

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

Trabalho de conclusão de curso apresentado no formato de artigo e nas normas da revista
Ecotoxicology

**Avaliação Ecotoxicogenética do Tensoativo do Líquido da Casca da Castanha do Caju
(TaLCC-20) proposto como larvicida para controle do *Aedes aegypti***

Milena Perez de Melo

**DOURADOS/MS
2019**

MILENA PEREZ DE MELO

**Avaliação Ecotoxicogenética do Tensoativo do Líquido da Casca da Castanha do Caju
(TaLCC-20) proposto como larvicida para controle do *Aedes aegypti***

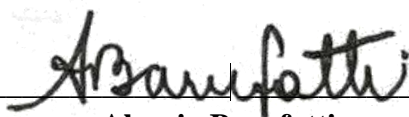
Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Aprovado em: 29/11/2019

BANCA EXAMINADORA



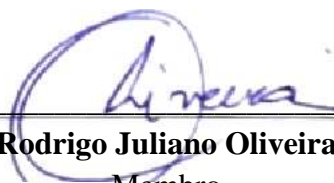
Bruno do Amaral Crispim
Presidente



Alexeia Barufatti
Membro



Fábio Kummrow
Membro



Rodrigo Juliano Oliveira
Membro

Agradecimentos

Nossa, muita gente para agradecer. Que bom!

Começo pela minha família, meu pai, meus queridos irmãos e principalmente minha mãe que mesmo distante fisicamente está sempre me apoiando e torcendo para que tudo ocorra bem. Se hoje eu alcancei algum mérito foi graças a educação e estudos que vocês me proporcionaram com tanto esforço.

Um obrigado especial ao meu orientador Professor Dr. Bruno do A. Crispim, muito mais que o orientador: amigo e parceiro, pela paciência, força de vontade, orientação valiosa, incentivo, presença constante, e acima de tudo pela amizade sincera. São muitos agradecimentos para você meu amigo, contribuindo não apenas para meu crescimento acadêmico, mas também pessoal, obrigada de coração.

A querida Professora Dr. Alexeia Barufatti, pelo conhecimento, incentivo, carinho, risadas e pela participação vital na minha formação como pesquisadora e também como pessoa.

Agradeço meus companheiros do LECOGEN: Felipe M. Merey, Héliana dos S. Nascimento, Luiza V. Francisco, Nathalya Alice de Lima, Sabrina R. da Luz, Marina Schibichewski e Ligia G. Germano. A interação cotidiana com vocês sempre foi e será muito importante para mim!

Ao Professor Dr. Rodrigo Juliano, pela oportunidade de participar desse trabalho e conhecimento compartilhado.

Aos membros da banca, Alexeia Barufatti, Fábio Kummrow e Rodrigo Juliano pela disponibilidade de tempo e atenção para realizar a leitura e correções/sugestões no documento.

Aos meus queridos amigos, Felipe M. Merey, Amanda B. Barbosa, Emanuely C. Ventura, Mateus P. da Silva, Sarah Grazia, Hemyly Karla, Thália Juliana, Tiago Ferreira e Maria Juanna. Vocês com certeza foram fundamentais durante esses 4 anos, obrigada por todos os momentos juntos, pela amizade incrível e pelo incentivo, amo vocês.

A Deus por guia-me sempre para o melhor caminho, por presentear-me sempre com essas pessoas maravilhosas em minha jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Avaliação Ecotoxicogenética do Tensoativo do Líquido da Casca da Castanha do Caju (TaLCC-20) proposto como larvicida para controle do *Aedes aegypti*

Milena Perez de Melo ¹(milenabio16@gmail.com).

¹ Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas, MS, Brasil.

Resumo

Febre amarela, dengue, chikungunya e zika são doenças transmitidas por mosquitos, como o *Aedes aegypti*. O produto com propriedade tensoativa composto pelo Líquido da Casca da Castanha do Caju e óleo de mamona (TaLCC-20) tem um efeito larvicida comprovado para *Ae. aegypti* na concentração de 5 mg/L. No entanto, além de provar sua eficiência, é necessário avaliar a segurança ambiental do produto. Nesse contexto, o objetivo foi avaliar o potencial ecotoxicológico e genotóxico do TaLCC-20 usando organismos de diferentes níveis tróficos. A espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* apresentou uma CI50-72h de 0,0013 mg/L, sendo classificada como categoria de risco nível Agudo I, a toxicidade para *D. similis* foi classificada como categoria de risco Agudo II apresentando uma EC50-48h de 2,00 mg/L, e para *O. niloticus*, CL50-96h de 15,69 mg/L categoria nível Agudo III. O TaLCC-20 apresentou efeito genotóxico para ambas as metodologias aplicadas (teste de micronúcleo/alterações nucleares e ensaio do cometa) apenas na maior concentração (7,5 mg/L). Baseado nesses resultados comprovamos baixa toxicidade para os três organismos estudados em comparação ao larvicidas recomendados pela OMS, ausência de micronúcleo e genotoxicidade em concentração inferior à de uso, além de apresentar eficiente toxicidade ao mosquito *Ae. aegypti* e consequentemente menor dano ao meio ambiente.

Palavras-chave: seguridade ambiental, micronúcleo, ecotoxicologia, ensaio do cometa, óleo de mamona.

Abstract

Yellow fever, dengue fever, chikungunya and zika are mosquito-borne diseases such as *Aedes aegypti*. The surfactant product composed of Cashew Nut Shell Liquid with castor oil (TaLCC-20) has a proven larvicidal effect for *Ae. aegypti* at a concentration of 5 mg/L. However, in addition to proving its efficiency, it is necessary to evaluate the environmental safety of the product. In this context, the objective was to evaluate the ecotoxicological and genotoxic potential of TaLCC-20 using organisms of different trophic levels. The species *Pseudokirchneriella subcapitata* had an IC50-72h of 0.0013 mg/L and was classified as an acute level risk category I. Toxicity to *D. similis* was classified as an acute category II presenting an EC50-48h of 2.00. mg/L, and for *O. niloticus* LC50-96h of 15.69 mg/L acute level category III. TaLCC-20 showed genotoxic effect for both applied methodologies (micronucleus/nuclear alteration test and comet assay) only at the highest concentration (7.5 mg/L). Based on these results we found low toxicity for the three organisms studied compared to WHO recommended larvicides, absence of micronucleus and genotoxicity in lower concentration than the one in use, besides presenting efficient toxicity to *Ae aegypti* mosquito and consequently less damage to the environment.

Keywords: environmental safety, micronucleus, ecotoxicology, comet assay, castor oil.

Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* (Culicidae) apresenta impacto sobre a saúde humana, e recebe atenção a nível mundial, uma vez que essa espécie é o principal vetor de doenças virais, como a febre amarela, dengue, chikungunya e zika (Custódio et al. 2019). A alta incidência desse vetor ocorre principalmente na área urbana devido ao crescente processo de urbanização, bem como às condições climáticas e sociais, favorecendo sua rápida disseminação (Busato et al. 2014). O *Ae. aegypti* é endêmico em mais de 100 países acometendo cerca de 50 a 100 milhões de pessoas em todo o mundo anualmente (WHO, 2005).

O controle químico é a principal estratégia utilizada para o combate deste vetor, baseando-se na aplicação de inseticidas e larvicidas. Apesar do controle químico ser eficiente por apresentar potencial tóxico para os mosquitos, o uso constante destes produtos ocasiona resistência do inseto (Ricoldi, Figueiredo e Desidério, 2018; Harburguer et al. 2018) necessitando assim de uma maior concentração para chegar ao efeito esperado, que conseqüentemente, provoca aumento da poluição ambiental que pode acarretar maior dano para organismos não alvo.

A resistência do mosquito, juntamente com a necessidade de buscar medidas de controle menos ou não tóxicos ao homem e ao meio ambiente, tem estimulado a busca por técnicas alternativas para o controle do inseto (Paiva et al. 2017; Iqbal et al. 2018). Diversos estudos têm sido desenvolvidos buscando inseticidas e/ou larvicidas naturais, a base de princípios ativos vegetais que pela complexidade da composição, diminuem o risco de resistência (Pandiyani, Mathew e Munusamy, 2019; Vani et al. 2018; Morejón et al. 2018; Romano et al. 2018) e contribuem para a redução do impacto ao meio ambiente.

O Líquido da Casca de Castanha de Caju (LCC) constituído principalmente de compostos fenólicos (Sookyung et al. 2018) apresenta eficiente atividade larvicida comprovada em *Ae. aegypti* (Romano et al. 2018; Akpo et al. 2017). Desta maneira, o nosso grupo de pesquisa sintetizou o Tensoativo do Líquido da Casca da Castanha do Caju (TaLCC-20), um surfactante de sódio resultante da mistura do líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona (Beatriz et al. 2015). Esse produto apresenta atividade larvicida e não causa danos genéticos em Camundongos, podendo ser um importante produto a ser explorado como larvicida para controle do mosquito (Vani et al. 2018).

Devido à ausência de estudos a respeito da seguridade ambiental desse promissor larvicida, torna-se relevante a avaliação de possíveis efeitos ecotoxicológicos e genotóxicos deste produto em organismos não alvos de diferentes níveis tróficos.

Os estudos de toxicidade são utilizados para estimar efeitos adversos de substâncias químicas sobre os organismos vivos, com a finalidade de identificar os riscos

relacionados à exposição de xenobióticos. Entre as técnicas para detectar efeitos genotóxicos ocasionados pelo aparecimento de lesões no DNA, o teste de micronúcleo/alterações nucleares e o ensaio do cometa são frequentemente utilizados, por serem relativamente simples, confiáveis e sensíveis permitindo uma rápida avaliação da integridade genômica dos organismos avaliados (Hussain et al. 2018; Zeng et al. 2019; Brina et al. 2018). Considerando a atividade larvicida comprovada do TaLCC-20, como uma nova estratégia para o controle do *Ae. aegypti*, o objetivo desse estudo foi avaliar a seguridade ambiental utilizando ensaios ecotoxicológicos e genotóxicos em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos.

Material e Métodos

Químico

Para a realização dos ensaios, foi utilizado Tensoativo do Líquido da Casca da Castanha do Caju (TaLCC-20) resultante da mistura do líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona desenvolvido por Beatriz et al. (2015).

Ensaio Ecotoxicogenético

Toxicidade crônica em *Pseudokirchneriella subcapitata*

Os ensaios foram realizados com a alga *P. subcapitata* de acordo com as NBR 12648 (ABNT, 2011) e OECD 201 (2011). As pré-culturas foram preparadas pela inoculação de 100 mL de meio oligo esterilizado em Erlenmeyers de 150 mL contendo algas por 72 h para obtenção de um pré inóculo.

A toxicidade foi avaliada pela inibição do crescimento da biomassa algácea determinados pela exposição de células de algas, em fase exponencial de crescimento, numa concentração inicial de 1×10^5 células/mL. O TaLCC-20 foi avaliado nas concentrações de 0,00005; 0,0005; 0,005; 0,01 e 0,05 mg/L, como controle negativo (CN) foi utilizada água deionizada autoclavada. Os testes foram realizados sob condições controladas, luminosidade a 4500 lux, temperatura a 25 ± 2 °C e agitação a 160 rpm por um período de 72 h. A biomassa foi calculada utilizando os dados de contagem realizado em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em concentração de inibição 50% (CI50-72 h), que corresponde à concentração que causa 50% de inibição no crescimento das algas com relação ao controle.

Toxicidade aguda em *Daphnia similis*

O cultivo de *D. similis* foi realizado em meio MS (ABNT NBR 12.713, 2016a e OECD 202, 2004), em condições de dureza 40 a 48 mg CaCO₃/L, condutividade 200 ± 20 µS/cm, temperatura a 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 16:8 h claro/escuro e pH entre 7,0 a 7,6.

Os testes de toxicidade aguda em *D. similis*, foram realizados de acordo com NBR 12.713 (ABNT, 2016) e OECD 202 (2004) foram realizados em quadruplicata. Em cada réplica foram utilizados cinco neonatos (n=20) de até 24 h de idade. Os ensaios foram realizados em tubos de 10 mL contendo as respectivas diluições de TaLCC-20 (0,40, 0,80, 1,50, 3,00 e 6,00 mg/L) e controle negativo (meio MS), os organismos permaneceram sem alimentação e aeração e sob as mesmas condições de fotoperíodo e temperatura do cultivo. A imobilização foi determinada visualmente após 48h de exposição para realização do cálculo da CE50-48h.

Ensaio com *Oreochromis niloticus*

Os peixes, foram aclimatados durante sete dias em aquários individuais com capacidade de 10 L, mantidos sob condições ideais de temperatura 26 ± 2 °C, oxigênio dissolvido $7,5\pm 0,5$ mg/L⁻¹, pH $7,5\pm 0,2$ e fotoperíodo de 12:12 h claro/escuro, alimentados diariamente duas vezes ao dia com ração comercial granulada com 28% de proteína bruta (Laguna®, Lote 05EX180067109).

Toxicidade Aguda

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados de acordo com ABNT NBR 15088 (2016b) e OECD 203 (1992). Após o período de aclimação, juvenis de *O. niloticus* (peso médio de $1,1\pm 0,59$ g) foram distribuídos em aquários e expostos a diferentes concentrações de TaLCC-20 (10, 12,5, 15, 18, 25 mg/L) e ao CN (água) por um período de 96 h. O experimento foi realizado em triplicata sendo 5 peixes por aquário (n=15). A mortalidade observada foi utilizada para o cálculo da Concentração Letal média para 50% dos organismos expostos (CL50-96h).

Genotoxicidade

Para a realização do teste de genotoxicidade, os peixes (n=6 por tratamento) foram expostos ao TaLCC-20 nas concentrações de 1,5, 3,8 e 7,5 mg/L que correspondem a 10; 25 e 50% da CL50-96h definidas anteriormente no teste de toxicidade aguda, e os controles negativo (água) e positivo (Ciclofosfamida - 40 mg/kg). Após o período de exposição de 72 h os animais foram anestesiados para coleta de sangue através do corte da nadadeira caudal destinada ao teste de micronúcleo/alterações nucleares e ensaio do cometa.

Teste de micronúcleos/alterações nucleares

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia utilizada por Schmid (1975) Sangue periférico de 6 peixes, por tratamento, foi coletado e utilizado para confecção das lâminas (triplicata) utilizando a técnica do esfregaço. Posteriormente, as lâminas foram secas, fixadas em etanol PA e coradas com Panótico rápido (NEWPROV). Foram

analisados 1000 eritrócitos por lâmina, totalizando 3000 células por tratamento, para determinação das frequências de células com micronúcleos (MCN) e alterações nucleares (AN).

Ensaio cometa

O ensaio do cometa foi realizado seguindo a metodologia utilizada por Ventura (2004). Foram coletados 6 µL de sangue por punção branquial e diluídos em 200 µL de solução Tampão PBS (tampão fosfato salina). As lâminas foram confeccionadas em triplicata para cada peixe utilizando 20 µL de suspensão celular em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (v/v) a 37 °C. Posteriormente as lâminas foram lisadas (1 mL Triton-X+10 mL DMSO+89 mL de solução lise estoque: NaCl PM 58,44; EDTA-Titriplex PM 372,24; Tris PM 157,59 E 445 mL de água ultrapura) por 2 h e desnaturadas (NaOH 0,3 mol L e EDTA 0,001 mol L (pH>13) por 20 minutos. Depois foram submetidas à eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 min. As lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L, fixadas em etanol PA e armazenadas a 4°C até o momento das contagens.

As lâminas foram coradas com brometo de etídeo (1,6 mg/mL) e 100 nucleóides por lâmina foram observados em microscópio de fluorescência (LABMED, Lx 400) na objetiva de 40x, posteriormente fotografados e analisados no programa *LUCIA comet assay* (LIM, Prague, CZ, v.7.02.00) utilizando os seguintes parâmetros, tamanho da cauda e porcentagem de DNA na cauda.

Análise de dados

Para análise de toxicidade, o software ICP (Norberg-king, 1993) foi utilizado para calcular a CI50 e o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber através do software JSPEAR para CE/CL50. Para a classificação da categoria de risco do TaLCC-20, utilizou-se a normativa OECD ENV/JM/MONO (2001) na qual é possível a classificação do nível de toxicidade de produtos químicos e/ou misturas. Para o presente estudo utilizou-se a classificação de misturas como “perigosos para os organismos aquáticos” especificada em categorias de agudas I a III, na qual I é a categoria de toxicidade mais alta, a classificação é definida com base nos valores de toxicidade aguda (CI50, CE50 e CL50). De acordo com Costa et al. (2008) quanto menor os valores numéricos da toxicidade maior é o efeito tóxico de um composto. E para representar esses resultados de forma direta com a toxicidade realizou-se a conversão dos valores (CI50, CE50 e CL50) em unidades tóxicas (UT), de acordo com a fórmula:

$$UT = \frac{100}{\text{Valor de Toxicidade (CI/CE/CL50)}}$$

Portanto, quanto maior o valor de UT, maior será a toxicidade da amostra.

Para comparação do ensaio genotoxicidade através do teste de micronúcleo/alterações nucleares e ensaio do cometa foram aplicados uma análise de variância não paramétrico de Kruskal-Wallis com *posteriori de Dunn* ($p \leq 0,05$), utilizando a plataforma R (R Core Team, 2019).

Resultados

Toxicidade aguda em *P. subcapitata*, *D. similis* e *O. niloticus*

Para *P. subcapitata* a concentração de 0,05 mg/L apresentou uma redução de 96,3 % do crescimento algácea em comparação ao CN, valor este muito superior às demais, na qual apresentaram uma variação de 32,4 a 61,3% (0,00005 - 0,01 mg/L) de inibição do crescimento. Já para *D. similis* as concentrações de 0,80 e 1,50 mg/L apresentaram 36% de mortalidade e na maior concentração (6,0 mg/L) foi observada 100% de morte. Para *O. niloticus* só foi constatado morte a partir da concentração de 15 mg/L (Tabela 1).

Tabela 1. Toxicidade de TaLCC-20 em *P. subcapitata*, *D. similis* e *O. niloticus* expressa pela média de mortalidade e inibição do crescimento.

<i>P. subcapitata</i>		<i>D. similis</i>		<i>O. niloticus</i>	
Tratamento	Crescimento algácea (72 h)	Tratamento	Mortalidade (48 h)	Tratamento	Mortalidade (96 h)
CN	405	CN	0/20	CN	0/15
0,00005	274	0,40	2/20	10	0/15
0,0005	204	0,80	7/20	12,5	0/15
0,005	194	1,50	7/20	15	7/15
0,01	157	3,0	9/20	18	13/15
0,05	15	6,0	20/20	25	15/15

A espécie *P. subcapitata* apresentou uma CI50-72h de 0,0013 mg/L (Tabela 2), sendo classificada como categoria de risco nível Agudo I (≤ 1 mg/L), a toxicidade em *D. similis* foi classificada como categoria de risco Agudo II ($>1 \leq 10$ mg/L) apresentando uma EC50-48h de 2,00 mg/L, e para *O. niloticus*, CL50-96h de 15,69 mg/L categoria nível Agudo III ($>10 \leq 100$ mg/L).

Tabela 2. Parâmetros ecotoxicológicos e intervalos de confiança - concentração inibitória (IC), concentração efetiva (CE) concentração letal (CL) obtidos a partir de testes agudos após a exposição de TaLCC-20 nas espécies, *P. subcapitata*, *D. similis* e *O. niloticus*.

Táxon	Espécie	Endpoint	Tempo de exposição	TaLCC-20 mg/L
Alga	<i>P. subcapitata</i>	CI ₅₀	72h	0,0013 (0,0003 - 0,0085)
Crustáceo	<i>D. similis</i>	CE ₅₀	48h	2,00 (1,53 - 2,63)
Peixe	<i>O. niloticus</i>	CL ₅₀	96h	15,69 (14,62 - 16,84)

De acordo com os resultados obtidos pela unidade tóxica (UT) o TaLCC-20 é mais tóxico para *P. subcapitata* do que para os outros organismos, atingindo um UT de 76,9, seguido por *D. similis* com 50 e *O. niloticus* com 6,37 (Figura 1).

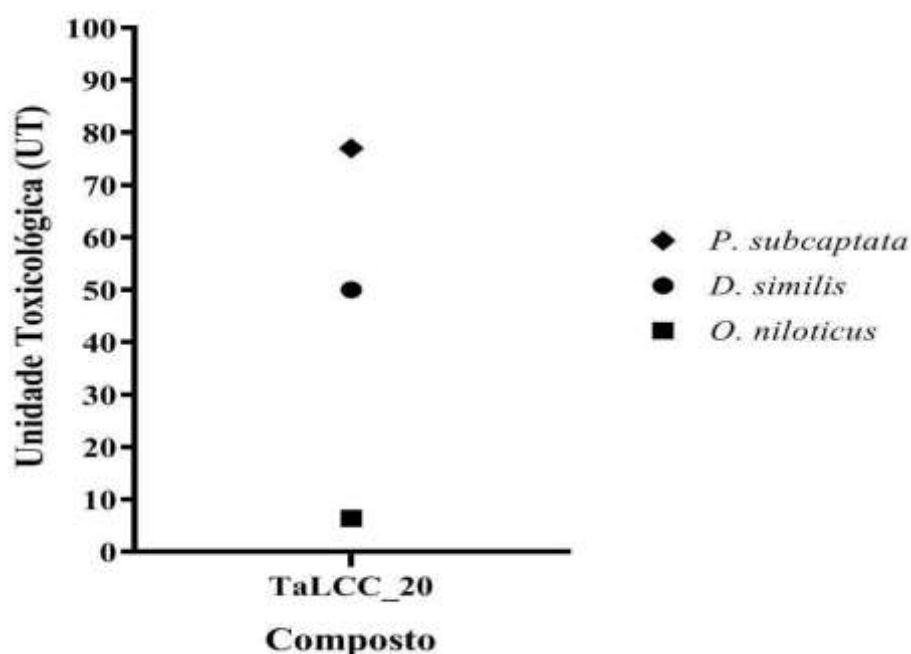


Figura 1. Toxicidade de TaLCC-20 em *P. subcapitata*, *D. similis* e *O. niloticus* expresso em unidades tóxicas (UT).

Ensaio de genotoxicidade em *O. niloticus*

O TaLCC-20 apresentou efeito genotóxico para ambas as metodologias aplicadas (teste de micronúcleo/alterações nucleares e ensaio do cometa) apenas na maior concentração (7,5 mg/L). Observou-se diferença significativa com o CN para as alterações cromossômicas brotamento nuclear ($p=0,03$) e invaginação nuclear ($p=0,007$), bem como para o índice de genotoxicidade ($p=0,005$) (Tabela 3). Para os dados de degradação do DNA em células sanguíneas de *O. niloticus*, houve aumento significativo em comparação ao CN na porcentagem de DNA ($p=0,02$) e no tamanho da cauda ($p=0,0008$) (Tabela 3).

Tabela 3. Mediana e desvio interquartilico das alterações nucleares e degradação do DNA em eritrócitos de *O.niloticus* após exposição ao TaLCC-20.

Tratamento (mg/L)	Alterações Cromossômicas				Degradação do DNA	
	BN	IN	IG	MCN	Porcentagem de DNA	Tamanho da Cauda (µm)
CN	0,02 0,00	1,11 0,16	1,13 0,17	0,00 0,01	22,00 2,19	37,64 3,35
CP	0,13 0,07*	1,47 0,09*	1,61 0,11*	0,03 0,00*	43,14 4,20*	57,50 4,06*
1.5	0,00 0,01	1,35 0,16	1,36 0,15	0,01 0,00	22,12 1,58	41,60 0,69
4.0	0,01 0,01	1,32 0,11	1,35 0,10	0,00 0,00	21,80 1,86	42,21 1,88
7.5	0,10 0,03*	1,58 0,28*	1,69 0,28*	0,00 0,00	25,80 0,81*	45,51 2,18*

BN: Brotamento nuclear; IN: Invaginação nuclear; IG: Índice de genotoxicidade; MCN: Micronúcleo.

* Indica diferença significativa quando comparado com o controle negativo

Discussão

O organismo mais sensível foi *P. subcapitata* (Tabela 2) esse produto foi considerado tóxico (CI50-72h 0,0013 mg/L) classificado como agudo I (toxicidade mais elevada). Essa alta toxicidade pode estar relacionada com a turbidez presente nos tratamentos, ocasionada pela coloração escura que pode ter dificultado a passagem de luz, interferindo assim no crescimento algáceo. Existem poucas informações disponíveis na literatura sobre pesquisas que avaliem a toxicidade de larvicidas utilizando como organismo-teste as algas, demonstrando assim a importânciade estudos como esse que avaliam a seguridade de novos potenciais larvicidas em diferentes níveis tróficos.

O ensaio com *D. similis* (CE50-48h 2,00 mg/L) apresentou menor toxicidade que outros larvicidas recomendados pela Organização Mundial da Saúde (MS, 2014a) (Abe et al. 2014; De Souza et al. 2011; Brock et al. 2006; Duchet et al. 2011). Trabalhos realizados por Jonsson et al. (2015) e Medeiros et al. (2013) utilizando o larvicida Diflubenzuron (DFB) em *D. magna* apresentaram toxicidade superior ao TaLCC-20 com CE50-48h de 0,00097 mg/L e 0,00056 mg/L, respectivamente. Outro larvicida recomendado pela OMS (2012), o Piriproxifeno (PPF) também apresenta maior toxicidade (CE50-48h de 0,00025 mg/L) em estudos realizados por Vieira Santos et al. (2017) utilizando microcrustáceo *D. magna*.

O organismo menos sensível foi *O. niloticus* apresentando CL50-96h de 15,69 mg/L, estudos realizados por Abe et al. (2019) com alevinos da mesma espécie relatam que o DFB foi mais tóxico que o TaLCC-20 apresentando CL50-96h de 10 mg/L, e na concentração de 3 mg/L observaram alterações no tecido branquial, como quebra do sistema celular epitelial, edemas nas células epiteliais e congestão sanguínea (aneurisma) nas lamelas. Dzieciolowska et al. (2017) mostram que o PPF na dose de 1 mg/L diminuiu aproximadamente 50% na taxa de sobrevivência de embriões do peixe Zebra (*Danio rerio*) em 4 dias e letalidade total após 7 dias de exposição.

No ensaio de genotoxicidade não foi observado presença de micronúcleo na espécie *O. niloticus*, indicando que o TaLCC-20 não ocasiona efeitos aneugênicos ou clastogênicos durante a divisão celular. Resultados similares a esse também foram relatados por Vani et al. (2018) que não observaram micronúcleo em fetos de camundongos após o período do tratamento gestacional, no qual, fêmeas prenhas receberam TaLCC-20 via oral (5 mg/kg) em todos os dias de gestação. Testes realizados com DFB em camundongos nas doses a partir de 0,3 mg/kg via oral por 72h (De Barros et al. 2013) demonstraram presença de micronúcleo.

Para as alterações nucleares e dano no DNA, o TaLCC-20 apresentou genotoxicidade apenas na maior concentração (7,5 mg/L). Estudos realizados por Benze et al. (2016) evidenciaram alterações nucleares em concentrações inferiores ao nosso estudo (0,5; 1,0 e 2,0 mg/L) em peixes da espécie *P. lineatus* expostos a DFB por um período de 14 dias. E Maharajan et al. (2018) encontrou danos significativos no DNA em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) exposto a PPF também em concentração inferior (1,66 mg/L) que nosso estudo. Portanto, com os dados obtidos na literatura, os larvicidas químicos recomendados pela OMS apresentaram uma maior genotoxicidade que TaLCC-20.

O PPF é geralmente usado no tratamento da água potável contra o mosquito *Ae. aegypti* em uma concentração final máxima de 0,05 mg/L, e o DFB variando de 0,02 a 0,25 mg/L conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (MS, 2014b). De acordo com a literatura ambos os larvicidas (PPF e DFB), constataram toxicidade e genotoxicidade superiores aos resultados obtidos com TaLCC-20. Além disso esses larvicidas ocasionam resistência aos insetos (Bellinato et al. 2016; Andrighetti et al. 2008; Su et al. 2019).

De acordo com Vani et al. (2018) o TaLCC-20 causa 100% de toxicidade nas larvas de *Ae. aegypti* em cerca de três horas na dose de 5 mg/L. Neste contexto os resultados obtidos no presente estudo, comprovam baixa toxicidade para os três organismos estudados em comparação ao larvicidas recomendados pela OMS, ausência de micronúcleo e genotoxicidade em concentração inferior a de uso, além de apresentar eficiente toxicidade ao mosquito *Ae. aegypti* e conseqüentemente menor dano ao meio ambiente.

Conclusão

O TaLCC-20 apresentou toxicidade para os organismos *P. subcapitata* e *D. similis* em concentrações inferiores à recomendada para uso como larvicida (5 mg/L). Para *O. niloticus*, o produto apresentou toxicidade em concentração 3x maior que a utilizada como larvicida. Porém, devido a genotoxicidade observada no teste de micronúcleo e ensaio do cometa, podemos concluir que o produto não apresenta segurança ambiental na formulação atual, sendo assim torna-se necessária a realização de modificações químicas no produto

buscando a diminuição da genotoxicidade, para que desta forma o mesmo possa ser utilizado como larvicida natural para controle de vetores responsáveis pela transmissão da dengue, zika, febre amarela e chikungunya.

Referências

Abe FR, Coleone AC, Machado AA, Gonçalves Machado-neto J (2014) Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). J Toxicol Environ Health A 77:37-45. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.865581>

Abe FR, Machado AA, Coleone AC, Da Cruz C, Machado-neto JG (2019) Toxicity of Diflubenzuron and Temephos on Freshwater Fishes: Ecotoxicological Assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. Water Air Soil Poll 230:77. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4128-7>

ABNT -Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2005) NBR 12648: Ecotoxicologia aquática -Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro.

ABNT -Associação Brasileiras de Normas Técnicas (2016a) NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro.

ABNT -Associação Brasileiras de Normas Técnicas (2016b) NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Brasília.

Akpo AA, Chougourou DC, Djènonatin A, Dossou J, Anagonou R, Akogbéto M (2017) Etude de l'efficacité du cashew nut shell liquid (cns) de *Anacardium occidentale* l. extrait à froid sur le contrôle de anopheles gambiae s.l résistant aux Pyrétrinoïdes. Eur Sci J 13:24. <http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p249>

Andrighetti MTM, Cerone F, Rigueti M, Galvani KC, Macoris MDLDG (2008) Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. WHO Regional Office for South-East Asia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/170712>. Acessado em 27 de julho de 2019

Beatriz A, De Lima D, Souza AP, Galdino GT, Silva ECR, Ito FM, Gomes RS, Arruda EJ (2015) Processo de produção e uso de misturas de surfactantes iônicos do líquido da casca da castanha do caju e do óleo de mamona como larvicida. SINTMOL Lab. https://sintmol.ufms.br/?page_id=214. Acesso em 14 de setembro de 2019

Bellinato DF, Viana-medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D (2016) Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. Biomed Res Int 2016:12. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8603263>

Benze TP, Sakuragui MM, De Paula Zago LH, Fernandes MN (2016) Subchronic exposure to diflubenzuron causes health disorders in neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. Environ Toxicol 31:533-542. <https://doi.org/10.1002/tox.22065>

Brina KR, Carvalho TS, Ardenghi PG, Da Silva LB (2018) Micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated buccal cells of urban solid waste collectors and recyclers in southern Brazil. Chemosphere 193:1058-1062. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.119>

Brock TC, Arts GH, Maltby L, Van Den Brink, PJ (2006) Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in European Union legislation. Integr Environ Assess Manag 2:e20-46. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630020402>

Busato MA, Corralo VS, Guarda C, Zulian V, Lutiskin JA, Bordin SMS (2014) Evolução da infestação por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) nos municípios do oeste do estado de Santa Catarina. *Rev Saude Publica* 7:107-118.

Costa CR, Olivi P, Botta CM, Espindola EL (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim Nova* 31:1820-1830.

Custódio JMDO, Nogueira LMS, Souza DA, Fernandes MF, Oshiro ET, Oliveira EFD, Piranda EM, Oliveira AGD (2019) Abiotic factors and population dynamic of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in an endemic area of dengue in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 61:e18. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201961018>

De Barros AL, De Souza VV, Navarro SD, Oesterreich SA, Oliveira RJ, Kassuya CAL, Arena AC (2013) Genotoxic and mutagenic effects of diflubenzuron, an insect growth regulator, on mice. *J Toxicol Environ Health Sci* 76:1003-1006. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.830585>

De Souza JP, Medeiros LDS, Winkaler EU, Machado-neto JG (2011) Acute toxicity and environmental risk of diflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 48:600-6. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v21i0.25846>

Duchet C, Mitie IH, Caquet T, Larroque H, Franquet E, Lagneau C, Lagadic L (2011) Chitobiase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to spinosad and diflubenzuron. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:800-810. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630020402>

Dzieciolowska S, Larroque AL, Kranjec EA, Drapeau P, Samarut E (2017) The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Sci Rep* 7:40067. <https://doi.org/10.1038/srep40067>

Harburguer L, Gonzalez PV, Audino PG, Zerba E, Masuh H (2018) N-substituted methyl maleamates as larvicidal compounds against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 117:611-615. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5729-y>

Hussain B, Sultana T, Sultana S, Masoud MS, Ahmed Z, Mahboob S (2018) Fish ecogenotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi J Biol Sci* 25:393-398. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.048>

Iqbal J, Ishtiaq F, Alqarni AS, Owayss AA (2018) Evaluation of larvicidal efficacy of indigenous plant extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say) under laboratory conditions. *Turk J Agric For* 42:207-215. <http://doi:10.3906/tar-1711-69>

Jonsson CM, Silva MSGM, De Macedo VS, Dantzger DD, Vallim JH, Marigo ALS, Aoyama H (2015) Prediction of a low-risk concentration of diflubenzuron to aquatic organisms and evaluation of clay and gravel in reducing the toxicity. *Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado*.

Maharajan K, Muthulakshmi S, Nataraj B, Ramesh M, Kadirvelu K (2018) Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): a multi biomarker study. *Aquat Toxicol* 196:132-145. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.010>

Medeiros LS, Souza JP, Winkaler EU, Carraschi SP, Cruz C, Souza-júnior SC, Machado-neto JG (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 Heal Part B*, 48:600-606. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.775000>

Morejón B, Pilaquinga F, Domenech F, Ganchala D, Debut A, Neira M (2018) Larvicidal Activity of Silver Nanoparticles Synthesized Using Extracts of *Ambrosia arborescens*

(Asteraceae) to Control *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Nanotechnol 2018:8. <https://doi.org/10.1155/2018/6917938>

MS - Ministério da Saúde (2014a) Larvicidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde para uso em água potável. <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/larvicidas/926-saude-de-a-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/11391-orientacoes-larvicidas>. Acesso em 15 outubro de 2019

MS - Ministério da Saúde (2014b) Orientações técnicas para a utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*. Ministério da Saúde. <http://saude.gov.br/o-ministro/926-saude-de-a-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/13059-orientacoes-tecnica-para-utilizacao-do-larvicida-pyriproxyfen-0-5-g-no-controle-de-aedes-aegypti>. Acesso em 20 de outubro de 2019.

Norberg-King TJ (1993) A linear interpolation method for sub-lethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach. Version 2.0 (software). USEPA – Duluth (MN)

OECD -Organization for Economic Co-operation and Development (2011) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Guidelines for testing of chemicals no. 201.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (2004) *Daphnia sp.*, acute immobilization test. Guidelines for testing of chemicals no. 202.

OECD -Organization for Economic Co-operation and Development (1992). Guideline for testing of chemicals no. 203.

OECD Organization for Economic Co-operation and Development (2001) Environment Directorate Joint Meeting Of The Chemicals Committee And The Working Party On Chemicals, Pesticides And Biotechnology. OECD ENV/JM/MONO.

Paiva DR, Lima DP, Avvari NP, Arruda EJ, Cabrini I, Marques MR, Dos Santos EA, Biaggio FC, Sangi DP, Beatriz AA (2017) Potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. Anais da Academia Brasileira de Ciências 89:373-382. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160615>

Pandiyan GN, Mathew N, Munusamy S (2019) Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. Ecotox Environ Safe 174:549-556. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.019>

R CORE TEAM (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Ricoldi MC, Figueiredo CS, Desidério JA (2018) Toxicity of Cry2 proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain T01-328 against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Arq Inst Biol 85:e0132018. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000132018>

Romano CA, Da Silva HHG, Garcia M, Da Silva IG (2018) Insecticidal activity of *Anacardium humile* (ANACARDIACEAE) nut shell liquid against *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). J Trop Pediatr 47:183-194. <https://doi.org/10.5216/rpt.v47i3.55118>

Schmid W (1975) The micronucleus test. Mutat Res 31:9-15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)

Sookyung U, Thitithammawong A, Nakason C, Pakhathirathien C, Thaijaroen W (2018) Effects of Cashew Nut Shell Liquid and Its Decarboxylated Form on the Properties of Natural Rubber. J Polym Environ 26:3451-3457. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1227-2>

Su T, Thieme J, Lura T, Cheng ML, Brown MQ (2019) Susceptibility Profile of *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) from Montclair, California, to Commonly Used Pesticides,

With Note on Resistance to Pyriproxyfen. *J Med Entomol* 56:1047-1054.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjz019>

Vani JM, Monreal MTFD, Auharek SA, Cunha-laura AL, De Arruda EJ, Lima AR, Silva CM, Antonioli-silva ACMB, Lima DP, Beatriz A, Oliveira RJ (2018) The mixture of cashew nut shell liquid and castor oil results in an efficient larvicide against *Aedes aegypti* that does not alter embryo-fetal development, reproductive performance or DNA integrity. *PloS ONE*, 13:e0193509v. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193509>

Ventura BDC, De Angelis DDF, Marin-morales MA (2008) Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic Biochem Phys*, 90:42-51.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.009>

Vieira Santos VS, Caixeta ES, Campos Júnior EOD, Pereira BB (2017) Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. *J Toxicol Environ Health Sci* 80:155-160.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1266721>

WHO - World Health Organization (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>. Acessado em 24 de outubro de 2019.

Zeng G, Zhang M, Wang P, Li X, Wu P, Sun D (2019) Genotoxicity effects of *Phanerochaete chrysosporium* against harmful algal bloom species by micronucleus test and comet assay. *Chemosphere* 218:1031-1041.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.148>