

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**AVALIAÇÃO DA SEGURIDADE AMBIENTAL DE PRODUTOS DERIVADOS DO
LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU TÉCNICO (LCCt) PROPOSTOS PARA
O COMBATE DO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

FELIPE MENDES MEREY

**DOURADOS/MS
2019**

FELIPE MENDES MEREY

**AVALIAÇÃO DA SEGURIDADE AMBIENTAL DE PRODUTOS DERIVADOS DO
LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU TÉCNICO (LCCt) PROPOSTOS PARA
O COMBATE DO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, da Universidade Federal da Grande Dourados.

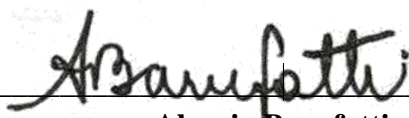
Aprovado em: 29/11/2019

BANCA EXAMINADORA



Bruno do Amaral Crispim

Presidente



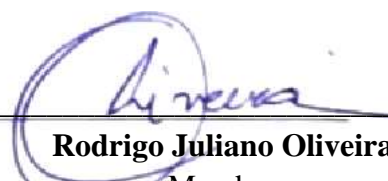
Alexeia Barufatti

Membro



Fábio Kummrow

Membro



Rodrigo Juliano Oliveira

Membro

AGRADECIMENTOS

Obrigado Senhor, por agir na minha vida em todos os momentos.

Das menores conquistas às grandes vitórias, como esse trabalho, devo inteiramente a minha família.

Obrigado por serem sempre o meu abrigo. Amo todos vocês!!!

Ao meu orientador, irmão e amigo prof. Dr. Bruno do Amaral Crispim, por ser um exemplo de coragem, dedicação e profissionalismo. Obrigado por todos os conhecimentos compartilhados, paciência e ânimo para ajudar em todos os momentos. Agradeço a Deus pela sua vida, chefia.

À profa. Dra. Alexeia Barufatti, por ter me ensinado muito mais que ciência, a senhora é um exemplo de pesquisadora, disposição e competência.

Meu muito obrigado a Ma. Marcia Ramos Jorge e ao prof. Dr. Eduardo José de Arruda, por terem compartilhado esse trabalho e conhecimentos comigo. Desde a realização de atividades em laboratório a escrita desse documento.

Ao prof. Dr. Fábio Kummrow e a Dra. Fabiana Gomes da Silva Dantas, por sempre estarem dispostos a ajudar, especialmente na interpretação dos resultados.

À profa. Dra. Alexeia Barufatti, prof. Dr. Fábio Kummrow e prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira por aceitarem participar da banca examinadora desse trabalho. Muito obrigado

Ao Alexandre Campos Banari por ter me indicado ao grupo/família LECOGEN, obrigado por ter feito tanto por mim. Aos meus amigos de laboratório, desde os mais antigos: Bruno, Héliana, Luiza, Juliana e Milena, e as novas integrantes: Nathalya, Marina, Lígia e Sabrina Luz. E também aos amigos da graduação: Manu, Sarah, Hemyly, Thália, Amanda Buzanari e Tiago Ferreira. Sou feliz por compartilhar os meus dias com vocês.

Àquele que a saudade se faz presente todos os dias. Te amo, Rafa.

Aos órgãos de fomento CNPq, FUNDECT e a UFGD pelo recurso disponibilizado para que a pesquisa pudesse ser realizada e pela bolsa concedida durante a minha graduação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização desse trabalho. Muito obrigado!

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA AMBIENTAL DE PRODUTOS DERIVADOS DO LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU TÉCNICO (LCCT) PROPOSTOS PARA O COMBATE DO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Highlights

- A Emulsão não apresentou genotoxicidade e/ou mutagenicidade para os organismos avaliados;
- A Emulsão apresenta maior seguridade ambiental que larvicidas recomendados pela OMS;
- A Emulsão pode ser registrada como um novo produto para controle do *Aedes aegypti*.

RESUMO

O desenvolvimento de novos inseticidas e/ou estratégias para controlar o *Aedes aegypti* é uma questão importante de saúde pública, além disso, é imprescindível avaliar se esses potenciais larvicidas são seguros ambientalmente para espécies não alvo. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a seguridade ambiental da Emulsão (Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico (LCCT) + Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico Sulfonato de Sódio (LCCTsNa)) e seus constituintes isolados (LCCT e LCCTsNa). Para tanto, foram realizados ensaios ecotoxicológicos, genotóxicos e mutagênicos em diferentes organismos não alvo. Em relação à toxicidade, *Daphnia similis* foi o organismo que apresentou maior sensibilidade aos três produtos avaliados, seguido de *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Oreochromis niloticus*. Em relação aos produtos testados, o LCCT foi o que apresentou maior toxicidade para os três organismos. A Emulsão apresentou fitotoxicidade para *Allium cepa* apenas na maior concentração. Entretanto, não foram observados efeitos genotóxicos e mutagênicos nos ensaios com *A. cepa*, *O. niloticus* e *Salmonella* microsoma. Baseado nos resultados, concluímos que apesar da Emulsão ter mostrado toxicidade para organismos não alvo é improvável que sejam encontradas concentrações tóxicas deste produto no meio ambiente devido à sua dispersão, diluição e degradação ambiental. Além disso, a Emulsão pode ser considerada menos tóxica que os demais larvicidas recomendados pela OMS nas espécies avaliadas. Dessa maneira, a Emulsão é um produto eficaz no controle das larvas e apresenta multifuncionalidade, podendo ser considerada uma nova estratégia para controle de vetores como o *A. aegypti*.

Palavras chave: larvicida; ensaio do cometa; micronúcleo; degradação do DNA; *Salmonella* microsoma; controle de vetores.

ABSTRACT

The development of new insecticides and/or strategies to control *Aedes aegypti* is an important to public health, and it is therefore essential to assess whether these potential larvicides are environmentally safe for non-target species. In this context, the objective of this study was to evaluate the environmental safety of the Emulsion (Technical Cashew Nut Shell Liquid (TCNSL) + Sodium Sulfonate Technical Cashew Nut Shell Liquid (NatCNSLS)) and its isolated constituents (TCNSL and NatCNSLS). For this, ecotoxicological, genotoxic and mutagenic assays were performed in different non-target organisms. Concerning the toxicity, *Daphnia similis* was the organism that presented the highest sensitivity to the three evaluated products, followed by *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Oreochromis niloticus*. Regarding the tested products, the TCNSL was the one that presented the highest toxicity for the three organisms. Emulsion presented phytotoxicity to *Allium cepa* only in the highest concentration. However, no genotoxic and mutagenic effects were observed in the *A. cepa*, *O. niloticus* and *Salmonella* microsome assays. Based on the results, we conclude that although Emulsion has shown toxicity to non-target organisms, toxic concentrations of this product in the environment are unlikely to be found due to its dispersion, dilution and environmental degradation. In addition, Emulsion may be considered less toxic than other WHO recommended larvicides in the species evaluated. Thus, Emulsion is an effective product for larval control and has multifunctionality and can be considered a new strategy for vector control such as *A. aegypti*.

Keywords: larvicide; comet assay; micronucleus; DNA degradation; *Salmonella* microsome; vector control.

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus em ressurgência responsáveis por causar a dengue, zika, febre amarela (família Flaviviridae) e chikungunya (família Togaviridae), são vírus que possuem como principal vetor o *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (Patterson et al. 2016; Wilder-Smith et al. 2017). Por ser uma espécie adaptada ao ambiente urbano e periurbano, o *A. aegypti*, têm causado problemas de saúde pública em diversos países, em especial àqueles localizados em regiões tropicais e subtropicais como o Brasil (Bhatt et al. 2013). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que 390 milhões de infecções de dengue ocorram anualmente, dentre elas 96 milhões se manifestam clinicamente (WHO 2018).

As estratégias para controle dessas doenças são principalmente focadas na redução de densidade do vetor, por meio de abordagens mecânicas, biológicas e químicas (Zara et al. 2016). O controle químico é amplamente empregado na redução das larvas, porém recentes estudos mostram que o uso de larvicidas apresentam elevada toxicidade para organismos não alvos (Abe et al. 2014; Abe et al. 2019) e a espécie *A. aegypti* tem adquirido resistência aos larvicidas comumente utilizados (Bellinato et al. 2016; Carvalho et al. 2004; Lima et al. 2006).

Assim sendo, a busca por novos produtos ou compostos ativos larvicidas, oriundos da química “verde” e economicamente viáveis, tornou-se necessária para o combate do *A. aegypti*, transmissor de doenças infecciosas. Considerando-se essas características, destaca-se o Líquido da Casca de Castanha de Caju técnico (LCCt), subproduto obtido da queima da castanha de caju, que apresenta comprovada atividade inseticida e larvicida contra o *A. aegypti* (Lomonaco et al. 2009).

Neste sentido nosso grupo de pesquisa realizou a sulfonação do LCCt tendo como produto o Sulfonato de Sódio (LCCtSNa), surfactante que visava ser utilizado como uma estratégia para controle do *A. aegypti* (Jorge et al. 2018). Porém, como descrito em Jorge et al. (2018), o LCCtSNa não apresenta atividade larvicida quando utilizado de forma independente. Deste modo, o LCCt foi emulsionado com LCCtSNa, obtendo uma emulsão multifuncional, com atividade larvicida (CL50-48 h 110,6 mg/L) e surfactante, podendo então ser utilizado como produto de limpeza integrado na rotina da população e atuando também no controle dos criadouros de *A. aegypti* a partir do escoamento das águas residuais.

No entanto, o efeito dessa emulsão e seus constituintes isolados em organismos aquáticos não alvos ainda não são totalmente compreendidos, sendo necessário realizar a avaliação da seguridade ambiental por meio de ensaios de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade em organismos que ocupam diferentes níveis tróficos, como produtores primários: plantas (*Allium cepa*) (Mustafa e Sunaarikan, 2008) e microalgas unicelulares (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

(Satyavani et al. 2012); consumidores primários: Cladoceras (*Daphnia similis*) (Buratini et al. 2004); e consumidores secundários como os peixes (*Oreochromis niloticus*) (Campos-Garcia et al. 2015). Além desses modelos, o teste Ames (*Salmonella microssoma*) (Ohe e Wakabayashi, 2004; Iqbal et al. 2017) também é uma importante ferramenta para determinação da mutagênicidade.

Considerando o potencial larvicida da Emulsão (LCCT+LCCTsNa) como uma nova estratégia para o controle do *A. aegypti*, o objetivo desse estudo foi avaliar a segurança ambiental desse composto e seus constituintes isolados (LCCT e LCCTsNa), utilizando ensaios ecotoxicológicos, genotóxicos e mutagênicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PRODUTOS

O Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico (LCCT) utilizado nos ensaios foi fornecido pela empresa Resibrás (Fortaleza-CE, Brasil). O LCCTsNa foi obtido através da sulfonação de LCCT com ácido sulfúrico fumegante (65,5-68% SO₃), pelo processo descrito na patente BR 10 2017 027264 8 (Jorge et al. 2017). A Emulsão (LCCT+LCCTsNa) foi preparada na proporção de 1:6 (1 parte ativo LCCT:6 partes de surfactante LCCTsNa), conforme descrito por Jorge et al. (2019).

2.2. AVALIAÇÕES ECOTOXICOLÓGICAS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

2.2.1. Ensaio de toxicidade crônica em *Pseudokirchneriella subcapitata*

O ensaio de inibição de crescimento com *P. subcapitata* foi realizado de acordo com as diretrizes OECD 201 (2011) e ABNT-NBR 12648 (2011). Um inóculo algal foi exposto ao LCCT em concentrações entre 0,01 e 10 mg/L, LCCTsNa entre 0,1 e 100 mg/L e Emulsão entre 0,70 e 70 mg/L. Além dos controles negativo (meio de cultivo Oligo+água deionizada) e solvente (meio de cultivo Oligo+DMSO 1%).

A concentração inicial de inóculo algal em cada réplica foi de 1×10^5 células mL. Os testes foram realizados em condições de esterilidade, sob condições controladas de luminosidade a 4500 lux, temperatura 25 ± 2 °C e agitação a 160 rpm por um período de 72 h. Posteriormente, o número de algas de cada concentração foi contado em câmara de Neubauer e comparado com o controle negativo. Para validação dos ensaios o número final de células no controle negativo foi no mínimo 16x maior em relação ao inóculo inicial do teste. A inibição de crescimento foi o indicativo de toxicidade e foi utilizada para determinação da concentração de inibição (CI_{50-72 h}).

2.2.2. Ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*

As *D. similis* foram cultivadas em meio MS de acordo com o protocolo ABNT NBR 12713 (2016), sob condições controladas de temperatura a 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 16:8 h claro/escuro e

intensidade luminosa de 700 lux. Os organismos foram alimentados três vezes por semana com algas *P. subcapitata*, e os parâmetros mantidos em dureza 44 ± 4 mg/L CaCO₃, oxigênio dissolvido 7 ± 1 mg/L, condutividade 200 ± 50 µS/cm e pH 7,0 a 7,6. Para realização do ensaio foram selecionados neonatos com menos de 24 h de idade, derivados da mesma cultura.

O teste de toxicidade aguda com *D. similis* foi realizado de acordo com os protocolos OECD 202 (2004) e ABNTNBR 12713 (2016). Os neonatos foram expostos ao LCCt em concentrações entre 0,0003 e 0,3 mg/L, LCCtSNa entre 0,1 e 15 mg/L e Emulsão entre 0,0021 e 2,1 mg/L. Como controle negativo foi utilizado meio de cultivo MS e como controle solvente meio de cultivo MS+DMSO 0,5%. Para cada tratamento foram adicionados 20 organismos, escolhidos e distribuídos aleatoriamente em quatro réplicas com volumes iguais de 10 mL.

O ensaio teve duração de 48 h, os organismos permaneceram sem alimentação e nas mesmas condições de fotoperíodo e temperatura do cultivo. Três ensaios independentes foram realizados e os mesmos foram validados quando, no seu término, a porcentagem de organismos imóveis no controle negativo não ultrapassou 10%. O número de organismos imóveis em cada tratamento foi utilizado para calcular a concentração que causou efeito em 50% dos organismos (CE50-48 h).

2.2.3. Ensaio de toxicidade aguda em *Oreochromis niloticus*

Os peixes foram aclimatados durante sete dias em aquários individuais com capacidade de 10 L, com aeração constante, temperatura em 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h de luz/escuro e alimentados com ração granulada contendo 28% de proteína bruta (Laguna®, Lote 05EX180067109). Neste período, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia. Diariamente, foi realizada a sifonagem, para retirada de fezes e ração não consumida, e renovou-se 50% da água do aquário.

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados de acordo com os protocolos ABNT NBR 15088 (2016) e OECD 203 (1992). Nos experimentos, foram utilizados juvenis de *O. niloticus*, com peso médio de $1,0\pm 0,71$ g. Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três réplicas de dez animais cada. Em todos os experimentos, foram utilizados aquários de vidro e o período de exposição dos peixes foi de 96 h em sistema estático e sem alimentação dos animais durante o período de exposição aos produtos. A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos animais mortos.

Os animais foram expostos ao LCCt em ou nas concentrações entre 12 e 27 mg/L, LCCtSNa entre 200 e 275 mg/L e Emulsão entre 35 e 105 mg/L. Como controle negativo foi utilizado água desclorada e como controle solvente água desclorada+DMSO 1%. Os parâmetros da qualidade da água foram mantidos em temperatura a 26 ± 2 °C, oxigênio dissolvido $7,5\pm 0,5$ mg/L e

pH $7,5\pm 0,2$, medidos pela sonda multiparâmetro YSI Professional Plus (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, EUA). O número de mortalidade observada nos tratamentos foi utilizado para o cálculo da concentração letal média (CL50-96 h).

2.3. AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM *Allium cepa*

O ensaio de *A. cepa* foi realizado de acordo com Fiskejö (1988). Sementes de *A. cepa*, variedade Baia Periforme (Isla Sementes Ltda., Brasil), foram colocadas para germinação em papel germitest, a temperatura de 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 12:12 h claro/escuro. Para cada tratamento foram realizadas três repetições, utilizando 30 sementes por repetição. As sementes foram expostas por 96 h ao LCCt em concentrações entre 27,5 e 440 mg/L, LCCtSNa entre 165 e 2640 mg/L e Emulsão entre 192,5 e 3080 mg/L. Além dos controles negativo (Água MiliQ) e solvente (DMSO 1%), submetidos as mesmas condições.

As sementes germinadas foram contadas e os tamanhos das raízes foram medidos com auxílio de paquímetro digital (Digimess®). Posteriormente, as sementes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético). As lâminas foram preparadas conforme descrito por Caritá e Marin-Morales (2008), e coradas com reagente de *Schiff* baseado no método de Feulgen. Para cada tratamento foram preparadas 5 lâminas com meristemas apicais de raízes de *A. cepa*. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 400x. Foram contadas 1000 células de cada lâmina, totalizando 5000 células por tratamento. A contagem foi realizada com o auxílio do software Fiji com a ferramenta *CellCounter*.

Os efeitos fitotóxicos foram determinados a partir do índice de germinação (IG) e crescimento médio das raízes (CMR). O efeito citotóxico foi avaliado por meio do cálculo do índice mitótico (IM). Os efeitos genotóxicos foram avaliados pelo índice de alterações cromossômicas (IAC) considerando os diferentes tipos de alterações cromossômicas (C-metáfase, ponte cromossômica, brotamento nuclear, núcleo lobulado, anáfase multipolar, células poliplóides, células binucleadas e perda cromossômica) e pelo índice de mutagenicidade (IMT) avaliado pela presença de micronúcleo. Para calcular os índices foram utilizadas fórmulas de acordo com Francisco et al. (2018).

2.4. AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM *Oreochromis niloticus*

A avaliação dos efeitos genotóxicos dos produtos foi realizada utilizando juvenis de *O. niloticus*, com peso médio de $17\pm 10,17$ g. Para o ensaio foram utilizados oito animais por tratamento, com exposição de 72 h. Para o LCCt as concentrações testadas foram 6,36, 12,73 e 19,09 mg/L, para o LCCtSNa foram 62,57, 125,15 e 187,72 mg/L e para a Emulsão foram 10,36,

20,72 e 31,08 mg/L, essas concentrações correspondem, respectivamente, a 25, 50 e 75% do valor determinado da CL50-96 h dos três produtos. Como controle negativo para LCCtSNa foi utilizado água desclorada e para LCCt e Emulsão foi usado DMSO 1% , e controle positivo Ciclofosfamida (40mg/kg) por via parenteral. Para avaliação dos efeitos genotóxicos desses produtos foram aplicados o teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares e o ensaio do cometa.

O teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares seguiu o protocolo descrito por Schmid (1975) e Heddle et al. (1983) com adaptações. Após o período de exposição os animais foram retirados dos aquários individualmente e um corte na região caudal foi realizado para obtenção de sangue, lâminas de esfregaço sanguíneo dos eritrócitos dos peixes (n=8) foram preparadas em triplicata. Posteriormente, as lâminas foram secas, fixadas em etanol PA e hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 min. A coloração foi realizada utilizando reativo de *Schiff* e *Fast Green*.

A contagem das alterações nucleares e dos micronúcleos foi realizada em microscópio óptico Nikon (Eclipse, E200), no aumento de 1000X. Foram contadas 1000 células por lâmina, totalizando 3000 células por peixe. No índice de genotoxicidade (IG) foram observadas as alterações como invaginação nuclear, brotamento nuclear, picnose, célula binucleada e núcleo lobulado, e no índice de mutagenicidade (MN) foi observada a frequência de micronúcleo (Carrasco et al. 1990).

O ensaio do cometa seguiu metodologia proposta por Singht et al. (1988) com modificações. Através do corte realizado na nadadeira caudal para o teste do micronúcleo, foi coletada uma amostra de 3 µL de sangue de cada peixe (n=8), diluída em 100 µL de PBS, e posteriormente adicionada 40 µL dessa mistura em 240 µL de agarose *low-melting*.

Após homogeneização, foi adicionado 140 µL da suspensão de células em duplicatas de lâminas previamente cobertas com agarose 1,5%, sobre a qual foi colocada uma lamínula. As lâminas foram deixadas em refrigeração a 4°C durante 10 min., posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO) por 2 h. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em uma cuba de eletroforese contendo solução tampão alcalino (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH > 13) por 20 min para desnaturação.

Após este período, foi realizada a eletroforese a 37V e 300mA por 25 min. Ao término da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e imersas em tampão de neutralização (Tris 0.4M com pH 7,5). Após serem neutralizadas as lâminas foram fixadas em Etanol PA durante 10 min. Para visualização dos danos no DNA as células foram coradas com Brometo de Etídeo (2 mg/L) e observados 500 nucleóides de cada tratamento em microscópio de fluorescência no aumento de

400X. Para análise dos cometas foi utilizado o programa Lucia Comet Assay v. 7.02, sendo considerados os parâmetros: Porcentagem de DNA na Cauda (PC) e Tamanho da Cauda (TC).

2.5. AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE UTILIZANDO O ENSAIO *Salmonella*/microsoma

O potencial mutagênico do LCcT, LCcTSNa e Emulsão foi avaliado pelo ensaio de *Salmonella*/microsoma realizado pelo método de micro-suspensão (Kado et al. 1983). Foram utilizadas as linhagens de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA97a, TA98, TA100, TA1535 e TA102 na presença e ausência de sistema de ativação metabólica (fração S9, Moltax Molecular Toxicology Inc., USA).

Para o preparo do inóculo, suspensões bacterianas foram concentradas cinco vezes por centrifugação a 10.000 g por 10 min a 4 °C e resuspendidas em tampão fosfato de sódio 0,2 mM a fim de se obter uma concentração de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL. O LCcT foi dissolvido em DMSO a 5% e água MiliQ, o LCcTSNa e a emulsão em DMSO a 1% e água MiliQ e, posteriormente foram diluídos em água MiliQ para o preparo das concentrações, 2-2000 mg/placa.

Quando os produtos apresentaram citotoxicidade foram testadas duas doses adicionais, 0,5 e 1 mg/placa, a fim de encontrar doses sem o perfil citotóxico. Volumes de 50 µL de inóculo, 50 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 mM) ou 50 µL de fração S9 e 5 µL das concentrações dos produtos foram adicionados aos tubos, homogeneizados e pré-incubados por 90 min a 37 °C. Após incubação, 2 mL de top ágar [(0,6% (w/v) ágar, 0,6% (w/v) NaCl, 0,05 mM L-histidina, 0,5 % (w/v) D-biotina] foram adicionados à solução e os tubos foram homogeneizados e vertidos em placas de ágar mínimo glicosado (AMG) [1,5% (w/v) ágar-ágar, 0,02% (v/v) de solução Vogel-Boner 50X e 10% (v/v) de solução de glicose].

O número de colônias revertentes por placa *his+* foi mensurado após 66 h a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata. O mutágeno 2-aminoantraceno (2,5 µg/placa) foi utilizado como controle positivo nos ensaios com ativação metabólica. Nos ensaios sem ativação metabólica foi utilizado o mutágeno 4-nitro-o-phenylenediamine (10 µg/placa) para as linhagens TA97a e TA98, azida sódica (2,5 µg/placa) para TA100 e TA1535, e mitomicina C (0.5 µg/placa) para a linhagem TA102. Como controle negativo foi utilizado o diluente dos produtos.

2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados do teste de toxicidade com *P. subcapitata* foram analisados no software ICp (versão 2.0) (Norberg-King, 1993) para determinação da CI50-72 h. Os testes de toxicidade com *D. similis* e *O. niloticus* (CE50-48 h e CL50-96 h) foram analisados utilizando o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977), através do software JSPEAR. Os valores de

CI/E/L50 foram convertidos para Unidade Toxicológica (UT) (Costa et al. 2008), de acordo com a fórmula:

$$UT = \frac{100}{CI/E/L50}$$

Para avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos em *A. cepa* e *O. niloticus* as análises estatísticas foram realizadas através da plataforma R (R Development Core Team 2016). Os resultados obtidos dos ensaios com ambos os modelos biológicos não apresentaram normalidade no teste Shapiro-Wilk, desta maneira, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis com *posteriori* de Dunn, considerando um nível de significância de 0,05.

Os resultados do teste de AMES foram analisados pelo programa estatístico Salanal (Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, NC). A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada de acordo com a fórmula:

$$RM = \frac{\text{número de revertentes da amostra}}{\text{número de revertentes controle negativo}}$$

As amostras foram consideradas potencialmente mutagênicas quando apresentaram $RM \geq 2$ em pelo menos uma das concentrações testadas. As amostras com $RM < 2$ foram consideradas negativas e com $RM < 0,7$ citotóxicas.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação Ecotoxicológica em *P. subcapitata*, *D. similis* e *O. niloticus*

O LCCT foi o composto que apresentou maior toxicidade nos três organismos testados. O LCCTNa foi o menos tóxico para *P. subcapitata* e *O. niloticus*, e a Emulsão apresentou menor toxicidade para *D. similis* (Tabela 1). Não houve inibição de reprodução e/ou mortalidade nos controles negativos, de todos os ensaios (Meio Oligo+Água deionizada; Meio MS; Água desclorada), e solvente (DMSO 1%).

Tabela 1. Concentração inibitória (CI), efetiva (CE) e letal (CL) em valores de 50% (CI/E/L50) dos testes realizados nos diferentes organismos para determinação da toxicidade, com nível de confiança de 95%.

Organismo	Endpoint	LCCT (mg/L)	LCCTNa(mg/L)	EMULSÃO(mg/L)
<i>P. subcapitata</i>	CI ₅₀	0,33 (0,30-0,37)	7,10 (5,60-15,40)	2,10 (1,96-2,17)
<i>D. similis</i>	CE ₅₀	0,12 (0,09-0,15)	0,75 (0,64-0,89)	1,05(0,91-1,26)
<i>O. niloticus</i>	CL ₅₀	25,46 (23,63-27,42)	250,30 (242,24-258,62)	41,44 (39,06-43,89)

Os produtos foram classificados de acordo a normativa para risco ambiental de misturas químicas OECD ENV/JM/MONO 6 (2001), que considera Agudo I > Agudo II > Agudo III em relação à toxicidade. Nesse sentido, o LCCT foi classificado como Agudo I para *P. subcapitata* e *D. similis* e Agudo III para *O. niloticus*, o LCCTNa como Agudo II para *P. subcapitata*, Agudo I para

D. similis e Agudo III para *O. niloticus*, e a Emulsão como Agudo II para *P. subcapitata* e *D. similis* e Agudo III para *O. niloticus*. Sendo assim o peixe foi considerado o organismo menos sensível nos três produtos testados.

De acordo com a conversão dos resultados de CI/E/L50 para Unidade Toxicológica (UT) (Costa et al., 2008), foi possível observar que *D. similis* foi o organismo que apresentou maior sensibilidade aos três produtos avaliados, seguido de *P. subcapitata* e *O. niloticus* (Figura 1).

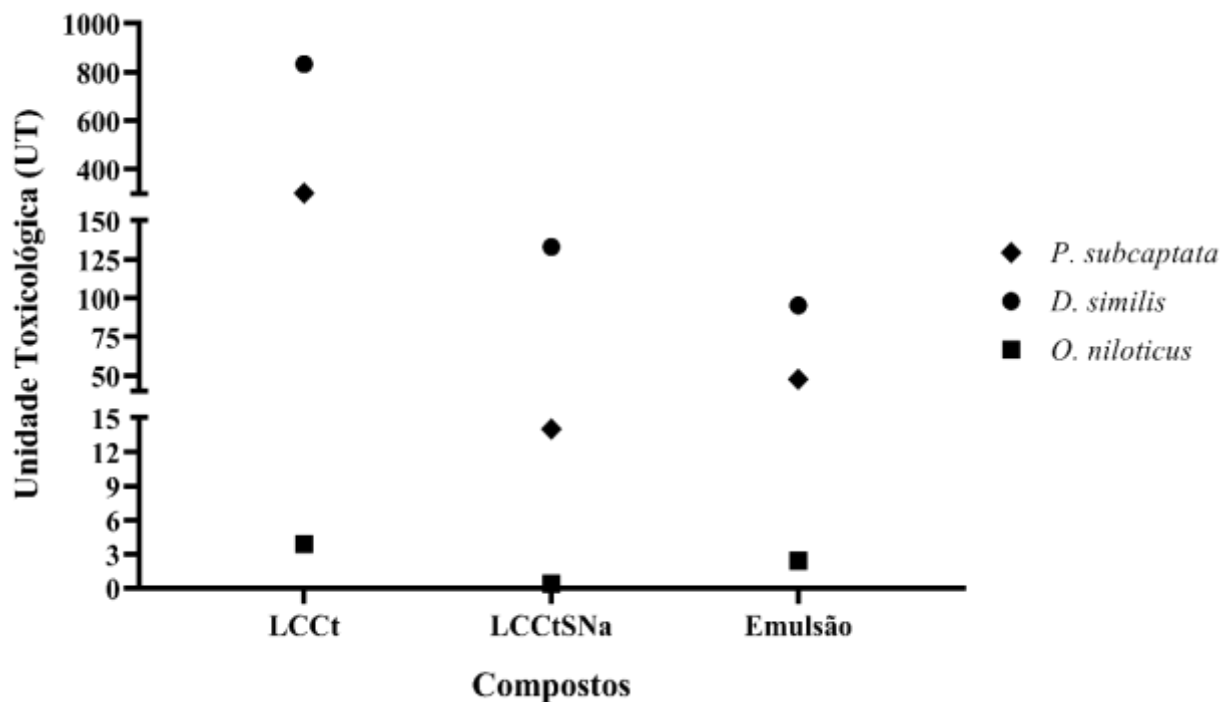


Figura 1. Unidade Toxicológica (UT) dos produtos LCCt, LCCtSNa e Emulsão em *P. subcapitata*, *D. similis* e *O. niloticus*.

3.2. Avaliação da fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa*

O LCCt apresentou fitotoxicidade e citotoxicidade, apenas nas concentrações de 220 e 440 mg/L para os parâmetros IG e IM, e para o parâmetro CMR foi observado efeito fitotóxico a partir da concentração de 55 mg/L (Tabela 2). O LCCtSNa não apresentou efeito fitotóxico e citotóxico, nas concentrações avaliadas, para nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 2). A Emulsão na concentração de 3080 mg.L⁻¹ apresentou diferença significativa para o IG quando comparada com controle negativo (p=0,006), entretanto, não foi observada fitotoxicidade e citotoxicidade nos parâmetros de CMR e IM em nenhuma das demais concentrações. O controle veículo (DMSO 1%), utilizado para solubilizar o LCCt e Emulsão, apresentou fitotoxicidade e citotoxicidade para os parâmetros IG e IM, quando comparados com o CN (Tabela 2).

Os produtos LCCt, LCCtSNa e Emulsão não apresentaram efeitos genotóxicos para *A. cepa* em relação ao índice de alterações cromossômicas (IAC) e índice de mutagenicidade (IMT)

em nenhuma das concentrações avaliadas ($p>0,05$) (Tabela 2). Foi observado efeito genotóxico no CV do LCCt e Emulsão para o parâmetro IAC (Tabela 2).

Tabela 2. Mediana e desvio interquartilico do índice de germinação (IG), comprimento médio das raízes (CMR), índice mitótico (IM), índice de alterações cromossômicas (IAC) e índice de mutagenicidade (IMT) observadas em sementes de *Allium cepa* expostas ao LCCt, LCCtSNa e emulsão.

Produtos	Concentração (mg/L)	Fitotoxicidade e Citotoxicidade			Genotoxicidade	
		IG (%)	CMR (mm)	IM (%)	IAC (%)	IMT (%)
LCCt	CN	46,67 10,00	6,08 0,53	98,33 0,95	0,10 0,05	0,00 0,00
	CV	10,00 3,33*	4,22 0,69	88,47 3,21*	0,49 0,10*	0,20 0,15
	27,5	16,67 11,67	4,42 0,57	95,44 1,64	0,10 0,10	0,00 0,05
	55	23,33 8,33	3,83 0,53*	95,64 3,12	0,10 0,10	0,00 0,05
	165	16,67 10,00	3,87 0,96*	96,79 0,83	0,20 0,14	0,30 0,33
	220	6,67 3,33*	3,32 0,22*	92,81 2,04*	0,09 0,05	0,00 0,05
	440	13,33 1,66*	2,52 0,73*	95,12 7,72*	0,00 0,05	0,00 0,05
LCCtSNa	CN	46,67 10,00	6,08 0,53	98,33 0,95	0,10 0,05	0,00 0,00
	165	30,00 6,66	8,13 1,73	93,00 0,98	0,20 0,34	0,00 0,39
	330	26,67 6,66	7,10 1,59	93,00 1,01	0,10 0,05	0,00 0,10
	990	30,00 8,33	5,98 1,24	93,00 0,82	0,20 0,19	0,20 0,09
	1320	50,00 11,66	7,10 2,24	93,72 1,41	0,59 0,15	0,30 0,29
	2640	36,67 10,00	6,83 1,20	94,26 1,09	0,57 0,24	0,10 0,10
EMULSÃO	CN	46,67 10,00	6,08 0,53	98,33 0,95	0,10 0,05	0,00 0,00
	CV	10,00 3,33*	4,22 0,69	88,47 3,21*	0,49 0,10*	0,20 0,15
	192,5	33,33 6,66	5,71 0,75	94,08 2,57	0,00 0,05	0,00 0,05
	385	40,00 10,00	6,14 0,68	95,76 1,04	0,18 0,10	0,10 0,09
	1155	36,67 6,66	6,11 0,34	94,87 1,55	0,00 0,10	0,00 0,05
	1540	30,00 6,66	6,16 1,13	96,54 0,48	0,20 0,05	0,10 0,05
	3080	20,00 6,67*	4,25 0,96	95,32 2,08	0,10 0,05	0,00 0,00

Medianas seguidas de asterisco (*) na coluna, para cada composto avaliado, apresentam diferença estatística quando comparadas com o controle negativo ($p<0,05$). CN – controle negativo; CV - controle veículo.

3.3. Avaliação da genotoxicidade em *O. niloticus*

No teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares e ensaio do cometa nenhum dos três produtos avaliados no estudo (LCCt, LCCtSNa e Emulsão) apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) dos seus respectivos controles negativos (DMSO 1% e água desclorada) (Tabela 3).

Tabela 3. Mediana e desvio interquartilico do índice de micronúcleo (MN), índice de genotoxicidade (IG), DNA presente na cauda (PD) e tamanho da cauda (TC) utilizados para avaliação da genotoxicidade em *Oreochromis niloticus* expostos ao LCCT, LCCTsNa e Emulsão.

Composto	Tratamentos (mg/L)	Alterações Cromossômicas		Degradação do DNA	
		MN	IG	PC (%)	TC (µm)
LCCT	CN ¹	0,00 0,00	1,79 1,66	38,53 1,91	18,37 0,44*
	CP	0,03 0,00*	6,86 0,61*	59,95 4,81*	45,22 1,23*
	6,36	0,00 0,00	1,26 0,17	33,19 0,73	15,65 1,07
	12,73	0,00 0,00	2,89 0,67	33,78 0,17	22,15 1,27
	19,09	0,00 0,00	2,82 1,49	37,02 2,51	22,52 1,32
LCCTsNa	CN ²	0,00 0,00	1,80 0,37	34,45 1,57	10,67 0,52
	CP	0,03 0,00*	6,86 0,61*	59,95 4,81*	45,22 1,23*
	62,53	0,00 0,00	2,50 0,67	48,80 2,45	18,75 1,45
	125,06	0,00 0,00	1,97 0,27	49,51 0,66	17,69 0,86
	187,59	0,00 0,00	3,05 0,38	40,55 0,98	18,25 1,85
Emulsão	CN ¹	0,00 0,00	1,79 1,66	38,53 1,91	18,37 0,44
	CP	0,03 0,00*	6,86 0,61*	59,95 4,81*	45,22 1,23*
	10,36	0,00 0,01	1,86 0,23	36,53 4,06	20,04 2,46
	20,72	0,00 0,01	2,18 0,03	27,23 0,79	19,81 1,02
	31,08	0,00 0,00	2,15 0,10	27,27 3,91	16,14 2,17

Medianas seguidas de asterísco (*) na coluna, para cada composto avaliado, apresentam diferença estatística quando comparadas com o controle negativo ($p < 0,05$). CN¹ – controle negativo (DMSO 1%); CN² – Controle negativo (água desclorada); CP – controle positivo

3.4. *Salmonella*/microsoma assay

Os produtos LCCT, LCCTsNa e Emulsão não apresentaram potencial mutagênico nas condições avaliadas (Tabela 4), uma vez que as doses não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), $RM > 2$ e uma relação de dose-resposta positiva. Porém, as linhagens TA97a, TA100, TA102 e TA1535 quando tratadas com as concentrações 20, 200 e 2000 mg/placa de LCCT indicaram citotoxicidade ($RM < 0,7$) devido o número de colônias revertentes induzidas ser inferior ao apresentado pelo controle negativo. No entanto, a linhagem TA98 apresentou citotoxicidade na dose de 2 mg/placa, deste modo foram testadas as concentrações de 0,5 e 1 mg/placa, sendo que neste caso o LCCT não apresentou citotoxicidade (Tabela 4).

Para o LCCTsNa foi evidenciada citotoxicidade nas linhagens TA100 e TA1535 nas concentrações de 200 e 2000 mg/placa. As linhagens TA97a, TA98 e TA102 também foram tratadas com doses menores, 0,5 e 1 mg/placa, para se obter doses sem perfil de citotoxicidade para o LCCTsNa (Tabela 4).

Para a Emulsão na ausência do sistema de metabolização exógena, a Emulsão (LCCT+LCCTsNa) apresentou potencial citotóxico para a linhagem TA97a nas concentrações de 200 e 2000 mg/placa e para a linhagem TA100 na concentração de 2000 mg/placa. Na presença da fração S9 também foi evidenciado potencial citotóxico nas maiores concentrações para as linhagens TA97a (200 e 2000 mg/placa) e TA1535.

Tabela 4. Atividade mutagênica expressa pela média de revertentes/placa e desvio padrão para linhagens TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535 de *Salmonella Typhimurium* para LCCT, LCCTsNa e a Emulsão na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica.

Produtos	Concentrações (mg/placa)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
LCCT	0,5	NT	NT			NT	NT	NT	NT	NT	NT
	1	NT	NT			NT	NT	NT	NT	NT	NT
	2										
	20										
	200										
	2000										
LCCTsNa	0,5					NT	NT			NT	NT
	1					NT	NT			NT	NT
	2										
	20										
	200										
	2000										
EMULSÃO	1										
	2										
	20										
	200										
	2000										

mg/placa- miligramas/placa; NT- Não Testadas.

Legenda: Citotóxico (RM<0,7) Negativo (RM<0,2)

4. DISCUSSÃO

O LC₅₀ foi o composto mais tóxico para todos os organismos avaliados nesse estudo, quando este foi sulfonado dando origem ao LC₅₀Na ocorreu a diminuição da sua toxicidade. Essa diminuição da toxicidade pode estar diretamente relacionada com a alteração/redução das insaturações da cauda apolar que o LC₅₀ possui, o que facilitava a permeabilização na membrana celular induzindo a toxicidade (Lomonaco et al. 2009; Paiva et al. 2017). A Emulsão apresentou efeito antagônico de toxicidade (Costa et al. 2008), uma vez que a soma das UT dos produtos isolados (LC₅₀ e LC₅₀Na), para os três organismos avaliados, são maiores que a toxicidade da mistura (Emulsão).

Devido a sua multifuncionalidade (surfactante e atividade biológica) a Emulsão foi proposta por Jorge et al. 2019 como a melhor alternativa para o combate do *A. aegypti* e não seus constituintes isolados (LC₅₀ e LC₅₀Na). Dentre os larvicidas comercializados, destacam-se o Diflubenzuron (Grupo Benzoiluréias), Piriproxifem (Grupo Éter Piridiloxipropílico) e Temefós (Grupo Organofosforado) que são recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para combate de mosquitos vetores, como o *A. aegypti* (WHO, 2012). De acordo com os resultados foi observado que a Emulsão apresentou CI₅₀-72 h de 2,10 mg/L para a espécie de alga verde *P. subcaptata*. Na literatura são escassos estudos que avaliam a toxicidade de larvicidas comercializados em espécies de algas. Entretanto, no estudo realizado por Jonsson et al. (2015) com *P. subcaptata* foi observada CI₅₀-168 h de 58,90 mg/L para a forma comercial do larvicida Diflubenzuron (Dimilin®), que é composto por 25% de princípio ativo e 75% de excipientes inertes. Porém, mesmo com o valor da CI₅₀ do Diflubenzuron (Dimilin®) sendo maior que a observada para a Emulsão, não é possível afirmar que o larvicida recomendado pela OMS é menos tóxico, uma vez que as condições experimentais dos estudos apresentam diferenças metodológicas.

O organismo mais sensível para a Emulsão foi *D. similis* com CE₅₀-48 h de 1,05 mg/L, apresentando menor toxicidade que o Piriproxifem (Vieira Santos et al. 2017), Temefós e Diflubenzuron (Abe et al. 2014), ambos estudos utilizaram *Daphnia magna* como organismo teste. Dessa maneira, a Emulsão pode ser considerada menos tóxica para espécies do gênero *Daphnia* que os larvicidas recomendados pela OMS.

Os peixes foram os organismos menos sensíveis do estudo, para a Emulsão foi observada CL₅₀-96 h 41,44 mg/L, sendo classificado como agudo III de acordo com a OECD ENV/JM/MONO 6 (2001). Quando comparada com estudos presentes na literatura, utilizando diferentes espécies de peixes, a Emulsão apresenta menor toxicidade que larvicidas comercializados, como por exemplo, do grupo Benzoiluréias, que agem como inibidores da síntese de quitina (Medeiros et al. 2013; Souza et al. 2011); Organofosforado, que atuam inibindo a Acetilcolinesterase (AChE) (Zhang et al.

2010; Singh et al. 2018); e Éter Piridiloxipropílico, que possuem como mecanismo de ação a inibição do desenvolvimento de características adultas (Caixeta et al. 2016). Os larvicidas Temefós e Diflubenzuron apresentaram CL50-48 h de 7,11 e 10,04 mg/L, respectivamente, para *O. niloticus* (Abe et al. 2019) sendo classificados como agudo II, podendo ser considerados mais tóxicos quando comparados com a Emulsão para mesma espécie de peixe. Nesse mesmo trabalho também foi avaliada a toxicidade aguda desses larvicidas para a espécie *Hyphessobrycon eques*, obtendo valores de CL50-48 h 7,30 mg/L para Temefós e 10,91 mg/L para Diflubenzuron, apresentando valores aproximados de toxicidade aguda para ambas as espécies de peixes analisadas, indicando assim que a Emulsão apresenta menor toxicidade que os larvicidas recomendado pela OMS.

Na avaliação da fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa* foi observado que o composto LCCT, para os parâmetros IG e IM, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com CN a partir da concentração de 220 mg/L, esses resultados corroboram com os de Leite et al. (2015) que observaram, em bulbos de *A. cepa*, que não houve fitotoxicidade e citotoxicidade na maior concentração avaliada de 69,5 mg/L. O LCCTsNa não apresentou fitotoxicidade em nenhuma das concentrações, esse fato pode ser explicado pelo processo de sulfonação, que também diminuiu a toxicidade para os outros organismos avaliados no presente estudo. A Emulsão apresentou efeito fitotóxico apenas na maior concentração (3080 mg/L, sendo 440 mg/L de LCCT e 2640 mg/L de LCCTsNa) para o parâmetro IG, haja vista que a Emulsão (1:6) é composta na proporção de 1 parte de LCCT para 6 partes de LCCTsNa, foi observado um efeito antagônico uma vez que o LCCT isolado apresenta fitotoxicidade e citotoxicidade em concentrações a partir de 220 mg/L.

Na avaliação da genotoxicidade em *A. cepa* os produtos LCCT, LCCTsNa e Emulsão não apresentaram efeito genotóxico, para os para os parâmetros IAC e IMT, em nenhuma das concentrações avaliadas. No estudo realizado por Karaismailoğlu (2016) que também avaliou células meristemáticas de *A. cepa* observou-se que o larvicida Piriproximem apresenta efeitos genotóxicos para o IAC a partir da concentração de 0,25 mg/L em 36 h de exposição e para o IMT a partir de 0,5 mg/L em 12 h de exposição. Dessa maneira, a proposta de utilizar a Emulsão como uma alternativa larvicida para o combate do vetor *A. aegypti* apresenta-se mais segura nesse organismo modelo.

O LCCT, LCCTsNa e a Emulsão não apresentaram genotoxicidade em eritrócitos de *O. niloticus* para os parâmetros de alterações nucleares e degradação do DNA em nenhuma das concentrações testadas. Dessa maneira, a Emulsão proposta como larvicida é segura quando comparado com o larvicida comercial Diflubenzuron (Dimilin®) que em trabalho realizado por Benze et al. (2014) observaram genotoxicidade para a espécie *Prochilodus lineatus* na concentração de 0,12 mg/L em análise de alterações nucleares e de 0,25 mg/L para o MN. Já em estudos realizados por Maharajan et al., 2018 utilizando outro larvicida recomendado pela OMS

(Piriproxifen), observaram efeito genotóxico pelo ensaio do cometa em embriões de *Danio rerio* com 96 hpf (horas pós fecundação).

O ensaio *Salmonella*/microsossoma é um dos testes mais utilizados na detecção do potencial mutagênico de novos produtos em virtude da sua sensibilidade e poder preditivo em relação a testes de carcinogenicidade em roedores, e por isso tem sido considerado o padrão ouro da Genética Toxicológica para avaliar mutágenos químicos (Escobar et al. 2013). Neste sentido, verificamos que por essa técnica, nenhum dos três produtos avaliados (LCCt, LCCtSNa e Emulsão) apresentaram potencial mutagênico nas linhagens avaliadas. Resultados similares a esses foram descritos por Aiub et al. (2002) que não observaram potencial mutagênico para o larvicida temefós nas mesmas linhagens (TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535) do nosso estudo. Porém, para as linhagens TA98NR, TA1535, YG7104 e YG7108 de *S. Typhimurium* o temefós foi mutagênico em concentrações semelhantes às aplicadas nos reservatórios de água para o combate de *A. aegypti*.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que apesar da Emulsão ter mostrado toxicidade para organismos não alvo *P. subcaptata*, *D. similis*, *O. niloticus* e *A. cepa* em concentrações abaixo da CL50 obtida para o efeito larvicida, é pouco provável que sejam encontradas concentrações tóxicas deste produto no meio ambiente devido à sua dispersão, diluição e degradação ambiental. Além disso, a Emulsão pode ser considerada menos tóxica que os demais larvicidas recomendados pela OMS nas espécies avaliadas.

Outra característica positiva do uso da Emulsão como larvicida é que a mesma não apresentou atividade genotóxica (*A. cepa* e *O. niloticus*) e/ou mutagênica (*Salmonella* microsossoma) para os organismos testados. Esses dados são imprescindíveis para que esse novo produto possa ser registrado e utilizado no Brasil. Dessa maneira, a Emulsão é um produto eficaz no controle das larvas e apresenta multifuncionalidade, podendo ser considerada uma nova estratégia para controle de vetores como o *A. aegypti*.

6. REFERÊNCIAS

- Abe, F. R. et al., 2014. Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). J. Toxicol. Environ. Health, Part A. 77, 37-45.
- Abe, F. R. et al., 2019. Toxicity of Diflubenzuron and Temephos on Freshwater Fishes: Ecotoxicological Assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. Water, Air, Soil Poll. 230, 77.
- Aiub, C. A. F. et al., 2002. Genotoxic evaluation of the organophosphorus pesticide temephos. Genet. Mol. Res. 1, 159-166.
- Bellinato, D. F. et al., 2016. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. Biomed Res. Int. 2016.

- Benze, T. P. et al., 2016. Subchronic exposure to diflubenzuron causes health disorders in neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol.* 31, 533-542.
- Bernstein, L. et al., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.* 97, 267-281.
- Bhatt, S. et al., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496, 504.
- Buratini, S. V. et al., 2004. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. *Bull Environ Contam Toxicol.* 73, 878-882.
- Caixeta, E. S., et al., 2016. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under environmentally realistic exposure conditions of integrated vector management for *Aedes aegypti* control in Brazil. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A.* 79, 799-803.
- Campos-Garcia, J. et al., 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 131-137.
- Caritá, R.; Marin-Morales, M. A. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere.* 72, 722-725.
- Carrasco, K. R. et al., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 47, 2123-2136.
- Carvalho, M. do S. L. et al., 2004. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev. Saúde Públ.* 38, 623-629.
- Costa, C. R. et al., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quím. Nova.* 31, 1820-1830.
- Escobar, P. A. et al., 2013. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutat. Res./Rev. Mutat.* 752, 99-118.
- Fiskesjö, G., 1988. The *Allium* test—an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* 197, 243-260.
- Francisco, L. F. V. et al., 2018. Cytotoxicity, Genotoxicity and Mutagenicity of Aluminum, Manganese and Lead in Meristematic Cells of Root *Allium cepa*. *Orbital: Electron. J. Chem.* 10, 60-65.
- Halstead, S. B., 2008. Dengue virus–mosquito interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 273-291.
- Hamilton, M. A. et al., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714-719.
- Heddle, J. A. et al., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.-Rev. Mutat.* 123, 61-118.
- Iqbal, M. et al., 2017. Mutagenicity and cytotoxicity evaluation of photo-catalytically treated petroleum refinery wastewater using an array of bioassays. *Chemosphere.* 168, 590-598.
- Jonsson, C. M. et al., 2015 Prediction of a low-risk concentration of diflubenzuron to aquatic organisms and evaluation of clay and gravel in reducing the toxicity Pan-Am. *J. Aquat. Sci.* 10, 259-272.
- Jorge, M. R. et al., 2017. Processo para síntese de surfactantes de LCC técnico, emulsões inseticidas e derivados de LCC para controle populacional do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e insetos de ciclo reprodutivo similar e/ou susceptíveis. BR 10 2017 027264 8. Patente: Privilégio de

Inovação. Número de registro: BR1020170272648. Instituto de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Brasil.

Jorge, M. R., 2018. Síntese, caracterização e aplicação de sulfonatos e emulsões de LCC técnico e cardanol para controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade da Grande Dourados (UFGD).

Kado, N. Y. et al., 1983. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res. Lett.* 121, 25-32.

Karaismailoğlu, M. C., 2016. The evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of pyriproxyfen insecticide on *Allium cepa* somatic chromosomes with mitotic activity, chromosome abnormality and micronucleus frequency. *Turk. J. Life Sci.* 1, 65-69.

Leite, A. de S. et al., 2015. 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 Res. Int.* 2015:626835.

Lima, E. P., et al., 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temephos em municípios do estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 250-263.

Lomonaco, D., et al., 2009. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chem.* 11, 31-33.

Maharajan, K., et al., 2018. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): a multi biomarker study. *Aquat. Toxicol.* 196, 132-145.

Medeiros, L. S. et al., 2013. Acute toxicity and environmental risk of teflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment. *J. Environ. Sci. Health, Part. B.* 48, 600–606.

Mustafa, Y.; Suna Arikan, E. 2008. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia.* 61, 45-52.

Norberg-King, T. J., 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report. 39, 3-93.

OECD 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OECD 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OECD 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OECD ENV/JM/MONO 6, 2001. Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment, Number 33.

Ohe T.; Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res.* 567, 109-149.

Paiva, D. R. et al., 2017. A potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 89, 373–382.

Patterson, J., et al., 2016. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. *West. J. Emerg. Med.* 17, 671–679.

R Core Team, 2016. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna. [http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org).

- Satyavani, G., et al., 2012. Toxicity assessment of expired pesticides to green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. ISRN toxicol. 2012.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. Mutation Res. 31, 9-15.
- Singh N. P. et al., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175, 184-191.
- Singh, S. et al., 2018. Evaluation of acute toxicity of triazophos and deltamethrin and their inhibitory effect on AChE activity in *Channa punctatus*. Toxicol Reports. 5, 85- 89.
- Souza, J. P. et al., 2011. Acute toxicity and environmental risk of diflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment. Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambiente. 21, 1-12.
- Vieira Santos, V. S. et al., 2017. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. J. Toxicol. Environ. Health, Part A. 80, 155-160.
- WHO - World Health Organization, 2012. Guidelines for testing, insecticide resistance and application of larvicidas. Geneva. https://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicidas_Sept_2012.pdf.
- WHO - World Health Organization, 2018. Dengue control. Epidemiology. Geneva. <https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>.
- Wilder-Smith, A. et al., 2017. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. Lancet Infect Dis. 17, e101-e106.
- Zara, A. L. de S. A., et al., 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidemiol. Serv. Saúde. 25, 391-404.
- Zhang, Z. Y. et al., 2010. Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. Pest Manag. Sci. 66, 84-89.