

2.01.99 – Biologia Geral

BIOPRODUTOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DO PRINCÍPIO DA QUÍMICA VERDE PARA O CONTROLE DO *Aedes Aegypti*

Marina Schibichewski¹; Héliana S. Nascimento²; Felipe M. Merey³; Bruno A. Crispim⁴; Eduardo J. de Arruda⁵; Alexeia Barufatti⁶

¹ Estudante da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA-UFGD)

² Doutoranda da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados (FACET-UFGD)

³ Mestrando da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados (FACET-UFGD)

⁴ Pós-Doutorando da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA-UFGD)

⁵ Pesquisador/Professor da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados (FACET-UFGD)

⁶ Pesquisadora/Orientadora da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA-UFGD)

Resumo

As arboviroses ocasionam problemas à saúde pública, sendo necessário o desenvolvimento de larvicidas com simplicidade tecnológica, baixo custo e multifuncionalidade. Os resíduos agroindustriais como o Líquido da Casca da Castanha de caju técnico (LCCT), constitui uma alternativa viável para o controle de vetores como o *Aedes aegypti*. Neste contexto, objetivou-se sintetizar bioprodutos à base do LCCT e avaliar a atividade larvicida. Os bioprodutos foram desenvolvidos por neutralizações parciais com bases inorgânica e orgânica. Os bioensaios de toxicidade para determinação da atividade larvicida foram realizados utilizando larvas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller. A mortalidade foi avaliada em 24 e 48 horas após a exposição, para a determinação da concentração letal para 50% e 90%. Os bioprodutos apresentaram atividade larvicida, pois ocasionaram morte das larvas em concentrações inferiores a 5 mg/L. Entretanto, o LCCTNa foi mais eficiente apresentando CL_{50-48h} de 2,38 mg/L.

Autorização legal: Não se aplica.

Palavras-chave: Larvicida; LCCT; Resíduo agroindustrial.

Apoio financeiro: FUNDECT, CNPQ, CAPES e UFGD.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFGD.

Introdução

Os vírus da Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela são transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* (Costa et al., 2018). As opções de controle populacional do inseto são ineficazes devido ao aumento dos níveis de resistência do inseto, educação para o controle e rejeição por parte da população nos cuidados do armazenamento e/ou tratamento das águas para consumo (Guzman et al., 2010). Desse modo, alternativas para o controle de vetores como o uso de produtos multifuncionais e/ou de longa duração (liberação controlada) são desejáveis (Kumar et al., 2016).

Os larvicidas biológicos de origem vegetal, facilitam o uso de moléculas com complexidade em sua composição, diminuindo os níveis de resistência do inseto (De Andrade Porto et al., 2013). Sendo assim, produtos multifuncionais com características surfactantes e potencial larvicida produzidos pela modificação de resíduos da biomassa, podem ser utilizados no controle de vetores (Dhar-Chowdhury et al., 2016; Kumar et al., 2016).

Deste modo, destaca-se o Líquido da Casca da Castanha de caju técnico (LCCT) oriundo da cadeia produtiva de *Anacardium occidentale*, conhecido popularmente como cajueiro. O LCCT é um resíduo extraído da castanha do caju durante o processamento industrial (Lomonaco et al., 2017), que apresenta propriedades larvicidas comprovadas contra o *A. aegypti* (Guissoni et al., 2013; Dourado et al., 2015; Lomonaco et al., 2017; Torres et al. 2015; Jorge et al., 2020). No entanto, o LCCT por ser um óleo viscoso e de baixa solubilidade, além de apresentar acidez (Lomonaco et al., 2017), dificulta sua ação direta nos criadouros. Em decorrência disso, modificações químicas na estrutura do LCCT são necessárias para proporcionar solubilidade e/ou potencializar a atividade biológica do bioproduto.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi sintetizar bioprodutos a partir de neutralizações parciais do Líquido da Casca da Castanha de caju técnico com bases inorgânica e orgânica e avaliar a atividade larvicida contra *A. aegypti*.

Metodologia

Síntese dos bioprodutos

Os bioprodutos foram sintetizados seguindo protocolo protegido pela patente BR 10 2019 014226 0 (Arruda et al., 2019) que por aspectos de segurança e confidencialidade não foram descritos. Os bioprodutos LCCtNa (Figura 1.a) e LCCtTEA (Figura 1.b) foram armazenados em temperatura ambiente após preparo.

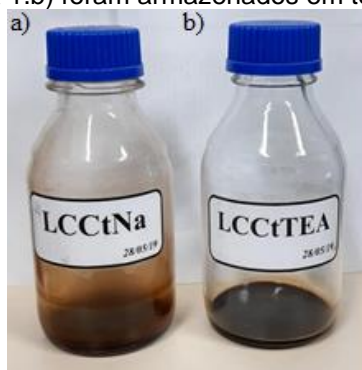


Figura 1. Bioprodutos derivados do Líquido da Casca da Castanha de caju técnico. a) LCCtNa (Líquido da Casca da Castanha de caju técnico + hidróxido de sódio); b) LCCtTEA (Líquido da Casca da Castanha de caju técnico + trietanolamina).

Ensaio larvicida em *Aedes aegypti*

Os bioensaios de toxicidade para determinação da atividade larvicida foram realizados seguindo protocolo da WHO (2005), utilizando larvas de 3º e 4º instar (L3 e L4) de *A. aegypti* (linhagem Rockefeller). Os ovos (obtidos da SUCEN, de Marília/SP) foram colocados em um recipiente plástico com água deionizada (Anjolette e Macoris, 2016), alimentados com ração triturada para peixes contendo 28% de proteína bruta (Laguna®, Lote 05EX180067109) para eclosão. Ao atingir 3ª e 4ª instar, as larvas foram separadas com pipeta de Pasteur e colocadas em copo plástico contendo 100 ml de água deionizada. Em seguida, foram adicionados os bioprodutos LCCtNa e LCCtTEA nas concentrações de 1, 2, 5, 10 e 25 mg/L, estabelecidos a partir de testes preliminares. Para cada concentração, 4 repetições foram usadas com 25 larvas por réplica, totalizando 100 larvas por concentração. Como controle negativo foi utilizado apenas água deionizada. As leituras de mortalidade foram realizadas às 24 e 48 horas após o início da exposição. As larvas foram consideradas mortas quando permaneceram imóveis na superfície da água ou no fundo do copo ou não mostraram nenhuma reação ao toque. Para a determinação da concentração letal para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) foi utilizada a análise Probit utilizando o pacote estatístico R versão 3.5.3 (R Core Team, 2019) na plataforma R® Studio, com intervalo de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

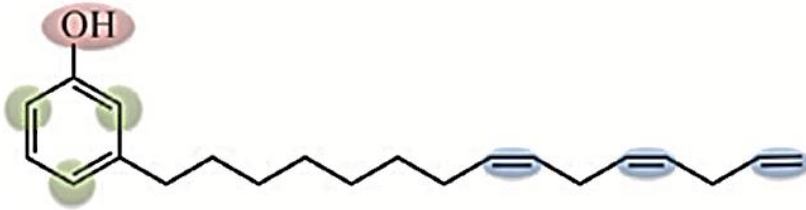
Foi possível obter os bioprodutos com ambas as bases neutralizantes, obtendo-se um produto homogêneo e solúvel. Ambos os bioprodutos apresentaram CL₅₀ inferior a 5 mg/L e CL₉₀ inferior a 13 mg/L para larvas de *A. aegypti* (Tabela 1). Komalamisra et al. (2005) estabeleceram que produtos destinados a larvicidas com CL₅₀ < 50 mg/L são considerados ativos.

Tabela 1. Atividade larvicida dos bioprodutos para *Aedes aegypti*, linhagem Rockefeller

| Bioproduto | 24h | | 48h | |
|------------|---|---|---|---|
| | CL ₅₀ (IC _{0,5}) (mg/L) | CL ₉₀ (IC _{0,5}) (mg/L) | CL ₅₀ (IC _{0,5}) (mg/L) | CL ₉₀ (IC _{0,5}) (mg/L) |
| LCCtNa | 2,65 (2,17 – 3,19) | 6,86 (5,37 – 9,80) | 2,38 (1,93 – 2,90) | 6,60 (75,11 – 9,63) |
| LCCtTEA | 4,02 (3,27 – 4,93) | 12,05 (9,18 – 17,83) | 3,74 (3,04 – 4,57) | 11,10 (8,48 – 16,36) |

LCCtNa (Líquido da casca da Castanha de Caju técnico + Hidróxido de sódio); LCCtTEA (Líquido da casca da Castanha de Caju técnico + Trietanolamina); CL₅₀ – Concentração letal para 50% dos organismos testados; CL₉₀ - Concentração letal para 90% dos organismos testados; IC_{0,5}– Intervalo de Confiança

Sendo assim, os bioprodutos derivados a partir do LCCt (Tabela 1), apresentados neste estudo, são considerados ativos contra larvas do *A. aegypti*. As propriedades larvicidas dos bioprodutos podem estar relacionadas a insaturação na cauda apolar dos fenóis lipídicos (Figura 2), tornando-os permeáveis a membrana celular induzindo a toxicidade para as larvas do mosquito (Lomonaco et al. 2009; Paiva et al. 2017).



Fonte: Lomonaco et al., 2017

Figura 2. Estrutura química do cardanol, principal componente do LCCT. Apresenta átomos de carbono nucleofílicos aromáticos localizados nas posições orto e para e o grupo hidroxila (grupamento fenol) seguido por uma longa cadeia lateral alifática contendo até três ligações duplas (configuração Z), que possibilitam grande número de funcionalizações e hidrofobicidade, permitindo melhor permeabilidade pela membrana celular das larvas.

O bioproduto LCCTNa apresentou maior toxicidade com CL_{50-24h} 2,65 mg/L (Tabela 1) quando comparado ao bioproduto LCCTTEA, nossos resultados corroboram com os relatados por Laurens et al. (1997) que observaram a atividade larvicida da neutralização total do LCC natural (sal de sódio de LCC) contra *A. aegypti* com CL_{50-24h} 2,3 mg/L. No entanto, a utilização do LCCT torna-se mais promissor que LCC natural, por um resíduo agroindustrial de fácil acesso, baixo custo (Dourado et al., 2015) e produzido em grande escala dispendo de 300,000 à 360,000 toneladas/ano (Attanasi et al., 2006). Entretanto, o LCCT apresenta pouca solubilidade em água, o que acaba dificultando sua dispersão em criadouros de insetos vetores.

Neste contexto, modificações químicas vêm sendo realizadas, a fim de torná-lo mais solúvel e potencializar a atividade larvicida do mesmo. Em estudo realizado por Jorge et al. (2020) desenvolveram sulfonações de LCCT, obtendo o sulfonato de sódio (LCCTsNa) com propriedades surfactantes, porém, após essas modificações o bioproduto perdeu a atividade larvicida, e após emulsionado (LCCT + LCCTsNa), a mistura apresentou atividade larvicida com CL_{50-24h} de 110,6 mg/L, em *A. aegypti*, propriedade adquirida devido suas características surfactantes. Os bioprodutos LCCTNa e LCCTTEA apresentaram solubilidade e atividade larvicida potencializada quando comparado ao trabalho de Jorge et al. (2020), isso pode estar relacionado ao processo de neutralização parcial do LCCT.

Sendo assim, a utilização do LCCT para o desenvolvimento de bioprodutos com atividade biológica se torna viável e promissora, pois visa utilizar os princípios da química verde, que estabelece o desenvolvimento de bioprodutos seguros usando fontes renováveis (Lenardão et al., 2003). Os bioprodutos, deste trabalho, apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti*, podendo posteriormente serem utilizados de forma direta em criadouros ou inseridos em produtos de limpeza (detergente), pois ambos apresentaram características surfactantes com atividade biológica.

Conclusões

A neutralização parcial do LCCT proporcionou a síntese de bioprodutos LCCTNA e LCCTTEA, com maior hidrossolubilidade, potencializando a atividade larvicida contra *A. aegypti*. Considerando que os bioprodutos apresentaram atividade larvicida menor que 5 mg/L (CL_{50}), podem ser considerados uma alternativa viável para o controle de vetores. A síntese de novos bioprodutos utilizando o resíduo agroindustrial vegetal, LCCT, é de grande importância econômica e sustentável, além de seguir os princípios da Química Verde. No entanto, são necessários estudos que avaliem a toxicidade em outros organismos considerados não alvos, promovendo ações importantes para as propostas de novos bioprodutos que não ocasionem danos ambientais.

Referências bibliográficas

- ANJOLETTE, A.F.F. & MACORIS, M.L.G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista, p. 19-29, 2016.
- ARRUDA, E. J. et al. Produto baseado em LCC para controle de insetos vetores, parasitas e pragas agrícolas. 2019, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR1020190142260. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 09/07/2019.
- ATTANASI, O.A. et al. Synthesis and reactions of hydrogenated cardanol. Tetrahedron, v. 62, n. 25, p. 6113-6120, 2006.
- COSTA C.F. et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 12(7): e0006594, 2018.
- DE ANDRADE PORTO, K.R.; et al. Atividade inseticida do líquido da castanha de caju sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Revista Brasileira de Biociências, v. 11, n. 4, 2013.
- DHAR-COWDHURY, P. et al. Socioeconomic and ecological factors influencing *Aedes aegypti* prevalence, abundance, and distribution in Dhaka, Bangladesh. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.94, n o 6, p. 1223-1233, 2016.
- DOURADO, D.M. et al. Effects of cashew nut shell liquid (CNSL) component upon *Aedes aegypti* Lin. (Diptera: Culicidae) larvae's midgut. Afr. J. Biotechnol., v.14, n. 9, p.829-834, mar. 2015.
- GUISSONI, A.C.P. et al. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.15, n o 3, p. 363-367, 2013.
- GUZMAN, M.G. et al. Dengue: a continuing global threat. Nature Rev. Microbiol. v.8, S7-S16, 2010.
- JORGE, M. R. et al. Sulphonates' mixtures and emulsions obtained from technical cashew nut shell liquid and cardanol for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Environmental Science and Pollution Research, p. 1-15, 2020.
- KOMALAMISRA, N. et al. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, v. 36, n. 6, p. 1412, 2005.
- KUMAR, G. et al. Impact of container material on the development of *Aedes aegypti* larvae at different temperatures. J.

Vector Borne Dis. v. 53, n o 2, p-144-148, jun. 2016.

LAURENS, A. et al. Antivectorial Activities of Cashew Nut Shell Extracts from *Anacardium occidentale* L. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products*, v. 11, n. 2, p. 145-146, 1997.

LENARDÃO, E.J. et al. " Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

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, 2009.

LOMONACO, D., MELE, G., & MAZZETTO, S.E. Cashew nutshell liquid (CNSL): from an agro-industrial waste to a sustainable alternative to petrochemical resources. In: *Cashew Nut Shell Liquid*. Springer, Cham, 2017. p. 19-38.

PAIVA, D.R. et al. A potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 1, p. 373-382, 2017.

TORRES, R.C.; Garbo, A.G. & Walde, R.Z.M.L. Characterization and bioassay for larvicidal activity of *Anacardium occidentale* (cashew) shell waste fractions against dengue vector *Aedes aegypti*. *Parasitology research*, v. 114, n. 10, p. 3699-3702, 2015.

WHO - World Health Organization 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. No.

WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.