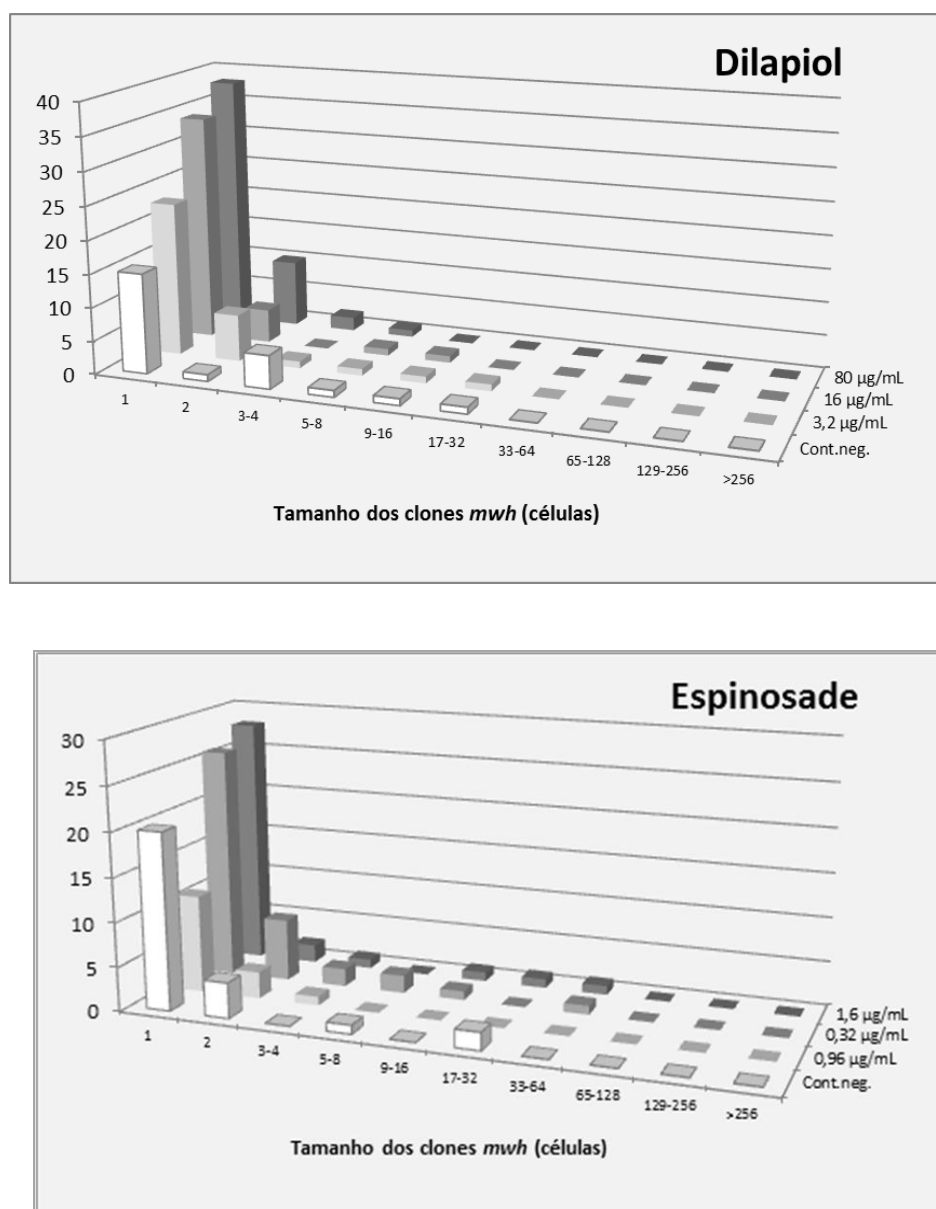


Figura 2. Distribuição do número de manchas de pelos mutantes, classificadas por classes (1 a > 256) em indivíduos trans-heterozigotos (*mwh/flr³*) controle negativos e tratados com diferentes concentrações de dilapiol e espinosade.

A **Tabela 2** apresenta uma visão comparativa da atividade genotóxica induzida pelos larvicidas dilapiol e espinosade. A análise dos resultados obtidos com os indivíduos trans-heterozigotos permite observar a indução de todos os tipos de eventos (mutacionais e recombinogênicos) causados por estes compostos.

A frequência padronizada dos clones *mwh* em áreas de 10^5 células indicado na primeira coluna da **Tabela 2** demonstra a ação genotóxica total induzida por µg/mL dos

compostos, nos indivíduos trans-heterozigotos. Comparando-se as frequências padronizadas do dilapiol e espinosade é possível verificar que o espinosade tem um potencial genotóxico 4 vezes maior que o dilapiol (4,20 e 0,3 para espinosade e dilapiol, respectivamente).

Da mesma forma, a análise das frequências padronizadas de clones mutantes induzidas pelos compostos, nos indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3, demonstra que o espinosade tem uma atividade indutora de mutações 0,6 vezes maior que o dilapiol, que teve uma atividade indutora nula de mutações.

Quando são comparadas as frequências padronizadas obtidas nos indivíduos trans-heterozigotos com os heterozigotos para o cromossomo TM3 pode-se obter a contribuição de eventos recombinogênicos, considerando a genotoxicidade total induzida pelos larvicidas. Os valores de porcentagem de recombinação apresentados na **Tabela 2** permitem a diagnose do dilapiol como um agente exclusivamente indutor de eventos do tipo recombinação mitótica (100%). No entanto, os valores obtidos na análise do espinosade demonstram que este composto induz preferencialmente eventos recombinacionais (85,71%), e em menos proporção, eventos mutacionais (14,29%).

Os resultados indicam, portanto, que os dois compostos são mais recombinogênicos do que mutagênicos.

Tabela 2.

Frequência padronizada da indução das mutações *mwh* por µg/mL das concentrações de exposição do dilapiol e do espinosade, e prevalência dos eventos de recombinação induzidos pelos compostos.

Compostos	Trans-heterozigotos <i>mwh/flr</i> ³			Heterozigotos para os marcadores <i>mwh/TM3</i>			Recombinação (%)
	Frequência padronizada ^b (clones <i>mwh</i> por 10 ⁵ céls. por µg/mL) (f_t)	Média geométrica de tamanho dos clones ^c (células) (2^{it-1})	Frequência padronizada por 10 ⁵ céls. corrigida p/ tam. dos clones ^d ($f'_t = 2^{it-2} \times f_t$)	Frequência padronizada ^b (clones <i>mwh</i> por 10 ⁵ céls. por µg.mL ⁻¹) (f_h)	Média geométrica de tamanho dos clones ^c (células) (2^{ih-1})	Frequência padronizada por 10 ⁵ céls. corrigida p/ tam. dos clones ^d ($f'_h = 2^{ih-2} \times f_h$)	Sem correção por tamanho de clone ($(1-f_h/f_t) \times 100$)
Dilapiol	0,30	0,88	0,10	0	30,06	0,30	100,00
Espinosade	4,20	1,35	2,90	0,60	0,82	0,20	85,71

^aTodos os valores foram corrigidos pelo controle. As frequências nas moscas heterozigotas para os marcadores *mwh/flr*³ foram calculadas sem correção para o tamanho dos clones (manchas); por conseguinte, estimativas um pouco diferentes são obtidas para as contribuições relativas de recombinação para os totais de clones induzidos. ^bAs frequências de clones por indivíduo, divididas pelo número de células examinadas por indivíduo (48.800) dão uma estimativa das frequências por célula e por divisão celular em experimentos de exposição crônica (Frei e Würigler, 1988). ^{c,d}A média geométrica e as correções foram calculadas de acordo com Frei et al. (1992).

2.6 Discussão

O dilapiol e o espinosade são compostos de efeito larvicida (Bernard et al., 1995; Maia et al., 1998; Pohlit et al., 2004; Silva et al., 2004; Crouse e Sparks, 1998; Sparks et al., 1998, 1999; Thompson et al., 2000; Bond et al., 2004; Stark et al., 2004; Huang e Subramanyam, 2007). No presente estudo foi possível determinar a relação entre a taxa de mortalidade de indivíduos e o uso de diferentes concentrações dos larvicidas dilapiol e espinosade. A taxa de mortalidade dos organismos expostos a larvicidas serve como parâmetro importante para determinar a toxicidade dos produtos. A relação entre a intensidade do efeito tóxico e a mortalidade está associada à concentração, tempo de exposição, composição química (formulação) e fatores como idade e saúde do organismo.

As curvas de sobrevivência produzidas após eclosão dos indivíduos submetidos aos tratamentos (Figura 1 dos resultados) revelaram que, nas concentrações testadas de 2.000, 10.000 e 50.000 µg/mL de dilapiol, houve a morte de quase todos os indivíduos. Já para o espinosade a toxicidade foi alta nas concentrações de 8 µg/mL e 200 µg/mL de espinosade, mas foi baixa na concentração intermediária de 40 µg/mL.

Conforme descrito por Davino e Barros (2008) a toxicidade de uma substância pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte ao organismo e para que tal dano ocorra é indispensável a interação do agente químico com o organismo. Muitos inseticidas comerciais são aplicados através de uma formulação que inclui um ingrediente ativo combinado com solventes orgânicos, emulsionantes ou agentes a base de água, a fim de afetar a penetração do inseticida no organismo e o seu desempenho final. Estes agentes aditivos podem amplificar ou antagonizar o efeito do ingrediente principal (Abo-Zeid et al., 1993). Assim, inseticidas formulados a partir de uma baixa qualidade de aditivos podem conter substâncias perigosas e impuras. Abo-Zeid et al. (1993) e Mansour e Mossa (2005) encontraram que inseticidas formulados, como o caso do *malathion*, podem ser mais efetivos na sua função de inibir o desenvolvimento do organismo, do que os produtos puros.

A toxicidade de extratos de plantas, como é o caso do dilapiol, vem sendo testada para o controle larvicida de espécies de mosquitos do gênero *Aedes* em diversas partes do mundo (Sharma et al., 1998, Silva et al., 2007). Entretanto, uma vez que um produto se mostre tóxico ao inseto, é preciso saber também se ele é genotóxico para outras espécies, já que o produto larvicida ficará também em contato com outros organismos e com o meio ambiente. Assim, informações não só sobre a toxicidade, mas também sobre a genotoxicidade das diferentes formulações de produtos são necessárias para que se possa avaliar os efeitos adversos dos inseticidas para a saúde humana e para o ambiente em geral (Dearfield et al., 1999; Bolognesi, 2003).

O presente trabalho se dedicou a estudar, em um segundo momento, o efeito genotóxico dos dois compostos nos indivíduos submetidos àquelas concentrações menos tóxicas (ou seja, com mais de 40% de sobreviventes). Assim, nas concentrações de 3,2, 16 e 80 µg/mL o dilapiol foi capaz de induzir atividade genotóxica (do tipo recombinação mitótica) com uma tendência aparente para o efeito dose dependente. Por outro lado, o efeito mutagênico do espinosade não foi dose dependente, pois se verificou que o efeito mutagênico foi positivo nas concentrações 0,32 e 1,6 µg/mL, e foi negativo na concentração intermediária de 0,96 µg/mL.

De acordo com os resultados da Figura 2 pode-se inferir que os larvicidas foram capazes de induzir alterações, predominantemente, no final das divisões celulares. Isso porque, após o tratamento as células-alvo sofrem de 5-6 ciclos de divisões (Frei e Würigler, 1988). Tais alterações também podem surgir pelo processo de aneuploidia.

Os resultados obtidos com os dois larvicidas no teste SMART de asa, após exposição crônica das larvas oriundas do cruzamento padrão, revelaram que a genotoxicidade do dilapiol e espinosade apresenta uma incidência de genotoxicidade com índices relativamente altos de indução de recombinação. A grande quantidade de manchas nos descendentes com níveis basais de citocromo P-450 (CYP450) demonstra que existem enzimas suficientes para a metabolização dos larvicidas. As mutações causam perda de heterozigose que podem envolver a perda de grandes segmentos de cromossomos e posteriormente causar danos importantes à informação genética do alelo específico (Langlois et al., 1989). A perda da heterozigose pode surgir por diversos caminhos, incluindo deleções, não disjunção mitótica bem como a recombinação entre cromossomos homólogos (Stark e Jasin, 2003).

Nas condições experimentais deste trabalho, o dilapiol apresentou efeito genotóxico. Os resultados também indicam que o espinosade foi, pelo menos, quatro vezes mais genotóxico do que o dilapiol, nas concentrações testadas. Como não houve efeito dose dependente nos testes com espinosade

Confrontando nossos resultados com os trabalhos mais relevantes da literatura, é possível fazer algumas importantes comparações. Rafael *et al.* (2008), por exemplo, submeteram larvas e pupas do mosquito *Aedes aegypti* às concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL de dilapiol por um período de 36 horas. Ao final, analisaram o efeito do composto observando os cromossomos de núcleos interfásicos por meio do teste de micronúcleos. Os autores verificaram um aumento estatisticamente significativo de micronúcleos nos dois tratamentos em relação ao experimento controle, e verificaram a presença de muitas pontes anafásicas e quebras cromossômicas nas duas concentrações testadas. Os autores concluem que o dilapiol foi capaz de causar mortalidade e também dano genético em *A.*

aegypti, ressaltando que a variação do efeito do dilapiol, dose dependente, é importante na hora de se definir métodos seguros de controle do mosquito. Por fim os autores concluem a necessidade de novas abordagens com o composto dilapiol a fim de definir melhor seu efeito residual e seletivo sobre *A. aegypti* e sobre outras espécies de mosquitos. No presente estudo foi analisada a *Drosophila melanogaster*, com resultados também indicando efeito genotóxico do dilapiol numa faixa de diluições semelhante a 200 µg/ml e também em doses menores (3,2 µg/mL, 16 µg/mL e 80 µg/mL). Não foi possível avaliar o efeito genotóxico na concentração de 400 µg/mL, pois o número de sobreviventes foi pequeno (30%), indicando que esta é uma concentração tóxica para a *Drosophila melanogaster*.

Outros estudos de aplicação do teste SMART também apontaram efeito genotóxico de óleos essenciais, assim como o dilapiol. Por exemplo, Karpouhtsis et al. (1998) estudou cinco compostos extraídos do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e comprovou o efeito genotóxico apenas do composto *thymol*, com forte indução mutagênica mas não recombinação mitótica. Em nosso estudo, ao contrário, o dilapiol teve efeito 100% recombinogênico, detectado através do aparecimento de manchas simples e total de manchas. É sabido que a recombinação mitótica pode desempenhar um papel fundamental na carcinogênese, uma vez que conversões gênicas, deleções, translocações, amplificações gênicas e *crossing-over* desigual podem ser mediadas por este mecanismo e contribuem para o desenvolvimento de alguns tipos de tumores (Bishop e Schiestl, 2001). Idaomar et al. (2002) ressaltam que a interação de compostos de óleos essenciais pode ativar a enzima do tipo citocromo P-450, permitindo a redução da atividade metabólica, favorecendo o efeito antimutagênico dessa mistura. É possível que o dilapiol, ao ser administrado em associação com outros óleos essenciais, possa ter outra atividade, até mesmo do tipo antigenotóxica.

Em contraste ao dilapiol, a literatura reconhece que o inseticida espinosade pode ter efeito tóxico bastante elevado. Del Sarto (2009), por exemplo, avaliou o efeito letal de diversos inseticidas sobre abelhas-sem-ferrão (*Melipona quadrifasciata*) e sobre abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) através da ingestão dos compostos e seus ingredientes ativos. Entre os inseticidas testados o espinosade (Tracer 480 g/L, Dow Agrosience) se mostrou como o mais tóxico em *M. quadrifasciata*, possuindo a menor DL₅₀ e sendo cerca de 20x mais letal que a deltametrina, abamectina e metamidofós. Em *A. mellifera* o espinosade também foi considerado altamente tóxico. Segundo o autor o uso do inseticida espinosade, entre outros, pode comprometer estes insetos e os programas de polinização nacionais, dependendo das doses utilizadas.

Mais recentemente, outro interessante relato da literatura, publicado por Akmoutsou et al. (2011) trouxe importantes contribuições sobre potencial tóxico e genotóxico do espinosade, avaliado através do teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*. Os

autores consideraram o espinosade cerca de 7-20 vezes mais tóxico que a deltametrina, também testada, porém encontraram resultados negativos quanto à indução da genotoxicidade no teste SMART.

É interessante ressaltar que Akmoutsou et al. (2011) submeteram as larvas a doses inferiores de espinosade, comparada às doses usadas em nosso trabalho. Assim, não houve efeito genotóxico a 0,10 µg/mL, 0,20 µg/mL e 0,30 µg/mL, enquanto foi detectado efeito positivo nas doses logo acima, ou seja, 0,32 µg/mL, 0,96 µg/mL e 1,6 µg/mL. Infelizmente, os autores não puderam aplicar o teste SMART em larvas submetidas a doses maiores, de 0,40 µg/mL e 0,50 µg/mL, pois houve efeito letal após 192 horas de exposição ao espinosade. Os resultados da toxicidade do espinosade também contrastaram muito com os resultados aqui apresentados, com taxas elevadas de sobrevivência de indivíduos nas doses de 0,96 µg/mL e 1,6 µg/mL, que são bem superiores à dose máxima de 0,50 µg/mL testada pelos autores. É possível que a explicação para estas grandes diferenças de resposta tóxicas e consequentemente, genotóxicas, em relação ao trabalho de Akmoutsou et. al. (2011) se deva a fatores como a formulação diferencial do espinosade usada pelos autores (obtido da empresa Dow Agrosience) ou diferenças na linhagem parental utilizada (TM2).

Mansour et al. (2007) já haviam advertido para o fato de diferenças terem sido encontradas entre trabalhos que avaliam a genotoxicidade do espinosade. Segundo os autores, os insetidas são misturas complexas e as informações sobre a toxicidade dos seus ingredientes ativos por si só não é suficiente para avaliar o risco para a saúde (Mansour e Mossa, 2005). Além disso, os autores advertem que embora a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1997) defina o espinosade como não mutagênico, a literatura não oferece dados completos a respeito desta condição. Em um de seus trabalhos, os autores relatam que o espinosade apresentou efeito mutagênico e reprodutivo em ratos machos albinos, nas concentrações utilizadas (Mansour et al., 2007). Os autores sugerem que a atividade do espinosade seja sempre acompanhada do detalhamento da sua estrutura química comercial e das impurezas presentes na formulação, o que precisa ser detalhado nos futuros trabalhos.

2.7 Conclusões

A utilização de *Drosophila melanogaster* como organismo teste para avaliação dos efeitos genotóxicos dos larvicidas dilapiol e espinosade, através do teste SMART de asa, permitiu verificar que ambos os compostos apresentaram efeito genotóxico nas condições testadas, sendo o dilapiol com efeito dose-dependente e o espinosade com um potencial genotóxico 4 vezes maior que o dilapiol, além disso o óleo essencial dilapiol foi considerado um composto puramente recombinogênico.

2.8 Referências

- Abo-Zeid, M.M., EL-BAROTY, G., Abdel-Rahim, E., Blankats, J., Dary, C., El-Sebae, Saleh, A. H., 1993. Malathion distribution in dermally and orally treated rats and its impact on the blood serum acetylcholine esterase and protein profile. *J. Environ. Sci. Hlth.*, v. 28, p.413–30.
- Andrade, H.R.R., Reguly, M.L., Lehmann, M., 2004. Wing somatic mutation and recombination test (SMART). In: Henderson, D.S. (Ed.). *Drosophila Cytogenetics Protocols*. Human Press Inc., Totowa, pp.389-412.
- Akmoutsou, P., Mademtzoglou, D., Nakou, I., Onoufriadis, A., Papadopoulou, X., Kounatidis, I., Frantzios, G., Papadakis, G., Kostas, V., Papadopoulos, N. T., Mabragani-tsipidou, P., 2011. Evaluation of toxicity and genotoxic effects os spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. *Pest Manag Sci*; 67:1534-1540.
- Angerilli, N.P.D., 1980. Influences of extracts of fresh water vegetation on the survival and oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Can Entomol.* 112: 1249-1252.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Idaomar, M., 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 585, 1–13.
- Bergeron, C.B.; VASQUES, R., 1996. Sreening of plants used by North American Indians for antifungal, bactericidal, larvicidal, and molluscicidal activities. *Intl. J. Pharmacog.*, v.34, n.4, p.233-242.
- Bernard, C.B.; Krishanmurty, H.G.; Chauret, D., & Durst, T. et al., 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.* v. 21, p. 801-814.
- Bishop, A.J.R., Schiestl, R.H., 2001. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1471: p109-121.
- Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res Rev. Mutat.* v. 543, p.251–272.
- Bond, J.G., Marina, C.F., Williams, T., 2004. The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Med. Vet. Entomol.* v.18, p.50–56.
- Consoli, R.A.G.B., Mendes, N.M.; Pereira, J.P., Santos; B.S.; Lamounier, M.A., 1989. Influence of several plant extracts on the oviposition behaviour of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) in the laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 84, p. 47-51.
- Crouse, G.D., Sparks, T.C., 1998. Naturally derived materials as products and leads for insect control: the spinosyns. *Reviews in Toxicology*, v.2, p.133–146.
- Cunha, K.S., Reguly, M.L., Graf, U., Andrade, H.H.R., 2001. Taxanes: The genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* v. 16, p.79-84.
- Daharam Shaktu, N.S.; Menon, P.K.M., 1983. Larvicidal property of three species of genus *Agave* (Fam: Amaryllidaceae) *J. Commun. Disorders* v. 15, p. 135-137.
- Davino, S. C., Barros, S. B. de M., 2008. Avaliação da Toxicidade, *in*: OGA, S., CAMARGO, M. M. A., BATISTUZZO, J. A. O. *Fundamentos de Toxicologia*, 3ª ed, São Paulo – SP, editora: Atheneu, p.61-67.

- Dearfield, K.L., Mccarroll, N.E., Protzel, A., Stack, H.F., Jackson, M.A., Waters, M.D., 1999. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. II. Mutagenicity and carcinogenicity of selected chloroacetanilides and related compounds. *Mutat. Res.* v. 443, p.183–221.
- Del Satro, M.C.L., 2009. Toxicidade de inseticidas para abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Entomologia.
- Elzen, G. W., Maldonado, S. N.; Rojas, M. G., 2000. Lethal and sub-lethal effects of selected insecticides and an insect growth regulator on the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) ectoparasitoid *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Econ. Entomol.*, v.93, p.300–03.
- EPA (USA Environmental Protection Agency). Spinosad Pesticide Fact Sheet No. HJ 501C. EPA, Office of Pesticides and Toxic Substances, (www.epa.gov). 1997.
- Frei, H.; Clements, J.; Hove, D. and WURGLER, F. E., 1992. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, v. 279, p. 21-33.
- Frei, H., Wurgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, v. 203, p. 297-308.
- Gadelha, D.P.; Toda, A.T., 1985. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Malariol.* v. 37, p. 29-36.
- Graf, U.; Wurgler, F.E.; Katz, A. J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B. & Kale, P. G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, v. 271, p.59-67.
- Guimarães, V.P.; da Silva, I.G.; H.H.G da Silva; Rocha, C., 2001. Atividade larvica do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* St. Hil. sobre *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae). *Rev. Patol. Trop.* v. 30, p. 243-249.
- Huang, F.N., Subramanyam, B. 2007. Effectiveness of spinosad against seven major stored-grain insects on corn. *Insect. Sci.* v.14, p.225–230.
- Idaomar, M.E.L., Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., Muñoz-Serrano, A., Liemans, V., Alonso-Moraga, A., 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mut. Res.* v.513, p.61-68.
- Ishak, R., 1987. Dengue: Aspectos clínico, epidmiológico, laboratorial e de profilaxia. *Bras. Med.* v. 24, p. 5-10.
- Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z. G., Mavragani-Tsipidou, P., 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J. Agric. Food. Chem.*, v.46: p.1111-1115.
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.* v. 9, p. 527–549.
- Langlois, R.G., Bigbee, W.L., Jensen, R.H., German, J., 1989. Evidence for increased *in vivo* mutation and somatic recombination in Bloom's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, p. 670-674.

- Lindsley, D.L., Zimm, G.G. 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*, Academic Press, New York, p.1133.
- Maia, J.G.S.; Zoghib, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L.; Luz, A.I.R., Bastos, C. N., 1998. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. Flavour and Fragrance Journal, v.13, p.269-272.
- Mansour, S.A. e Mossa, H., 2005. Comparative effects of some insecticides as technical and formulated on male albino rats. J. Egyptian Soc. Toxicol. v.32, p.41–54.
- Mansour, S.A., Mossa, A.H., Heikal, T.M., 2007. Cytogenetic and hormonal alteration in rats exposed to recommended “safe doses” of spinosad and malathion insecticides. Int. J. Agri. Biol., v.10, p.9–14.
- Macoris, M. L. G.; Andrighetti, M. T. M.; Takaku, L.; Glasser, C. M.; Garbeloto, V. C.; Bracco, J. E., 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil to organophosphates insecticides, INSTITUTO OSWALDO CRUZ, v.98, n.5, p.703-708.
- Marzochi, K.B.F. 1994. Dengue in Brazil- Situation, transmission and control - a proposal for ecological control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 89, p. 235-245.
- Miles, M., Dutton, R., 2000. Spinosad — a naturally derived insect control agent with potential for use in integrated pest management systems in greenhouses. The BCPC Conference: *Pests and diseases*. Volume 1. Proceedings of international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 13-16 november, p.339-344.
- Monath, T.P., 1994. Dengue: The risk to developed and developing countries. Proc Natl Acad Sci USA v. 91, p. 2395-2400.
- Pohlit, A. M.; Quignard, E. L. J. Nunomura, S. M. & Tadei, W. P., 2004. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil, for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. Acta Amazon, v.34, p. 97-105.
- Rafael, M. S.; Hereira-rojas, W. J.; Roper, J. J.; Nunomura, S. M. & Tadeil, W. P., 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. Genetics and Molecular Research, v.7, n.3, p.772-781.
- Rawlins, S.; Wan, J.O.H., 1995. Resistance in some Caribbean population of *Aedes aegypti* to several insecticides. J. Am. Mosq. Control v. 11, p. 59-65.
- Salgado, V. L., 1998. Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiology correlates. Pestic. Bioch. Physiol., v. 60, p. 91–102.
- Salgado, V. L., Sheets, J. J., Watson, G. B., Schmidt, A. L., 1998. Studies on the mode of action of Spinosad: The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. PesticideBiochem. Physiol., v.60, p.103–10.
- Sandes, A.R.R., Blasi, G., 2000. Biodiversidade química e genética. Biotec. Ciê. Des. v. 13, p. 28-37.
- Sharma, N., Qadry, J. S., Subramaniam, B., Verghese, T., 1998. Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephansi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Pharm. Biol., v.36, p.3-7.
- Schoonover, J. R., Larson, L. L., 1995. Laboratory activity of spinosad on non-target beneficial arthropods. Arthropod Management Tests, v.20, p.357.

- Silva, H.H.G., da Silva, I.G., dos Santos, R.M.G., E.R. Filho, Elias, C.N., 2004. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 37, p. 396-399.
- 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, p.248.
- Sparks, T.C., Thompson, G. D., Kirst, H. A., Hertlein, M. B., Mynderse, J. S., Turner, J. R., Worden, T. V., 1999. Fermentation-derived insect control agents, *In*: HALL, F.R., MENN, J. J. (eds.), "Methods in Biotechnology", Humana Press, Totowa NJ, p. 171–88.
- Sparks, T.C., Thompson, G. D., Kirst, H. A., Hertlein, M. B., Larson, L. L., Worden, T. V., Thibault, S. T., 1998. Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents, on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Econ.Entomol.*, v. 91, p. 1277–83.
- Stark, J.M., Jasin, M., 2003. Extensive loss of heterozygosity is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, n.2, p. 733-743.
- Stark, J.D., Vargas, R., Miller, N., 2004. Toxicity of spinosad in protein bait to three economically important tephritid fruit fly species (Diptera:Tephritidae) and their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *J Econ Entomol* v.97, p.911–915.
- Thompson, G.D., Dutton, R., Sparks, T. C., 2000. Spinosad: a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manage. Sci.*, v.56, p.696–702.
- Thompson, G.D., Michel, K.H., YAO, R. C., Mynderse, J. S., Mosburg, C. T., Worden, T. V., Chio, E. H., Sparks, T. C., Hutchins, S. H., 1997. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a New Class of Insect Control Products. *Down to Earth*, v.52, p.1–5.
- Tiburi, M., Reguly, M.L., Schwartzmann, G., Cunha, K.L., Lehmann, M., Andrade, H.H.R., 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, v. 519, p. 141-149.
- Vogel, E. W., Zilastra, J. A., 1987. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparación with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutation Res.*, v. 180, p.189-200.
- Wirth, M.C., G.P. Georgiou., 1999. Selection and caracterization of temephos in a population *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Island. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* v. 15, p. 315-320.
- WHO (World Health Organization) TDR Dengue Control. World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/denguecontrol/en/index.html> acesso em 25 de janeiro de 2012.

3. CONCLUSÕES FINAIS

Os compostos dilapiol e espinosade estudados apresentaram, nas condições deste estudo, efeito genotóxico em células somáticas de asas de *D. melanogaster*, avaliados através do teste SMART. Esse efeito foi, sobretudo, relacionado a eventos recombinacionais. Nossos resultados apontam para a necessidade de considerar os potenciais riscos que o uso esporádico, sistemático e/ou constante de inseticidas no âmbito doméstico, na agricultura e em programas de controles de vetores, pode representar à saúde humana, ao nível tóxico ou genotóxico. Devido a diferenças encontradas entre nossos resultados e outros, citados na literatura, sugerimos que sejam feitos testes adicionais, com novas diluições, formulações e em outros organismos, para que se conheça melhor o potencial mutagênico dos dois compostos, considerados promissores no combate ao mosquito da dengue no Brasil.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras o nosso grupo está interessado em implementar a metodologia do teste Cometa em *Drosophila melanogaster* e testar novamente o efeito dos compostos dilapiol e espinosade. Especialmente em relação ao espinosade, pretendemos aplicar a metodologia SMART, utilizando o composto comercial importado, produzido pela empresa Dow Agrosience USA, a fim de confirmar os resultados obtidos para a forma comercial em pastilhas, definindo melhor os riscos para a saúde humana e o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** v. 287, p. 2185 – 2195, 2000.
- ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas. Editora da ULBRA, p. 281-307, 2003.
- ARTAVANTIS-TSAKONAS, S.; MATSUMOTO, K.; FORTINI, M. E. Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cells of *Drosophila melanogaster*, as measured in the wing spot test. **Environ. Mol. Mutagen.** v.34, p.47 – 51, 1995.
- BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology** v. 46, n. 2, p. 446 – 475, 2008.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Clinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.441-443, 1997.
- BERGERON, C. B. & VASQUES, R. Screening of plants used by North American Indians for antifungal, bactericidal, larvicidal, and molluscicidal activities. **Intl. J. Pharmacog.**, v.34, n.4, p.233-242, 1996.
- BERNARD C. B.; KRISHANMURTY, H. G.; CHAURET, D.; DURST, T. et al. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **J. Chem. Ecol.** v.21, p.801-814, 1995.
- BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics** v. 6, p. 9 – 23, 2005.
- CAVALIERE, M. J. et al. Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 267-72, 1996.
- CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (Brasil). Dengue. In: GUIA brasileiro de vigilância epidemiológica. 4 ed. ver. ampl. Brasília: FUNASA, CENEPI, 2001, p. 51-54.
- CONTI, J. H.; MINAMI, K.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares do morangueiro por análise de RAPD. **Horticultura Brasileira**, Brasileira, v.20,n.2,p.145-152, 2002.
- CROUSE, G. D., SPARKS, T. C. Naturally derived materials as products and leads for insect control: the spinosyns. **Rev. Toxicol.**, v.2, p.133–46, 1998.
- DeAMICS, J. E., DRIPPS, C. V., HATTON, C. J., KARR, L. L. Physical and biological properties of the spinosyns: Novel macrolide pest-control agents from fermentation. p. 144-154. In: HEDIN, HOLLINGWORTH, MASLER, MIYAMOTO. **Phytochemicals for Pest Control, Symposium** Series 658, 1997.
- DEFERRARI, M. et al. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 260, p. 105-113, 1991.
- DEGRAEVE, N.; CHOLLET, M.C.; MOUTSCHEN, J. Cytogenetic and genetics effects of subchronic treatment with organophosphorus insecticides. **Archives of Toxicology**, New York, v. 56, p. 66-67, 1984.

- DEGRAEVE, N.; MOUTSCHEN, J. Genetic and cytogenetic effects induced in the mouse by as ornagophosphorus inseticide: Malation. **Environmental Research**, v. 34, p. 170-174, 1984.
- DULOUT, F. N., et al. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 143, p. 237-244, 1985.
- ELZEN, G. W., MALDONADO, S. N.; ROJAS, M. G. Lethal and sub-lethal effects of selected insecticides and an insect growth regulator on the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) ectoparasitoid *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). **J. Econ. Entomol.**, v.93, p.300-03, 2000.
- ERNEST, H., PATRICIA, E. L. IN: HODGSON, E., LEVI, P.E. (EDS.) *A Textbook of Modern Toxicology*, 2nd edition, P: 15. **Toxicology Program North Carolina: Appleton and Lange**, 1997.
- EYER, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review. **Human & Experimental Toxicological**, v. 14, p. 857-864, 1995.
- FEANY, M.B., BENDER, W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature** v. 404, p. 394 - 398, 2000.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina Ribeirão Preto**, v.32, p.15-20, 1999.
- FONTES JÚNIOR, E. A.; SOUSA, P. J. C.; SOUSA, R. C.; MAIA, J. G. S., SANTOS, A. M. S. Atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *Piper aduncum*. In: **Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Salvador - BA: FESBE 2002. Salvador - BA: Mix Tecnologia Digital, p.66, 2002.
- FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive results. **Mutation Research**, v.203, p.297-308, 1988.
- GAIA J. M. D.; MOTA M. G. C.; CONCEIÇÃO C. C. C.; COSTA M. R. & MAIA, J. G. S. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.686-689, 2004.
- GARCIA-BELLIDO, A., RIPOLL, P., MORATA, G. Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. **Developmental Biology**, v. 48, p.132-147, 1976.
- GARRETT, V. Genotoxic and carcinogenic potencial of anticholinesterases. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. (Ed.). **Chemical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates**. Oxford: Butterworth. Heinemann. p. 233-240, 1992.
- GOLDBERG, L.; MARGALIT, G. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*. **Mosquito News**. v. 37, p. 355-358, 1977.
- GRAF, U.; WÜRGLER F.E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B., KALE, P. G., Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.**, v.271, p.59-67, 1984.
- HALSTEAD, S. B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **World Health Stat. Q.**, v.45, p.292-298, 1992.

- HALSTEAD, S. B., YAMARAT, C. & SCANLON, J. E. The Thai hemorrhagic fever epidemic of 1962. a preliminary report. **J. Med. Assoc. Thailand**, v.46, p.449-466, 1963.
- HEDIN, P. A. New concepts and trends in pesticide chemistry. **J. Agr. Food Chem.** v.30, p.201-215, 1982.
- HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflanzen. v. 9. Birkhäuser Verlag, Stuttgart, 1990.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, p. 860-921, 2001.
- ISMAN, M. B.. Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. **Rev. Pest. Toxicol.** v3, p.1-2,1995.
- JENSEN, S., HANSEN, J., BOLL, P. M. Lignans and neolignans from Piperaceae (Review). **Hytochemistry**, v. 33, n.3, p.523-530, 1993.
- JOLY, L. G. Feeding and trapping fish with *Piper auritum*. **Econ. Bot.**, v.35, n.4, p.383-390, 1981.
- KARPOUHTSIS, I., PARDALI, E., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z. G., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **J. Agric. Food. Chem.**, v.46: p.1111-1115, 1998.
- KORNEBERG, T. B.; KRASNOW, M. A. The Drosophila genome sequence: implications for biology and Medicine. **Rev. Science**, v. 287, n.4541, p.2218-2220, 2000.
- LUNA, J. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARO-SILVA, M. A. Susceptibility of Aedes aegypti to temephos and cypermethrin insecticides, Brasil. **Rev. de Saúde Pública**, v.38, p.1–2, 2004.
- MANSOUR, S. A., MOSSA, A. H., HEIKAL, T. M. Cytogenetic and hormonal alteration in rats exposed to recommended “safe doses” of spinosad and malathion insecticides. **Int. J. Agri. Biol.**, v.10, p.9–14, 2007.
- MONTEIRO, G. M.; LIRA, D. S.; MAIA, J. G. S.; BARROS, C. A. L. & SOUSA, J. P. C. Acute and subacute toxicity of the essential oil of *Piper aduncum* In: Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas. Águas de Lindóia. **European Journal of Pharmaceutical Sciencies**, v.13, p.153, 2001.
- MORADIM, A. A.; NAVICKIENE, H. M. D.; REGASINI, L. O.; TELASCREA, M.; AGRIPINO, D.; FIRRI, A. F.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. & FURLAN, M. Comparação da composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Piper aduncum* L., *P. arboreum* AUBLET. e *P. tuberculatum* JACQ. In: **Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, 17. [CD-ROM]. (Anais/Resumos) Cuiabá: CBO, 2002.
- NEPOMUCENO, J. C., CUNHA, D. L. Genotoxicidade do anastrozol avaliado por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. **Rev. Perquirere**, Patos de Minas: UNIPAM, n. 8, v. 1, p.79-99, 2011.
- ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T., STICHER, O. Cytotoxic and antibacterial dinydrochalcones from *Piper aduncum*. **J. Nat. Prod.**, v.57, p.18-26, 1994.
- PARK, B. S., LEE, S.E., CHOI, W. S, JEONG, C.Y., SONG, C., CHO, K. Y. Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperoctadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. **Crop Prot.** v.21, p.249-251, 2002.

- POHLIT, A. M.; QUIGNARD, E. L. J. NUNOMURA, S. M., TADEI, W. P. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil, for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazon**, v.34, p. 97-105, 2004.
- RAFAEL, M. S.; HEREIRA-ROJAS, W. J.; ROPER, J. J.; NUNOMURA, S. M., TADEI, W. P. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.3, p.772-781, 2008.
- RAND, M.D. Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in Neurotoxicology. **Neurotoxicol Teratol.** v. 32, n. 1, p.74-92, 2010.
- ROUSE, J., JACKSON, S.P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. **Science** 297, 547-551, 2002.
- RUBIN, G. M., LEWIS, E. B. A Brief History of *Drosophila*'s Contributions to Genome Research. **Science**, 24, v. 287 n. 5461 p.2216-2218, 2000.
- SALGADO, V. L. Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiology correlates. **Pestici. Bioch. Physiol.**, 60: 91–102, 1998.
- SALGADO, V. L., SHEETS, J. J., WATSON, G. B., SCHMIDT, A. L.. Studies on the mode of action of Spinosad: The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. **Pesticide Biochem. Physiol.**, v.60, p.103–10, 1998.
- SANTOS, L. G. Biodiversidade e políticas públicas. In: FATHEUER, T. ARROYO. J.C.; MACHADO, J. A. **Relatos e reflexões a partir do Simpósio Internacional Amazônia: Estratégias de Desenvolvimento Sustentável em Debate**. NAEA/UFPA. Belém. p.63-85, 1998.
- SCHOONOVER, J. R., LARSON, L. L. Laboratory activity of spinosad on non-target beneficial arthropods. **Arthropod Management Tests**, v.20, p.357, 1995.
- SCHULTES, R., RAFFAUF, R. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of Northwestern Amazonia. Portland, Oregon: Dioscorides Press; 1990.
- SENGUPTA, S., RAY, A. B., The chemistry of Piper species: **A review Fitoterapia**, v.58, p.147-166, 1987.
- SHARMA, N.; QADRY, J. S.; SUBRAMANIAM, B., VERGHESE, T. Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephansi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Pharm. Biol.**, v.36, p.3-7, 1998.
- SILVA, W. C.; RIBEIRO, J. D.; SOUZA, H. E. M., CORRÊA, R. S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v.37, n.2, p. 293-298, 2007.
- SINGH, G., UPADHYAY, R. K. Essential oil: A potent source of natural pesticides. **J. Sci. Ind. Res.** v.52, p.676-683, 1993.
- SIVIERO, F., MACHADO-SANTELLI, G. M. Mutagênese Carcinogênese, In: OGA, S., CAMARGO, M. M. A., BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª ed, São Paulo – SP, editora: Atheneu, p.83-86, 2008.
- SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. Principles of Genetics. J Wiley e Sons, 2000

- SOUSA, P. J. C.; BARROS, C. A. L.; ROCHA, J. C. S.; LIRA, D. S.; MONTEIRO, G. M., MAIA, J. G. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 217-221, 2008.
- SOUTO, P. R. M. 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, p.248, 2006.
- SPARKS, T.C., THOMPSON, G. D., KIRST, H. A., HERTLEIN, M. B., LARSON, L. L., WORDEN, T. V., THIBAUT, S. T. Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents, on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **J. Econ.Entomol.**, 91: 1277–83, 1998.
- SPARKS, T.C., THOMPSON, G. D., KIRST, H. A., HERTLEIN, M. B., MYNDERSE, J. S., TURNER, J. R., WORDEN, T. V. Fermentation-derived insect control agents, *In*: HALL, F.R., MENN, J. J. (eds.), “*Methods in Biotechnology*”, p: 171–88. **Humana Press**, Totowa NJ, 1999.
- ST-JOHN, M. A. R.; XU, T. Insights from model systems-understanding human cancer in a fly? **Am. J. Hum. Genet.**, v.61, p.1006-1010, 1997.
- THOMPSON, G.D., DUTTON, R., SPARKS, T. C. Spinosad: a case study: an example from a natural products discovery programme. **Pest Manage. Sci.**, v.56, p.696–702, 2000.
- THOMPSON, G.D., MICHEL, K.H., YAO, R. C., MYNDERSE, J. S., MOSBURG, C. T., WORDEN, T. V., CHIO, E. H., SPARKS, T. C., HUTCHINS, S. H. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products. **Down to Earth**, v.52, p.1–5, 1997.
- VALLE, D.; BRAGA, I. A. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**. v. 16 n.4, 2007.
- VOGEL, E. W., ZILASTRA, J. A. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparación with genetic damage in early germ-cell stages. **Mutation Res.**, v. 180, p.189-200, 1987.
- WHO (World Health Organization) TDR Dengue Control. World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/denguecontrol/en/index.html> acesso em 25 de janeiro de 2012.
- WILLIAMS, T., VALLE, J., VIÑUELA, E.. Is the naturally derived insecticide spinosad compatible with insect natural enemies? **Biocontrol Science and Technology**, v.13, p.459-475, 2003.
- ZAIM, M., GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 161-163, 2002.

ANEXOS

AUTHOR INFORMATION PACK 9 Jan 2012 www.elsevier.com/locate/foodchemtox 1

FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY AUTHOR INFORMATION PACK TABLE OF CONTENTS

.
XXX

- Description
- Audience
- Impact Factor
- Abstracting and Indexing
- Editorial Board
- Guide for Authors

ISSN: 0278-6915

DESCRIPTION

Food and Chemical Toxicology (FCT) publishes original research articles, reviews, and case reports on the toxic effects, in animals or humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on food safety, chemical safety, and other areas of consumer product safety. Research papers with a clear scientific contribution to the field of food/ chemical toxicology will be given preference in the review process. Manuscripts concerning materials/ substances of only local interest for which the chemical composition of the material/substance is not clearly defined will not be considered. In addition to these areas, papers on industrial and agricultural chemicals and pharmaceuticals are encouraged. Furthermore new areas such as safety evaluation of novel foods and ingredients and biotechnologically derived products, including nanomaterials and inter-relationships between nutrition and toxicology are encouraged. Studies should address the physiological, biochemical or pathological changes induced by specific substances, techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology or the mode/mechanisms underlying toxic phenomena. All aspects of in vivo toxicology are covered, including systemic effects on specific organ systems, immune functions, carcinogenesis and reproductive/developmental toxicology. Papers reporting the toxicological examination of specific chemicals or consumer products are published irrespective of the positive or negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of scientific adequacy. FCT encourages submission of in vitro papers, particularly those fostering the 3 Rs.

IMPACT FACTOR

2010: 2.602 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

Editor-in-Chief for Vision and Strategy

A. Wallace Hayes, Vision and Strategy, Spherix Consulting and Harvard University, 298 South Main

AUTHOR INFORMATION PACK 9 Jan 2012 www.elsevier.com/locate/foodchemtox 3

Jean-Luc Volatier, Anses DER, 27-31 avenue général Leclerc, 94701 Maisons Alfort cédex, France,
Email: Jean-Luc.VOLATIER@anses.fr

Gary Williams, Dept. of Pathology, New York Medical College, Basic Science Building, Room 413, Valhalla, NY 10595, USA, Email: gary_williams@nymc.edu

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

AUTHOR INFORMATION PACK 9 Jan 2012 www.elsevier.com/locate/foodchemtox 7

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Please amend your research highlights so that they consist of 3 to 5 brief bullet points which convey the core findings of your work. Please ensure EACH bullet point does NOT exceed 125 characters (including spaces). An example is given below:

AUTHOR INFORMATION PACK 9 Jan 2012 www.elsevier.com/locate/foodchemtox 8

RESEARCH HIGHLIGHTS EXAMPLE:

* Research highlights are a mandatory field of a submitted paper & therefore should not exceed 125 characters including spaces.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under Abbreviations as a footnote to the title page (see above).

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to by their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.