

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**BIOATIVO LCCtL: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, EMBRIOTÓXICA E
GENOTÓXICA PARA USO POTENCIAL NO CONTROLE DE *Aedes aegypti***

KRYSLLA BARBOSA ROCHA DE CARVALHO

DOURADOS/MS

2025

KRYSLLA BARBOSA ROCHA DE CARVALHO

**BIOATIVO LCCTL: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, EMBRIOTÓXICA
E GENOTÓXICA PARA USO POTENCIAL NO CONTROLE DE *Aedes aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal da Grande Dourados,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alexeia Barufatti

Coorientadora: Marina Stefan
Schibichewski

DOURADOS/MS

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C331b Carvalho, Kryslia Barbosa Rocha De
BIOATIVO LCCtL: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, EMBRIOTÓXICA E
GENOTÓXICA PARA USO POTENCIAL NO CONTROLE DE *Aedes aegypti* [recurso
eletrônico] / Kryslia Barbosa Rocha De Carvalho. -- 2025.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Alexeia Barufatti.
Coorientador: Marina Stefânes Schibichewski.
TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2025.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Controle de vetores. 2. Ecotoxicologia. 3. Genotoxicidade vegetal. 4. Larvicida. I. Barufatti,
Alexeia. II. Schibichewski, Marina Stefânes. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

KRYSLLA BARBOSA ROCHA DE CARVALHO

**BIOATIVO LCCtL: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, EMBRIOTÓXICA E
GENOTÓXICA PARA USO POTENCIAL NO CONTROLE DE *Aedes aegypti***

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

Orientador: Alexeia Barufatti

Aprovado em: *04 de julho de 2025*

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

ALEXEIA BARUFATTI

Data: 07/07/2025 15:03:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ALEXEIA BARUFATTI

Presidente



Documento assinado digitalmente

HELINA DOS SANTOS NASCIMENTO

Data: 04/07/2025 17:28:36-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

HÉLINA DOS SANTOS NASCIMENTO

Membro



Documento assinado digitalmente

NATHALYA ALICE DE LIMA

Data: 07/07/2025 12:25:03-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

NATHALYA ALICE DE LIMA

Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, saúde e sabedoria concedidas ao longo de toda esta jornada. Sem Ele, nada disso teria sido possível.

Aos meus pais, Laudiney e Débora, e às minhas irmãs, Kadyjha e Kayrah, pelo amor, apoio emocional e financeiro, carinho incondicional e por sempre acreditarem em mim. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, tornando possível a conclusão desta graduação e deste trabalho.

Às minhas amigas da graduação e do laboratório, Camila e Emily, por tornarem essa etapa mais leve, divertida e acolhedora. Obrigada pelo companheirismo, apoio e todas as risadas compartilhadas.

Ao meu namorado, Gabriel, por estar presente no início dessa caminhada, por me acalmar nos momentos difíceis, e principalmente, por não me deixar surtar sozinha.

À minha orientadora, Dra. Alexeia Barufatti, por todo suporte, orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. À minha coorientadora, Marina Stefan Schibichewski, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo auxílio essencial nos testes realizados.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade, pelos aprendizados, ajuda constante e parceria durante a realização deste estudo.

A Nathalya Alice de Lima e Dra. Héline dos Santos Nascimento, por gentilmente aceitarem compor a banca avaliadora deste trabalho.

Por fim, sou imensamente grata a todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta etapa tão importante da minha vida.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é um dos principais vetores de arboviroses, como Dengue, Zika e Chikungunya, representando um problema de saúde pública, pois afeta a vida de milhares de pessoas todos anos. Por isso, é de suma importância buscar alternativas naturais para realizar o controle do vetor. Uma alternativa é o Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico (LCCT) que possui reconhecida atividade larvicida contra esse vetor, mas sua hidrofobicidade limita a aplicação em ambientes aquáticos. Para superar essa limitação, foi desenvolvida uma formulação auto-emulsionável do LCCT com Lauril Sulfato de Sódio, denominada LCCTL, visando melhorar sua solubilidade e sem comprometer a sua eficácia larvicida. O LCCTL apresentou comprovada atividade larvicida com uma CL_{50} -24 h de 9,59 mg/L. Assim, o presente trabalho avaliou a segurança ambiental do bioativo LCCTL por meio de ensaios ecotoxicológicos e genotóxicos com organismos não-alvo de diferentes níveis tróficos. Foram conduzidos testes de toxicidade crônica com *Raphidocelis subcapitata*, toxicidade aguda com *Daphnia similis*, embriotoxicidade com *Danio rerio*, além de avaliação genotóxica com *Allium cepa*. Os resultados demonstraram que o LCCTL apresentou toxicidade classificada como agudo I para *R. subcapitata* e *D. similis*, e agudo III para *D. rerio*, indicando maior sensibilidade dos organismos de níveis tróficos inferiores. No teste com *A. cepa*, o LCCTL não induziu efeitos genotóxicos significativos, com ausência de alterações cromossômicas e formação de micronúcleos, mesmo em concentrações elevadas. Os resultados indicaram que o LCCTL possui potencial para ser utilizado como um biolarvicida eficaz e ambientalmente seguro, representando uma alternativa sustentável aos inseticidas sintéticos no controle de *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: Controle de vetores. Ecotoxicologia. Genotoxicidade vegetal. Larvicida.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is one of the main vectors of arboviruses such as Dengue, Zika, and Chikungunya, posing a public health concern as it affects the lives of thousands of people every year. Therefore, it is extremely important to seek natural alternatives for vector control. One such alternative is Technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL), which has recognized larvicidal activity against this vector. However, its hydrophobicity limits its application in aquatic environments. To overcome this limitation, a self-emulsifying formulation of tCNSL with Sodium Lauryl Sulfate was developed, named LCCtL, aiming to improve its solubility without compromising its larvicidal effectiveness. LCCtL demonstrated confirmed larvicidal activity with a 24 h-LC₅₀ of 9.59 mg/L. Thus, the present study evaluated the environmental safety of the bioactive LCCtL through ecotoxicological and genotoxic assays using non-target organisms from different trophic levels. Chronic toxicity tests with *Raphidocelis subcapitata*, acute toxicity with *Daphnia similis*, embryotoxicity with *Danio rerio*, and genotoxicity assessment with *Allium cepa* were conducted. The results showed that LCCtL presented toxicity classified as acute category I for *R. subcapitata* and *D. similis*, and acute category III for *D. rerio*, indicating greater sensitivity in organisms from lower trophic levels. In the *A. cepa* test, LCCtL did not induce significant genotoxic effects, with no chromosomal alterations or micronucleus formation observed, even at high concentrations. These findings indicate that LCCtL has the potential to be used as an effective and environmentally safe biolarvicide, representing a sustainable alternative to synthetic insecticides in the control of *Ae. aegypti*.

Keywords: Vector control. Ecotoxicology. Plant genotoxicity. Larvicide.

SUMÁRIO

1.Introdução/Justificativa	1
2.Revisão de literatura	3
2.1 Resíduos agroindustriais como fonte de compostos bioativos para controle de vetores	3
2.2 Desenvolvimento de formulações larvicidas à base de LCCt com aplicação aquática	4
2.3 Segurança ambiental do LCCtL: estratégias de avaliação ecotoxicológica e genotoxicológica.....	5
2.3.1 Ensaio com microalgas	6
2.3.2 Ensaio com microcrustáceos	7
2.3.3 Ensaio de embriotoxicidade com <i>Danio rerio</i>	7
2.3.4 Avaliação genotóxica em <i>Allium cepa</i>	8
3.Objetivos	10
3.1 Geral	10
3.2 Específicos	10
4.Hipóteses	10
5.Material e métodos	11
5.1 Síntese do bioproduto	11
5.2 Ensaio ecotoxicológico	11
5.2.1 Toxicidade crônica em <i>Raphidocelis subcapitata</i>	11
5.2.2 Toxicidade aguda em <i>Daphnia similis</i>	12
5.2.3 Embriotoxicidade em <i>Danio rerio</i>	13
5.2.4 Genotoxicidade em <i>Allium cepa</i>	14
5.3 Avaliação ecotoxicológica	14
6. Resultados e discussão	15
7. Conclusão	19

8. Referências	20
9. Anexo I	26

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O *Aedes aegypti* é o vetor transmissor de arboviroses, como a Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela. Estas doenças representam uma ameaça significativa à saúde pública, afetando milhares de indivíduos anualmente (TERRA et al., 2017). Em 2024, houve um aumento no número de casos dessas doenças transmitidas pelo mosquito no Brasil, ultrapassando cinco milhões de casos notificados (SVS-MS, 2024). Embora avanços tenham sido realizados no desenvolvimento da vacina contra a Dengue, a sua prevenção e controle dessas arboviroses ainda exigem medidas rigorosas de combate ao vetor.

O uso de inseticidas/larvicidas químicos permanece como uma das ferramentas para conter a propagação dessas doenças (ZARA et al., 2016). Entretanto, além do mosquito desenvolver resistência ao uso desses produtos comerciais, há também a possibilidade destes compostos químicos afetarem organismos não-alvo. Por isso, é essencial buscar alternativas naturais para reduzir os efeitos adversos destes no meio ambiente, como o uso de resíduos agroindustriais com propriedades biológicas (LAUFENBERG et al., 2003; HARBURGUER et al., 2018; PADMANABAN et al., 2022).

Uma possibilidade promissora é o Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico (LCCt), resíduo agroindustrial proveniente da tostagem da castanha de caju. Esse composto apresenta comprovada atividade larvícida e insetícida contra *Ae. aegypti*, além de seu uso ser de fácil acesso e baixo custo (LOMONACO et al., 2009; DE CARVALHO et al., 2019; JORGE et al., 2020). No entanto, o LCCt é um óleo viscoso e apresenta hidrofobicidade, o que dificulta sua utilização em ambientes aquáticos, sendo o local de desenvolvimento das larvas desse vetor. Assim, modificações químicas em sua estrutura são necessárias a fim de aumentar a solubilidade em água e potencializar sua atividade larvícida.

Sendo assim, uma formulação auto-emulsionável foi desenvolvida a partir do LCCt com Lauril Sulfato de Sódio, denominado LCCtL, apresentando características hidrossolúveis. A partir desse bioativo, foram realizados ensaios e foi verificada uma alta atividade larvícida contra o *Ae. aegypti*, com $CL_{50-24\text{ h}}$ de 9,59 mg/L, ou seja, a ocorrência de mortalidade de 50% de larvas em 24 h (SCHIBICHEWSKI, 2025).

Embora biolarvicidas sejam frequentemente considerados ambientalmente seguros, estudos recentes indicam que compostos naturais, especialmente os formulados

com surfactantes, também podem apresentar efeitos adversos sobre organismos aquáticos em níveis tróficos distintos (SOBRINO-FIGUEROA, 2018). Assim, a avaliação ecotoxicológica e genotóxica é crucial para garantir que tais compostos não causem desequilíbrios ecológicos quando utilizados em larga escala (SISSINO et al., 2021). Dessa forma, considerando que o destino deste bioproduto é o ambiente aquático, torna-se essencial realizar ensaios ecotoxicológicos com o objetivo de verificar sua toxicidade sobre organismos aquáticos não-alvo.

Os ensaios ecotoxicológicos baseiam-se na exposição de organismos-teste a diferentes concentrações de uma substância ou mistura de substâncias por um período determinado (SISSINO et al., 2021). Durante essas análises, são avaliados os efeitos sobre funções biológicas fundamentais, como o desenvolvimento embrionário e a mortalidade, aspectos que exercem impacto direto sobre o equilíbrio dos ecossistemas (SISINNO et al., 2021).

Essas avaliações podem ser conduzidas em distintos níveis tróficos da cadeia alimentar, incluindo produtores (microalgas unicelulares – *Raphidocelis subcapitata*), consumidores primários (Cladocera – *Daphnia similis*) e consumidores secundários (peixes – *Danio rerio*) (JORGE et al., 2022). Além disso, é fundamental examinar o potencial genotóxico do LCCtL, de modo a assegurar sua segurança para uso ambiental.

Nesse contexto, o teste com *Allium cepa* destaca-se como uma ferramenta eficiente, por possibilitar a avaliação de diversos parâmetros, como o índice germinativo (fitotoxicidade), o índice mitótico e a análise de aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos (BARBÉRIO et al., 2011; BONCIU et al., 2018; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esses parâmetros são amplamente utilizados como indicadores dos impactos provocados pelo composto nos organismos expostos.

Apesar dos avanços relacionados à formulação do LCCtL e à sua eficácia larvicide, ainda são escassos os estudos que avaliem seus possíveis efeitos ecotoxicológicos e genotóxicos em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos. Considerando o destino ambiental previsto para o produto e a necessidade de validar sua segurança antes de seu uso em larga escala, torna-se imprescindível realizar uma avaliação integrada de seus efeitos em organismos não-alvo. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a segurança ambiental do bioativo LCCtL por meio de ensaios de toxicidade e genotoxicidade utilizando diferentes organismos-teste.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA CONTROLE DE VETORES

O processo de industrialização e da globalização, aliado ao crescimento demográfico, tem impulsionado significativamente as atividades agrícolas e industriais em escala global. Esse crescimento exponencial tem como consequência a geração anual de volumes substanciais de resíduos agroindustriais, tanto em pequenas propriedades agrícolas como em grandes complexos comerciais (YAFETTO, 2023).

Esses resíduos, provenientes da agricultura, pecuária, aquicultura ou silvicultura, são frequentemente descartados de maneira inadequada ou utilizados na alimentação animal, práticas que não proporcionam ganhos econômicos significativos para o setor industrial e resultam em questões ambientais adversas (NIGAM et al., 2009; KERMANI et al., 2015). Assim sendo, a produção desses resíduos pode aumentar a poluição do solo e dos corpos d'água, devido ao seu processo natural de dispersão, o que pode resultar em problemas de saúde pública (ROSA et al., 2011; JAYEOLA et al., 2018).

Dessa forma, torna-se necessário encontrar alternativas de uso para esses resíduos de forma mais adequada. Além disso, é importante considerar que estes são uma importante fonte de nutrientes e ricos em biomassa (MADUREIRA, 2020). Destacam-se também por possuírem compostos bioativos, como compostos fenólicos e carotenoides (SHIRAHIGUE et al., 2020). Além disso, é relevante seu uso como enzimas, óleos essenciais, rações para animais e larvicidas naturais (ALEXANDRINO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; LIU et al., 2012; LOMONACO et al., 2017). Outro uso relevante seria o potencial larvicida que pode auxiliar no combate a vetores transmissores de doenças (CARVALHO et al., 2019; KALA et al., 2019; JORGE et al., 2020). Dentre esses resíduos, podemos ressaltar o Líquido da Casca da Castanha de caju técnico (LCCt) que pode ser apresentado como Líquido da Casca da Castanha de Caju natural (LCCn) ou Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico (LCCt)

O Líquido da Casca da Castanha de Caju natural (LCCn), encontrado na casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*), é um óleo viscoso de cor marrom-avermelhado composto em sua maior parte por ácido anacárdico (60-70%), cardanol (10-20%), cardol (3-10%) e 2-metilcardol (2-5%). Para extração desse óleo são utilizadas diversas técnicas, como extração por solvente, extração por pirólise e, mecânicas (LOMONACO et al., 2017). O Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico (LCCt) é

obtido por meio de técnicas de torrefação ou processamento em óleo quente, submetidas a altas temperaturas (180-190 °C), geralmente obtidos por indústrias (GEDAM et al., 1986; LOMONACO et al., 2017). Nesse processo, o ácido anacárdico passa por um processo de descarboxilação, e é transformado em cardanol. Dessa forma, esse composto é formado por cardanol (60-70%), cardol (10-20%) e 2-metilcardol (2-5%) (LOMONACO et al., 2017).

2.2 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LARVICIDAS À BASE DE LCCT COM APLICAÇÃO AQUÁTICA

O Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico apresenta comprovada atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (LOMONACO et al., 2009; CARVALHO et al., 2019). Contudo, seu uso como biolarvicida em ambientes aquáticos é limitado devido à sua alta viscosidade e natureza hidrofóbica, o que dificulta a dispersão e ação nos criadouros do mosquito.

Nos últimos anos, diferentes abordagens químicas vêm sendo exploradas com o objetivo de melhorar a solubilidade em água e potencializar a eficácia larvicida do LCCT. Entre essas estratégias, destacam-se o uso de agentes emulsificantes e o desenvolvimento de formulações inovadoras que favoreçam a dispersão do composto, tornando sua aplicação mais eficiente nos criadouros do mosquito.

Komalamisra (2005) classifica produtos com CL_{50} entre 100 e 750 mg/L como eficazes, e aqueles com CL_{50} superiores a 750 mg/L como inativos. Estudos iniciais demonstraram que o LCCT apresenta CL_{50} de 19,76 mg/L (CARVALHO et al., 2019) e 51,04 mg/L (LOMONACO et al., 2009), evidenciando seu potencial como agente larvicida.

Visando otimizar essas características, o grupo de pesquisa Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LECOGEN) conduziu diferentes estratégias de modificação do LCCT. Jorge et al. (2020) realizaram a sulfonação do LCCT, gerando uma mistura com sulfonato de sódio (LCCTsNa), que conferiu propriedades surfactantes. No entanto, embora a mistura tenha alcançado boa solubilidade, a atividade larvicida foi reduzida (CL_{50} de 110,6 mg/L), indicando a necessidade de formulações alternativas.

Subsequentemente, Nascimento et al. (2022) exploraram reações de neutralização parcial do LCCT com bases inorgânicas (hidróxido de sódio e potássio) e orgânicas (monoetanolamina, dietanolamina e trietanolamina). A neutralização com hidróxido de sódio (NaOH) resultou na formulação denominada LCCTNa, que apresentou uma

atividade larvívica aprimorada (CL_{50} de 2,65 mg/L). Contudo, observou-se problemas de estabilidade e precipitação em meio aquoso, limitando sua aplicação prática.

Dando continuidade à otimização da formulação, estudos posteriores buscaram a proporção ideal de neutralização (entre 1% e 100%) que equilibrasse eficácia larvívica e estabilidade (CRISPIM et al., no prelo). Embora a neutralização parcial a 50% tenha mostrado resultados promissores, desafios relacionados à solubilidade persistiram.

A fim de contornar os problemas de solubilidade, uma nova formulação autoemulsionável, denominada LCCtL, foi desenvolvida pela combinação do LCCt com Lauril Sulfato de Sódio. Esta formulação proporcionou excelente solubilidade em água e manteve alta atividade larvívica, com CL_{50-24h} de 9,59 mg/L contra larvas de *Ae. aegypti*.

Considerando que o LCCtL será aplicado em ambientes aquáticos, torna-se essencial avaliar sua segurança ambiental por meio de bioensaios que envolvam organismos não-alvo de diferentes níveis tróficos. Essa abordagem permite identificar potenciais efeitos adversos e garantir que o produto esteja em conformidade com as normativas ambientais vigentes. Assim, o presente trabalho contribui com uma etapa fundamental para a consolidação do LCCtL como um biolarvívica eficiente, ecologicamente sustentável no controle do *Aedes aegypti*.

2.3 SEGURANÇA AMBIENTAL DO LCCtL: ESTRATÉGIAS DE AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA E GENOTOXICOLÓGICA

A avaliação da segurança ambiental de substâncias com aplicação potencial em ambientes aquáticos exige uma abordagem que contemple diferentes níveis tróficos e tipos de efeitos ecotoxicológicos (SISSINO et al., 2021). No presente estudo, foram selecionados bioensaios com organismos aquáticos e um modelo vegetal para análise genotóxica, permitindo uma visão abrangente dos possíveis impactos do bioativo LCCtL.

Os ensaios ecotoxicológicos foram conduzidos com organismos representativos de diferentes níveis da cadeia trófica aquática — produtores primários (microalgas), consumidores primários (microcrustáceos) e consumidores secundários (peixes). Complementarmente, um ensaio genotóxico com *Allium cepa* foi realizado, visando avaliar potenciais efeitos clastogênicos e aneugênicos associados à exposição ao bioativo.

A ecotoxicologia é a área da toxicologia dedicada ao estudo dos impactos adversos causados por substâncias no meio ambiente (SISINNO et al., 2021). Entre os diversos tipos de ecossistemas, os aquáticos são amplamente reconhecidos como receptores finais

de uma vasta gama e quantidade de contaminantes (KENDALL et al., 2001). Assim, para investigar os efeitos dos contaminantes químicos na vida aquática, têm-se empregado ensaios de toxicidade utilizando organismos aquáticos em condições controladas de laboratório (SISINNO et al., 2021).

Os ensaios ecotoxicológicos são conduzidos para avaliar a toxicidade de substâncias individuais ou misturas complexas. Uma das principais vantagens desses testes é que conseguem capturar os efeitos sinérgicos de diferentes compostos e sua disponibilidade no ambiente. Além disso, também consideram os efeitos de metabólitos ou produtos resultantes da degradação. Isso é crucial, pois alguns compostos podem se tornar prejudiciais após serem metabolizados nos organismos (CLEUVERS, 2003; ALBERT, 2023).

Nesses testes são examinados os impactos sobre funções biológicas essenciais, como a mortalidade, mobilidade e crescimento, que têm consequências diretas para a biodiversidade (SISINNO et al., 2021). Geralmente, esses ensaios são conduzidos avaliando o efeito das substâncias em diferentes níveis tróficos, como produtores, consumidores primários e consumidores secundários, visto que na natureza as interações são complexas e os efeitos no ecossistema precisam ser avaliados (NASCIMENTO et al., 2022; JORGE et al., 2022). Conforme a concentração do composto e a duração da exposição variam, os ensaios permitem a avaliação de toxicidade aguda ou crônica (EXPÓSITO, 2017).

2.3.1 ENSAIOS COM MICROALGAS

As microalgas são organismos unicelulares que desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos, pois convertem a energia solar em biomassa, contribuem significativamente para a produção de oxigênio, e servem como fonte de alimento para a maioria dos peixes e invertebrados presentes nesse ambiente (SATYAVANI et al., 2012; SISINNO et al., 2021).

Os efeitos adversos provocados por agentes tóxicos sobre esses organismos podem resultar na diminuição dos níveis de oxigênio e na alteração da produção de substâncias primárias, impactando diretamente a cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, o meio ambiente (CETIN et al., 2006). Entre os métodos recomendados para a avaliação toxicológica em algas, destacam-se os estudos que investigam a inibição do crescimento da biomassa algácea, essenciais para a avaliação de risco ambiental (KAHRU et al., 2008; SISINNO et al., 2021).

A resposta ao impacto de um composto tóxico em microalgas varia de acordo com a espécie (ROJICKOVÁ-PADRTOVÁ e MARSALEK, 1999). Por essa razão, apenas algumas espécies de microalgas de água doce são selecionadas como modelos, como *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. Essas espécies atendem a três critérios essenciais: são organismos unicelulares que não formam agregados em cultivo e testes, são facilmente mantidas em condições de laboratório e demonstram alta sensibilidade a contaminantes (EXPÓSITO, 2017).

No cenário internacional, a execução desse tipo de ensaio segue os protocolos de inibição do crescimento de algas definidos pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 201 (OECD, 2011). Já no Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabelece o método padronizado para ensaios com algas (*Chlorophyceae*) por meio da normativa ABNT NBR 12648 (2023).

2.3.2 ENSAIOS COM MICROCRUSTÁCEOS

Os microcrustáceos da ordem Cladocera, como o gênero *Daphnia*, são amplamente utilizados em ecotoxicologia devido ao seu ciclo de vida curto, facilidade de manutenção. Além disso, a capacidade desses organismos de se reproduzirem assexuadamente por partenogênese permite a obtenção de descendentes geneticamente iguais, o que garante uma sensibilidade relativamente uniforme entre os organismos utilizados nos testes (SISINNO et al., 2021).

A espécie *Daphnia magna* é amplamente empregada em estudos internacionais, principalmente associada ao protocolo de imobilização aguda descrito na OECD 202 (2004). Por outro lado, no Brasil, os ensaios de toxicidade geralmente utilizam a espécie *Daphnia similis* (BURATINI et al., 2004), que consta como organismo-teste recomendado no procedimento de ensaio com *Daphnia* spp estabelecido pela norma ABNT-NBR 12713 (2022). A mobilidade e mortalidade dos neonatos são endpoints sensíveis e diretamente correlacionados ao risco ecológico.

2.3.3 ENSAIOS DE EMBRIOTOXICIDADE COM *Danio rerio*

O *Danio rerio* é um modelo consolidado em estudos toxicológicos devido à sua alta homologia genética com vertebrados superiores e suas vantagens práticas, como pequeno tamanho, embriões transparentes e desenvolvimento extrauterino rápido (FEITSMA e CUPPEN, 2008; SPOSITO, 2018). Esse modelo de toxicidade embrionária

do *D. rerio* é adotada devido à sua alta conservação genética com os humanos. Dessa forma, ele tem sido utilizado na triagem dos efeitos tóxicos de compostos bioativos, principalmente em seu estágio de embrião (JAYSINGHE e JAYAWARDENA, 2019).

O estágio embrionário é considerado o mais sensível no ciclo de vida dos peixes, sendo os embriões particularmente vulneráveis devido à imaturidade fisiológica e à baixa capacidade de desintoxicação (HALLARE et al., 2006). Na figura 1, é possível observar os embriões em 24h e 48h, sem alterações.

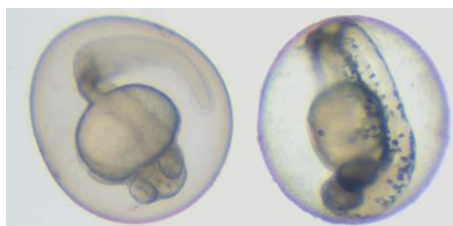


Figura 1. Embrião de *D. rerio* em 24h e 48h, respectivamente.

O *Danio rerio* tem sido amplamente utilizado como modelo experimental vertebrado, por apresentar características biológicas favoráveis e estar alinhado aos princípios dos 3Rs (Redução, Substituição e Refinamento) no uso de animais em pesquisa (RUSSEL et al., 1992; KIRK et al., 2018).

Com base nessas vantagens, a OECD publicou, em 2013, o protocolo nº 236, que estabelece diretrizes para ensaios de embriotoxicidade com zebrafish, como alternativa aos testes de toxicidade aguda em peixes adultos. O método consiste na exposição de embriões recém-fertilizados à substância em teste por até 96 horas, com observações realizadas a cada 24 horas, visando identificar sinais de toxicidade aguda, como coagulação dos ovos, ausência de somitos, não destacamento da cauda do saco vitelino e ausência de batimentos cardíacos (OECD, 2013).

Ao final do ensaio, a concentração letal capaz de causar a morte de 50% da população (CL_{50}) é determinada com base nas observações apicais positivas. O protocolo também define critérios de validação, incluindo o uso de controles positivos e negativos e a viabilidade dos embriões.

2.3.4 AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM *Allium cepa*

A avaliação de genotoxicidade constitui uma etapa fundamental no monitoramento de substâncias químicas destinadas ao uso ambiental, especialmente em produtos que possam atingir ecossistemas aquáticos ou terrestres. Ensaio com plantas

superiores vêm sendo utilizados como modelos genéticos, devido à sua sensibilidade e correlação satisfatória com sistemas animais (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Entre as espécies vegetais mais empregadas em análises citogenéticas, destacam-se *Allium cepa*, *Vicia faba* e *Zea mays* (BIRUK et al., 2017; BONCIU et al., 2018). Dentre essas, *A. cepa* (cebola comum) é reconhecida como um dos sistemas-teste mais eficazes, por apresentar baixo número cromossômico ($2n = 16$) com cromossomos de tamanho adequado à observação microscópica, além de facilidade de cultivo e disponibilidade comercial (CHAUHAN et al., 1999).

O método de teste utilizando *A. cepa* foi primeiramente proposto por Levan (1938) com o objetivo de investigar os mecanismos citológicos responsáveis pela indução da duplicação cromossômica através da colchicina, um alcaloide altamente tóxico obtido da planta *Colchicum autumnale*. Inicialmente, as raízes do bulbo de *A. cepa* foram germinadas em água pura e posteriormente transferidas para uma solução contendo colchicina. Durante o experimento, observaram-se alterações nos fusos mitóticos das células na presença dessa substância.

Fiskesjö (1979) introduziu modificações no ensaio, propondo que as raízes fossem expostas às amostras desde o início do crescimento. Este método permitiu a avaliação dos efeitos de soluções solúveis, insolúveis e misturas complexas em água, estabelecendo a espécie como um bioindicador padrão para análises de qualidade aquática (FISKESJÖ, 1985). Posteriormente, Rank e Nielsen (1993) aprimoraram a análise das aberrações cromossômicas (AC), aumentando a eficiência do sistema na detecção de agentes genotóxicos. Ma et al. (1995) expandiu o método ao incluir a avaliação de micronúcleos (MN) na descendência (F1), considerando essa medida um indicador eficaz de mutagenicidade, uma vez que os MN resultam de erros na divisão celular não corrigidos nas células-filhas.

Atualmente, o ensaio com *A. cepa* envolve a exposição controlada de raízes de bulbos ou de sementes germinadas às amostras de interesse, juntamente com controles positivos e negativos. Os parâmetros avaliados incluem: Índice germinativo; Índice mitótico; Frequência de alterações cromossômicas (AC); Frequência de micronúcleos (MN); (BARBÉRIO et al., 2011; BONCIU et al., 2018; LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Esses indicadores permitem detectar efeitos clastogênicos (danos estruturais ao DNA) e aneugênicos (alterações no número de cromossomos), fornecendo uma avaliação robusta sobre o potencial genotóxico de substâncias.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar a segurança ambiental do bioativo LCcTL por meio de ensaios ecotoxicológicos e genotóxicos com organismos não-alvo de diferentes níveis tróficos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade crônica do bioativo LCcTL em *Raphidocelis subcapitata*, por meio da determinação da concentração de inibição média (CI₅₀).
- Determinar a toxicidade aguda do bioativo LCcTL em *Daphnia similis*, por meio da concentração de efeito médio (CE₅₀).
- Avaliar a toxicidade aguda e os efeitos embriotóxicos do bioativo LCcTL em embriões de *Danio rerio*, por meio da determinação da concentração letal média (CL₅₀).
- Avaliar a genotoxicidade do bioativo LCcTL utilizando o teste em *Allium cepa*, com análise do índice mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos.

4. HIPÓTESES

- O bioativo LCcTL apresenta segurança ambiental para pelo menos um dos organismos não-alvo avaliados.
- O bioativo LCcTL apresenta diferentes níveis de toxicidade entre os organismos avaliados, refletindo sensibilidade específica por nível trófico.
- O bioativo LCcTL não apresenta efeitos genotóxicos significativos em *A. cepa*, em comparação com o controle negativo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Síntese do Bioativo

O bioativo foi sintetizado a partir do Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico (LCCT), Lauril Sulfato de Sódio (LSS) e dimetilsulfóxido (DMSO), conforme protocolo adaptado de Schibicheswki (2025). Posteriormente, preparou-se uma solução concentrada de LSS a 130Mm em DMSO a 5% (v/v), utilizada como veículo para solubilização do LCCT.

Em seguida, um recipiente contendo água deionizada foi colocado em um agitador mecânico (modelo 715, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda), sob agitação constante de 500 rpm. A solução concentrada foi então adicionada lentamente, em forma de gotejamento contínuo, ao longo de 10 min. Após a adição, a mistura permaneceu sob agitação por mais 20 min, resultando na formação de uma emulsão estável.

5.2 Ensaios ecotoxicológicos

5.2.1 Toxicidade crônica em *Raphidocelis subcapitata*

A manutenção da cultura algal e os ensaios de toxicidade em *R. subcapitata* foram realizados seguindo as normativas estabelecidas pela ABNT NBR 12648 (2023) e OECD 201. As microalgas foram cultivadas em Erlenmeyers estéreis contendo 45 mL de meio de cultivo L.C. Oligo e a concentração inicial de inóculo algal para cada réplica foi de 1×10^5 células/mL.

A ausência de efeitos tóxicos do controle de veículo foi previamente verificada para todos os organismos-teste, com resultados compatíveis com os controles negativos. O inóculo algal foi exposto ao bioativo LCCTL em cinco concentrações de 0,2; 0,4; 0,75; 1,3 e 2,5 mg/L além de controles negativo (CN) (água deionizada) e controle veículo (CV) (Lauril Sulfato de Sódio + DMSO + água deionizada). Os ensaios de toxicidade foram realizados em três réplicas para cada concentração em dois ensaios independentes. Em seguida, os Erlenmeyers ficaram sob condições controladas de luminosidade de 4500 lux, temperatura a 25 ± 2 °C e agitação a 160 rpm por 72 h em mesa agitadora orbital. O número de algas foi contado em Câmara de Neubauer utilizando microscópio invertido (Alltton®) com aumento de 250 x. A inibição do crescimento foi usada para determinar a CI_{50-72h} com base na curva concentração-resposta, utilizando o software ICp (versão 2.0) (Norberg-King, 1993). Os ensaios foram considerados válidos quando o crescimento

celular no controle negativo foi ao menos 16 vezes superior ao inóculo inicial, conforme estabelecido pela ABNT NBR 12648 (2023).

5.2.2 Toxicidade aguda em *Daphnia similis*

A manutenção das culturas e os ensaios de toxicidade em *D. similis* foram realizados de acordo com as normativas estabelecidas pela ABNT NBR 12713 (2022). A cultura de microcrustáceos foi mantida em meio de cultivo MS sob condições controladas em incubadoras BOD a temperatura de 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 16:8 h claro/escuro, intensidade luminosa de 700 lux e alimentados três vezes na semana com *R. subcapitata*. Ademais, os parâmetros de qualidade das culturas como condutividade (200 ± 50 µS/cm), dureza (44 ± 4 mg/L de CaCO₃), oxigênio dissolvido (7 ± 1 mg/L) e pH (7,0-7,6) foram mantidos durante todo o experimento conforme padronizado pela ABNT NBR 12713 (2022).

Os neonatos com até 24h de idade derivados da mesma cultura foram selecionados para a realização dos ensaios. Posteriormente, foram colocados em tubos de ensaio com 10 mL de solução contendo o bioativo LCCTL em cinco concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,6; 1,0 mg/L além do CN (meio de cultivo MS) e CV (Lauril Sulfato de Sódio + DMSO + meio de cultivo MS). Para o controle veículo (CV), utilizou-se a mesma proporção de Lauril Sulfato de Sódio (130 mM em 5% de DMSO) diluída no meio MS, de forma a corresponder à concentração presente na maior dose de LCCTL (1,0 mg/L), permitindo verificar se a toxicidade observada era atribuída ao bioativo e não aos seus componentes isolados.

As soluções foram homogeneizadas antes da exposição. Para cada tratamento foram utilizadas 4 réplicas contendo 5 neonatos cada, totalizando 20 organismos por concentração, escolhidos aleatoriamente. Após isso, os tubos foram incubados sob condições controladas de temperatura a 20 ± 2 °C por 48 h. Ao final do experimento, a quantidade de organismos mortos/imóveis foi registrada. Foram realizados dois ensaios independentes.

Os testes foram validados considerando que, ao término do ensaio, a mortalidade/imobilidade no controle negativo não ultrapassou 10%. A mortalidade/imobilidade foi o indicativo de toxicidade utilizado para a determinação da concentração de efeito média (CE_{50-48 h}), utilizando o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al. 1977), através do software JSPEAR.

5.2.3 Embriotoxicidade em *Danio rerio*

Os ensaios de embriotoxicidade em *D. rerio* foram realizados de acordo com as normativas estabelecidas pela OECD 236 (2013). A temperatura da água foi mantida a 26 ± 1 °C nas câmaras de teste durante o período, condutividade de 6µS/cm e pH de 7,2. Os embriões do peixe foram coletados imediatamente após o acasalamento natural, enxaguados com água e verificados sob uma lupa. Os ovos não fertilizados e aqueles que apresentaram irregularidades ou lesões foram descartados.

Após o controle do sucesso da fertilização, os ovos foram transferidos individualmente para placas de 24 poços contendo 2 ml de solução de exposição por poço, sendo que quatro poços com água do meio de cultivo (CN). O CV foi previamente testado, havendo ausência de mortalidade. Seguiu-se o ensaio com o bioativo. O teste foi realizado utilizando 60 ovos por tratamento, divididos em 3 réplicas, com concentrações de 0,025; 0,25; 2,5; 5; 12,5 e 25 mg/L. As placas foram mantidas a 26 ± 1 °C sob fotoperíodo de 10:14 h (claro/escuro). Ao final de 96 h, foram avaliados os endpoints de embriotoxicidade (coagulação dos ovos, ausência de batimentos cardíacos). A CL₅₀-96h foi calculada utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber no software JSPEAR (HAMILTON et al., 1977).

5.2.4 Genotoxicidade em *Allium cepa*

O ensaio de genotoxicidade com *A. cepa* foi realizado conforme metodologia descrita por Leme & Marin-Morales (2009), utilizando sementes comerciais da variedade Baia Periforme (Isla®, Brasil), não tratadas com agroquímicos. As sementes foram continuamente expostas por um período de 120h, a concentrações de 10, 25, 50, 100 e 250 mg/L do LCCTL, além de CN (água deionizada) e CV (LSS + DMSO em proporções equivalentes às utilizadas na concentração de 250 mg/L de LCCTL). A germinação foi realizada em papel germitest, sob temperatura de 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 12:12 h claro/escuro. O ensaio foi realizado em triplicata, com 20 sementes por placa.

Após o período de exposição, as raízes primárias germinadas foram fixadas em Solução Carnoy 3:1 (álcool: ácido acético), por 8 h, posteriormente transferidas para novo fixador Carnoy e armazenadas a 4 °C até o preparo das lâminas. Após fixação, as raízes foram lavadas com água destilada e hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 min. Em seguida, foram lavadas com água destilada e coradas com Reativo de Schiff por 2h. Para a preparação das lâminas, as raízes foram novamente lavadas com água destilada e as regiões meristemáticas seccionadas, colocadas nas lâminas com 1,0 ml de solução de carmim acético a 2% para contra coloração, e maceradas (LEME e MARIN-MORALES,

2009). Foram preparadas dez lâminas por tratamento e a análise foi realizada por meio de microscópio óptico (aumento de 400x), com registro de imagens. Foram contadas 500 células por lâmina, totalizando 5.000 células por tratamento, com auxílio do software ImageJ. As células foram classificadas como interfásicas, em mitose ou com alterações nucleares (Anexo I), permitindo o cálculo de: índice mitótico (IM), índice de alterações cromossômicas (IAC) e índice de micronúcleos (IMC).

$$IM = \frac{\text{Total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

$$IAC = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

$$IMC = \frac{\text{Total de células com micronúcleo}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

A análise estatística foi conduzida no software R: os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição normal foram analisadas por ANOVA one-way, seguidas de teste de Tukey; para dados não-normais, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

5.3 Avaliação ecotoxicológica

Os valores de CI_{50} (para *Raphidocelis subcapitata*), CE_{50} (para *Daphnia similis*) e CL_{50} (para *Danio rerio*) foram convertidos em Unidades Toxicológicas (UT), de acordo com o método descrito por Costa et al. (2008), utilizando a seguinte fórmula:

$$UT = \frac{100}{CI/CE/CL_{50}}$$

Essa conversão foi efetuada para possibilitar a comparação dos dados de toxicidade entre diferentes organismos não alvo (Costa et al. 2008). Em seguida, a classificação toxicológica do bioativo testado foi realizada com base nos valores de $CI/CE/CL_{50}$ obtidos para cada organismo, seguindo o protocolo do sistema de classificação integrado para danos ambientais e misturas químicas da OECD 33 (2002). Com base nos valores obtidos, o bioativo LCCtL foi classificado quanto à toxicidade aguda de acordo com o sistema integrado de classificação da OECD 33 (2002), o qual

estabelece as seguintes categorias: **Agudo I**: $CE_{50} \leq 1,0$ mg/L (alta toxicidade); **Agudo II**: $CE_{50} > 1,0-10,0$ mg/L (toxicidade moderada); e **Agudo III**: $CE_{50} > 10,0-100,0$ mg/L (baixa toxicidade). Dessa forma, a utilização combinada da conversão em UT e da classificação OECD 33 possibilita uma avaliação integrada e comparativa da segurança ambiental do bioativo LCcTL frente a diferentes organismos aquáticos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bioproduto LCcTL apresentou CI_{50} de 0,63 mg/L para *R. subcapitata*, CE_{50} de 0,36 mg/L para *D. similis* e CL_{50} de 10,37 mg/L para *D. rerio* (Tabela 1). Não foi observada mortalidade ou inibição/reprodução nos controles negativos em nenhum dos ensaios realizados.

Tabela 1. Concentração inibitória (CI_{50}), efetiva (CE_{50}) e letal (CL_{50}) em valores de 50%, com intervalo de confiança de 95%, e classificação toxicológica do bioativo LCcTL nos diferentes organismos-teste.

Organismo-alvo	Endpoint	LCcTL (mg/L) (IC95%)	Classificação Toxicológica	Unidade Toxicológica (UT)
<i>R. subcapitata</i>	CI_{50}	0,63 (0,46 – 0,73)	Agudo I	158,7
<i>D. similis</i>	CE_{50}	0,36 (0,30 – 0,45)	Agudo I	277,7
<i>D. rerio</i>	CL_{50}	10,37 (10,06 – 10,71)	Agudo III	9,64

A transformação dos dados em Unidades Toxicológicas (UT) revelou que *D. rerio* foi o organismo menos sensível ao bioativo, enquanto *D. similis* apresentou maior sensibilidade, seguida por *R. subcapitata*. Os organismos *R. subcapitata* e *D. similis* foram classificados como de risco Agudo I, enquanto *D. rerio* foi classificado como Agudo III.

Estudos anteriores realizados com derivados do LCcT demonstraram toxicidade elevada sobre organismos não-alvo. Jorge et al. (2020, 2022) avaliaram o LCcT sulfonato de sódio (LCcTSNa + LCcT) e observaram valores de CI_{50} de 0,15 mg/L e CE_{50} de 0,30 mg/L, evidenciando toxicidade superior em relação aos resultados obtidos com o LCcTL

no presente trabalho. De maneira semelhante, Nascimento et al. (2022), ao testarem o LCCTK, relataram valores próximos aos encontrados neste estudo, com CI_{50} de 0,73 mg/L e CE_{50} de 0,89 mg/L, ambos classificados como risco Agudo I.

No que se refere à comparação com larvicidas sintéticos, o ensaio realizado com *D. similis* (CE_{50} –48 h de 0,36 mg/L) indicou menor toxicidade em comparação a produtos recomendados pelo Ministério da Saúde (SVS-MS, 2009). Por exemplo, um estudo conduzido por Medeiros et al. (2013) com o larvicida Diflubenzuron em *D. magna* evidenciou toxicidade significativamente mais elevada, com valor de CE_{50} –48 h de 0,00056 mg/L. Além disso, outro larvicida amplamente recomendado pela Organização Mundial da Saúde, o Piriproxifeno, apresentou toxicidade ainda mais alta, com CE_{50} –48 h de 0,00025 mg/L, conforme demonstrado por Vieira Santos et al. (2017), também utilizando *D. magna*.

Em relação à embriotoxicidade, estudos com Piriproxifeno em *D. rerio* relataram CL_{50} de 3,79 mg/L após 120 horas de exposição (ROBERT et al., 2024), enquanto o Diflubenzuron não apresentou letalidade até a concentração de 10 mg/L. Por outro lado, o bioativo LCCTL demonstrou uma CL_{50} superior (10,37 mg/L), indicando menor toxicidade para embriões de peixe quando comparado ao Piriproxifeno.

Outro aspecto relevante associado ao uso de larvicidas sintéticos refere-se ao processo de degradação de substâncias como o Diflubenzuron, que pode resultar na formação do metabólito p-cloroanilina, classificado como potencialmente mutagênico e cancerígeno para humanos e outros organismos (BENZE et al., 2016). Nesse contexto, o bioativo LCCTL, que alia atividade larvicida comprovada e propriedades autoemulsionáveis, configura-se como uma alternativa potencialmente mais segura e eficaz para o controle do *Aedes aegypti*.

No ensaio com *A. cepa*, os tratamentos de 25, 50, 100 e 250 mg/L resultaram em um aumento significativo do Índice Mitótico (IM) em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), indicando um incremento na atividade mitótica nessas concentrações (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio-padrão do Índice Mitótico (IM), Índice de Alterações Cromossômicas (IAC) e Índice de Micronúcleos (IMC) (%), com significância de 95%, em sementes de *A. cepa* expostas ao LCCTL incluindo controles negativo (CN) e veículo (CV).

Concentração	IM (%) $\pm$ DP	IAC (%) $\pm$ DP	IMN (%) $\pm$ DP
--------------	-----------------	------------------	------------------

CN	37,84±0,18b	0,42±0,27a	0,14±0,21a
CV	46,60±0,12b	0,36±0,32a	0,10±0,14a
10 mg/L	40,16±0,08b	0,18±0,27a	0,22±0,38a
25 mg/L	53,34±0,08a	0,16±0,23a	0,10±0,14a
50 mg/L	66,92±0,11a	0,0±0,0b	0,06±0,19a
100 mg/L	52,06±0,13a	0,08±0,10a	0,02±0,06a
250 mg/L	54,40±0,11a	0,14±0,16a	0,18±0,38a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade

Um aumento no IM no ensaio de *A. cepa* pode indicar um estímulo proliferativo ou uma resposta compensatória, indicando que a divisão celular foi intensificada em decorrência da ação dos compostos avaliados (ÖZKARA et al., 2015).

O IAC não apresentou diferenças significativas em relação aos controles em nenhuma das concentrações testadas, com valores variando de 0,00% a 0,42%. Quanto ao IMC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e os controles, demonstrando que o bioativo LCCtL não induziu efeitos mutagênicos relevantes.

Estes resultados corroboram com de Leite et al. (2015), que também não observaram efeitos citotóxicos, genotóxicos ou mutagênicos em raízes de bulbos de *A. cepa* expostas a LCCt até 69,5 mg/L. No presente estudo, mesmo em concentrações significativamente superior (até 250 mg/L), o bioativo não induziu alterações cromossômicas nem micronúcleos, reforçando o perfil de segurança. Além disso, apesar do aumento no IM, não houve genotoxicidade, reforçando o diferencial do LCCtL de produtos sintéticos.

A avaliação da genotoxicidade é considerada uma etapa crítica na caracterização da segurança de substâncias com aplicação em saúde pública (JORGE et al., 2022). Essa avaliação é fundamental para compreender os riscos potenciais associados à exposição a diferentes substâncias, como produtos químicos, fármacos e aditivos alimentares. Os resultados obtidos nos testes de genotoxicidade constituem a base científica que subsidia a avaliação de riscos e embasa decisões regulatórias, contribuindo para a proteção da saúde humana e a preservação do meio ambiente (PATRA et al., 2019).

A ausência de efeitos genotóxicos e mutagênicos nessa análise reforça o potencial do LCCtL como um biolarvicida ambientalmente seguro, adequado para aplicação em

ambientes aquáticos, com baixo risco para organismos vegetais não-alvo, alinhando-se aos princípios de um controle de vetores sustentável e ecologicamente responsável.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o bioativo LCcTL apresenta toxicidade significativa para microalgas (*R. subcapitata*) e microcrustáceos (*D. similis*), com classificação Agudo I, enquanto embriões de *D. rerio* foram menos sensíveis, apresentando toxicidade classificada como Agudo III. Esses achados confirmam a hipótese de que o LCcTL possui diferentes níveis de toxicidade entre os organismos avaliados, refletindo a sensibilidade específica de cada nível trófico.

Por outro lado, a ausência de alterações cromossômicas e de formação de micronúcleos nas células de *Allium cepa* evidencia que o bioativo não induziu efeitos genotóxicos ou mutagênicos detectáveis, corroborando a hipótese de que o LCcTL não apresenta genotoxicidade significativa em comparação com o controle negativo.

Além disso, embora tenha sido observada toxicidade para alguns organismos aquáticos, os resultados indicam que ao menos um dos organismos não-alvo avaliados apresentou menor sensibilidade, apoiando a hipótese de segurança ambiental relativa do LCcTL.

Quando comparado aos larvicidas sintéticos recomendados pela OMS, o LCcTL se destacou por apresentar menor toxicidade, reforçando seu potencial de uso como uma alternativa mais segura e sustentável no controle de *Ae. aegypti*. Dessa forma, o presente trabalho contribui com informações relevantes para as etapas de avaliação ambiental necessárias ao desenvolvimento de um biolarvicida eficaz e ambientalmente seguro. Como etapas futuras, recomenda-se a realização de ensaios de campo e simulações ambientais em condições naturais, visando avaliar a eficácia larvicida, a persistência e a degradação do LCcTL em diferentes tipos de criadouros e corpos hídricos.

8. REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12648: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), 2023.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de Ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera), 2022.
- ALBERT, S.; BLOEM, E. Ecotoxicological methods to evaluate the toxicity of bio-based fertilizer application to agricultural soils – A review. **The Science of the total environment**, v. 879, n. 163076, p. 163076, 2023
- ALEXANDRINO, A. M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Food Science and Technology**, v. 27, n.2, p. 364-368, 2007.
- AMORIM, J. F. S. et al. Dengue infection in mice inoculated by the intracerebral route: neuropathological effects and identification of target cells for virus replication. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; MELLO, M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 927–935, 2011.
- BARRADAS MORES, G. et al. Occupancy by *Aedes aegypti* in a Subtropical City is Most Sensitive to Control during Autumn and Winter Months. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 1, p. 445-454, 2020.
- BIRUK, L. N. et al. Toxicity and genotoxicity assessment in sediments from the Matanza Riachuelo river basin (Argentina) under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, n. August 2016, p. 302– 311, 2017.
- BONCIU, E. et al. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191–209, 2018.
- BOTAS, G. S. et al. *Baccharis reticularia* DC. and limonene nanoemulsions: promising larvicidal agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. **Molecules**, v. 22, n. 11, p.1990, 2017.
- BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, p. 179-293, 2007.
- BURATINI, S. V. et al. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 73, n. 5, p. 878-882, 2004.
- CARVALHO, G. H. F. et al. Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nut shell against arbovirus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5514-5523, 2019.

CETIN, A. K. et al. Growth Rate of *Scenedesmus acutus* (Meyen) in Cultures Exposed to Trifluralin. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, 2006.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 181–189, 1999.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology letters**, v. 142, n. 3, p. 185–194, 2003.

COSTA, C. F. et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006594, 2018.

EXPÓSITO, N. et al. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. **The Science of the total environment**, v. 601–602, p. 865–873, 2017.

FEITSMA, H.; CUPPEN, E. Zebrafish as a cancer model. **Molecular cancer research: MCR**, v. 6, n. 5, p. 685–694, 2008.

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz. 2019. Como é o ciclo de vida do mosquito “*Aedes aegypti*”? Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypt>>. Acesso em: 05 jun. 2024.

FISKESJÖ, G. Mercury and selenium in a modified *Allium* test. **Hereditas**, v. 91, n. 2, p. 169–178, 1979.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

FOSTER, W. A. et al. Mosquitoes (Culicidae). **Medical and veterinary entomology. Academic press**, p. 261–325, 2019.

GEDAM, P. H. et al. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 14, n. 2, p. 115–157, 1986.

GUEDES, R. N. C. et al. Patterns of insecticide resistance in *Aedes aegypti*: meta-analyses of surveys in Latin America and the Caribbean. **Pest Management Science**, v. 76, n. 6, p. 2144–2157, 2020.

JAYEOLA, C. O. et al. Production of Bioactive Compounds From Waste. **Therapeutic, Probiotic and Unconventional Foods**. Academic Press, p. 317–340, 2018.

JAYASINGHE, C.D. ; JAYAWARDENA, U.A. Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, V. 2019, 2019.

JORGE, M. R. et al. Ecotoxicological Evaluation of Products Obtained from Technical

Cashew Nutshell Liquid (tCNSL) Proposed as Larvicide to Control *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). **Ecologies**, v. 3, n. 2, p. 161-174, 2022.

JORGE, M. R. et al. Sulphonates' mixtures and emulsions obtained from technical cashew nut shell liquid and cardanol for control of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 22, p. 27870-27884, 2020.

HALLARE, A.; NAGEL, K.; KOHLER, H-R.; TRIEBSKORN, R. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 3, p. 378-388, 2006.

HARBURGUER, L. et al. N-substituted methyl maleamates as larvicidal compounds against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 117, n. 2, p. 611–615, 2018.

KALA, S. et al. Nanoemulsion of cashew nut shell liquid bio-waste: Mosquito larvicidal activity and insights on possible mode of action. **South African Journal of Botany**, v. 127, p. 293-300, 2019.

KAHRU, A. et al. Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: a minireview. **Sensors**, v. 8, n. 8, p. 5153-5170, 2008.

KENDALL, R. J. et al. Ecotoxicology. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. **McGraw-Hill**, 6a ed., cap. 29, p. 27, 2001.

KERMANI, Z. J. et al. Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 424-434, 2015.

Kirk, R.G.W. Recovering the Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. **Sci. Technol. Hum. Values** ,43(4):622-648, 2018.

KOMALAMISRA, et al. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1412, 2005.

LAUFENBERG, G. et al. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource technology**, v. 87, n. 2, p.167-198, 2003.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LEVAN, Albert. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938

LIU, L. et al. Structure–activity relationship of citrus polymethoxylated flavones and their inhibitory effects on *Aspergillus niger*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n.17, p. 4336-4341, 2012.

LOMONACO, D. et al. Cashew nutshell liquid (CNSL): from an agro-industrial waste to a sustainable alternative to petrochemical resources. **Springer**, p. 19-38, 2017.

LOMONACO, D. et al. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. **Green Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 31-33, 2009.

LUCKENBACH, T.; KILIAN, M.; TRIEBSKORN, R.; OBEREMM, A. Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 355–370, 2001.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49–53, 1993.

ROBERT et al. Embryotoxic Effects of Pesticides in Zebrafish (*Danio rerio*): Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Its Mixtures. **Toxics**, v. 12, n. 2, p. 160–160, 2024.

RODRIGUES, C. et al. A new alternative to produce gibberellic acid by solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 181-188, 2009.

ROJÍČKOVÁ, R.; MARŠÁLEK, B. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. **Chemosphere**, v. 38, n. 14, p. 3329–3338, 1999.

ROSA, M. F. et al. Valorização de resíduos da agroindústria. **II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais–II (SIGERA)**, v. 1, p. 98-105, 2011.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW); 1992

MA, T. et al. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995

MADUREIRA, J. et al. Ionizing Radiation Technologies to Increase the Extraction of Bioactive Compounds from Agro-Industrial Residues: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 40, p. 11054-11067, 2020.

NASCIMENTO, H. S. et al. Self-emulsifiable Bioactive Derivatives of Technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL) Developed to Control *Aedes aegypti* Populations. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, n. 5, p. 2539-2552, 2022.

NIGAM, P. S. N. et al. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues. **Springer Science & Business Media**, 2009.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, **OECD Publishing**. Paris; 2013.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, **OECD Publishing**, 2011.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, **OECD Publishing**, 2004.

ÖZKARA, A. et al. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**, v. 67, n. 5, p. 783–791, 2015.

PADMANABAN, H. et al. Scoping review on impact of mosquito - borne diseases of man and animals and use of potential bacterial larvicidal agents to control mosquito vectors. **International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive**, v. 4, n. 2, p. 046–055, 2022.

PATTERSON, J. et al. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671, 2016.

PATRA, J. K. et al. Genotoxicity and Toxicological Studies. Em: **A Practical Guide to Pharmacological Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 55–75.

SATYAVANI, G. et al. Toxicity assessment of expired pesticides to green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

SCHIBICHEWSKI, M. S. **Desenvolvimento de larvicida sustentável à base do Líquido da Casca da Castanha de Caju técnico: caracterização físico-química e avaliação de eficácia sobre o *Aedes aegypti***. 2025. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2025.

SHIRAHIGUE, L. D. et al. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. **Ciência Rural**, v. 50, 2020.

SISINNO, C. L. S. et al. Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações. 1a ed., Recurso Digital, **Interciência**, 2021.

SOBRINO-FIGUEROA, A. Toxic effect of commercial detergents on organisms from different trophic levels. **Environmental science and pollution research international**, v. 25, n. 14, p. 13283–13291, 2018.

SVS-MS – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE.

Boletim Epidemiológico, v. 55, 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-11.pdf/@download/file>>. Acesso em: 08 jul. 2024.

SPOSITO, J. C. V. et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, 2018.

TERRA, M. R. et al. *Aedes aegypti* e as arboviroses emergentes no Brasil. **Revista Uningá Review**, v. 30, n. 3, 2017.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. **World Health Organization**, 2012.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality: first addendum to the fourth edition. **World Health Organization**, 2017.

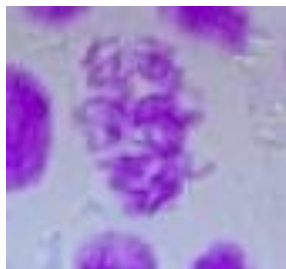
YAFETTO, L.; ODAMTTEN, G. T.; WIAFE-KWAGYAN, M. Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e14814, 2023.

ZARA, A. L. D. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

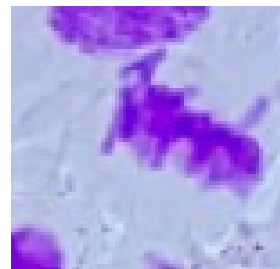
ANEXO I – Alterações cromossômicas em *Allium cepa*



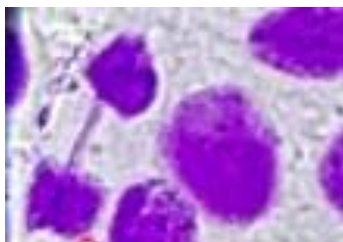
C-metáfase



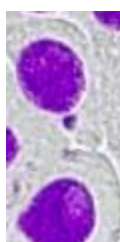
Metáfase poliploide



Metáfase com aderência



Telófase com ponte



Intérfase com micronúcleo



Metáfase com perda



Anáfase multipolar