

AValiação TOXIGENÉTICA DO LIQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU TÉCNICO (LCCT)

Felipe M. Merey^{1*}, Bruno A. Crispim², Marcia R. Jorge³, Eduardo J. Arruda⁴, Milena P. de Melo¹, Alexéia Barufatti⁵

1. Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)
2. Pós Doutorando pelo programa de Biologia Geral/Bioprospecção- UFGD/Coorientador
3. Mestra pelo programa de Ciências e Tecnologia Ambiental- UFGD
4. Professor da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia - UFGD
5. Professora da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais- UFGD/Orientadora

Resumo

A dengue, chikungunya, zika e febre amarela são doenças virais transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes spp.* O *Aedes aegypti* é o vetor principal. Por décadas, o controle populacional tem sido difícil e a espécie tornou-se resistente e vetorialmente competente por adaptação. Neste cenário são necessárias novas alternativas para controle de insetos vetores. Os produtos sustentáveis são parte importante dessa estratégia, são sustentáveis e podem possuir duração prolongada a partir de modificações químicas ou processos tecnológicos. Neste contexto, destaca-se o Líquido da Casca da Castanha do Caju técnico (LCCT), que é subproduto industrial rico em fenóis lipídicos e com comprovada atividade larvicida. O objetivo do estudo foi realizar bioensaios para avaliação toxigenética do LCCT em modelos animal e vegetal. Os bioensaios realizados para a avaliação dos efeitos toxicológicos do LCCT demonstraram que tanto em modelo vegetal quanto animal o produto apresentou baixa toxicidade. Em relação a genotoxicidade o produto apresentou efeito antígenotóxico para ambos os organismos avaliados no estudo. Pode-se concluir a partir dos resultados que o LCCT não apresentou riscos ecotoxicológicos nos modelos estudados e pode ser considerado um ativo seguro para fins de controle epidemiológico de insetos vetores.

Autorização legal: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD), sob o protocolo de nº 09/2017.

Palavras-chave: *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*, *Aedes aegypti*

Apoio financeiro: FUNDECT, CAPES, CNPq e UFGD

Trabalho selecionado para a JNIC: UFGD

Introdução

Os mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), são responsáveis pela transmissão de diferentes arbovírus, causadores de doenças como a dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018), estima-se que ocorram 390 milhões (95% de intervalo credível 284-528 milhões) de casos anuais de dengue, com crescente agravamento à saúde da população.

As estratégias de controle populacional, apesar de considerarem a redução populacional do vetor, por uso de inseticidas químicos ou biológicos, não têm reduzido de forma prolongada os surtos e/ou incidência da dengue, chikungunya, zika e febre amarela de forma duradoura (BRAGA e VALLE, 2007). Dessa maneira, novas estratégias e produtos inseticidas de reduzido impacto ambiental devem ser pesquisados para o controle de vetores são desejáveis.

O líquido da casca da castanha de caju (LCC) *in natura* é constituído por misturas de fenóis lipídicos, majoritariamente por ácido anacárdico e obtido por extração a baixa temperatura ou por uso de solventes. O líquido da casca da castanha de caju técnico (LCCT) é obtido por exsudação após o processo de tostagem a 185°C. No processo de tostagem industrial as castanhas são submetidas a temperaturas em torno de 180-190°C, e o ácido anacárdico converte-se em cardanol, originando o LCCT, subproduto ainda pouco valorizado na cadeia produtiva do caju (VASAPOLLO *et al.*, 2011). O produto é obtido em grandes quantidades e, se constitui em um valioso recurso para a valorização da cadeia produtiva do caju e pode ser utilizado em diferentes aplicações, incluindo a atividade inseticida (LOMONACO *et al.*, 2009).

De forma a garantir a inocuidade dos novos produtos sintetizados, modificados ou transformados a partir do LCCT para o controle populacional de insetos vetores, o seu uso envolve estudos para a análise do impacto ambiental sobre organismos não alvos. A sua dispersão no solo e águas residuais pode impactar a fauna e flora e neste aspecto a realização de pesquisas são necessárias para avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade em organismos vivos.

Os bioensaios utilizados mostraram-se adequados para a identificação de efeitos adversos provocados por substâncias xenobióticas nos organismos, em diferentes concentrações e em diversos tempos de exposição. Dentre os testes indicados para avaliação dos possíveis efeitos toxigenéticos do LCCT, destacam-se o teste de *Allium cepa* (modelo vegetal) e ensaios com *Oreochromis niloticus* (modelo animal).

Nesse contexto, o estudo teve por objetivo avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos do LCCT em modelos biológicos.

Metodologia

Ensaio toxigenético com *Allium cepa*

O ensaio de *A. cepa* foi realizado de acordo com Grant (1982), Fiskesjö (1985) e Ma *et al.* (1995). Sementes de *A. cepa* foram expostas por um período de 96h a diferentes concentrações de LCCT (27,5; 55; 165; 220 e 440 mg L⁻¹), com controle negativo - CN (água destilada) e controle veículo - CV (DMSO 1%). Para cada tratamento/concentração foram realizadas três repetições, totalizando 90 sementes por tratamento submetidas às mesmas condições experimentais. Os efeitos tóxicos foram avaliados através do cálculo do índice de germinação e aferição do comprimento médio das raízes. Para determinação da citotoxicidade do composto foi avaliado o índice mitótico das células expostas aos diferentes tratamentos, calculado por meio da análise de células em divisão nas diferentes fases (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Os efeitos genotóxicos do LCCT, foram determinados por meio do índice de alterações cromossômicas. Além das atividades clastogênica e aneugênica recorrendo à análise índice de mutagenicidade.

Ensaio toxicológico e genotóxico com *Oreochromis niloticus*

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado de acordo com os protocolos ABNT NBR 15088 (2016) e OECD 203 (1992). Os tratamentos foram utilizados para determinação da concentração letal média (CL50) após dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três réplicas de dez animais em cada réplica, na densidade de 1g de peixes por litro de água. O período de exposição dos peixes foi de 96h e o sistema de condução dos testes foi o estático, sem substituição ou sifonagem de água nem alimentação dos animais durante o período de exposição ao LCCT. A avaliação da mortalidade e a retirada dos mortos foram diárias. Em cada replicata, foi utilizado controle negativo (CN) com água sem os compostos e um controle veículo (CV) (DMSO 1%). A avaliação toxicológica foi realizada com as concentrações de 12; 15; 18; 21; 24 e 27 mg L⁻¹.

Para a avaliação dos efeitos genotóxicos do LCCT os peixes foram submetidas às mesmas condições descritas na avaliação toxicológica. Nestes experimentos foram utilizados oito peixes por tratamento. Os animais ficaram expostos durante 72h as concentrações de 6,36, 12,73 e 19,09 mg L⁻¹ que correspondem a 25, 50 e 75% do valor da CL50-96h, respectivamente. Como controle positivo (CP), injetou-se intraperitonealmente ciclofosfamida na concentração de 40mg kg⁻¹. Para controle negativo (CN) foi utilizado água sem os compostos e como controle veículo (CV) DMSO 1%. O teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares seguiu o protocolo descrito por Schmid (1975) e Heddle *et al.* (1983) com adaptações. Foram preparadas, em triplicata, lâminas com esfregaço sanguíneo dos eritrócitos dos peixes expostos às diferentes concentrações de LCCT e controles. Posteriormente, as lâminas foram secas, fixadas em etanol PA e hidrolisadas em HCl 1N à 60°C. A coloração foi realizada utilizando o corante reativo de Schiff e contra corante Fast Green.

Resultados e Discussão

Ensaio toxigenético com *Allium cepa*

O LCCT até a concentração de 165 mg L⁻¹ não influenciou significativamente na germinação (IG) das sementes de *A. cepa*, quando comparados com o controle negativo (CN) (**Tabela 1**). Para o crescimento médio das raízes (CMR) também não foi observado toxicidade nessa mesma faixa de concentrações (ver **Tabela 1**). Resultados similares aos nossos foram relatados por Leite *et al.* (2015) que realizaram estudos com bulbos de *A. cepa* e identificaram que não houve efeito tóxico até a concentração de 69,5 mg L⁻¹. Foi observado inibição significativa do IG e CMR nas concentrações de 220 e 440 mg L⁻¹ quando comparadas com o controle negativo (CN) (p<0,05).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão (±) do índice de germinação (IG) e do comprimento médio das raízes (CMR), observados em sementes de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de LCCT.

TRATAMENTOS	IG (%)	CMR (mm)
CN	28,89±5,09 ^a	5,43±1,47 ^a
CV	7,78±3,85 ^c	5,77±2,92 ^a
27,5 mg L ⁻¹	22,22±12,62 ^{ab}	4,80±0,66 ^a
55 mg L ⁻¹	24,44±8,39 ^{ab}	3,64±0,56 ^{ab}
165 mg L ⁻¹	21,11±10,72 ^{ab}	3,83±0,97 ^{ab}
220 mg L ⁻¹	8,89±3,85 ^c	3,24±0,23 ^b
440 mg L ⁻¹	12,22±1,92 ^{bc}	2,63±0,74 ^b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna não apresentam diferença estatística entre si (p<0,05). CN - controle negativo; CV - controle veículo.

Os resultados mostram que o LCCT não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, não houve diferença estatística significativa quando comparadas com o controle negativo (CN) (**Tabela 2**). Em relação a genotoxicidade, foi possível observar a diminuição significativa da frequência de alterações cromossômicas nas concentrações superiores a 165 mg L⁻¹, corroborando com estudo realizado por Leite *et al.* (2015) que relataram que o LCCT apresenta efeito antígenotóxico e de reparação em células de *A. cepa*. Nenhuma das concentrações testadas apresentou genotoxicidade. Em relação a danos genéticos permanentes, decorrentes da formação de micronúcleos nas células (IMT), observou-se que a partir da concentração de 220 mg L⁻¹, houve redução significativa do IMT, comparadas com o controle negativo (CN). As concentrações variando de 27,5 a 165 mg L⁻¹ o IMT não apresentou diferenças estatísticas relativamente ao controle negativo (CN) ($p > 0,05$).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão (\pm), em porcentagem, do Índice Mitótico (IM), Índice de Alterações Cromossômicas (IAC) e do Índice de Mutagenicidade (IMT), respectivamente, observados em sementes de *A. cepa* expostas ao LCCT.

Tratamentos	IM (%)	IAC (%)	IMT (%)
CN	93,97 \pm 2,84 ^{abc}	0,36 \pm 0,24 ^{ac}	0,20 \pm 0,14 ^{ac}
CV	90,77 \pm 2,95 ^d	0,52 \pm 0,17 ^c	0,12 \pm 0,13 ^{ac}
27,5 mg L ⁻¹	94,68 \pm 1,58 ^{abc}	0,29 \pm 0,29 ^{ab}	0,12 \pm 0,13 ^{abc}
55 mg L ⁻¹	95,70 \pm 2,21 ^{abc}	0,20 \pm 0,15 ^{ab}	0,14 \pm 0,20 ^{abc}
165 mg L ⁻¹	96,50 \pm 1,29 ^{abc}	0,27 \pm 0,21 ^{abc}	0,29 \pm 0,26 ^{ac}
220 mg L ⁻¹	92,83 \pm 1,75 ^{ad}	0,14 \pm 0,15 ^b	0,02 \pm 0,04 ^b
440 mg L ⁻¹	91,62 \pm 6,54 ^{abd}	0,08 \pm 0,08 ^b	0,08 \pm 0,13 ^{ab}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna não apresentam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). CN – controle negativo; CV - controle veículo.

Ensaio toxicológico e genotóxico com *Oreochromis niloticus*

Os parâmetros da água durante a avaliação toxicológica do LCCT em *O. niloticus*, como oxigênio dissolvido (OD) (98% \pm 10%), temperatura (22 \pm 1°C) e pH (7,4 \pm 0,2) permaneceram constantes durante todo o experimento. O valor da CL50-96h referente a avaliação toxicológico em *O. niloticus* foi de 25,46 mg L⁻¹, variando com 95% de confiabilidade de 23,63 a 27,42 mg L⁻¹.

Não foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, para as seguintes alterações: célula binucleada, núcleo lobulado e micronúcleo (**Tabela 3**). Para invaginação nuclear observa-se que o CP se difere dos demais tratamentos. A partir da concentração de 6,36 mg L⁻¹ ocorre uma queda significativa da frequência de brotamento nuclear e do índice de genotoxicidade em relação aos demais tratamentos. Com base nos resultados encontrados foi possível verificar que o LCCT tem efeito antígenotóxico em *O. niloticus*, da mesma forma que foi observado no modelo vegetal *A. cepa*.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão de alterações cromossômicas observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes tratamentos.

Tratamentos	IN	BN	CB	NL	MN	IG
CN	1,85 \pm 0,60 ^a	0,07 \pm 0,07 ^a	0,08 \pm 0,01 ^a	0,01 \pm 0,02 ^a	0 ^a	2,04 \pm 0,51 ^a
CP	3,81 \pm 0,77 ^b	0,17 \pm 0,07 ^b	0,04 \pm 0,05 ^a	0,01 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,02 ^a	4,06 \pm 0,79 ^b
CV	2,03 \pm 0,93 ^a	0,03 \pm 0,00 ^{ac}	0,03 \pm 0,02 ^a	0 ^a	0 ^a	2,09 \pm 0,95 ^a
6,36 mg L ⁻¹	1,11 \pm 0,20 ^a	0,01 \pm 0,01 ^c	0,01 \pm 0,02 ^a	0 ^a	0 ^a	1,16 \pm 0,20 ^c
12,73 mg L ⁻¹	1,83 \pm 1,01 ^a	0,08 \pm 0,07 ^a	0,01 \pm 0,02 ^a	0 ^a	0 ^a	1,03 \pm 1,07 ^a
19,09 mg L ⁻¹	1,88 \pm 0,43 ^a	0,08 \pm 0,05 ^{ab}	0,02 \pm 0,04 ^a	0,01 \pm 0,01 ^a	0,2 \pm 0,03 ^a	1,55 \pm 0,41 ^{ac}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna não apresentam diferença estatística entre si. IN- Invaginação Nuclear; BN- Brotamento Nuclear; PC-Picnose; CB- Célula Binucleada; NL-Núcleo Lobulado; MN-Micronúcleo; IG-Índice de Genotoxicidade; CN- Controle Negativo; CP-Controle Positivo; CV-Controle Veículo

Conclusões

Dessa maneira, pode-se concluir que o LCCT nas concentrações testadas não apresentou risco ecotoxicológicos nos modelos avaliados. Como este subproduto apresenta um potencial larvicida já comprovado, o mesmo pode ser considerado viável para a síntese, modificação e incorporação em novos produtos visando o controle populacional do *A. aegypti*.

Referências bibliográficas

ABNT NBR15088 de 12/2016- Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae)

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v.

16, n. 2, p. 113–118, 2007

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, v. 102, n. 1, p. 99–112, 14 fev. 2008.

GRANT W.F. Chromosome aberrations assay in A report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Programme. *Mutation Res*, v.99, p. 273-291, 1982

HEDDLE, J. A. *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, v. 123(1), p.61-118, 1983.

LEITE, Aracelli de Sousa *et al.* Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays. *BioMed research international*, v. 2015, 2015.

LOMONACO, D. *et al.* Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chemistry*, v. 11, n. 1, p. 31–33, 1 jan. 2009.

MA, T.-H. *et al.* The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, v. 334, n. 2, p. 185–195, 1 abr. 1995.

OECD (1992), Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris,

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Dengue and severe dengue. 2018.

SCHMID, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, v. 31(1), p.9-15.

VASAPOLLO, G. *et al.* Use of novel cardanol-porphyrin hybrids and their TiO₂-based composites for the photodegradation of 4-Nitrophenol in water. *Molecules*, v. 16, p. 5769–5784, 2011.