

Toxicidade da formulação obtida a partir do líquido da castanha do caju *Anacardium occidentale* L. em *Artemia salina* Leach.

Toxicity formulation obtained from liquid cashew *Anacardium occidentale* L. in *Artemia salina* Leach.

Priscilla Rezende Motti¹
Karla Rejane de Andrade Porto²
Antonia Railda Roel³

¹ Aluna do Mestrado em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). E-mail: prscllrzndmtt@gmail.com

² Bolsista DTI 1 INAU/ CNPq, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). E-mail: portokra@gmail.com

³ Docente do Programa de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). E-mail: arroel@ucdb.br

RESUMO ABSTRACT

O líquido da castanha de caju (LCC) possui comprovada ação inseticida para as larvas de *Aedes aegypti*. Porém tem elevada volatilidade e fácil degradação que inviabiliza seu uso direto, sendo necessária a sua incorporação em material inócuo e inerte, de forma a não alterar as funções já reconhecidas como bioinseticida. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi determinar as concentrações letais (CL) do produto elaborado a partir do LCC frente às larvas de *A. salina* L. e avaliar a sua estabilidade. O ativo foi processado por secagem em "spray dryer" e incorporado em um excipiente adequado para a sua solubilização em meio aquoso e, na cromatografia líquida de alta eficiência, apresentou uma incorporação de 87,8%, após em diferentes concentrações (0,5 mg mL⁻¹; 0,25 mg mL⁻¹ e 0,125 mg mL⁻¹) foi empregado nos bioensaios e demonstrou elevada solubilidade em água. Para os bioensaios com *Artemia salina* Leach., o produto foi diluído em concentrações 0,5 mg mL⁻¹; 0,25 mg mL⁻¹ e 0,125 mg mL⁻¹ em quadruplicata, com um controle positivo e um negativo. Após 24h de exposição, os indivíduos foram analisados segundo a taxa de mortalidade e definida a concentração letal pelo método de Probit. Foi definida a CL₁₀ em 0,1872 mg mL⁻¹, CL₅₀ em 0,3147 mg mL⁻¹ e CL₉₀ em 0,529 mg mL⁻¹. O bioensaio com a *A. salina* indicou que, mesmo em concentrações menores, o pó foi tóxico e, com base nesses resultados, será necessário dar início a novas etapas de testes clínicos e de ecotoxicidade.

PALAVRAS-CHAVE

bioinseticida
microcrustáceo
concentração letal

The liquid from cashew (LCC) has proven insecticidal to larvae of Aedes aegypti. However, it has high volatility and easy degradation which prevents their direct use, their incorporation into harmless inert material, so as not to change the functions already recognized as being necessary biopesticide. Thus, the aim of this study was to determine lethal concentrations (LC) of the product manufactured from the LCC front of the larvae of A. salina L. and assess its stability. The asset was processed by drying in a "spray dryer" and incorporated into a suitable for their solubilization in aqueous excipient and high performance liquid chromatography showed an incorporation of 87.8% after in different concentrations (0.5 mg mL⁻¹; 0.25 mg mL⁻¹ and 0.125 mg mL⁻¹) was used in bioassays and showed high solubility in water. For bioassays with Artemia salina Leach, the product was diluted to a concentration of 0.5 mg mL⁻¹; 0.25 mg mL⁻¹ and 0.125 mg mL⁻¹ in quadruplicate, with a positive and negative control. After 24 h exposure the subjects were analyzed according to the mortality rate and the lethal concentration defined by Probit method. Was defined in the CL₁₀ 0.1872 mg mL⁻¹, LC₅₀ 0.3147 mg mL⁻¹ and LC₉₀ in mg mL⁻¹ 0.529. The bioassay with A. salina indicated that even at lower concentrations the dust was toxic and based on these results will need to initiate new phases of clinical trials and ecotoxicity.

KEY WORDS

bioinsecticide
microcrustacean
lethal concentration

1 INTRODUÇÃO

Os estudos toxicológicos *in vitro* se tornam uma opção na triagem em busca de plantas que possuam efeitos tóxicos; além de diminuir custos e obter respostas rápidas, possibilitam a identificação preliminar de plantas com potencial efeito tóxico e permitem a redução dos animais utilizados na experimentação (BEDNARCZUK et al., 2010).

O teste de letalidade em *Artemia salina* Leach., um dos organismos mais visados para testes de bioensaios, pode ser usado como guia de triagem e fracionamento biomonitorado em extrato de plantas biologicamente ativas, em que a resposta mais simples para monitorar a letalidade é apenas um critério, vida ou morte (MONTANHER et al., 2003). Além da identificação de bioatividade de compostos, os testes com esse microcrustáceo podem indicar um parâmetro preliminar de intoxicação humana e em outros organismos, prevenindo riscos futuros (ALVES et al., 2000).

O caju é a cultura de maior importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil. A amêndoa é muito apreciada, constituindo, junto com o líquido da castanha do caju (LCC), o principal produto de exportação. O uso do LCC vem sendo associado à prevenção de algumas doenças, referenciado como substância antimicrobiana, e o efeito biológico, nocivo ou benéfico. Esses produtos podem ser dependentes do teor e da forma como são consumidos, conforme estudos para substâncias bioativas, bem como testadas para atividades larvicidas de insetos (COSTA et al., 2005).

Embora o custo da matéria-prima do LCC seja baixo, bem como seu processo de obtenção segundo relata Mazzetto et al. (2009), sua elevada volatilidade inviabiliza seu uso direto, sendo, portanto, necessário incorporá-lo em um material inócuo e inerte, de forma a não alterar as funções já reconhecidas como bioinseticida. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi determinar as concentrações letais (CL) do produto elaborado a partir do ácido anacárdico obtido do LCC frente às larvas de *A. salina* L.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo da formulação em pó

O produto comercial CASHOL[®] (A044-11, grau de pureza 99%), com um conteúdo médio de 98% de ácido anacárdico mais a presença de cardol, metilcardol e resíduos, foi disperso em solução hidroalcoólica a 80% v/v na proporção 1:1 v/v. em seguida numa matriz sólida comercial, por adsorção e subsequente tamisação.

2.2 Determinação do LCC na formulação em pó

O protótipo foi submetido à análise em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (modelo Varian 210) detector de arranjo de diodos (DAD) e no software Star WS (Workstation 2.0). A coluna utilizada foi de fase reversa C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5µm) e pré- coluna (2,5 cm x 3 mm) de mesma fase da coluna (Phenomenex). A eluição foi realizada empregando sistema gradiente no tempo de 40 minutos, sistema esse com acetonitrila/água/ácido acético (66/33/2v:v:v) (A) e tetrahidrofurfano (B), o qual iniciou a eluição com 10% de B, em 40 minutos atingiu 100% de B. A vazão de fluxo da bomba foi de 1mL/min, e o volume injetado foi de 20 µL. A análise foi conduzida a 22 °C, tanto no preparo da curva analítica quanto na análise do produto, e as injeções foram realizadas em triplicata.

A curva de padrão externo empregada para quantificar o ácido anacárdico na formulação em pó foi preparada empregando o composto comercial utilizado na formulação.

2.3 Bioensaios

Para avaliar a inocuidade de um produto em pó utilizando como ativo o ácido anacárdico, foram conduzidos testes com *Artemia salina* L em diferentes concentrações.

Foram utilizadas, para este trabalho, larvas do 3º estágio, obtidas de cistos de *A. salina* L. eclodidos em água do mar artificial (solução salina), decorrente, sob a iluminação parcial. Os testes foram realizados em concentrações a 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL a partir de

uma solução estoque de 500 mg/mL, a qual é preparada, adicionando-se 0,015g da amostra do extrato em um volume final de 30 mL de água do mar a 1% de DMSO. Em cada concentração, foram utilizadas 10 larvas, e os testes foram realizados em quadruplicatas, tendo como controle branco (água desclorada) e negativo (rotenona), em tubos de ensaio com capacidade de 10 mL contendo um volume final de cinco mililitros. Em todos os testes, as larvas foram deixadas em contato com as soluções de extratos, durante 24 horas. Em seguida, foi determinado o número de mortos e sobreviventes, e realizada a contabilização percentual dos indivíduos mortos, os dados expressos em percentual de mortalidade também foram expressos como Taxa de Toxicidade à *A.salina* L. (TAS).

Os dados de mortalidade obtidos nos respectivos controles branco ou negativo foram submetidos ao programa Polo-PC (software Leora-POLO 97355947870655352), que utiliza o método de Probit, e a análise foi estabelecida pelas faixas de correlação de 0,90; 0,95 e 0,99 definindo então os valores das concentrações letais para 10%, 50% e 90% da população exposta a cada ensaio e os respectivos intervalos de confiança, estabelecendo assim os valores de CL_{10} , CL_{50} e CL_{90} .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ácido anacárdico em estudo prévios sobre larvas de *Aedes aegypti* L. causou mortalidade para 10, 50 e 90% da população nas concentrações letais em 0,0187, 0,095 e 0,162 mg/mL, respectivamente (figura 1). A partir do valor da concentração de maior efeito letal populacional, foi elaborada formulação em pó com ácido anacárdico, perfazendo a concentração final de 10%. A análise cromatográfica por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) revelou uma incorporação de 8,78% do ativo. Dessa forma, o produto foi então submetido à avaliação sobre os naúpilos de *A. salina* L. por se tratar de um teste simples e de triagem de toxicidade.

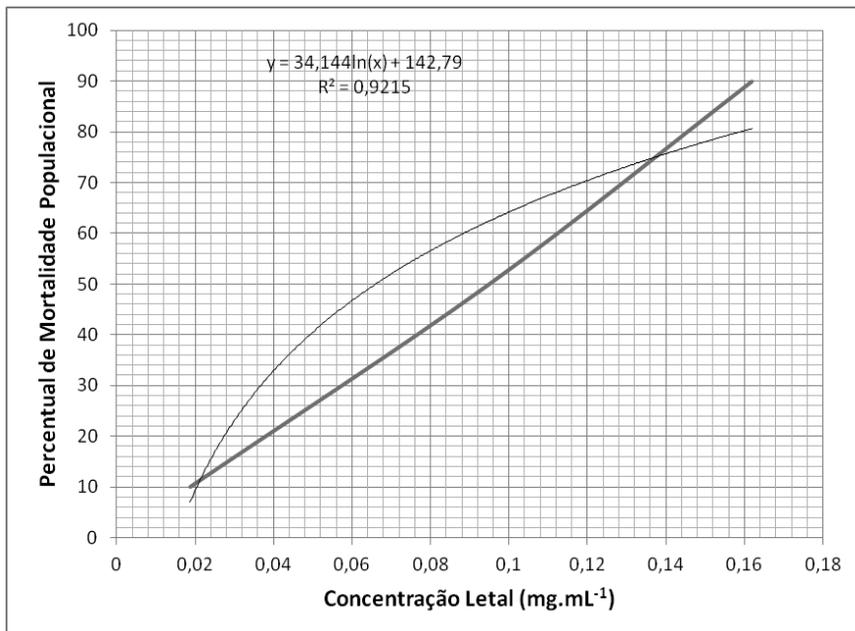


Figura 1 - Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em diferentes concentrações do ácido anacárdico.

A Taxa de Toxicidade à *Artemia salina* (TAS) foi estabelecida para o produto em pó, nas concentrações de 1,0 mg.mL⁻¹; 0,5 mg.mL⁻¹; 0,25 mg.mL⁻¹ e 0,125 mg.mL⁻¹, que continha do ativo as concentrações correspondentes em 0,1 mg.mL⁻¹; 0,05 mg.mL⁻¹; 0,025 mg.mL⁻¹ e 0,0125 mg.mL⁻¹, e os valores de toxicidade estão apresentados na tabela 1. A análise simples dos dados possibilitou estabelecer que o produto, segundo o fundamento dos testes (MEYER et al., 1982), apresentou elevada toxicidade nas concentrações em 1,0 mg.mL⁻¹ e 0,5 mg.mL⁻¹, sendo possível seu uso sem causar danos em 0,25 mg.mL⁻¹, e totalmente inócua na concentração de 0,125 mg.mL⁻¹.

Tabela 1 - Taxa de Toxicidade a *Artemia salina* em diferentes concentrações da formulação em pó contendo 10% de ácido anacárdico.

Concentração da formulação em pó (mg.mL ⁻¹)	Percentual de mortalidade (%)
1,0	100
0,5	85
0,25	40
0,125	-

Numa definição mais precisa, foram definidas, através do cálculo de Probit (software Leora POLO 97355947870655352), as concentrações letais no nível de significância a 95% para a quantificação efetiva da formulação em pó, tabela 2 e figura 2, confirmando assim os dados preliminares e estabelecendo as faixas de toxicidade e segurança limite para cada concentração e sua correlação com o percentual de ação na população da formulação proposta.

Tabela 2 - Cálculo das Concentrações Letais (CL) mg.mL⁻¹ e faixa de letalidade da formulação em pó contendo 10% do ácido anacárdico sobre os naúpilos de *Artemia salina* L.

Dosagem Letal	Valor absoluto (mg.mL ⁻¹)	Faixa de letalidade (mg.mL ⁻¹)
DL ₁₀	0,187	0,1458 - 0,2197
DL ₅₀	0,3147	0,2770 - 0,3569
DL ₉₀	0,529	0,4527 - 0,6743

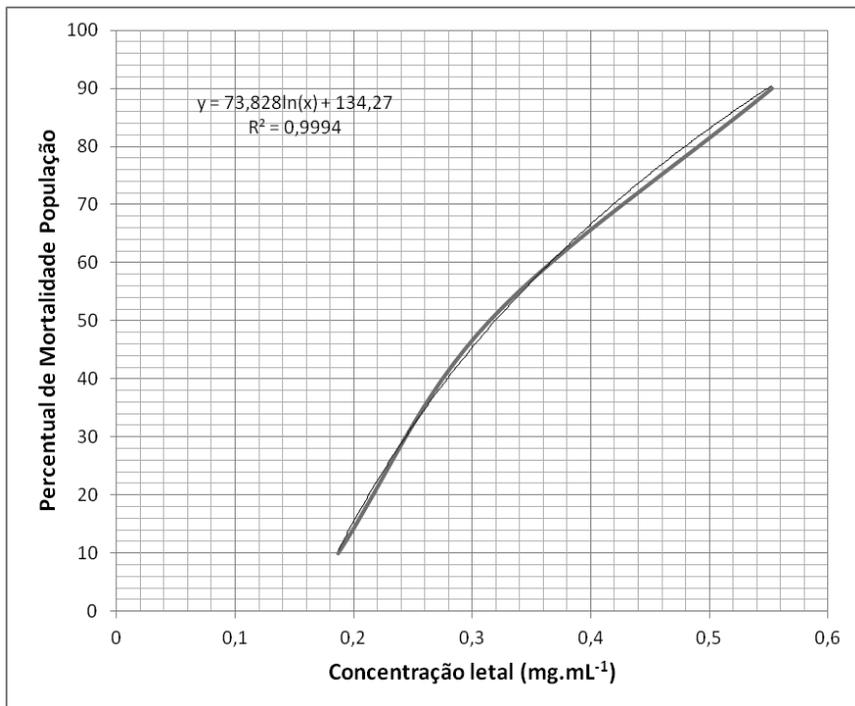


Figura 2 - Cálculo das Concentrações Letais (CL) mg.mL⁻¹ da formulação em pó do ácido anacárdico sobre os naúpiolos de *Artemia salina* L.

Na busca por controle biológico contra *A. aegypti* várias pesquisas foram feitas no intuito de desenvolver novas substâncias inseticidas. Diversas plantas apresentam essas substâncias, e a utilização de produtos preparados a partir delas, tais como extratos e óleos essenciais, contra mosquitos têm aumentado (AMER; MEHLHOR, 2006).

O baixo impacto ambiental impulsiona pesquisas para formulações de inseticidas botânicos, em contrapartida pouco se conhece sobre a capacidade terapêutica das plantas, mesmo com a imensa biodiversidade brasileira. Entre os estudos realizados nos últimos 10 anos, podem ser observados, na ação inseticida contra *A. aegypti* L., os extratos das folhas das espécies de *Ageratum conyzoides* L., *Cymbopogon citratus* Stapf, *Lippia sidoides* Chamisso., *Ocimum gratissimum* L., *Obasicum purpurascens* Benth e *O. tenuiflorum* L., *Cymbopogon winterianus*

Jowitt e *Tagetes minuta* L (FURTADO et al., 2005); do mesmo gênero do presente estudo, destaca-se o uso do óleo essencial das folhas de *Anacardium humile* St. Hill (PORTO et al., 2008), bem como o extrato diclorometânico da folha de *Kielmeyera coriacea* Mart. (Clusiaceae); este último causou mortalidade média superior a 90%, outros extratos provocaram mortalidade média igual ou superior a 50%. Também foi relatada a ação larvicida do extrato hexânico da casca do caule de *Talauma ovata* A.St.-Hil. (Magnoliaceae), madeira da raiz e folha de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) e da casca da raiz de *Matayba guianensis* Aubl. (Sapindaceae), extrato etanólico da casca e da madeira do caule de *Xylopiá emarginata* Mart. (Annonaceae) (COELHO et al., 2009). Do *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae), conhecido por cajueiro, o uso do líquido da castanha do caju mostrou ser um eficiente inseticida (GUISSONI et al., 2013; PORTO et al., 2013), e ainda, o extrato bruto etanólico da semente de *Annona coriácea* Mart. (Annonaceae) (DILL et al., 2012).

A procura crescente de produtos naturais que sejam capazes de realizar o controle de mosquitos adultos assim como das larvas e que, ao mesmo tempo, não provoquem nenhum dano ao meio ambiente, é então um das ferramentas de grande destaque nos estudos do controle do vetor (BARRETO et al., 2006), associando ainda baixo custo e facilidade de obtenção no mercado.

4 CONCLUSÃO

O grau de correlação da reta ascendente de regressão linear no teste com *A. salina* L. indicou que a confiabilidade dos dados estão próximos da relação absoluta ($r=1$) entre a mortalidade populacional (%) e a concentração da substância ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) testada. Já para o teste em *A. aegypti* L. essa mesma confiabilidade dos resultados com o ativo puro, apesar de ter sido menor que o resultado em *A. salina* L., também é considerado, estatisticamente, uma forte relação.

Embora o ácido anacárdio, o ativo do produto formulado em pó, tenha apresentado mortalidade considerável em larvas de *A. aegypti* L. comprovando sua eficiência para o controle desse vetor, fato esse que o que elenca como um bioinseticida, frente aos naúpilos da *A. salina* L., o produto mostrou-se tóxico nas concentrações de 1,0 e 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

com mortalidade superior a 50% da população em teste. Padrões de ecotoxicidade devem então ser analisados antes da indicação direta do produto.

REFERÊNCIAS

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-373, 2000.

AMER A.; MEHLHORN, H. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research*, v. 99, p. 478-90, 2006.

BARRETO, C. F.; CAVASIN, G. M.; SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindussaponaria* Lin (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical*, v. 35, n. 1, p. 37-57, 2006.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.

COELHO, A. A. M.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. *BioAssay* (bioassay.org.br), v. 4, n. 3, p. 1-6, 2009.

COSTA, T. S. A.; JALES, K. A.; OLIVEIRA, M. E. B.; GARRUTI, D.S. Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanha de caju. *Comunicado técnico*, 2005.

DILL, E. M.; PEREIRA, M. J. B.; COSTA, M. S. Efeito residual do Extrato de *Annona coriácea* sobre *Aedes aegypti*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 595-601, 2012.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE, N. M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Revista Neotropical Entomology*, v. 34, p. 843-847, 2005.

GUISSONI, A. C. P.; SILVA, I. G.; GERIS, R.; CUNHA, L. C.; SILVA, H. H. G. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa de controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 3, p. 363-367, 2013.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha do caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. *Revista Química Nova*, v. 32, n. 3, 2009.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J..E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E., McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MONTANHER, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Monitoramento dos extratos brutos de espécies de *Polygala* (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, p. 66-68, 2003.

PORTO, K. R. A.; ROEL, A. R. ; SILVA, M. M.; COELHO, R. M.; SCHLEDER, E. J. D.; JELLER, A. H. Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 1-4, 2008.

PORTO, K. R. A.; ROEL, A. R.; MACHADO, A. A.; CARDOSO, C. A. L.; SEVERINO, E.; OLIVEIRA, J. M. Atividade inseticida do líquido da castanha de caju sobre larvas de *Aedes aegypti* L., (1762) (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira Biociência*, v. 11, n. 4, p. 419-422, 2013.

