

## **TOXICIDADE DO LIQUIDO DA CASTANHA DE CAJU, LCC, SOBRE O PEIXE PAULISTINHA *Danio rerio* (Cyprinidae)**

Karla R. A. Porto<sup>1</sup>, Alexandre A. Machado<sup>2</sup>, Octavio L. Franco<sup>2</sup>, Antônia R. Roel<sup>3</sup>, Danielle B. L. Soares<sup>4</sup>.

1. Pesquisadora da Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

2. Pesquisador da Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

3. Orientadora e Pesquisadora da Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

4. Acadêmica do curso de Agronomia da Universidade Católica Dom Bosco.

### **Resumo**

O *Aedes aegypti* L. (Culicidae) é vetor de doenças como febre amarela, dengue, chikungunya e zika que atingiram níveis alarmantes nos últimos anos. O uso de inseticidas químicos sintéticos tem sido a primeira opção para o controle do vetor, porém estes contaminam o ambiente podem atingir organismos não alvo. Objetiva-se assim, estudar métodos sustentáveis de controle com menor impacto ambiental, como os inseticidas de origem vegetal e analisar o seu impacto toxicológico para o meio ambiente. Assim, foi estabelecido para este estudo a avaliação do perfil de toxicidade para o peixe paulistinha *Danio rerio* exposto as concentrações padronizadas do inseticida botânico a base do liquido de castanha de caju, LCC, desenvolvido para o controle de *A. aegypti*.

**Autorização legal:** 012/2014 CEUA.

**Palavras-chave:** ecotoxicologia; controle biológico; inseticida botânico.

**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, FUNDECT

### **Introdução**

O Brasil vive uma grande epidemia de infecções causadas por um único agente vetorial, o *Aedes aegypti* L. (Culicidae), difundido em todo território nacional, mesmo nos estados com temperatura mais amena, por volta de 20°C. Confirmado pelo Ministério da Saúde e as Secretarias de Vigilância de Saúde dos Estados, o mosquito é o responsável pela transmissão da Dengue, febre de Chikungunya e do Vírus Zika (Resendes et al., 2010; Ministério da Saúde, 2015).

A utilização de inseticidas químicos, aliado a eliminação dos criadouros com campanhas educacionais, é a melhor opção para o controle do vetor numa condição de pandemia. Porém o controle intensivo e contínuo praticado há décadas ocasionou o acúmulo de inseticidas químicos sintéticos nos corpos d'água e lençóis freáticos, além do aparecimento de populações resistentes aos produtos utilizados (Hoang et al., 2011, Hoang e Rand 2015).

Devido às preocupações desse impacto sobre o meio ambiente e a saúde da população, o desenvolvimento de produtos biológicos ou pesticidas a base de plantas têm se apresentado como ferramenta acessória ao uso de inseticidas sintéticos (Kamaraj et al., 2010).

O grupo de pesquisa Uso sustentável de recursos Naturais, CNPq, desenvolveu um inseticida para larvas de *A. aegypti* em formulação em pó, a base do liquido da castanha de caju, LCC, atualmente em processo de patente BR 10 2018 003604 1. O produto é eficiente para larvas e com efeito deletério nas demais fases de desenvolvimento e reprodução (Porto et al., 2017).

Portanto, faz-se necessário enfatizar a importância do conhecimento sobre ecotoxicologia dos inseticidas em desenvolvimento no ambiente. Seguindo assim a Instrução Normativa (IN) Conjunta nº 03, de 10 de março de 2006 (Brasil, 2006) e a NBR 12713 (2009), que indica principais estudos ecotoxicológicos solicitados para o desenvolvimento e uso de inseticidas. Na fase I estão os ensaios de toxicidade para invertebrados de água doce, peixes de água doce, insetos não-alvo, abelhas e toxicidade oral aguda para aves (Oliveira Filho, 2008).

Assim, foram estabelecidos para este estudo toxicológico com o peixe paulistinha *Danio rerio*, submetidos às concentrações do inseticida em pó a base de LCC, comparado ao padrão Rotenona e ao KCI do protocolo da ABNT.

### **Metodologia**

Os ensaios de toxicidade foram aprovados pelo Comitê Experimentação do Uso de Animais CEUA/Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, sob protocolo 012/2014 e seguiu as normativas e adaptações. Os peixes com peso médio entre 0,3 a 0,4g foram aclimatados em água destilada e pH corrigido para 7,0 com solução alcalinizante (Labcon®), temperatura ambiente média de 25°C durante seis dias. Foi

adotada a padronização para densidade populacional em  $1 \text{ gL}^{-1}$  para cada grupo de três indivíduos, mantida as condições para todos os procedimentos realizados.

O produto larvicida em pó foi formulado a base do líquido da cstanha de caju, LCC (Cashol® Lote A044-11) foi obtida por adsorção em solução hidroalcoólica incorporado numa matriz sólida, e seco por roa evaporação (Buchi R-114®) e em malha (Tyler®). A formulação preparada foi estabelecida seguindo a proporção equivalente em peso por volume (p/v), e testada nas concentrações 0,58, 1,02 e  $1,7 \text{ gL}^{-1}$  definidas como larvicida (Porto et al., 2017). Cada tratamento foi realizado com três réplicas.

Aquários, simularam ambientes aquáticos naturais, onde os peixes da espécie *D. rerio* foi utilizado como controle negativo, contendo apenas água, um controle de sensibilidade genotóxica contendo soluções de Cloreto de Potássio (P.A-A.C.S., Synth) definido como composto de referência nas concentrações de 1,0; 1,5; 2,0 e  $2,5 \text{ gL}^{-1}$  (ABNT, 2007). O controle positivo, além do teste de referência foi realizado com rotenona nas concentrações estabelecidas como larvicida para o *A. aegypti*.

Os ensaios foram conduzidos em sistema estático por até 48 horas, com temperatura ambiente média de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa  $42 \pm 6\%$  e fotofase de 12 horas, sem alimentação. A partir dos registros de mortalidade dos peixes foi determinada a concentração de efeito, CE, em 50% da população exposta. Assim, a CE(50) foi calculada para o teste, assim como o limite superior (LS) e o limite inferior (LI). A cada 24 horas foi observada a mortalidade dos peixes e registrados o pH e a temperatura da água, até 48 horas de exposição.

A taxa de toxicidade entre os grupos citados apresentaram no período de 48h uma variação linear crescente. Por meio da regressão linear foi determinada a equação da reta (I) para o KCl e para Rotenona (II).

$$y = 452,88x + 45,921, r^2 = 0,9994 \quad (I)$$

$$y = 3694x + 22,947, r^2 = 0,9695 \quad (II)$$

Nos testes agudos a alimentação foi suspensa para evitar a geração de dados falso-positivos, pois jejum alimentar de 24 horas evita o acúmulo de matéria orgânica e interferência na ação dos compostos avaliados (Marcon et al., 2014).

## Resultados e Discussão

Os ensaios de toxicologia aquática além de se destacarem como uma importante ferramenta de sensibilidade dos organismos a fatores ambientais, tóxicos ou desfavoráveis à sua biologia, cumprem também a finalidade de regulamentação oficial do país. Devido à sua grande adaptabilidade e sobrevivência em diferentes condições ambientais, o *D. rerio* é uma estratégia eficaz para avaliar a natureza do contaminante aquático e o processo tóxico.

É definida como concentração média efetiva, CE50 a concentração de amostra ou substância de referência que causa um efeito agudo a 50% dos organismos aquáticos, no tempo de exposição e nas concentrações do teste, no período de 24 e/ou 48 horas. Determinar os valores de concentrações efetivas e letais (EC 50 e CL 50) garantem maior confiança devido a sua reprodução, podem ainda serem extrapolados para avaliar a toxidade em uma população (Costa et al., 2008).

Os resultados do ensaio estão representados em limite de mortalidade mínima e máxima (Tabela 1). Enquanto para o tratamento com o padrão KCL, definido como teste de sensibilidade observou-se mortalidade aguda com limites entre  $0,8616$  a  $2,1956 \text{ gL}^{-1}$ , e para o tratamento com Rotenona na concentração definida como larvicida com limites entre  $0,2696$  a  $0,9344 \text{ gL}^{-1}$ . Entretanto, nas mesmas condições, as concentrações do inseticida em pó 10% a base de LCC testadas não provocaram nenhum dano aos peixes.

Por se tratar de um produto botânico, para ser aplicado em ambientes aquáticos e devido sua complexidade química e apresentar alguma afinidade com as membranas celulares, quando liberado para o ambiente em mesmo em baixas concentrações, por tempo prolongado pode causar alterações aos organismos aquáticos suscetíveis. Justifica-se assim, a necessidade de observar sua dispersão e impacto no ambiente aquático, comparando aos padrões estabelecidos na ABNT, colaborando com o estudo de Carraschi et al. (2012), que estabeleceram como etapas iniciais de avaliação de risco a um componente químico ao ambiente e o que o mesmo provoca.

Tabela 1. Teste de toxidade aguda padronizado pela ABNT, estabelecendo os limites mínimos (Lm) e máximos (LM) para rotenona e KCl em  $\text{gL}^{-1}$ .

Tratamento	EC (50) $\text{gL}^{-1}$	Limites na correlação 95%	
		Limite mínimo (Lm) ( $\text{gL}^{-1}$ )	Limite máximo (LM) ( $\text{gL}^{-1}$ )
KCl*	1,87	0,8616	2,1956
Rotenona	0,602	0,2696	0,9344

\*Indicado como padrão interno de sensibilidade segundo ABNT

A rotenona é um isoflavonóide extraído das raízes da planta *Derris elliptica* usada como pesticida e ictiotóxica, e neste último mais relacionada com peixes cartilaginosos, atua por inibição do complexo I da cadeia respiratória, bloqueando a transferência de elétrons para NADPH e consequente produção de ATP (Alecio et al., 2010). Estudos clássicos com fitoterápicos já alertavam para as relações ecotoxicológicas dos rotenóides sobre peixes, sugerindo haver uma maior ictiotoxidade conforme a maior evolução da espécie e consequentemente melhor resposta farmacocinética. Além da sua ação direta sobre os peixes, a rotenona também é indutora de mutagenicidade que é uma alteração herdável na estrutura do material genético alterando o desenvolvimento e a fisiologia dos organismos susceptíveis (Mascaro et al., 1998).

O produto desenvolvido como inseticida para *A. aegypti* a base de LCC 10% não provocou nenhum efeito deletério aos peixes *D. rerio* nessas condições estabelecidas, indicando segurança do produto a esse bioindicador. Estudos in vitro com o produto e o impacto sobre a atividade das enzimas hepáticas colinesterase sérica (ChE) e Malato desidrogenase (MDH), revelou que o mesmo não alterou a atividade enzimática e garantindo segurança para humanos e para o ambiente (Porto et al., 2016).

### Conclusões

A espécie de peixe *D. rerio* é igualmente sensível aos efeitos deletérios agudos das soluções com KCl e Rotenona, que confere a efetividade da metodologia e estabelece o padrão de referência para testes futuros de inseticidas botânicos.

O produto inseticida em pó a base de LCC 10%, mesmo nas maiores concentrações larvicidas, quando disperso no ambiente aquático não causa alteração nos peixes no tempo de até 48h. O que caracteriza o produto como não tóxico nas dosagens testadas.

### Referências bibliográficas

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. NBR 15088, São Paulo, 2004.
- ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas (2004) NBR 15088: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. São Paulo, 19 p.
- ABNT. Ecotoxicologia aquática – toxicologia crônica de curta duração- métodos de ensaios com peixes. Norma ABNT-NBR 15499, Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. Normas técnicas – Ensaio de toxicidade com microcrustáceos – NBR 12713 (2009).
- Alecio MR, Fazolin M, Coelho Netto RA, Catani V, Estrela JLV, Alves SB et al. Ação inseticida do extrato de *Derris amazonica* Killip para *Ceratomyza arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). Acta Amaz 2010; 40: 719-728
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3. Os produtos microbiológicos destinados ao uso em ambientes hídricos deverão atender ao estabelecido nesta Instrução Normativa e em norma específica. Diário Oficial da União 2006; 10 de março.
- Carraschi, S. P., Luna, L. A. V., Neto, A. N., Gírio, A. C. F., Cruz, C., & Pitelli, R. A. (2012). Toxicidade aguda e risco ambiental de surfactantes agrícolas para o guaru *Phalloceros caudimaculatus* (Pices: Poecilidae). Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology, 7(1), 28-32.
- Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Expindola ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim Nova 2008; 7: 180-1830
- Hoang TC, Pryor RL, Rand GM, Fraquez R (2011) Use of butterflies as no target insect test species and the acute toxicity and hazard of mosquito control insecticides. Environ Toxicol Chem 30: 997–1005.
- Hoang TC, Rand GM (2015) Mosquito control insecticides: A probabilistic ecological risk assessment on drift exposures of naled, dichlorvos (naled metabolite) and permethrin to adult butterflies. Sci Total Environ 502: 252-260.
- Kamaraj C, Rahuman AA, Mahapatra A, Bagavan A, Elango G (2010) Insecticidal and larvicidal activities of medicinal plant extracts against mosquitoes. Parasitol Res 107: 1337–1349.
- Marcon L, Silva Filho PB, Lopes DS, Mounteer AH, Benjamin LA. O inseticida Thiodan sobre o desenvolvimento folicular de lambaris. Cienc Rural St. Maria 2014; 44: 2245-2251
- Mascaro UCP, Rodrigues LA, Bastos JK, Santos E, Chaves da Costa JP. Valores de DL50 em peixes e no rato tratados com pó de raízes de *Derris* spp e suas implicações ecotoxicológicas. Pesq Vet Bras 1998; 18: 53-56
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 47. Bol Epidemiol. 2015; 46: 1-9.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da periculosidade ambiental de bioinseticidas como uma nova perspectiva para a ecotoxicologia no Brasil. J Braz Soc Ecotoxicol, v. 3, p. 1-7, 2008.

PORTO, K. R. A.; MOTTI, P. ; ROEL, Antonia Railda ; Machado, Alexandre Alves de ; CLAUDIA, ANDREA LIMA CARDOSO ; Matias, Rosemary . Effect of insecticide from brazilian cashew nuts liquid (CNL) *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In: Marcos Antonio Soares, Mário Augusto Gonçalves Jardim.. (Org.). Natural resources in wetlands: from Pantanal to Amazonia. 1ed.Belém: MPEG, 2017, v. , p. 251-266.

PORTO, Karla Rejane de Andrade et al. In vitro evaluation of the effect of botanical formulations used in the control of *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) on liver enzymes. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 49, n. 6, p. 693-697, 2016.

Resendes APC, Silveira NAPR, Chagastelles Sabroza PC, Souza-Santos R (2010) Determinação de áreas prioritárias para ações de controle da dengue. Rev Saúde Pub 44:274-282.