

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

MÁRCIA RAMOS JORGE

**Síntese, caracterização e aplicação de sulfonatos e emulsões de
LCC técnico e cardanol para controle de *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

**DOURADOS/MS
Abril 2018**

MÁRCIA RAMOS JORGE

Síntese, caracterização e aplicação de sulfonatos e emulsões de LCC técnico e cardanol para controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Arruda
Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Aléxia Barufatti Grisolia e Prof. Dr. Roberto da Silva Gomes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração Tecnologia.

DOURADOS/MS
Abril 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

J82s Jorga, Marcia Ramos

Stress, caracterização e aplicação de sulfonatos e anilinos de LCC técnico e cardmol para controle de *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) / Marcia Ramos Jorga – Dourados: UFGD, 2018. 128f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo José de Arruda

Co-orientadora: Alessia Bonfatti Grisolia

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Biomassa industrial. 2. Atividade larvívora. 3. Surfactantes. 4. Avaliação ecotoxicológica. 5. Controle de vetores. I. Título.

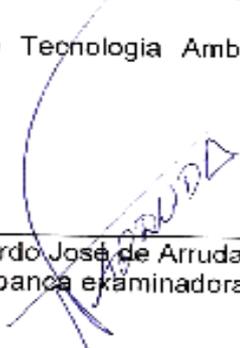
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

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



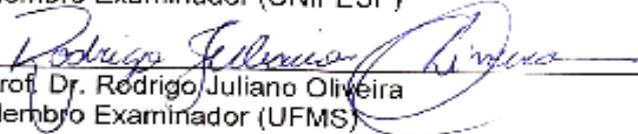
Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Síntese, caracterização e aplicação de sulfonatos e emulsões de LCC técnico (LCCt) e cardanol (C) para controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**”, de autoria de **Márcia Ramos Jorge**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Eduardo José de Arruda
Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. Fábio Kummrow - (Participação remota)
Membro Examinador (UNIFESP)



Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira
Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 5 de abril de 2018.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

UFGD
Universidade Federal
da Grande Dourados

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA AMBIENTAL
Linha de Pesquisa: Potencial Tecnológico De Matérias Primas e Resíduos Agroindustriais

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA - SÍNCRONA - EM BANCA DE DEFESA DE
MESTRADO/ UFGD**

Às 9h:00min do dia 23/04/2018, participei de forma síncrona com os demais membros que assinam o ato físico deste ato público, da banca de Defesa da Dissertação de Mestrado do candidato **Márcia Ramos Jorge**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Considerando o trabalho avaliado, as arguições de todos os membros da banca e as respostas dadas pelo candidato, formalizo para fins de registro, por meio deste, minha decisão de que o candidato pode ser considerado: APROVADA (Aprovado(a) ou Reprovado(a))

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fábio Lammrow

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de São Paulo - campus Diadema

Agradecimentos

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Professor Eduardo Arruda pela orientação permanente, disponibilidade e suporte incondicional. O professor sempre acreditou nas minhas capacidades e transmitiu a confiança e motivação que eu precisava para alcançar os meus objetivos. Compartilhou o seu vasto conhecimento, estimulou o meu espírito crítico e vontade de ir sempre mais longe. Sou eternamente grata pelo seu apoio e encorajamento ao longo dos últimos anos, como mentor, professor e amigo.

A minha mais profunda gratidão vai para a Professora Alexéia Grisolia pela ajuda e apoio em todos os momentos deste período, académicos e pessoais. O seu papel foi crucial no desenvolvimento deste projeto. Obrigada Professora, pelo empenho constante.

Agradeço sinceramente ao Professor Roberto Gomes pelo apoio e auxílio à minha pesquisa e pela disponibilidade em colaborar nas várias etapas.

Gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro, e à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), pelo apoio institucional e logístico.

O meu agradecimento vai também para a Professora Kelly Mari Oliveira e Fabiana Dantas, do Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFGD; Professor Adilson Beatriz e restante equipe do Laboratório de Síntese e Transformação de Moléculas Orgânicas (SINTMOL), bem como para o Professor Antônio Pancrácio, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; Professora Gisela Umbuzeiro e Ádria Carloto, do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade da Faculdade de Tecnologia, assim como Isaías Cabrini do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); Professor José Rogero, Professora Sizue Rogero e Adriana Cavalcante, do Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN); Professor João Ventura e Catarina Dias, do Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto (IFIMUP) (Portugal); e Professora Cristina Barrias, Tiago Santos e Ricardo Vidal, do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde/Instituto de Engenharia Biomédica (i3S/INEB) da Universidade do Porto (Portugal). A todos o meu mais sincero obrigada por me reberem e/ou colaborarem na realização das análises indispensáveis à concretização deste projeto.

Agradecimentos

Ao Professor Fábio Kummrow (Universidade Federal de São Paulo) e ao Professor Cláudio Nogueira (UFGD), pela partilha dos vossos valiosos conhecimentos e disponibilidade permanente para responder aos meus questionamentos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório e da faculdade, especialmente Juliana Spósito, Marisa Scherer, Bruno Crispim, Felipe Merey e Herbert Lee, obrigada pelo apoio que sempre senti da vossa parte, pela ajuda imperativa no desenvolvimento do meu trabalho e pelos bons momentos juntos.

Para a Laís Albuquerque, Maycon dos Santos, Marivane Turim, Carlos Manoel e Guilherme Tonial, muito obrigada pela amizade, suporte e todos os momentos que compartilhámos, irão sempre estar no meu coração.

À Ondina Feitosa, colega de casa, amiga e “mãe”, o meu eterno agradecimento pelo apoio incondicional, amor e ensinamentos de vida que me transmitis-te. Foi um prazer poder partilhar a meu dia-a-dia contigo. És uma das melhores pessoas que alguma vez conheci.

Aos meus amigos Filipa Palas, Lady Oliveira, Ricardo Morais, Adilson da Luz, Raquel Pereira, Ana Lima, Silvana Luz e Gustavo Cuco, agradeço que tenham estado sempre disponíveis para me ouvir constantemente a falar do meu trabalho e dos meus receios e, mesmo tão distantes, tenham decidido ficar por perto. Obrigada pelo apoio e pelos grandes momentos que tivemos juntos, pessoalmente e *online*. Vocês são muito importantes para mim.

Quero expressar a minha profunda gratidão ao meu pai Valdemar Jorge, à minha irmã Diana Jorge e aos meus avós Preciosa Fonte e José Jorge. A vocês devo tudo o que sou e que alcancei. O vosso amor, apoio e paciência foram essenciais ao longo de toda a minha vida, tenho muita sorte de vos ter comigo.

Por fim, dedico esta dissertação à minha mãe, Maria Cruz. Onde quer que estejas, serás sempre lembrada.

SUMÁRIO

RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
Capítulo 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Proposta	3
1.1.1. <i>Objetivos específicos</i>	4
1.2. Estrutura da Dissertação	5
Capítulo 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. <i>Aedes aegypti</i> - Sobrevivência e criadouros	7
2.2. Química Verde	10
2.2.1. <i>12 Princípios da Química Verde</i>	11
2.3. Líquido da casca da castanha de caju	12
2.3.1. <i>Extração, classificação e constituição</i>	12
2.3.2. <i>Propriedades e aplicações</i>	14
2.3.2. <i>Atividade inseticida e antimicrobiana</i>	14
2.3.3. <i>Sulfonação e tensoatividade</i>	16
2.4. Surfactantes	17
2.4.1. <i>Classificação dos surfactantes</i>	18
2.4.2. <i>Propriedades funcionais</i>	18
2.4.2.1. <i>Tensão superficial</i>	19
2.4.2.2. <i>Formação de micelas e Concentração Micelar Crítica</i>	20
2.5. Emulsões	22
2.5.1. <i>Preparo de emulsões e importância da formulação</i>	25
2.5.2. <i>Estabilidade da Emulsão</i>	26
2.6. Avaliação Ecotoxicológica	27
2.6.1. <i>Toxicidade aguda e crônica</i>	28
2.6.1.1. <i>Raphidocelis subcapitata</i>	29
2.6.1.2. <i>Daphnia similis</i>	30
2.6.1.3. <i>Danio rerio</i>	30
2.6.2. <i>Testes de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade</i>	31
2.6.2.1. <i>Allium cepa</i>	32

Capítulo 3: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, E ATIVIDADE SURFACTANTE E BIOLÓGICA DE SULFONATOS E EMULSÕES DE LCC TÉCNICO E CARDANOL.....	33
3.1. Introdução	33
3.2. Materiais e Métodos.....	35
3.2.1. <i>Obtenção do Cardanol</i>	35
3.2.2. <i>Processo de Sulfonação do Cardanol e LCC técnico.....</i>	35
3.2.3. <i>Preparação das Emulsões de Cardanol/LCC técnico e LCC técnico sulfonato de sódio</i>	36
3.2.4. <i>Caracterização Molecular.....</i>	36
3.2.4.1. <i>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....</i>	36
3.2.5. <i>Atividade biológica.....</i>	37
3.2.5.1. <i>Bioensaios de toxicidade em larvas de Aedes aegypti</i>	37
3.2.5.2. <i>Atividades Bacteriostática e Bactericida.....</i>	37
3.2.6. <i>Caracterização Físico-Química</i>	38
3.2.6.1. <i>Tensão Superficial.....</i>	38
3.2.6.2. <i>Concentração Micelar Crítica.....</i>	39
3.2.6.3. <i>Tamanho, distribuição de tamanho e potencial Zeta das micelas</i>	40
3.3. Resultados e Discussão	42
3.3.1. <i>Obtenção do Cardanol</i>	42
3.3.2. <i>Processo de Sulfonação do Cardanol e LCC técnico.....</i>	43
3.3.3. <i>Preparação das Emulsões de Cardanol/LCC técnico e LCC técnico sulfonato de sódio</i>	44
3.3.4. <i>Caracterização Molecular.....</i>	45
3.3.4.1. <i>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....</i>	45
3.3.5. <i>Atividade biológica.....</i>	47
3.3.5.1. <i>Bioensaios de toxicidade em larvas de Aedes aegypti</i>	47
3.3.5.2. <i>Atividades Bacteriostática e Bactericida.....</i>	53
3.3.6. <i>Caracterização Físico-Química</i>	55
3.3.6.1. <i>Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica.....</i>	55
3.3.6.2. <i>Tamanho, distribuição de tamanho e potencial Zeta das micelas</i>	58
3.4. Conclusão.....	62
Capítulo 4: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DANOS GENÉTICOS PROVOCADOS POR PRODUTOS INSETICIDAS E SURFACTANTES PRODUZIDOS A PARTIR DE LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU TÉCNICO.....	63

4.1. Introdução	63
4.2. Materiais e Métodos.....	65
4.2.1. <i>Compostos-teste</i>	65
4.2.2. <i>Ensaio de inibição de crescimento algal em Raphidocelis subcapitata.....</i>	65
4.2.3. <i>Ensaio de toxicidade aguda em Daphnia similis</i>	66
4.2.4. <i>Ensaio de toxicidade aguda em Danio rerio</i>	67
4.2.5. <i>Ensaio de fitotoxicidade em Allium cepa</i>	67
4.3. Resultados.....	69
4.3.1. <i>Toxicidade em Raphidocelis subcapitata, Daphnia similis e Danio rerio</i>	69
4.3.2. <i>Ensaio de fitotoxicidade em Allium cepa</i>	71
4.4. Discussão.....	76
4.5. Conclusão.....	78
Capítulo 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A: Dados dos testes de toxicidade.....	92
ANEXO I: Pedido de Patente BR 10 2017 027264 8	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais constituintes do LCC natural e LCC técnico.	13
Figura 2. Representação da estrutura de um surfactante.	17
Figura 3. Processo de formação e auto-organização da micela (DALVIN, 2011)	21
Figura 4. Representação gráfica das propriedades físicas de um tensoativo para determinação da CMC (ROSSI et al., 2006).....	22
Figura 5. Representação dos tipos de emulsões de acordo com a dispersão das fases (ALMEIDA, 2014).	23
Figura 6. Representação do sistema usado para a determinação da condutividade elétrica das amostras	40
Figura 7. Reações de sulfonação dos diferentes constituintes do LCC técnico.	44
Figura 8. Espectros de FTIR-ATR para as amostras de cardanol e LCC técnico.	46
Figura 9. Espectros de FTIR-KBr para as amostras de cardanol sulfonato de sódio e LCC técnico sulfonato de sódio.	47
Figura 10. Resumo gráfico da atividade biológica de LCC técnico emulsionado com LCC técnico sulfonato de sódio sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i>	53
Figura 11. Tensão superficial da solução de LCCtSNa e emulsões cardanol+LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa a 25°C.....	55
Figura 12. Resistência elétrica (Ω) dos (a) controles, (b) LCCtSNa, e emulsões (c) cardanol+LCCtSNa e (d) LCC técnico+LCCtSNa nas tensões 0,5 e 2V.....	57
Figura 13. Inibição de crescimento (%) de <i>Raphidocelis subcapitata</i> em função das concentrações de (a) LCC técnico, (b) LCCtSNa e (c) LCC técnico+LCCtSNa, após 72h de exposição. “0” – controle; “0*” – controle solvente.	93
Figura 14. Curvas de imobilidade (%) de <i>Daphnia similis</i> em função das concentrações de (a) LCC técnico, (b) LCCtSNa e (c) LCC técnico+LCCtSNa, após 48h de exposição. “0” – controle; “0*” – controle solvente.....	94
Figura 15. Curvas de letalidade (%) de <i>Danio rerio</i> em função das concentrações de (a) LCC técnico, (b) LCCtSNa e (c) LCC técnico+LCCtSNa, após 96h de exposição. “0” – controle; “0*” – controle solvente.	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Comparação da composição do LCC natural e do LCC técnico em fenóis lipídicos (KUMAR et al., 2002).....	13
Tabela 2. Diferenças entre macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões (Adaptada de Kale e Deore (2017))......	24
Tabela 3. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24h de exposição de larvas L3 e L4 de <i>Ae. aegypti</i> a cardanol.....	48
Tabela 4. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de <i>Ae. aegypti</i> a LCC técnico	48
Tabela 5. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de <i>Ae. aegypti</i> a CSNa.	49
Tabela 6. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de <i>Ae. aegypti</i> a LCCtSNa.....	49
Tabela 7. Concentrações letais para 50% da população (CL ₅₀) (mg L ⁻¹) obtidas para cardanol, LCC técnico e respectivos sulfonatos sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> após 24h de exposição.....	50
Tabela 8. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de <i>Ae. aegypti</i> a cardanol+LCCtSNa.....	51
Tabela 9. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de <i>Ae. aegypti</i> a LCCT+LCCtSNa.....	51
Tabela 10. Concentrações letais para 50% da população (CL ₅₀) (mg.L ⁻¹) obtidas para as emulsões de cardanol/LCCT e LCCtSNa sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> após 24h de exposição.	52
Tabela 11. Concentrações inibitórias mínimas (mg L ⁻¹) para cardanol (C), LCCT, CSNa, LCCtSNa, cardanol+LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa (LCCT+LCCtSNa).....	53
Tabela 12. Tensão superficial e desvio-padrão da solução de LCCtSNa e emulsões cardanol+LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa (25°C).....	56
Tabela 13. Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta das soluções de LCCtSNa e emulsões de cardanol/LCC técnico e LCCtSNa.....	59
Tabela 14. Concentração inibitória (CI), efetiva (CE) ou letal (CL) para 50% dos indivíduos das espécies <i>R. subcapitata</i> , <i>D. similis</i> e <i>D. rerio</i> , respectivamente, expostos a LCC técnico, LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa, com nível de confiança de 95%.	70
Tabela 15. Média e desvio-padrão do índice de germinação (IG), em porcentagem, observado em sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a LCC técnico, LCCT sulfonato de sódio e LCC técnico+LCCT sulfonato de sódio	71

Tabela 16. Média e desvio-padrão do comprimento médio das raízes (CMR), em mm, observado em sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa.....	72
Tabela 17. Média e desvio-padrão do índice mitótico (IM), em porcentagem, observado em sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa.....	72
Tabela 18. Média e desvio-padrão do índice de alterações cromossômicas (IAC), em porcentagem, observado em sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa.....	74
Tabela 19. Média e desvio-padrão do índice de mutagenicidade (IMT), em porcentagem, observado em sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa.....	75
Tabela 20. Média de células (desvio-padrão) observadas no ensaio de inibição do crescimento algal de LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa em <i>Raphidocelis subcapitata</i> após 72h de exposição	92
Tabela 21. Número total de organismos imóveis (desvio-padrão) observados no ensaio de toxicidade aguda de LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa em <i>Daphnia similis</i> após 48h de exposição	93
Tabela 22. Número total de organismos mortos (desvio-padrão) observados no ensaio de toxicidade aguda do LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa em <i>Danio rerio</i> em estágio embrionário após 96 de exposição.	94

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da resistividade elétrica.	40
Equação 2. Equação de Stokes-Einstein.....	41
Equação 3. Cálculo do índice de germinação (IG), em porcentagem.	68
Equação 4. Cálculo da média de crescimento das raízes (CRM), em mm.	68
Equação 5. Cálculo do índice mitótico (IM), em porcentagem.....	69
Equação 6. Cálculo do índice de alterações cromossômicas (IAC), em porcentagem.....	69
Equação 7. Cálculo do índice de mutagenicidade (IMN), em porcentagem.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (Refletância total atenuada)
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
C	Cardanol
CBM	Concentração bactericida mínima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CE ₅₀	Concentração efetiva para 50% da população
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CI ₅₀	Concentração inibitória para 50% da população
CIM	Concentração inibitória mínima
CL ₅₀	Concentração letal para 50% da população
CMC	Concentração micelar crítica
CSNa	Cardanol-sulfonato de sódio
<i>D. similis</i>	<i>Daphnia similis</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dispersão dinâmica de luz)
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared (spectroscopy)</i> (Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier)
KBr	Brometo de Potássio
L3/L4	Larvas de 3º e 4º estágios
LCC	Líquido da casca de castanha de caju
LCCT	Líquido da casca de castanha de caju técnico
LCCTsNa	Líquido da casca de castanha de caju técnico-sulfonato de sódio
OD	Oxigênio dissolvido
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
PA	Padrão analítico
PDI	<i>Polydispersion index</i> (Índice de polidispersão)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>R. subcapitata</i>	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

RESUMO

A dengue, chikungunya, zica e febre amarela são doenças (re)emergentes transmitidas pelo *Aedes aegypti*, que representam um grave problema de saúde pública. As opções de controle do inseto vetor são ineficazes e limitadas e, apesar de considerarem a redução populacional do vetor, não têm reduzido a incidência das doenças de forma duradoura. Deste modo, o desenvolvimento de novos inseticidas e estratégias para controle populacional do inseto devem ser consideradas, contemplando a redução de impactos ambientais e para a saúde pública. A maioria dos criadouros estão localizados em ambiente doméstico. Assim, é fundamental estimular a adesão da sociedade aos programas de prevenção das doenças e controle dos vetores, disponibilizando produtos de baixo custo, fácil utilização e mais sustentáveis, que substituam ou possam se associar a outros integrados nas rotinas diárias, como, por exemplo, produtos de limpeza. O líquido da casca de castanha de caju técnico (LCCt) é um subproduto abundante da cadeia produtiva do caju, disponível a baixo custo, e apresenta comprovada atividade inseticida/larvicida e estrutura química similar à dos surfactantes convencionais mais utilizados. Surfactantes e/ou misturas binárias com surfactantes e ativos biológicos produzidos a partir de LCCt podem ser usados na higienização de superfícies e espaços. O escoamento desses produtos juntamente com as águas residuais permite a sua disseminação nos espaços de acúmulo de água, que constituem os criadouros de *Ae. aegypti*. Neste propósito, realizou-se a sulfonação de LCCt cardanol (seu maior constituinte), com vista à produção de detergentes domésticos com propriedades inseticidas. A atividade larvicida foi avaliada por meio de ensaios de toxicidade com larvas de *Ae. aegypti* de 3º e 4º estádios. Os resultados obtidos mostraram que os sulfonatos não apresentam atividade larvicida. No entanto, quando os LCCt-sulfonatos de sódio (LCCtSNa) foram combinados com LCCt ou cardanol, na forma de emulsões, verificou-se atividade biológica, sendo determinadas concentrações letais para 50% dos organismos expostos (CL₅₀) de 15,8 e 27,5 mg L⁻¹, respectivamente. Ensaio de toxicidade da emulsão LCCt+LCCtSNa foram realizados em *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia similis* e *Danio rerio*, e de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *Allium cepa*. As concentrações que causaram a inibição de crescimento, imobilidade e letalidade a 50% dos organismos expostos de *R. subcapitata*, *D. similis* e *D. rerio* (CI₅₀, CE₅₀ e CL₅₀) foram de 0,30, 0,15 e 69,11 mg L⁻¹, respectivamente. No ensaio realizado em *Allium cepa* não se verificaram efeitos fitotóxicos ou danos genéticos nas concentrações testadas. Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade podem fornecer informações úteis para a derivação de critérios para

Resumo

qualidade ambiental do produto multifuncional proposto, considerando a necessidade da redução dos impactos ambientais gerados pelos inseticidas convencionais. Os resultados mostram que a emulsão LCCT+LCCTsNa é um larvicida e surfactante eficiente, constituindo um produto importante para o controle do vetor da dengue, chikungunya, zica e febre amarela, e conseqüentemente redução da incidência das doenças. Assim, esta proposta é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de produtos inseticidas multifuncionais alternativos aos inseticidas convencionais, com maior disponibilidade e custo reduzido, permitindo o controle prolongado do vetor nas residências.

Palavras-chave: biomassa industrial, atividade larvicida, surfactantes, multifuncionalidade, avaliação ecotoxicológica, controle de vetores

ABSTRACT

Dengue, chikungunya, zika and yellow fever are (re)emerging diseases transmitted by *Aedes aegypti*, which represent a serious public health problem. The options of vector control, mainly resorting to the use of chemical insecticides, are ineffective and limited. Despite considering the population reduction of the vector, they have not reduced the incidence of the diseases in a lasting way. Thus, the development of new insecticides and strategies for population control of the insect should be considered, contemplating the reduction of impacts on the environmental and public health. Most breeding sites are located in the domestic environment. Thus, it is essential to encourage society's adherence to disease prevention and vector control programs by providing low-cost, easy-to-use and more sustainable products that substitute or can be associated with others integrated into daily routines, such as cleaning products. Technical cashew nut shell liquid (tCNSL) is an abundant byproduct of the cashew production chain available at low cost, and has proven insecticidal/larvicidal activity and chemical structure similar to that of the most commonly used conventional surfactants. Surfactants and/or binary mixtures with surfactants and biological actives produced from tCNSL can be used to clean surfaces and spaces. The flow of these products with the waste water allows their dissemination in the spaces of water accumulation, which constitute the breeding sites of *Ae. aegypti*. In this purpose, the sulfonation of tCNSL and cardanol (its major constituent) was carried out in order to produce household detergents with insecticidal properties. The larvicidal activity was evaluated by means of toxicity tests with *Ae. aegypti* larvae of 3rd and 4th stages. The results obtained showed that the sulfonates do not present larvicidal activity. However, when sodium tCNSL-sulfonates (tCNSLSNa) were combined with tCNSL or cardanol as emulsions, biological activity was observed, with lethal concentrations for 50% of exposed organisms (LC₅₀) of 15,8 and 27,5 mg L⁻¹, respectively. Toxicity tests of the tCNSL+tCNSLSNa emulsion were performed on *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia similis* and *Danio rerio*, and toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity assays were performed in *Allium cepa*. Concentrations causing 50% growth inhibition, immobility and lethality of the exposed organisms of *R. subcapitata*, *D. similis* and *D. rerio* (IC₅₀, EC₅₀ and LC₅₀) were 0,30, 0,15 and 69,11 mg L⁻¹, respectively. No phytotoxic effects or genetic damage were observed at the concentrations tested in *Allium cepa*. The results obtained in the toxicity tests can provide useful information for the derivation of criteria for environmental quality of the proposed multifunctional product, considering the need to reduce the environmental impacts generated

Abstract

by conventional insecticides. The results show that the tCNSL+tCNSLSNa emulsion is an efficient larvicide and surfactant, constituting an important product to control the vector of dengue, chikungunya, zika and yellow fever, and consequently reduce the incidence of the diseases. Thus, this proposal is a promising strategy for the production of multifunctional insecticides alternatives to conventional insecticides, with greater availability and low cost, allowing the prolonged control of the vector in the residences.

Keywords: industrial biomass, larvicidal activity, surfactants, multifunctionality, ecotoxicological evaluation, vector control

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Os mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), são responsáveis pela transmissão de diferentes arbovírus, causadores de doenças como a dengue, zica, chikungunya e febre amarela. Nos últimos anos, estes arbovírus espalharam-se rapidamente pelo mundo. Apesar das origens iniciais prováveis como zoonoses, os seres humanos tornaram-se o principal hospedeiro desses vírus, particularmente nas áreas (peri)urbanas (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). As alterações climáticas, vantajosas à propagação de insetos vetores (CAMPBELL et al., 2015), e o aumento da globalização, favorecem a disseminação das doenças nas populações que não possuem imunidade (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016), tornando os seus impactos imprevisíveis.

A dengue apresenta-se como uma das mais importantes doenças reemergentes no mundo transmitidas pelo *Ae. aegypti*, devido ao grande número de casos notificados (BRAGA; VALLE, 2007a; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), 2009), estima-se que ocorram cerca de 50 a 100 milhões de casos anuais de dengue, com crescente agravo à saúde da população, aumento de gastos governamentais, prejuízos sócio-econômicos e sobrecarga aos sistemas de Saúde Pública. Bhatt et al. (2013) estimam que a carga total de infecção seja três vezes superior à apresentada pela OMS, devido a subnotificação e/ou deficiências nestes registros epidemiológicos e de atendimento nos postos e hospitais públicos e da rede privada.

O Brasil enfrenta a introdução e um rápido processo de dispersão, no sentido do endemismo, de dois novos arbovírus conhecidos na África e na Ásia: o vírus da chikungunya e o vírus da zica, que se acredita terem sido introduzidos durante a Copa do Mundo realizada em 2014 (LIMA et al., 2016; VASCONCELOS, 2015).

Após a detecção da circulação do vírus da zica no Nordeste do Brasil e em outros países da América Latina, registrou-se o aumento expressivo de casos de Síndrome de Guillain-Barré. Contudo, “O divisor de águas foi a declaração do governo brasileiro em outubro de 2015 de emergência nacional de saúde pública, devido ao aumento no número de crianças nascidas com microcefalia no Estado do Pernambuco” (RIBEIRO; KITRON, 2016). Desde que a correlação entre a infecção do vírus da zica e a microcefalia fetal foi descoberta, este vírus recebeu grande atenção por parte dos organismos de saúde pública e da mídia (FAUCI; MORENS, 2016 apud

PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016) oficialmente declarado como emergência global de Saúde Pública pela OMS em Fevereiro de 2016 (GULLAND, 2016).

A febre amarela representa a mais perigosa doença transmitida por *Aedes*, apresentando taxa de mortalidade muito elevada, atingindo 89% no continente africano (BARNETT, 2007). Ao longo dos anos, até ao início do século XX, foram vários os surtos de febre amarela ao redor do mundo. No Brasil, até 1930 e antes da sua erradicação, a transmissão era feita por mosquitos da espécie *Aedes sp.* urbana, de origem africana. Na mesma década foram desenvolvidas duas vacinas contra a doença e nos anos subsequentes foram realizadas campanhas de vacinação em massa na América do Sul e alguns países de África. No entanto, as vacinas não abrangeram a todos. Apenas a partir de 2000 estas vacinas foram incorporadas nos planos de vacinação infantil dos países sul americanos e africanos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2010).

Apesar da vacinação diminuir o número de pessoas susceptíveis ao longo do tempo, grande parte da população não possui cobertura vacinal a curto prazo. Assim, centenas de casos de febre amarela em países endêmicos da América do Sul são relatados anualmente à OMS (CDC, 2010). Atualmente, o Brasil enfrenta um surto desta doença, mas de origem silvestre, sendo o vírus transmitido por outras espécies. Este tem sido continuamente transmitido ao longo da costa Atlântica em áreas não consideradas em risco até à revisão da avaliação de risco, publicada pela OMS no início de 2017 (OMS, 2017). O aumento do número de casos de febre amarela silvestre, a alta densidade de infestação pelo *Ae. aegypti* e a baixa cobertura vacinal favorecem o risco de reurbanização da febre amarela no Brasil (CAVALCANTE; TAUIL, 2017).

Desde o início do século XX, até às décadas de 1960-70, foram realizadas campanhas agressivas de controle ao *Ae. aegypti*, adiando a sua propagação no Hemisfério Ocidental e tendo sido erradicado de território brasileiro por diversas ocasiões. No entanto, falhas/ineficiência de vigilância epidemiológica e/ou alterações sociais e ambientais, decorrentes de uma urbanização acelerada e falta de infraestrutura sanitária, facilitaram a reprodução e a propagação do vetor e a consequente (re)emergência de doenças (BRAGA; VALLE, 2007; OMS, 2009). Na tentativa de controle do vetor, a estratégia mais utilizada recai no uso massivo de inseticidas químicos sintéticos organofosforados e piretróides. Além destes, são também utilizados inseticidas biológicos que possuem como ingredientes ativos fungos, bactérias e vírus (BRAGA; VALLE, 2007b; ZARA et al., 2016).

As estratégias de controle, apesar de considerarem a redução populacional do vetor, por meio da gestão/manejo integrada(o), incluindo o uso de inseticidas químicos ou biológicos, são ineficazes, limitadas e ineficientes, devido ao aumento dos níveis de resistência do inseto, não adesão da população ao controle, à falta de tratamento das águas para consumo, à dificuldade em alcançar níveis elevados e regulares de cobertura, às dificuldades operacionais e econômicas de implementação e manutenção de infraestruturas para controle biológico, e à falta de saneamento (GUZMAN et al., 2010; OMS, 2009). Assim, não se verifica a redução dos surtos e/ou incidência da dengue, chikungunya, zica e febre amarela de forma duradoura. Além disso, o uso intensivo de inseticidas convencionais provoca o aparecimento de populações de insetos resistentes e a reemergência de doenças transmitidas por vetores (BRAGA; VALLE, 2007a; CAMPBELL et al., 2015).

Neste cenário, novas estratégias e produtos inseticidas alternativos para o controle de vetores, principalmente utilizando produtos com múltipla funcionalidade e de longa duração, são desejáveis. Estes devem alcançar o inseto em estágios imaturos e o adulto (alado) nos criadouros, particularmente habitações e imediações, recorrendo a sistemas de liberação controlada ou moléculas reservatórios, para controle direto do inseto alvo, alteração das condições físico-químicas dos criadouros e microbiota com implicações na disponibilidade de alimento e atratividade das fêmeas aos criadouros (OMS, 2009).

1.1. Proposta

A forma mais promissora de alcançar o controle populacional do inseto vetor a longo prazo e de forma duradoura é através da mudança de comportamento da população para realização do controle doméstico do vetor (ZARA et al., 2016). Assim, é fundamental o estímulo à adesão da sociedade e efetiva participação nos programas de controle dos criadouros domésticos, de forma a prevenir a ocorrência das doenças, por meio da disponibilização de produtos de baixo custo, multifuncionais e com atividade biológica abrangente, de fácil utilização e que substituam outros já integrados nas rotinas diárias da população, como por exemplo produtos de limpeza que possuam atividade inseticida e alterem as condições dos criadouros para a reprodução do inseto alvo.

O uso dos produtos na higienização de superfícies e espaços domésticos permite, a partir do acúmulo do produto e do escoamento das águas residuais, o controle de espaços/reservatórios que possam servir de criadouros dos insetos, aumentando a disseminação

do inseticida e alcançando maior número de criadouros. Deste modo, é possível o controle do vetor, considerando aspectos ecológicos e sócio-econômicos e até o comportamento e/ou preferências da espécie vetora (ALMANZOR; HOWELL; CARVAJAL, 2016; DHAR-CHOWDHURY et al., 2016; KUMAR et al., 2016).

De acordo com a crescente preocupação ambiental, a síntese de novos produtos deve contemplar a redução do impacto ambiental, busca por intermediários da biomassa ou resíduos renováveis, emprego de tecnologias limpas, e valoração dos recursos naturais com reflexos no emprego e renda de comunidades (LENARDÃO et al., 2003; ZARA et al., 2016).

A proposta de novos inseticidas multifuncionais, como biossurfactantes ou surfactantes produzidos através da modificação de produtos da biomassa por uso de tecnologia simples e expansível, como o líquido da casca da castanha de caju (LCC), é inovadora na área industrial e da saúde, e pode contribuir para o atendimento das demandas de saúde pública por meio da aplicação dos princípios da Química Verde (FERREIRA et al., 2015; FRANCO et al., 2017; LENARDÃO et al., 2003).

De forma a avaliar e/ou prever os seus possíveis efeitos nos seres vivos, meio ambiente e conseqüentemente na saúde humana, torna-se importante a avaliação ecotoxicológica dos produtos por meio da realização de ensaios toxicológicos em diversos organismos-teste (OMS; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2010). Deste modo, o trabalho teve como objetivo a síntese de produtos multifuncionais, com atividade inseticida/larvicida e surfactante conjunta, a partir da sulfonação de lipídeos fenólicos de LCC técnico (LCCt) para controle de formas imaturas (larvas) de insetos vetores nos criadouros, e avaliação toxicológica para determinação da viabilidade da sua aplicação para o ambiente.

1.1.1. Objetivos específicos

- Preparação dos surfactantes na forma de sais sódicos de sulfonatos de LCCt e cardanol (C);
- Caracterização molecular dos produtos intermediários e sulfonados;
- Análise dos efeitos inseticidas dos surfactantes sulfonados sobre larvas de *Ae. aegypti* (linhagem Rockefeller);
- Análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CIB) dos produtos, em bactérias Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-) com vista ao controle secundário do vetor;

- Formulação de emulsões de LCCt ou cardanol e LCCt sulfonato de sódio e avaliação da atividade biológica sobre larvas de *Ae. aegypti* e bactérias Gram + e -;
- Avaliação da tensoatividade dos sulfonatos e emulsões: tensão superficial, concentração micelar crítica (CMC), tamanho médio, distribuição e carga superficial das micelas;
- Realização de ensaios ecotoxicológicos dos produtos em modelos vegetais (*Raphidocelis subcapitata* e *Allium cepa*) e animais (*Daphnia similis* e *Danio rerio*).

1.2. Estrutura da Dissertação

O **Capítulo 1** apresenta os impactos na saúde pública resultantes da transmissão de diferentes tipos virais por vetores, especificamente o mosquito *Ae. aegypti*, e os problemas enfrentados para o controle populacional e proliferação, e consequente contenção das infecções, assim como o propósito do presente estudo.

O **Capítulo 2** introduz conceitos necessários à compreensão do presente trabalho que permitem justificar as metodologias usadas no seu desenvolvimento, destacando a origem, composição e propriedades do produto industrial (LCCt) como intermediário para a síntese dos compostos propostos, constituindo deste modo a revisão de literatura.

O **Capítulo 3** apresenta a primeira parte do estudo, que inclui a descrição dos processos de síntese química dos sulfonatos de LCCt e formulação das emulsões; caracterização molecular dos produtos base e resultantes; caracterização físico-química dos sulfonatos e emulsões; e avaliação da atividade biológica dos compostos base e produtos resultantes sobre larvas de *Ae. aegypti* e bactérias Gram + e -, com vista à determinação dos potenciais surfactante e larvicida conjuntos dos produtos gerados.

O **Capítulo 4** apresenta a segunda parte do estudo, no qual são incluídos os dados de toxicidade dos produtos de maior interesse estudados no Capítulo 3, determinados por meio da realização de ensaios ecotoxicológicos usando organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos (*R. subcapitata*, *D. similis* e *D. rerio*), bem como organismos terrestres (*A. cepa*).

O **Capítulo 5** apresenta as conclusões deste estudo e possíveis desenvolvimentos futuros do projeto.

O **Apêndice A** apresenta os resultados detalhados dos ensaios de toxicidade em *R. subcapitata*, *D. similis* e *D. rerio*, que permitiram calcular as concentrações médias de inibição/efeito/letalidade para 50% dos organismos-teste apresentadas no Capítulo 4.

O **Anexo I** apresenta o pedido de patente BR 10 2017 027264 , que garante o direito exclusivo de exploração do processo de sulfonação do LCCt, bem como do seu produto, e emulsões.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Aedes aegypti* - Sobrevivência e criadouros

No seu ciclo de vida, o mosquito *Ae. aegypti* passa por quatro estágios de desenvolvimento, até se tornar inseto adulto (alado): ovo (forma terrestre), larva (quatro estágios larvais), pupa (formas aquáticas) e inseto adulto (forma terrestre). Apesar de ter um período de vida curto de, no máximo, 2 meses em laboratório, e menor tempo na natureza, a fêmea pode produzir e ovipositar até 1.500 ovos durante o período de vida como parte da estratégia de sobrevivência da espécie. Ao realizar a oviposição, estabelece um banco de ovos nas superfícies dos criadouros, permitindo a manutenção, a reposição e a perpetuação da espécie, mesmo sob condições consideradas adversas.

Ae. aegypti (Linnaeus, 1762) realiza a oviposição de forma parcelada nos criadouros para aumentar as condições de sobrevivência e estabelecimento da espécie no ecossistema. Rozeboom e colaboradores (1973) observaram que as fêmeas dispersavam seus ovos por vários sítios de reprodução (criadouros). Em cada sítio são depositados de 11 a 30 ovos por oviposição (CHADEE, 2009). Assim, as estratégias de controle de vetores devem considerar o conhecimento de aspectos reprodutivos do inseto devido à formação desse banco de ovos que permite a rápida reposição da espécie no ambiente. Deste modo, os estádios imaturos (ovos e larvas) apresentam-se como parte importante no controle populacional (CHADEE, 2009; REITER, 2007).

O criadouro deve ser viável para reprodução da espécie. A escolha dos locais de oviposição é um fator crítico para sobrevivência e dinâmica das populações e seu conhecimento é importante para o controle populacional de mosquitos. A escolha de tais locais resulta de uma complexa interação entre fatores químicos e físicos (bióticos e abióticos), que indicam grau de preferência na seleção dos criadouros e locais de oviposição (BARBOSA; SILVA, 2002; ROZEBOOM; ROSE; IKEDA, 2002).

As características físico-químicas dos habitats aquáticos dos mosquitos influenciam a taxa de sobrevivência de ovos e larvas (GETACHEW et al., 2015). Alguns fatores podem ser destacados devido à sua importância para a oviposição, tais como disponibilidade de alimento, temperatura da água; pH; oxigenação, conteúdo de amônia, de nitrato, de sulfato e de fosfato; e condutividade/sólidos dissolvidos (OLAYEMI et al., 2010; RAO et al., 2011). Após eclosão,

as larvas consomem material orgânico em decomposição, detritos e microrganismos do microambiente aquático para obtenção de nutrientes e desenvolvimento larval. O controle via cadeia alimentar, microbiota e atratividade das fêmeas aos criadouros são partes importantes de estratégias para a redução populacional da espécie. O cenário atual mostra que o tipo de recipiente, a qualidade da água e as condições físico-químicas, biológicas e nutricionais encontrados no microambiente dos criadouros são parâmetros importantes para a atração, a reprodução e a continuidade da espécie em questão (OLAYEMI et al., 2010; RAO et al., 2011).

Nos períodos chuvosos e quentes ocorre (re)infestação de insetos vetores em diferentes áreas geográficas. O clima quente e úmido produz um aumento da densidade populacional de insetos a partir da disponibilidade de criadouros, alimentos e condições favoráveis que aumentam o risco de incidência das diferentes doenças transmitidas pelos vetores, i.e. *Aedes* spp (GETACHEW et al., 2015).

Os estudos da literatura indicam que a predominância de *Ae. aegypti* numa determinada região depende das condições climáticas, tipo de criadouros e forma da dispersão da espécie. O uso de parâmetros abióticos, por exemplo, a condutividade da água de criação como índice para a proliferação de mosquitos pode ser explorado nas estratégias de controle do vetor (RAO et al., 2011). No estudo de Getachew e colaboradores (2015) observou-se que a condutividade da água com uma faixa de 162,9-616,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ apresentou correlação negativa com a densidade larval. Fillinger e colaboradores (2009) mostraram uma correlação negativa da densidade larval com a condutividade para o vetor da malária. Os valores de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ levaram a reduções significativas na densidade larval dos criadouros. Getachew e colaboradores (2015) mostraram que o pH do criadouro varia de 6,72 a 7,63, apresentando uma correlação positiva com a densidade larval. Assim, valores de pH de, no máximo, 6,5 a 8,0 permitem a sobrevivência de *Ae. aegypti* (UMAR; DON-PEDRO, 2008). Destacou-se ainda que aumentos de condutividade (salinidade) impõem à espécie condições desfavoráveis para a oviposição nos criadouros (ARDUINO; ÁVILA, 2015; GOPALAKRISHNAN et al., 2013).

Deste modo, estratégias que considerem as alterações dos parâmetros físico-químicos dos criadouros em termos de pH, condutividade, temperatura e oxigênio dissolvido (OD) podem ser usadas como ferramentas para formulação de inseticidas para o controle populacional de mosquitos. No entanto, os resultados do estudo de Arduíno e Ávila, (2015) sugerem que *Ae. aegypti* possui habilidade para reprodução em condições desfavoráveis, superando fatores limitantes para o desenvolvimento da espécie em situações extremas de

temperatura, pH, OD e condutividade, o que indica um aumento da resistência/adaptabilidade da espécie.

A estratégia de oviposição para a espécie *Aedes spp* é diferente se comparada com outras espécies de mosquitos. A literatura mostra que o estímulo à oviposição é a disponibilidade de alimentos, possivelmente sinalizada por semioquímicos da microbiota presente nos criadouros a partir da degradação de materiais orgânicos e/ou densidade de microrganismos. Estes semioquímicos são percebidos pela fêmea para a oviposição e continuidade da espécie, possivelmente, por indicarem a disponibilidade de alimentos para as larvas. Ponnusamy e colaboradores (2008, 2010, 2015) mostraram que fêmeas de *Ae. aegypti* foram atraídas pela infusão de folhas de bambu numa mistura de 14 espécies bacterianas. Estes resultados mostram que substâncias voláteis de vegetais e/ou bactérias indicam a disponibilidade de alimentos, podendo constituir atrativos para as fêmeas dos mosquitos.

Thorn, Reynolds e Greenman (2011) descrevem diferenças significativas no tipo e concentração de voláteis produzidos por diferentes bactérias cultivadas em laboratório. A partir da análise de tipos e densidades celulares específicas, pode ser avaliada a influência na atração/repulsão da espécie *Aedes spp.* pelos semioquímicos produzidos por bactérias e substâncias orgânicas (PONNUSAMY et al., 2015).

Madeira, Macharelli e Carvalho (2002) mostraram, a partir de estudos em laboratório, preferências por tipos de criadouros para a espécie *Ae. aegypti*. Os resultados apresentaram diferenças inter e intrapopulação para os criadouros escolhidos para oviposição. Observou-se também que a oviposição pode ocorrer na água quando a superfície de oviposição não permite a adesão dos ovos. No entanto, os mosquitos preferem superfícies porosas ou ásperas para a oviposição. Os ovos não submersos na maioria das vezes não eclodem, em contraste aos ovos submersos que eclodem após o estímulo da hidratação (embebimento em água)..

Mitchell-Foster e colaboradores (2012) sugeriram que novas estratégias podem ser utilizadas no controle integrado de vetores. A imposição de condições desfavoráveis aos insetos a partir dos criadouros podem contribuir para aumento da eficácia do inseticida e controle vetorial. Neste aspecto, alterações das condições físico-químicas e biológicas dos criadouros podem contribuir para aumento da eficácia de inseticidas. Inseticidas podem ser multifuncionais para um controle abrangente de forma secundária ou terciária a partir de alterações das condições dos criadouros ou da microbiota. Estratégias integradas podem considerar a imposição de situações desfavoráveis e incluir agentes biológicos ou não para as alterações *in loco*. A exposição a competidores, alterações físico-químicas e outros reduzem a

probabilidade de eclosão e sobrevivência da espécie, podendo afetar parâmetros como tempo de maturação das larvas, tamanho do adulto, densidade populacional, fecundidade, atração e viabilidade de ovos (MITCHELL-FOSTER et al., 2012).

2.2. Química Verde

A crescente preocupação ambiental, que originou o conceito de Química Verde no início da década de 90, contribuiu para o desenvolvimento de pesquisas com vista à prevenção da poluição originada na produção de compostos sintéticos, assim como à síntese de compostos mais ecológicos e seguros, por meio de processos ambientalmente corretos (FARIAS; FÁVARO, 2011; LENARDÃO et al., 2003; SOARES, 2013).

A Química Verde ou *Green Chemistry*, também conhecida por química sustentável, química limpa, química absolutamente benigna ou química auto-sustentável, foi definida inicialmente como o desenho, desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (DUA et al., 2012; LENARDÃO et al., 2003; SOARES, 2013). Deste modo, esta ideia representa a suposição de que processos químicos que geram problemas ambientais possam ser substituídos por alternativas menos poluentes ou não-poluentes (LENARDÃO et al., 2003).

Contudo, na prática, a Química Verde é atualmente adotada para uma abordagem muito mais ampla no sentido de alcançar os objetivos relativos às questões ambientais. Além do uso e produção de produtos químicos mais eficientes e com menos desperdícios, a Química Verde envolve também a redução de outros impactos, por meio da redução da quantidade de energia utilizada nos processos químicos (DUA et al., 2012).

Assim, os produtos e/ou processos da Química Verde podem ser divididos em três categorias, de acordo com a *Environmental Protection Agency* (EPA): a) uso de fontes renováveis ou recicladas de matéria-prima; b) aumento da eficiência de energia, ou utilização de menos energia para produzir a mesma ou maior quantidade de produto; c) evitar o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas (DUA et al., 2012; LENARDÃO et al., 2003).

2.2.1. 12 Princípios da Química Verde

Considerando a ideologia da Química Verde, foram definidas as principais diretrizes para a concepção de produtos ou processos químicos mais ecológicos (ANASTAS; WARNER, 1998):

1. **Prevenção:** Evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou "limpá-lo" após a sua geração;
2. **Economia de Átomos:** As metodologias de síntese devem ser desenhadas de modo a maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final;
3. **Síntese de Produtos Menos Perigosos:** Sempre que praticável, a síntese deve prever o uso e geração de substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente;
4. **Desenho de Produtos Seguros:** Os produtos químicos devem ser desenhados de modo a realizarem a função desejada e, ao mesmo tempo, minimizando a sua toxicidade;
5. **Solventes e Auxiliares mais Seguros:** O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) deve, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas;
6. **Busca pela Eficiência de Energia:** A utilização de energia pelos processos químicos deve ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos de síntese devem ser conduzidos a temperatura e pressão ambientes;
7. **Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima:** Sempre que técnica é economicamente viável, matérias-primas renováveis devem ser escolhidas em detrimento de fontes não-renováveis;
8. **Evitar a Formação de Derivados:** A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária de processos físicos/químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos;
9. **Catálise:** Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.

- 10. Desenho para a Degradação:** Os produtos químicos devem ser desenhados para, no final de sua função, se fragmentarem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente;
- 11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição:** Deverão ser desenvolvidas metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle do processo em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.
- 12. Química Intrinsecamente mais Segura para a Prevenção de Acidentes:** As substâncias e a forma como são utilizadas em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial de ocorrência de acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

2.3. Líquido da casca da castanha de caju

O cajueiro (*Anacardium Occidentale* L.) é uma planta tropical da família Anacardiceae comumente encontrada dentro da região do equador entre 23°N e 23°S, em países como Vietnã, Nigéria, Índia, Brasil, Indonésia, Costa do Marfim, Filipinas, Tanzânia, Guiné-Bissau e Moçambique, e é comercialmente explorada há séculos (LOMONACO et al., 2009; PIMENTEL et al., 2009; TAIWO, 2015).

Este dá origem a um fruto duro e oleaginoso, de cor cinza esverdeada, a castanha de caju. A castanha é constituída por concha externa, concha interna e semente. Entre os invólucros interior e exterior encontra-se uma matriz macia tipo favo de mel que contém um líquido castanho escuro, de consistência viscosa, conhecido como líquido da casca da castanha de caju (LCC). Este constitui cerca de 20-25% do peso do fruto e apresenta-se como uma importante fonte natural de fenóis lipídicos de cadeia longa insaturados, sendo obtido como subproduto da indústria do caju (PIMENTEL et al., 2009; TAIWO, 2015).

2.3.1. Extração, classificação e constituição

Dependendo do modo de obtenção/extração, o LCC é classificado em LCC natural, se extraído da castanha de caju por uso de solventes, pressão e baixa temperatura, para evitar a descarboxilação do ácido anacárdico, e LCC técnico (LCCt) (forma degradada do LCC natural, rico em cardanol), obtido no processamento industrial da castanha de caju, através de tostagem a 180-190°C (LOMONACO et al., 2009). No aquecimento ocorre a descarboxilação do ácido

anacárdico resultando em cardanol. Este constitui o subproduto mais abundante e pouco valorizado na cadeia de produção de caju, onde cada tonelada de fruta gera 215 kg de nozes, 125 kg de LCCt e os restantes 54% representam o bolo residual usado como combustível para caldeiras (OLIVEIRA, 2014; PIMENTEL et al., 2009; VASAPOLLO et al., 2011). O LCCt é produzido e disponibilizado em grandes quantidades, na ordem das centenas de toneladas por ano (LOMONACO et al., 2009).

O LCC contém fenóis lipídicos como ácido anacárdico, cardol, cardanol e metilcardol, apresentando-se em diferentes proporções para LCC natural e LCCt. As variações dependem da fonte e condições de extração como temperatura e pressão. Os fenóis lipídicos são moléculas com estruturas apolares pendentes saturadas e insaturadas (monoenois, dienois e trienois) (DOURADO et al., 2015; KUMAR et al., 2002; LOMONACO et al., 2009; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009) (**Figura 1 e Tabela 1**).

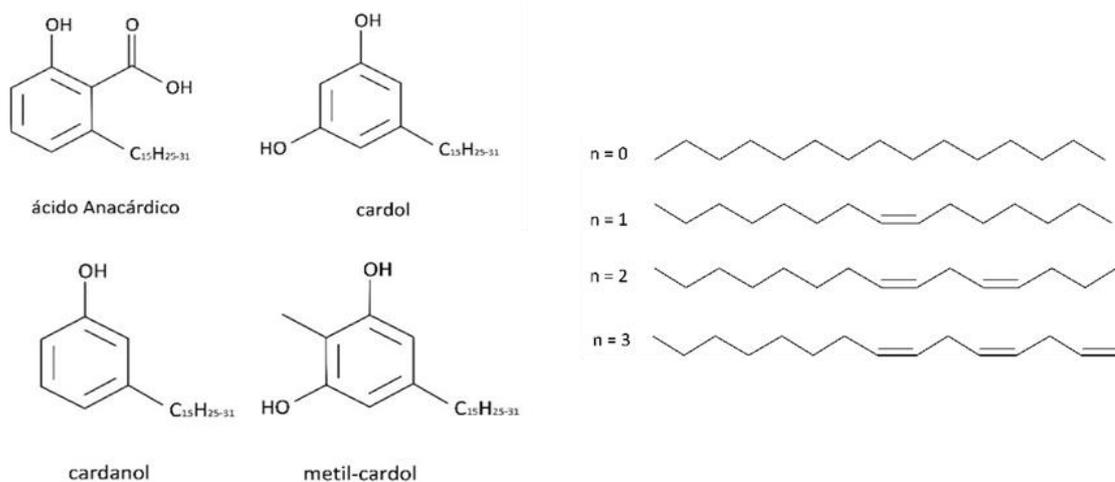


Figura 1. Principais constituintes do LCC natural e LCC técnico.

Tabela 1. Comparação da composição do LCC natural e do LCC técnico em fenóis lipídicos (KUMAR et al., 2002).

Constituinte	LCC natural (%)	LCC técnico (%)
Ácido anacárdico	60 a 65%	1 a 2%
Cardanol	10	60 a 65%
Metilcardol	Traços	10%
Cardol	15 a 20%	15 a 20%
Material polimérico	-	10%

2.3.2 Propriedades e aplicações

O LCC e produtos derivados apresentam propriedades que os tornam únicos para diversas aplicações. O aspecto mais atraente do LCC como material de partida é o seu baixo custo. O LCC e, em particular, o cardanol, seu maior constituinte, pela sua estrutura química, podem participar em um grande número de reações como sulfonação, polimerização, descarboxilação, hidrogenação, halogenação (C., 2007).

Os polímeros de LCC apresentam grande flexibilidade devido à plastificação resultante da presença da cadeia lateral longa, que proporciona também resistência à água. É compatível com uma ampla variedade de polímeros, e a sua pronta solubilidade em uma série de solventes comuns faz com que seja uma escolha natural para um grande número de aplicações em revestimentos de superfície. Por isso, o LCC é utilizado para muitas aplicações industriais como a fabricação de tintas, vernizes, isolantes, colas, resinas, materiais de fricção da indústria automobilística (C., 2007).

As suas propriedades biológicas possibilitam também a formulação de produtos de ação biológica/farmacêuticos como bactericidas, fungicidas e inseticidas. O LCC possui propriedades antioxidantes devidas aos seus compostos fenólicos naturais (LOMONACO et al., 2009; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES FILHO, 2010; STASIUK; BARTOSIEWICZ; KOZUBEK, 2008).

2.3.2. Atividade inseticida e antimicrobiana

As plantas apresentam-se como fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas sintetizadas pelas reações que constituem o seu metabolismo em resposta a ataques de agentes patogênicos. Estes produtos podem ser macromoléculas, como os glicídios e os lipídeos, ou micromoléculas como os terpenóides, alcalóides, fenóis e glicosídeos (GUISSENI et al., 2013). Esta interação entre plantas e predadores naturais constitui a base para o estudo de novas substâncias ativas com propriedades inseticidas e antimicrobianas para formulação de produtos comerciais alternativos (BRAZ FILHO, 2010).

Deste modo, e também devido à sua disponibilidade como resíduos industriais e/ou subprodutos, os LCCs natural e técnico e seus fenóis lipídicos são estudados para a síntese de novos inseticidas mais eficientes, seletivos, biodegradáveis, econômicos e de reduzido impacto ambiental, procurando maior segurança para a população, e tendo em vista o controle

populacional de insetos vetores e redução da incidência de doenças como febre amarela, dengue, chikungunya e zica (VANI et al., 2018).

Estudos previamente realizados e disponíveis na literatura comprovam a atividade inseticida/larvicida do LCC natural (DOURADO et al., 2015; GUISSONI et al., 2013) e LCCt, bem como cardanol e cardol (LOMONACO et al., 2009) para controle de *Ae. aegypti*. Lomonaco e colaboradores (2009) mostraram que as insaturações são responsáveis pela lipossolubilidade, permeação da membrana celular e aumento da toxicidade dos compostos fenólicos, fatores determinantes para a atividade larvicida. Paiva e colaboradores (2017) reiteram a importância das insaturações, bem como da realização de modificações estruturais nos fenóis lipídicos para a potencialização da atividade inseticida.

Adicionalmente, o LCC apresenta atividade antimicrobiana (GONÇALVES, 2007; KUBO et al., 1993; LIMA; PASTORE; LIMA, 2000; PARASA et al., 2011). Esta ação antibiótica pode estar associada ao caráter anfipático dos fenóis lipídicos constituintes do LCC (DÍAZ et al., 2015; LIMA; PASTORE; LIMA, 2000). Os LCCs apresentam afinidade às bicamadas lipídicas das membranas bacterianas devido à interação dos grupos hidroxila do anel aromático com fosfolipídeos, enquanto as cadeias alquílicas potenciam a solubilidade das porções fenólicas nas regiões lipídicas das células. Os fenóis lipídicos, já incorporados nas membranas celulares, interagem e alteram intensamente as interações intermoleculares com as proteínas, aumentando a permeabilidade e permitindo o extravasamento do citoplasma e constituintes celulares. O grupo hidroxila reage com o sítio ativo das enzimas, formando ligações de hidrogênio, inibindo as atividades dos microrganismos (DÍAZ et al., 2015; LIMA; PASTORE; LIMA, 2000).

Além disso, o LCC possui capacidade de complexar o ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^{2+}), que participam nos processos de respiração celular e metabolismo energético, reduzindo a sua biodisponibilidade para os microrganismos e alterando rotas metabólicas vitais, o que provoca a sua morte (DÍAZ et al., 2015; TSUJIMOTO et al., 2007).

As alterações dos parâmetros físico-químicos e biológicos do meio aquático de reprodução dos insetos (criadouros) podem ser conseguidas pelo LCCt, cardanol e outros produtos derivados do LCCt. Estas moléculas interferem na cadeia alimentar, contaminando e alterando a qualidade/disponibilidade de alimento nos criadouros, como matéria orgânica e microrganismos, entre outros efeitos adversos, e até reduzindo a atratividade das fêmeas aos criadouros para oviposição devido à interferência sobre a produção de substâncias voláteis

atrativas pela microbiota dos criadouros (ARRUDA et al., 2011; DAVID et al., 2016; RODRIGUES, 2009).

A literatura sugere que a microbiota intestinal das larvas do mosquito pode contribuir para a digestão de sangue no inseto, apresentando-se também como um componente chave da competência do vetor, uma vez que as bactérias intestinais podem perturbar o desenvolvimento de patógenos (DAVID et al., 2016; RODRIGUES, 2009). Estes fatores podem ser explorados para a formulação de novas estratégias de controle de vetores e arbovíroses.

2.3.3. *Sulfonação e tensoatividade*

A síntese de surfactantes derivados de LCC é uma área em expansão e resulta da necessidade da substituição dos surfactantes atuais, particularmente o nonilfenol, altamente tóxico, por outros mais sustentáveis (SOARES, 2013; TYMAN; BRUCE, 2004). O LCC e derivados constituem intermediários naturais para sulfonação e etoxilação. Estes apresentam estrutura similar aos produtos utilizados para a produção de surfactantes de origem petroquímica, como o dodecilbenzeno sulfonato que é o surfactante mais utilizado atualmente para limpeza doméstica e higiene pessoal; e o nonilfenol etoxilado, com menor utilização e restrições nas formulações para uso doméstico, mas ainda muito utilizado nas formulações industriais (PEUNGJITTON et al., 2009; SOARES, 2013; TYMAN; BRUCE, 2004).

O processo de sulfonação consiste na introdução de trióxido de enxofre (SO_3) em um composto orgânico por meio da formação da ligação carbono-enxofre, sendo a sua principal característica a formação de compostos estáveis de ácidos alquil-sulfônicos com propriedades surfactantes (ORTEGA, 2012). Os constituintes do LCC apresentam uma estrutura lipídica com um grupo hidrocarboneto hidrofóbico e um grupo fenólico final. Deste modo, os produtos obtidos a partir da sulfonação do anel aromático destes compostos terão propriedades surfactantes similares ao dodecilbenzeno sulfonato de sódio (PEUNGJITTON et al., 2009).

Assim, e acompanhando a crescente preocupação com a contaminação ambiental resultante dos surfactantes de origem petroquímica, o LCC técnico e cardanol apresentam-se como produtos “verdes” passíveis de substituir os derivados petroquímicos com desempenho equivalente (PEUNGJITTON et al., 2009; SOARES, 2013), podendo ser propostos como intermediários para sulfonação e formulação de produtos domésticos multifuncionais que apresentem tensoatividade e atividade biológica (inseticida/larvicida/antimicrobiana) conjunta.

2.4. Surfactantes

Surfactantes “ (...) são substâncias que pela sua estrutura e propriedades têm capacidade de reduzir as tensões interfaciais e superficiais dos líquidos onde se encontram” (PENTEADO; SEOUD; CARVALHO, 2006). Estes, também denominados de tensoativos, são moléculas anfipáticas contendo uma porção apolar hidrofóbica, solúvel em óleo, e uma porção polar hidrofílica, que se dissolve em água, conforme representado na **figura 2** (BARÇANTE, 2016; DALTIM, 2011).



Figura 2. Representação da estrutura de um surfactante.

Devido à presença das duas porções distintas, o surfactante em presença de água e óleo adsorve-se nas interfaces e tende a posicionar-se de maneira a que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o grupo apolar para a fase oleosa, formando um filme molecular ordenado nas interfaces, reduzindo as tensões interfacial e superficial. A parte apolar, cadeia constituída por 8 a 18 átomos de carbono, não forma polos de concentração de carga eletrostática, ao contrário da parte polar que deve ser formada por alguns átomos que apresentem concentração de carga, podendo ser iônica ou não-iônica. Esta característica é responsável pela solubilidade da molécula surfactante em água, pois as cargas (negativas ou positivas) apresentam atração eletrostática pelas moléculas de água vizinhas, já que estas possuem cargas negativa e positiva na mesma molécula (FELIX, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002; ROSSI et al., 2006).

De acordo com as suas características físico-químicas, os surfactantes podem atuar como detergentes, emulsificantes, dispersantes, solubilizantes ou agentes de flotação. Atualmente, detêm um vasto campo de aplicação, sendo utilizados nas áreas biológica, farmacológica, cosmética, têxtil, indústria petroquímica, extração de metais, e como lubrificantes e inibidores de corrosão (NITSCHKE; PASTORE, 2002; ROSSI et al., 2006; SOARES, 2013).

2.4.1. Classificação dos surfactantes

Os surfactantes podem ser classificados em diversos tipos, de acordo com as propriedades do seu grupo polar (DALTIM, 2011; ROSSI et al., 2006):

- **Surfactantes iônicos:** apresentam cargas elétricas na parte hidrofílica da sua estrutura. Ao se dissociarem da água, formam íons, sendo designados por:
 - Aniônicos, se a carga for negativa, tendo origem em gorduras animais ou óleos vegetais, sendo os mais conhecidos os alquil alcanoatos (sabões) e os compostos sulfonados e sulfatados (dodezilbenzeno sulfonato de sódio);
 - Catiônicos, se a carga for positiva, destacando-se os sais de amônio quaternários;

Geralmente, os surfactantes catiônicos (+) são menos solúveis em água do que os surfactantes aniônicos (-), e ambos não podem ser misturados devido ao risco de neutralização, gerando um composto sem cargas e desse modo, insolúvel em água.

- **Surfactantes não-iônicos:** não apresentam cargas elétricas na sua estrutura. A sua solubilidade é devida à presença de grupos funcionais com afinidade à água nas suas moléculas, sendo que quanto maior o número de moléculas anexadas, maior será a polaridade da molécula final e maior será a sua solubilidade. Assim, são compatíveis com a maioria dos surfactantes, havendo uma grande procura destes pelas indústrias químicas. São exemplos destes os surfactantes etoxilados (nonilfenol etoxilado) e ésteres graxos.
- **Surfactantes anfóteros:** podem comportar-se como aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH da solução. Comportam-se como surfactantes aniônicos em meio alcalino e como surfactantes catiônicos em meio ácido. Normalmente, são compatíveis com todas as outras classes de surfactantes, constituindo exemplos destes os aminoácidos e as betaínas.

2.4.2. Propriedades funcionais

2.4.2.1. Tensão superficial

Uma molécula de água tem diversas moléculas vizinhas que a atraem. Deste modo, a soma vetorial das forças de atração tem uma resultante nula, já que ela se encontra completamente rodeada de moléculas. No entanto, a ausência de moléculas de água acima da superfície capazes de exercer a mesma força de atração que as moléculas abaixo exercem sobre estas faz com que essa força puxe permanentemente as moléculas de água da superfície para dentro do líquido (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; DALTIM, 2011).

Os movimentos do líquido que permitem um aumento da superfície, como a formação de uma gota em um conta-gotas, originam um número maior de moléculas do meio que devem ir para a superfície, região de maior energia, contrariamente à força exercida. Assim, verifica-se a tendência para a redução do número de moléculas que estão na superfície e, portanto, para que a área superficial do líquido seja a mínima possível, fazendo com que as forças superficiais se tornem menores e o sistema mais estável. Por isso, pequenas gotas de líquidos tendem ao formato esférico na tentativa de minimizar a área superficial em respeito a seu volume (DALTIM, 2011).

A força que deve ser vencida para o aumento de uma superfície líquida é designada por tensão superficial. Denomina-se, assim, tensão superficial ou interfacial (líquido-líquido ou líquido-gás) o efeito das forças coesivas entre moléculas de água, permitindo que estas permaneçam unidas. Deste modo, compostos com forças de atração intermoleculares mais altas apresentam maior tensão superficial (FELIX, 2012).

A tensão superficial verifica-se através da assimetria de atração das moléculas da superfície ou interface. Quando o volume de líquido é grande, o número de moléculas na superfície é muito pequeno comparativamente com o total de moléculas. Deste modo, a tensão superficial não tem grande influência no comportamento de volumes maiores de líquido. No entanto, em volumes pequenos, como uma gota, é uma propriedade muito importante, determinando inclusive o seu tamanho. Ao ser formada, uma gota de água não cai de imediato devido às forças de atração entre as moléculas de água da gota e às que permanecem no conta-gotas. À medida que se aumenta o volume da gota, o peso resultante da massa também aumenta, até ao ponto em que a força peso excede a força de atração das moléculas e a gota cai. Quanto maiores as forças de atração entre as moléculas do líquido, maior deverá ser o tamanho da gota para que ela se destaque do conta-gotas (DALTIM, 2011).

Os surfactantes constituem agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema por meio da substituição das moléculas de alta energia na interface, diminuindo deste modo a tensão superficial e interfacial dos líquidos e, permitindo alterar e/ou facilitar estas interações de espécies/sistemas com diferenças moleculares (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; DALTIM, 2011). A tensão superficial é também afetada pela temperatura. Quanto maior a temperatura, mais fraca é a interação entre os átomos e, portanto, menor é a tensão superficial (DALTIM, 2011).

2.4.2.2. Formação de micelas e Concentração Micelar Crítica

Um surfactante, por apresentar características hidrofílica e lipofílica na mesma molécula, nunca apresenta total estabilidade na sua dissolução, quer em meio polar (água) ou apolar (óleo). É essa instabilidade que proporciona aos surfactantes características diferenciadas dos outros compostos (DALTIM, 2011).

Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a capacidade de formação de agregados/micelas que funcionam como sistemas/reservatórios nano ou microparticulados. Quando se adicionam à água pequenas quantidades de um surfactante, uma parte é dissolvida como monômero e outra parte forma uma monocamada na interface ar-água, na qual as moléculas surfactantes se posicionam perpendicularmente às superfícies, estabilizando e fixando-se na superfície, e tendendo a não regressar ao interior da solução. Deste modo, a cada concentração de monômero corresponde uma tensão superficial característica. À medida que a concentração de surfactante aumenta em um sistema e, portanto, a concentração de monômero atinge um valor crítico, deixam de haver espaços livres na superfície, atingindo o limite de redução da tensão superficial e permitindo o aumento da concentração de surfactante livre no meio. Através do seu movimento livre dentro da solução, as moléculas de surfactante encontram-se e, devido à afinidade entre partes apolares ou partes polares, dependendo da sua afinidade com o meio, existe a tendência dessas moléculas se agruparem, formando micelas (**Figura 3**) (DALTIM, 2011; ROSSI et al., 2006; TADROS, 2013)). As micelas constituem compostos estáveis do ponto de vista termodinâmico e são facilmente reproduzíveis, formando-se geralmente a baixas concentrações em água (FELIX, 2012).

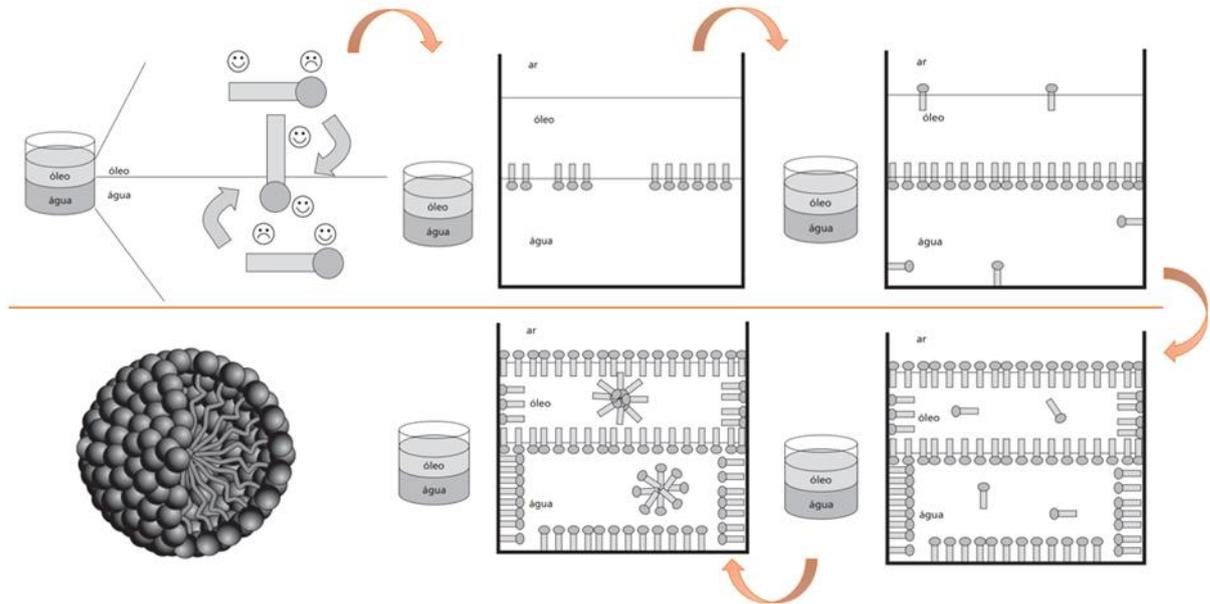


Figura 3. Processo de formação e auto-organização da micela (DALTIM, 2011).

Essas micelas crescem e se organizam em diferentes formas geométricas, pois são mais estáveis que os surfactantes livres em solução. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas é designada por concentração micelar crítica (CMC) que pode ser avaliada a partir de abruptas alterações/mudanças dos sistemas (**Figura 4**). Em solução aquosa, as moléculas de surfactante agregam-se em forma de esfera, com as partes hidrofóbicas (caudas) viradas para o interior e as partes hidrofílicas (cabeças) para o exterior (**Figura 3**) (DALTIM, 2011; FELIX, 2012; TADROS, 2013)). Experimentalmente, a CMC pode ser determinada por meio de algumas propriedades físicas em solução, como tensão superficial, condutividade, pressão osmótica e detergência (ROSSI et al., 2006).

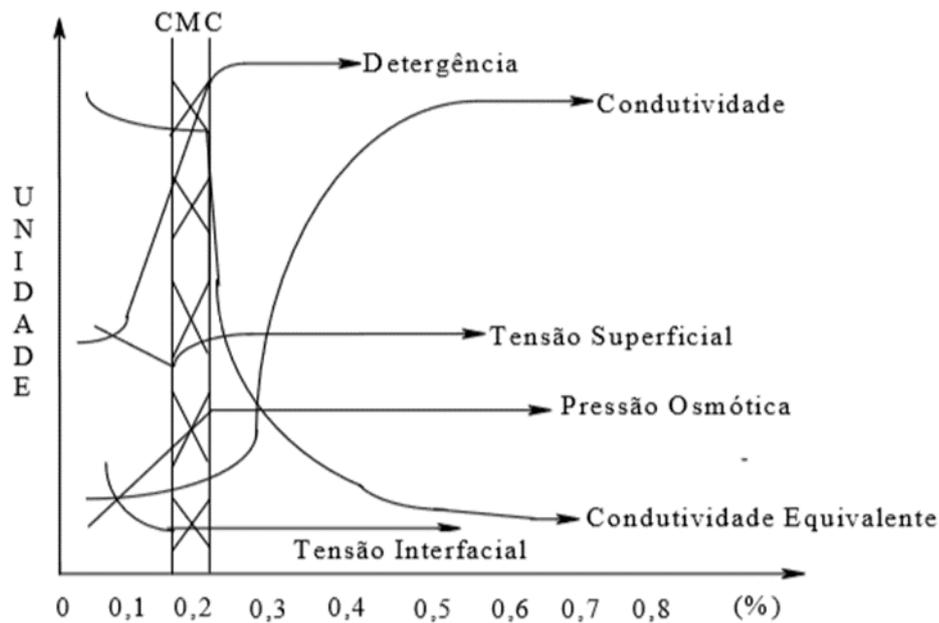


Figura 4. Representação gráfica das propriedades físicas de um tensoativo para determinação da CMC (ROSSI et al., 2006).

Se novos espaços em superfícies forem disponibilizados, as micelas serão preteridas pelos surfactantes em detrimento da organização nas superfícies (DALTIM, 2011).

Assim, a eficiência, medida através da CMC, e a efetividade, relacionada com as tensões superficiais e interfaciais, são as características fundamentais que determinam a performance de um surfactante. Tais propriedades conferem aos surfactantes diferentes aplicações envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BARROS et al., 2007; FELIX, 2012).

2.5. Emulsões

Uma das principais aplicações dos surfactantes é a preparação de emulsões. Estas são dispersões constituídas por duas fases líquidas imiscíveis ou parcialmente miscíveis, que são misturadas usando cisalhamento mecânico e pelo menos um surfactante. Uma fase do sistema é apolar, geralmente composta por hidrocarbonetos, também chamada de óleo ou fase oleosa; e outra polar, normalmente constituída por água, chamada de fase aquosa (ALMEIDA, 2014; KALE; DEORE, 2017). A fase dispersa, também conhecida como fase interna ou discreta é fragmentada em gotículas dentro de uma fase contínua ou externa. As emulsões são

termodinamicamente instáveis. Com o tempo, o tamanho das partículas de uma emulsão convencional aumenta continuamente, ocorrendo assim separação das fases (KALE; DEORE, 2017).

De acordo com a **figura 5**, as emulsões podem ser classificadas segundo a natureza das fases no sistema, existindo dois tipos principais: 1) óleo em água (O/A, em inglês O/W): fase oleosa (gotas de óleo) dispersa na fase aquosa; e 2) água em óleo (A/O, em inglês W/O): fase aquosa dispersa na fase oleosa. Além destas mais simples, existem também emulsões múltiplas, que podem ser do tipo água em óleo em água (A/O/A, em inglês W/O/W) e óleo em água em óleo (O/A/O, em inglês O/W/O) (ALMEIDA, 2014; BARÇANTE, 2016; KALE; DEORE, 2017; SCHRAMM, 2006).

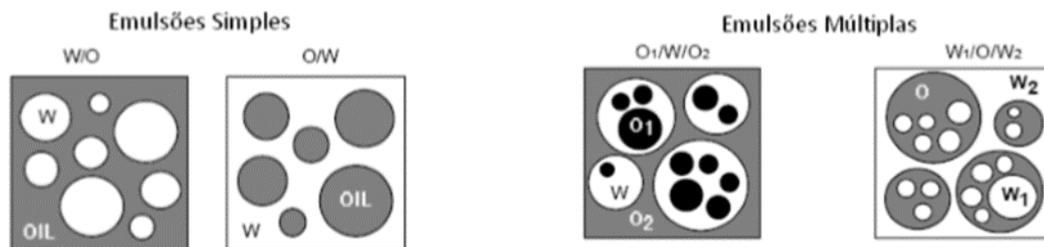


Figura 5. Representação dos tipos de emulsões de acordo com a dispersão das fases (ALMEIDA, 2014).

Segundo Gupta e colaboradores (2016) e Kale e Deore (2017), as emulsões podem ser classificadas em macroemulsões, microemulsões ou nanoemulsões, dependendo de diversos parâmetros como turbidez, tamanho das partículas, métodos de preparação ou estabilidade.

A microemulsão é uma mistura líquida transparente que incorpora partículas muito pequenas, de dimensões nanométricas, comparativamente com as emulsões convencionais ou macroemulsões. A IUPAC define microemulsão como a dispersão de água, óleo e um ou mais surfactantes, constituindo um sistema isotrópico e termodinamicamente estável com diâmetro de domínio disperso variando aproximadamente entre 1 e 100 nm, geralmente 10 a 50 nm. As nanoemulsões são muito semelhantes às microemulsões, constituindo dispersões de partículas nanométricas, mas obtidas por meio da aplicação de forças mecânicas, ao contrário das nanoemulsões que se formam espontaneamente. Na **tabela 2** são apresentadas as diferenças entre este tipo de emulsões:

Tabela 2. Diferenças entre macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões (Adaptada de Kale e Deore (2017)).

<u>Parâmetros</u>	<u>Macroemulsão</u>	<u>Microemulsão</u>	<u>Nanoemulsão</u>
<u>Aparência</u>	Turbida	Transparente	Transparente
<u>Tamanho das partículas</u>	1-20 μm	1-100 nm	1-100 nm
<u>Formação</u>	Cisalhamento mecânico	Formação espontânea	Cisalhamento mecânico Emulsificação de alta energia: <ul style="list-style-type: none"> • Homogeneização de alta pressão • Microfluidização • Ultrasonicação
<u>Métodos de preparação</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Método da goma seca • Método da goma molhada • Método do sabão <i>in situ</i> • Método mecânico 	<ul style="list-style-type: none"> • Método de titulação de fase • Método de inversão de fase por temperatura 	Emulsificação de baixa energia: <ul style="list-style-type: none"> • Método de inversão de fase por temperatura • Técnica de evaporação do solvente • Método de inversão de fase por composição • Emulsificação espontânea
<u>Concentração de surfactante</u>	Alta	Alta (20% do peso)	Baixa (3-10% do peso)
<u>Estabilidade</u>	Termodinamicamente instável, cineticamente estável	Termodinamicamente estável, prazo de validade longo	Cineticamente estável/metaestável, termodinamicamente instável
<u>Fases</u>	Bifásica	Monofásica	Monofásica
<u>Tensão Interfacial</u>	Alta	Muito baixa	Muito baixa (menos de 10 dyn cm^{-1})
<u>Dispersão de luz</u>	Menos dispersão	Forte Dispersão múltipla de luz visível	Forte Dispersão múltipla de luz visível
<u>Vantagens</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Solubiliza substâncias hidrófobas ou solúveis em óleo • Aumenta a absorção de medicamentos • Aumenta a absorção tópica de medicamentos 	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de preparar e ampliar devido à capacidade de formação espontânea • Aumento da taxa de absorção e biodisponibilidade, eliminando variações interferentes 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhora a solubilidade em água e a biodisponibilidade final de medicamentos lipofílicos • Melhor forma de dosagem para incorporar medicamentos ativos causadores de irritação GIT Melhor forma de

<p><u>Desvantagens</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mascara o sabor e odor de medicamentos em desacordo • Aumenta a palatabilidade de óleos nutritivos • Menos estável em comparação com outras formas de dosagem • Vida útil reduzida • Problemas de estabilidade durante o armazenamento 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhora a solubilidade de medicamentos lipofílicos • Termodinamicamente mais estável e, portanto, adequada para uso a longo prazo • Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de produtos • Melhor sistema para minimizar o metabolismo de primeira passagem • Uso de quantidade excessiva de surfactante e co-surfactante aumenta o custo • Concentração excessiva de surfactantes pode levar a toxicidade para as mucosas 	<p>dosagem para incorporar medicamentos propensos à degradação mediada pelo metabolismo de primeira passagem</p> <ul style="list-style-type: none"> • Problemas de estabilidade raramente observados • Alto custo de produção
----------------------------	--	--	---

2.5.1. *Preparo de emulsões e importância da formulação*

De acordo com Salager (2000) a criação de um sistema emulsionado envolve diversas opções e ações. Estas podem ser classificadas em três categorias consoante o tipo de variáveis tratadas. As duas primeiras referem-se à escolha dos compostos a utilizar na emulsão e à quantidade de cada um, enquanto a terceira está relacionada à metodologia a usar para o preparo da emulsão (SALAGER, 2000).

Primeiramente, deve ser considerada a natureza das substâncias que irão constituir a emulsão: óleo, água e emulsionante. Geralmente, nenhuma destas substâncias será pura, mas sim uma mistura, mais ou menos complexa. Estas variáveis, designadas de variações de campo ou de formulação, bem como temperatura e pressão, constituem as variáveis físico-químicas intensivas que definem as condições de equilíbrio termodinâmico do sistema por meio da igualdade dos potenciais químicos (SALAGER, 2000).

A segunda escolha refere-se às variáveis de composição, que definem as quantidades relativas das diferentes substâncias envolvidas no sistema. Duas variáveis de composição independentes são suficientes em um sistema ternário surfactante-óleo-água, uma vez que a terceira é a que completa 100%. A concentração ou proporção de surfactante e a relação óleo-água são, normalmente, as variáveis independentes selecionadas. Na generalidade dos casos

práticos, estão envolvidos mais de três componentes no sistema. Contudo, o ternário básico constitui a maioria da sua massa ou volume, pelo que aditivos de menor representatividade podem não ser considerados na composição geral, apesar de poderem alterar totalmente o comportamento da fase (SALAGER, 2000).

Por último, considera-se a escolha do protocolo de emulsão, dependendo do grau das características de não-equilíbrio apresentadas. De acordo com o tipo de emulsão pretendida (**tabela 2**), existem diversos métodos que possibilitam a sua preparação, com variações na temperatura de preparo, métodos e velocidade de agitação e/ou cisalhamento, e ordem de adição dos constituintes (KALE; DEORE, 2017).

2.5.2. Estabilidade da Emulsão

A estabilidade de uma emulsão está relacionada com a persistência ou decaimento do sistema disperso sob determinadas circunstâncias e constitui o ponto mais crítico de uma emulsão (ALMEIDA, 2014). Esta pode ser influenciada por diversos fatores: viscosidade, tamanho da gota, relação volumétrica da fase, temperatura, pH, envelhecimento da emulsão, tipo do emulsificante presente, diferença de densidade e agitação (ALMEIDA, 2014; SALAGER, 2000). A estabilidade termodinâmica de uma emulsão depende do equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas da partícula. Isto é, forças atrativas tendem a desestabilizar uma emulsão, enquanto que as forças repulsivas (repulsão eletrostática entre duas camadas elétricas de sinal similar) estabilizariam a emulsão, mantendo as gotículas separadas (KINYANJUI; ARTZ; MAHUNGU, 2003). Segundo Daltin (2011), também a diferença da densidade entre as fases e a diferença entre a viscosidade da fase externa e interna podem contribuir para a separação de fases da emulsão.

O percentual da fase dispersa, alta resistência mecânica e elástica da interface, alta solubilidade do surfactante na fase contínua (Lei de Bancroft), alto potencial Zeta e estreita distribuição do tamanho de gotas são parâmetros que contribuem para a estabilidade das emulsões. Além disso, aumentar a temperatura da emulsão geralmente acelera o seu processo de quebra (DALTIM, 2011).

2.6. Avaliação Ecotoxicológica

Um inseticida, ou qualquer produto químico, antes de ser aprovado e disponibilizado no mercado, deve ser avaliado quanto ao perigo para organismos não-alvo. Esta avaliação tem como objetivo garantir que não haja mudanças significativas a longo prazo para a população nem para a função do ecossistema, assim como efeitos a curto prazo, como mortalidade, através da caracterização da natureza e magnitude dos perigos para a saúde humana e receptores ecológicos, derivados da exposição a contaminantes químicos ou outros estressores ambientais (substância ativa e/ou metabolitos) (OMS; FAO, 2010).

Deste modo, agências governamentais de diversos países e organizações internacionais, como a Agência Europeia do Ambiente (AEA), a Agência Americana de Proteção do Ambiente (em inglês, USEPA), a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, em inglês OECD), a Sociedade de Ecotoxicologia Ambiental e Química (em inglês, SETAC) ou o Executivo Britânico de Segurança e Saúde (em inglês, UK HSE), estão ativamente envolvidas no desenvolvimento de metodologias para a avaliação de riscos ecológicos (FAIRMAN et al., 1998).

Os perigos ecológicos das substâncias podem ser identificados através da observação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade destas, utilizando diversos métodos: estudo das exposições acidentais a uma substância decorrentes, por exemplo, de descargas, derramamentos e/ou vazamentos de produtos tóxicos na atmosfera, cursos de água e solo; estudos *in vitro* usando células/linhagens de células, e exposição *in vivo* em animais/plantas experimentais (PARASURAMAN, 2011). A toxicidade de uma substância depende não só da sua natureza mas de fatores físico-químicos como temperatura, pH, salinidade, bem como do organismo-teste utilizado, concentração da substância, tempo de exposição e condições de realização do teste (ROZMAN; DOULL; HAYES JR., 2010).

Os organismos-teste devem apresentar sensibilidade constante a diversos agentes tóxicos. Para a realização dos ensaios, é fundamental reunir conhecimentos sobre os aspectos biológicos da espécie, como hábitos alimentares, reprodução, fisiologia e comportamento. Idealmente, os organismos devem apresentar pequenas dimensões e ciclos de vida não muito longos (BERTOLETTI; DOMINGUES, 2006; RAND; PETROCELLI, 1985). Alguns dos critérios principais para a escolha de um organismo-teste são a facilidade de manuseio e obtenção, sua ampla disseminação, bem como a sua importância na cadeia alimentar. Recomenda-se que sejam utilizados nos ensaios ecotoxicológicos organismos de três níveis

tróficos distintos, uma vez que nenhuma espécie isolada indica adequadamente o tipo de distúrbios ou estresse em todos os ambientes (BERTOLETTI; DOMINGUES, 2006; HOLT; MILLER, 2010).

Os ecossistemas naturais são complexos e consistem em muitos extratos/camadas de organismos que interagem. O dano a qualquer um desses organismos pode ter impacto em todo o ecossistema (FAO, 2010). Assim, dentre os ensaios ecotoxicológicos disponíveis para avaliação dos efeitos de novas substâncias no ambiente destacam-se os seguintes, compreendendo ambiente aquático e terrestre, e diferentes níveis tróficos: ensaio de inibição de crescimento algal em *R. subcapitata*, ensaio de toxicidade aguda em *D. similis* e *D. rerio*, e teste de fitotoxicidade com *A. cepa*.

2.6.1. Toxicidade aguda e crônica

O teste de toxicidade aguda é realizado para determinar o efeito/resposta de uma única dose/concentração de um químico particular numa espécie específica, devendo sempre ser realizado com pelo menos duas espécies diferentes. Neste, os organismos são expostos a concentrações elevadas do agente tóxico por um período de tempo curto relativamente ao seu ciclo de vida, geralmente de dois a sete dias (PARASURAMAN, 2011; RAND; PETROCELLI, 1985; VAN LEEUWEN; VERMEIRE, 2007; VOSYLIENĖ, 2007).

A ausência de movimento apresenta-se como o critério de mortalidade. Esta é expressa em concentração letal média (CL₅₀) ou concentração efetiva média (CE₅₀), ou seja, a dose estimada do produto em investigação que mata ou imobiliza 50% da população do teste ao longo do período de tempo definido (PARASURAMAN, 2011; RAND; PETROCELLI, 1985; VAN LEEUWEN; VERMEIRE, 2007).

No teste de toxicidade crônica, os organismos são expostos a baixas concentrações de agente tóxico por um longo período de tempo, envolvendo desde 1/10 do ciclo vital até à totalidade da vida do organismo, ou mesmo várias gerações, tornando-se mais complexos. O seu objetivo é determinar a concentração de um produto que produz um efeito adverso num grupo de organismos durante um longo período de tempo sob condições controladas. Em geral, estes testes são realizados com organismos de diferentes estágios de desenvolvimento, particularmente os mais sensíveis, como embriões, larvas ou jovens (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; RAND; PETROCELLI, 1985; VOSYLIENĖ, 2007).

Geralmente, os efeitos são subletais e são observados em concentrações de produto e tempo de exposição que permitem a sobrevivência dos organismos, mas afetam as suas funções biológicas, alterando o crescimento, desenvolvimento, eclosão, reprodução e vitalidade da prole, comportamento dos indivíduos, parâmetros fisiológicos ou histológicos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; VOSYLIENĖ, 2007).

Desta forma, é possível calcular a concentração de inibição média (CI₅₀), isto é, a dose estimada do produto que inibe 50% dos organismos teste, e a maior concentração que não provoca efeito deletério na sobrevivência e reprodução dos organismos (concentração de efeito não observado – CENO) (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB), 1991; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), 2002; VAN LEEUWEN; VERMEIRE, 2007; VOSYLIENĖ, 2007).

Os efeitos crônicos são mais frequentes do que os agudos, principalmente devido a dois fatores: acumulação do agente tóxico no organismo, que ocorre quando a quantidade eliminada é inferior à quantidade absorvida, aumentando progressivamente a concentração do agente no organismo; e/ou adição dos efeitos ocasionados por exposições repetidas, sem que ocorra a acumulação no organismo. Deste modo, os agentes tóxicos provocam efeitos adversos subletais ou até letais com o decorrer do tempo (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

2.6.1.1. *Raphidocelis subcapitata*

Um dos organismos mais recomendados para testes de toxicidade aquática são as algas, uma vez que são abundantes em ecossistemas de água doce e se apresentam como produtores primários dominantes na cadeia alimentar no ambiente aquático. Elas produzem oxigênio e substâncias orgânicas das quais a maioria das outras formas de vida dependem, fornecendo alimentos para outros organismos, incluindo peixes e invertebrados, e representando a base da cadeia alimentar (MCCORMICK; CAIRNS, 1994; OMAR, 2010; SATYAVANI et al., 2012).

As algas apresentam altas taxas de reprodução e ciclos de vida muito curtos, apresentando rápidas taxas de resposta fisiológica, o que as torna indicadores céleres e valiosos de impactos a longo prazo – toxicidade crônica. Além disso, espécies de algas exibem distribuições mais amplas entre ecossistemas e regiões geográficas. Como principais produtores, as algas são mais diretamente afetadas por fatores físicos e químicos. São sensíveis a alguns poluentes, acumulando-os facilmente, sendo o seu metabolismo também sensível à variação de distúrbios ambientais e naturais. As algas são facilmente cultivadas em laboratório

e a sua amostragem é fácil, barata e cria um impacto mínimo na biota residente (MCCORMICK; CAIRNS, 1994; OMAR, 2010).

Testes padronizados com microrganismos podem ser realizados com várias espécies de algas verdes unicelulares. Um exemplo é a microalga de água doce *R. subcapitata*, também conhecida como *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* ou *Chlorella vulgaris* (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT), 2011; BERTHET, 2015; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2006). Esta pertence à Ordem Chlorococcales, Classe Chlorophyceae, Divisão Chlorophyta e é, provavelmente, cosmopolita, sendo comum em ambientes mesotróficos a eutróficos.

2.6.1.2. *Daphnia similis*

O gênero *Daphnia* inclui microcrustáceos muito usados em testes para a avaliação da toxicidade aguda e crônica de agentes químicos e misturas complexas devido à sua grande sensibilidade para diversos contaminantes aquáticos, assim como pela sua importância nas cadeias alimentares de ambientes de água doce, pela sua facilidade de cultura e manutenção em laboratório, e reprodução partenogenética, gerando uma população constituída apenas por fêmeas geneticamente idênticas à mãe, o que permite a obtenção de organismos teste com sensibilidade constante (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004).

A *D. similis* (Claus, 1876), pertencente à Ordem Cladocera, faz parte do zooplâncton de água doce. Esta foi introduzida como organismo teste pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do CETESB e é muito similar à *Daphnia magna*, organismo já muito utilizado em ensaios toxicológicos, pertencendo ao mesmo subgrupo do subgênero *Ctenodaphnia* (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004). Estes testes são realizados segundo normas nacionais e internacionais (ABNT, 2016; OECD, 2004).

2.6.1.3. *Danio rerio*

Os peixes são animais vertebrados e representam consumidores de ordem primária, secundária e terciária. Deste modo, são utilizados como organismos-teste uma vez que permitem compreender de que forma agentes tóxicos afetam organismos de maior grau de estruturação (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Testes utilizando peixes são eficientes por

estes responderem aos tóxicos de modo similar aos grandes vertebrados, além de serem encontrados abundantemente nos ecossistemas (RAMSDORF et al., 2009).

D. rerio, conhecido como peixe-zebra ou paulistinha, pertencente à família Cyprinidae, é um dos principais organismos utilizados em diferentes áreas de pesquisa, principalmente a ecotoxicologia, genômica e toxicologia aquática (DAI et al., 2014; GRUNWALD; EISEN, 2002; GUO et al., 2017). Entre as principais características que tornam este animal atrativo para a pesquisa científica tem-se: pequeno tamanho, fácil cultivo (adaptabilidade em laboratório e baixo custo de manutenção), alta fecundidade, fácil observação (embriões transparentes), alta sensibilidade, desenvolvimento rápido (larvas eclodem 48-72h após fertilização) e genoma com alta homologia em relação ao humano (71% das proteínas humanas apresentam ortólogos em peixes-zebra). Deste modo, este modelo pode ser utilizado para prever os efeitos de agentes tóxicos em humanos (BAR-ILAN et al., 2009; HILL et al., 2005; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; ZHANG; WILLETT; FREMGEN, 2003).

Os bioensaios em *D. rerio* (zebrafish) em estado embriolarval, validados pela OECD (2013) (Protocolo nº236 - Fish Embryo Toxicity (FET) Test), avaliam a indução de malformações embrionárias e larvais, e letalidade por agentes tóxicos.

2.6.2. Testes de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade

Os vegetais são de particular interesse em ecotoxicologia devido à sua imobilidade, extensa rede de raízes e ao seu papel fundamental nos ecossistemas como produtores primários (HOCK; ELSTNER, 2005). As plantas são frequentemente utilizadas em ensaios de fitotoxicidade devido a diversos fatores: simplicidade e confiabilidade, adequação única para realização de testes com herbicidas/pesticidas, possibilidade de maior número de amostragens, baixo custo operacional e alta sensibilidade. Adicionalmente, as plantas superiores apresentam cromossomos grandes e em número reduzido, facilitando a sua visualização e permitindo a análise de efeitos genotóxicos e mutagênicos provocados por agentes tóxicos. Os resultados obtidos são passíveis de serem comparados com outros de testes realizados em mamíferos (FISKESJÖ, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009; MA et al., 1995; RANK; NIELSEN, 1997; WANG, 1991).

A citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade podem ser avaliadas recorrendo à análise da divisão celular, alterações cromossômicas e danos genéticos (formação de

micronúcleos), que representam efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; NEFIC et al., 2013).

2.6.2.1. *Allium cepa*

A. cepa, comumente designada por cebola, é um organismo-teste que tem sido muito utilizado na avaliação de danos celulares causados por xenobióticos, consistindo na exposição das raízes aos possíveis agentes genotóxicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O ensaio de *A. cepa* é considerado uma ferramenta confiável e eficaz para a previsão do impacto ambiental de substâncias químicas. Além disso, testes fitotóxicos como taxa de germinação e crescimento das raízes também demonstraram ser importantes ferramentas na avaliação de impactos toxicológicos de agentes químicos no meio ambiente (SILVA; MONTEIRO, 2017).

Deste modo, o ensaio com *A. cepa* possibilita a previsão de danos ao material genético das células, que podem implicar danos para os seres humanos (NEFIC et al., 2013). O método de avaliação de alterações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* foi validado em 1991 pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), sob o aval da OMS e do Programa Ambiental das Nações Unidas (em inglês, UNEP) (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

Capítulo 3

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, E ATIVIDADE SURFACTANTE E BIOLÓGICA DE SULFONATOS E EMULSÕES DE LCC TÉCNICO E CARDANOL

3.1. Introdução

Os mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), são responsáveis pela transmissão de diferentes arbovírus, causadores de doenças como a dengue, zica, chikungunya e febre amarela (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Desde o início do século XX até às décadas de 1960-70, foram realizadas campanhas agressivas de controle ao *Ae. aegypti*, adiando a sua propagação no Hemisfério Ocidental. No entanto, falhas/ineficiência de vigilância epidemiológica e alterações sociais e ambientais facilitaram a reprodução e a propagação do vetor e a consequente (re)emergência de doenças (BRAGA; VALLE, 2007; OMS, 2009).

As estratégias de controle, apesar de considerarem a redução populacional do vetor, por meio de gestão integrada, incluindo o uso de inseticidas químicos sintéticos organofosforados e piretróides, ou biológicos, são ineficazes, limitadas e ineficientes, devido a diversos fatores como falta de saneamento, dificuldades operacionais e econômicas, ou aumento dos níveis de resistência do inseto (CAMPBELL et al., 2015; GUZMAN et al., 2010; OMS, 2009). Neste cenário, é fundamental o desenvolvimento de novas estratégias e produtos inseticidas alternativos para o controle de vetores, principalmente utilizando produtos com múltipla funcionalidade e de longa duração, visando o alcance do inseto em estágios imaturos e adulto (alado) nos criadouros, particularmente habitações e imediações, e que permitam estimular a adesão da população ao controle doméstico do vetor (OMS, 2009).

O LCCT é uma das principais e mais baratas fontes naturais de fenóis lipídicos e pode ser utilizado para diferentes aplicações, tais como inseticidas, resinas e plásticos, entre outras (LOMONACO et al., 2009; SANTOS; MAGALHÃES, 1999). Constitui um subproduto obtido do processamento industrial (tostagem) da castanha de caju e é majoritariamente composto por cardanol (60 a 65%) e ácido anacárdico, cardol, metilcardol e materiais poliméricos (KUMAR et al., 2002; LOMONACO et al., 2009; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

O LCCT, cardanol e cardol apresentam atividade inseticida/larvicida contra *Ae. aegypti* (LOMONACO et al., 2009; PAIVA et al., 2017), bem como atividade antimicrobiana (KUBO et al., 1993; LIMA; PASTORE; LIMA, 2000; PARASA et al., 2011). Estes podem alterar os

parâmetros físico-químicos e biológicos do meio aquático de reprodução dos insetos, interferindo na cadeia alimentar, contaminando e alterando a qualidade/disponibilidade de alimento nos criadouros, como matéria orgânica e microrganismos, ou mesmo reduzindo a atratividade das fêmeas aos criadouros para oviposição devido à produção de semioquímicos sinalizadores. A microbiota intestinal das larvas do mosquito pode contribuir para a digestão de sangue no inseto, apresentando-se também como um componente chave da competência do vetor, e perturbar o desenvolvimento de patógenos (ARRUDA et al., 2011; DAVID et al., 2016).

O LCCT e, em particular, o cardanol, apresentam estruturas similares aos surfactantes de origem petroquímica, como o dodecilbenzeno sulfonato de sódio e o nonilfenol etoxilado, pelo que apresentam possibilidade de possuírem propriedades semelhantes. Neste aspecto, tendo em atenção a preocupação ambiental resultante da disposição e utilização destes produtos, o LCCT e cardanol apresentam-se como produtos “verdes” (FERREIRA et al., 2015; FRANCO et al., 2017; LENARDÃO et al., 2003) adequados para substituir derivados petroquímicos para a produção de surfactantes com performance equivalente em aplicações industriais e na fabricação de domissanitários (PEUNGJITTON et al., 2009). As modificações necessárias para a obtenção da atividade surfactante permitem o aumento da solubilidade dos fenóis lípidicos, o que possibilita explorar as suas propriedades larvicidas para aplicações tecnológicas nas áreas industrial e da saúde.

Uma propriedade fundamental dos surfactantes é a capacidade de formação de agregados/micelas que funcionam como sistemas/reservatórios nano ou microparticulados (DALVIN, 2011), o que possibilita a liberação controlada de produtos ativos e a permeação celular. A performance de um surfactante é avaliada por meio da concentração a partir da qual se formam micelas (CMC) e da tensão superficial e interfacial dos líquidos, que se referem a eficiência e efetividade, respectivamente (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; DALVIN, 2011). Tais propriedades conferem aos surfactantes diferentes aplicações envolvendo detergentes, emulsificação, solubilização, molhabilidade, capacidade espumante e dispersão de fases (BARROS et al., 2007). As emulsões são dispersões constituídas por duas fases líquidas imiscíveis que são misturadas usando pelo menos um surfactante (KALE; DEORE, 2017).

A forma mais promissora de alcançar o controle populacional do inseto vetor a longo prazo e de forma duradoura é por meio da mudança de comportamento da população para realização do controle doméstico do vetor, uma vez que mais de 90% dos criadouros se encontram nas residências. Assim, o objetivo deste estudo foi a síntese de produtos com

atividade larvicida, antimicrobiana e surfactante conjunta, de baixo custo, fácil utilização e que substituam/complementem os produtos de limpeza já integrados nas rotinas diárias da população, permitindo o controle de criadouros a partir do escoamento das águas residuais e acúmulo do produto, na sequência da realização da higienização de superfícies e espaços domésticos.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Obtenção do Cardanol

O cardanol foi isolado a partir do LCCt. O processo de isolamento foi realizado no SINTMOL – Instituto de Química, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) – Campo Grande-MS, segundo os métodos descritos na patente BR 10 2014 030002-3 A2 (BEATRIZ et al., 2016). Os reagentes PA utilizados (hexano, acetato de etila e celite) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Dinâmica, Brasil.

A cromatografia é a separação de dois ou mais compostos ou íons pela distribuição entre duas fases, uma que está em movimento e outra estacionária. Estas duas fases podem ser sólido-líquido, líquido-líquido ou gás-líquido. Para confirmação do isolamento do cardanol e pureza das amostras obtidas, realizou-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada. Esta é uma forma de cromatografia sólido-líquido, rápida e barata, em que a fase estacionária é normalmente um absorvente polar e a fase móvel pode ser um único solvente ou combinação de vários (GIDDINGS; KELLER, 2016).

Assim, as amostras foram adicionadas a uma extremidade da placa cromatográfica (fase estacionária) e mergulhadas na fase líquida ou móvel, mistura de hexano e acetato de etila em proporção mássica de 6:1.

3.2.2. Processo de Sulfonação do Cardanol e LCC técnico

O cardanol e LCCt foram sulfonados seguindo a metodologia desenvolvida por Peungjitton e colaboradores (2009), com modificações/adaptações. O cardanol/LCCt (10 g) foi diluído em 100 mL de metanol e a solução foi arrefecida em banho de água-gelo até cerca de 10°C. Adicionou-se lentamente, gota a gota, à solução, por meio de um funil de adição, 10,5 g de ácido sulfúrico fumegante (H₂SO₄ com 65,5-68% de SO₃ livre com NaOH), ao longo de 2

horas (h) com agitação constante, mantendo o banho de água-gelo para arrefecimento da mistura reacional. A mistura foi deixada para atingir a temperatura ambiente por um período de 3h, com agitação constante. Em seguida, a mistura foi neutralizada com 35 mL de sal sódico (hidróxido de sódio 5 M) à temperatura ambiente. Após agitação durante uma hora, a mistura foi extraída com hexano e o resíduo sólido foi separado da fase aquosa, tendo sido em seguida filtrado e lavado com acetona. Os sólidos obtidos foram secos em estufa até 50°C, resultando em LCC técnico sulfonato de sódio (LCCtSNa) e cardanol sulfonato de sódio (CSNa).

3.2.3. Preparação das Emulsões de Cardanol/LCC técnico e LCC técnico sulfonato de sódio

As emulsões de cardanol+LCCtSNa e LCCT+LCCtSNa são do tipo O/A e foram preparadas utilizando a seguinte metodologia: inicialmente pesou-se o óleo e em seguida o surfactante (LCCtSNa), colocado fracionado de forma a determinar a concentração necessária para a emulsão do óleo. Adicionou-se água ultrapura (MilliQ), de 100,0 em 100,0 µL, até se obter a diluição total da mistura, e em seguida DMSO a 1%. As emulsões foram agitadas em Vortex e colocadas em banho-maria por 30 minutos a 50°C (KALE; DEORE, 2017).

3.2.4. Caracterização Molecular

3.2.4.1. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A técnica permite a caracterização da estrutura molecular dos óleos e sulfonatos por meio da identificação dos grupos funcionais, além de caracterizar as possíveis interações intra e intermoleculares existentes por meio do deslocamento de bandas de absorção características. Assim, as análises provenientes desta técnica possibilitaram caracterizar e avaliar domínios nos produtos iniciais e sulfonatos, bem como possíveis interações químicas entre os componentes das misturas físicas.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos para o LCCT e cardanol utilizando o acessório de refletância total atenuada (ATR), em que os óleos foram espalhados sobre o cristal; e para os sulfonatos em pó, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) com as amostras (CSNa e LCCtSNa). A análise foi realizada no Laboratório de

Óptica da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), por meio da utilização de um espectrofotômetro modelo FT/IR-4100typeA– JASCO.

3.2.5. Atividade biológica

3.2.5.1. Bioensaios de toxicidade em larvas de *Aedes aegypti*

Os bioensaios de toxicidade foram realizados utilizando larvas de 3º e 4º estádios (L3 e L4) de *Ae. aegypti* (linhagem Rockefeller, susceptível), obtidas a partir de ovos fornecidos pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN - Marília-SP) e criados no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Para a eclosão, os ovos foram colocados em um recipiente plástico com água dechlorada e a alimentação das larvas foi realizada com ração de peixe (Sera Koi® profissional *Spirulina* - alimento de peixes). As larvas foram mantidas dessa forma até atingirem o 3º e 4º estágio larval. Concentrações entre 0,01 e 75,0 mg L⁻¹ foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO a 1%) para LCCt e cardanol, e no intervalo de 0,01 mg L⁻¹ a 850,0 mg L⁻¹ para os sulfonatos. Foram também testadas as emulsões cardanol+LCCtSNa e LCCt+LCCtSNa (1:6) em concentrações entre 0,01 mg L⁻¹ e 250,0 mg L⁻¹ (correspondentes ao cardanol e LCC técnico). Para cada concentração foram utilizadas 4 repetições com 25 larvas por repetição. Como controle veículo utilizou-se DMSO a 1% e como controle negativo somente água MiliQ.

As leituras de mortalidade foram realizadas no período de 24, 48 e 72 h após a aplicação dos produtos. As larvas foram consideradas mortas quando permaneceram imóveis na superfície da água ou no fundo do recipiente e/ou não apresentaram reação ao toque com pincel. Os bioensaios de toxicidade foram realizados em triplicata e em dias diferentes, conforme metodologia da OMS (1992).

Para a determinação da concentração letal para 50% da população (CL₅₀) utilizou-se a análise de Probit por meio do software StatPlus® 2009 Professional 5.7.8 (AnalystSoft Inc.), com intervalo de confiança 95% (FINNEY, 2009).

3.2.5.2. Atividades Bacteriostática e Bactericida

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Foram testados microrganismos provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA): *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778).

As bactérias foram cultivadas em ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia, Mumbai, IND) a 37°C por 24h e a concentração do inóculo foi ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, utilizando leitura no comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Visível Digital Microproce Q898DRM - QUIMIS ISO 8001). LCCt e cardanol foram dissolvidos em DMSO a 5% e água MiliQ, os sulfonatos em água MiliQ e as emulsões em DMSO a 1% e água MiliQ, e submetidos a diluições sucessivas (1:2) em microplacas de 96 poços com caldo Müeller Hinton (Himedia, Mumbai, IND), obtendo as concentrações de 1000 a 1,9 mg L⁻¹. Para o controle do ensaio foi utilizado o antibiótico ampicilina (AMP, Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA). Além da leitura visual, a CIM foi determinada adicionando aos poços 50 µL de solução 0,1% de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC, Vetec, Sigma-Aldrich, São Paulo, BRA) por 30 minutos (min.). A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato na qual os microrganismos não apresentaram crescimento visível (PANGHAL; KAUSHAL; YADAV, 2011). O teste foi realizado em duplicata, em três momentos diferentes.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), uma alíquota de 10 µL de todos os poços da microplaca foi retirada e plaqueada em ágar Müeller Hinton (Himedia, Mumbai, IND). A CBM foi definida como a menor concentração em que não houve crescimento de colônias (CLSI, 1999). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFGD.

3.2.6. Caracterização Físico-Química

3.2.6.1. Tensão Superficial

A gota pendente é o método universal para caracterizar a tensão superficial de líquidos puros ou soluções. Uma gota pendente do líquido de interesse foi formada dentro de uma caixa termostática fechada de aço inoxidável, cuja atmosfera foi saturada com um conjunto da

amostra líquida. As gotas foram geradas na ponta de um capilar Teflon de 0,50 mm de diâmetro ajustado à agulha metálica de uma seringa micrométrica, e registadas e gravadas assim que a estabilização foi alcançada.

Foram realizadas 3 medidas para cada amostra: LCCt e cardanol, sem diluição, e LCCtSNa, LCCt+LCCtSNa e cardanol+LCCtSNa, nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M (obtidas por meio das massas molares estimadas de acordo com a composição do LCCt descrita por Mazzeto, Lomonaco e Mele (2009): LCCt – $305,5 \text{ g mol}^{-1}$; cardanol – $301,0 \text{ g mol}^{-1}$; grupo sulfônico – $103,0 \text{ g mol}^{-1}$; LCCtSNa – $405,5 \text{ g mol}^{-1}$), tendo sido utilizada água MiliQ para as diluições sucessivas. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente de 25°C no equipamento Optical Contact Angle OCA 15 Plus, com câmera acoplada. As imagens captadas foram analisadas e os cálculos de tensão superficial efetuados pelo software SCA 20.

A forma das gotas resulta de duas forças: a gravitação alonga a gota e a tensão superficial exerce força para manter a gota em forma esférica de forma a minimizar a deformação da superfície. A geometria característica para o estado de equilíbrio é a curvatura do perfil da gota. Esta força de equilíbrio é matematicamente definida pela equação de Young-Laplace. Assim, uma vez que o perfil da gota é determinado, a tensão superficial do líquido (γ) ou a tensão interfacial entre dois líquidos pode ser determinada. A tensão superficial pode ser interpretada como energia por área, J m^{-2} ou força por distância, N m^{-1} . O ensaio foi realizado no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S)/ Instituto de Engenharia Biomédica (INEB) da Universidade do Porto - UP (Portugal).

3.2.6.2. Concentração Micelar Crítica

A determinação da CMC foi realizada por condutividade elétrica. As medições foram realizadas na solução de LCCtSNa e emulsões cardanol+LCCtSNa e LCCt+LCCtSNa em 5 concentrações distintas cada: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M, tendo sido utilizada água MiliQ para as diluições sucessivas. O controle foi realizado com LCCt, cardanol, papel de filtro, água ultrapura e ar. As soluções foram impregnadas em papel de filtro qualitativo com retenção de partículas de 5-13 μm (VMR European®, France) com as dimensões 2,5 cm x 2,5 cm x $0,113 \pm 0,004$ mm, e secos a temperatura ambiente. As amostras foram colocadas sobre um substrato de vidro. As medidas foram realizadas aplicando a corrente (I) e a tensão de medição (V) usando duas pontas POGO, aplicando pressão com um micrômetro conectado a um Keithley PicoamMeter 487 a temperatura ambiente. As varreduras de tensão foram realizadas nos

intervalos 0 volts (V) – 2V – 0V – -2V – 0V, com um passo de tensão de 0,1 V. A resistividade elétrica (ρ) é dada pela **equação 1**:

$$\rho = \frac{RA}{L} (\Omega \text{ cm})$$

Equação 1. Cálculo da resistividade elétrica.

onde: R é a resistência (V / I), A é a área transversal (amostra (t) x largura (d)) e L é a distância entre as pontas (2,2 cm). Cada valor é calculado através da média (a 0,5 e 2 V) de três locais diferentes da amostra. Na **figura 6** mostra-se a representação do sistema para determinação da condutividade elétrica das amostras.

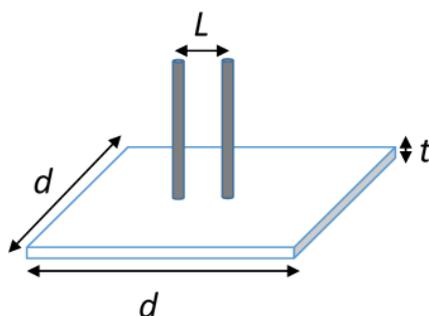


Figura 6. Representação do sistema usado para a determinação da condutividade elétrica das amostras

A análise foi realizada no Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto (IFIMUP), Porto (Portugal). A partir do plote das condutividades x concentrações pode-se determinar a CMC a partir da diminuição ou alteração abrupta da condutividade ou resistência elétrica das amostras em determinada concentração do produto em análise.

3.2.6.3. Tamanho, distribuição de tamanho e potencial Zeta das micelas

O tamanho e distribuição de tamanho das micelas, bem como o seu potencial Zeta, na solução de LCcTSNa e emulsões LCcT+LCcTSNa e cardanol+LCcTSNa, foram determinados recorrendo ao equipamento Zetasizer Nano ZSP (Malvern instruments). Os produtos foram

preparados com água MiliQ, nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M. As medições foram realizadas em triplicata, a 25°C.

A dispersão dinâmica de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) é uma técnica muito utilizada para medir o tamanho (diâmetro) e a distribuição do tamanho de partículas sub-micrométricas. Este método é baseado na capacidade das partículas em suspensão se difundirem em todas as direções e estarem em movimento constante (movimento Browniano das partículas). Tal movimento permite que o laser seja disperso nas partículas em diferentes intensidades. A intensidade de dispersão da luz detectada está relacionada com a velocidade de difusão das partículas e conseqüentemente com o tamanho destas. Quanto maior for a partícula, mais lento será o seu movimento Browniano, ou seja, menor será a velocidade de difusão (HASSELLÖV et al., 2008).

As variações de intensidade de dispersão de luz são detectadas por um fotodíodo e analisadas por um autocorrelacionador digital que gera uma função correlação que é proporcional ao coeficiente de difusão de partículas (D). A partir deste, o tamanho da partícula (d – diâmetro hidrodinâmico médio), dependente da temperatura (T) que influencia a viscosidade (η), é calculado através da equação de Stokes-Einstein (**equação 2**), onde K_B é a constante de Boltzmann (HASSELLÖV et al., 2008):

$$d = \frac{TK_B}{3\pi\eta D}$$

Equação 2. Equação de Stokes-Einstein.

O índice de polidispersão (PDI) é um parâmetro calculado a partir da análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão de luz, na qual apenas um tamanho de partícula é assumido e um ajuste exponencial simples é aplicado à função de autocorrelação. Os valores obtidos permitem descrever a homogeneidade da distribuição de tamanho das partículas.

As partículas dispersas no meio aquoso, na sua maioria, tendem a adquirir uma carga elétrica superficial, que altera a distribuição dos íons envolventes, gerando um aumento da concentração de íons à volta das partículas e proporcionando-lhes, assim, uma camada elétrica dupla. A partícula e a sua parte interna desta camada movimentam-se conjuntamente, fazendo com que a parte externa (cujo potencial dos íons tende a decrescer à medida que se afastam da partícula) se arraste e provoque o “rompimento” entre os íons das duas camadas. A região onde ocorre esta separação denomina-se plano de quebra. Deste modo, o potencial Zeta apresenta-se

como a diferença de potencial elétrico entre o plano de quebra e um determinado ponto no fluido da suspensão.

O potencial Zeta é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas. Este é medido através da aplicação de um campo elétrico na suspensão, que provoca a migração das partículas em direção ao eletrodo com carga oposta à sua carga, com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial Zeta. Tal velocidade é medida recorrendo à dispersão de luz e ao método de velocimetria a laser do efeito de Doppler. Valores elevados de potencial Zeta, positivos ou negativos, indicam que uma suspensão ou emulsão é estável, visto que a repulsão entre partículas previne a ocorrência de agregação.

A análise foi realizada em colaboração com o Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S)/ Instituto de Engenharia Biomédica (INEB) da Universidade do Porto - UP (Portugal).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Obtenção do Cardanol

Na primeira etapa deste estudo foi realizado o processo de isolamento do cardanol a partir do LCCT, disponibilizado pela empresa Resibrás, em Fortaleza-CE, Brasil. Neste processo foram utilizados 174,0 g de LCCT (102,66 g de cardanol, teórico) e foram obtidos 38,9 g de cardanol purificado, num total de 4 amostras recolhidas em diferentes partes do sistema.

Para comparações, considera-se o rendimento da metodologia (BEATRIZ et al., 2016), onde 40,59 g de cardanol foram isolados, sendo esta massa correspondente a 80% de rendimento de um total de 86,0 g de LCCT (50,74 g). O LCCT usado possui na sua composição 59% de cardanol. Deste modo, o rendimento da reação realizada foi de 37,89%.

De acordo com a literatura, o LCCT é constituído por 60%-65% de cardanol e resulta da tostagem da castanha de caju no intervalo de temperatura de 180-190°C, constituindo um resíduo/subproduto industrial da biomassa (KUMAR et al., 2002; LOMONACO et al., 2009; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). Desta forma, trata-se de um produto com composição variável, devido às possíveis variações de fonte e origem, temperatura de tostagem, bem como de outros parâmetros físico-químicos, da planta e solo. A ausência de controle dos locais de armazenamento pode originar contaminações físicas e degradações, alterando a

composição. Assim, o rendimento do processo de obtenção pode sofrer variações. Neste caso, o rendimento da reação realizada foi cerca de 50% inferior ao descrito na metodologia.

O acompanhamento do isolamento foi realizado por cromatografia em camada delgada, comprovando-se que o produto obtido foi cardanol puro em 3 das 4 amostras recolhidas. Entretanto, uma das amostras apresentou traços de cardol.

3.3.2. Processo de Sulfonação do Cardanol e LCC técnico

O cardanol isolado foi sulfonado, de acordo com a metodologia descrita por Peungjitton e colaboradores (2009), com adaptações, usando-se uma amostra de 1,0 g. Desta resultaram 0,758 g de cardanol sulfonato de sódio, obtendo-se um rendimento de 56,99%, considerando o rendimento descrito na metodologia utilizada, 86,47%, no qual se obteve 11,5 g de produto final sulfonado e neutralizado a partir de uma amostra de 10,0 g de cardanol.

O LCCt fornecido pela indústria e sem qualquer tratamento prévio foi sulfonado (**figura 7**), seguindo a mesma metodologia, usando diversas amostras de 15,0 g. Das sulfonações resultou uma média de 15,36 g de LCC sulfonato de sódio. Considerando as massas molares estimadas do LCCt ($305,5 \text{ g mol}^{-1}$) e do LCCtSNa ($405,5 \text{ g mol}^{-1}$), de acordo com a composição referida por Mazzetto, Lomonaco e Mele (2009), o rendimento médio das reações foi de 77,16%.

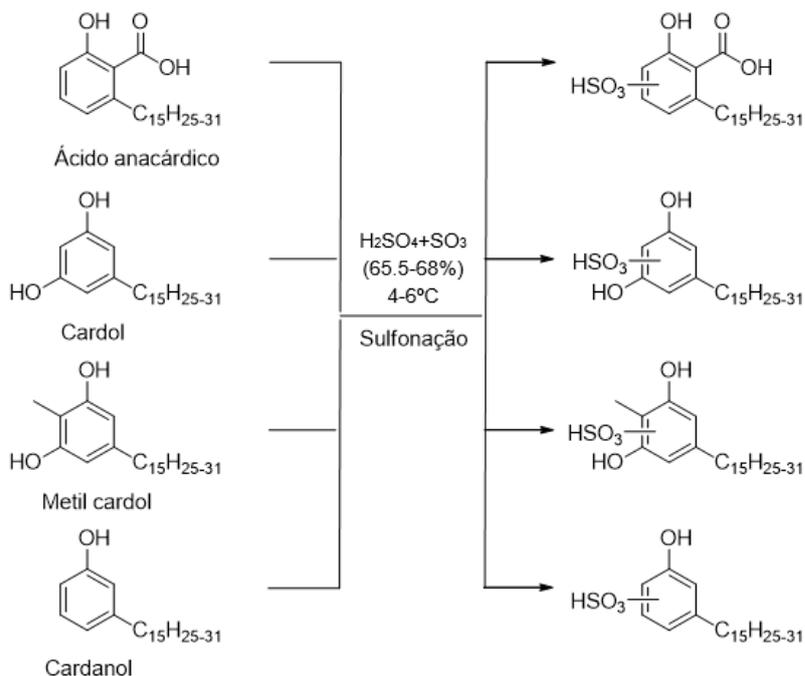


Figura 7. Reações de sulfonação dos diferentes constituintes do LCC técnico.

O rendimento reacional da sulfonação do cardanol foi inferior ao descrito na metodologia. A extensa variação do rendimento pode dever-se a alterações das condições no processo de síntese, como a temperatura da reação, velocidade de adição do ácido sulfúrico fumegante, tempo de contato, agitação e resfriamento. Estes parâmetros são de difícil controle.

Quanto às reações de sulfonação do LCCT, obteve-se um rendimento médio considerável, com uma diferença inferior a 10% relativamente à sulfonação do cardanol descrito na metodologia base, o que sugere que o procedimento laboratorial de síntese descrito é adequado para a sulfonação do LCCT. Deste modo, não é necessário isolar o cardanol para obter um composto sulfonado.

3.3.3. Preparação das Emulsões de Cardanol/LCC técnico e LCC técnico sulfonato de sódio

Foram preparadas emulsões: cardanol+LCCTsNa e LCCT+LCCTsNa. Foram realizadas várias tentativas com concentrações crescentes de sulfonato para a solubilização dos óleos, e volumes de água crescentes para a dissolução da mistura, determinando-se a proporção mássica

de 1:6 (1 parte ativo:6 partes de surfactante) para emulsificar os óleos, com 1% de DMSO, numa concentração final de óleo de 8333,3 mg L⁻¹.

No processo de emulsão não se verificou a completa dissolução do LCCtSNa, o que pode ser devido à presença de impurezas do processo industrial, e de material polimérico no LCCt, decorrentes do armazenamento em condições não controladas e do processo de tostagem para sua obtenção industrial realizado a altas temperatura (KUMAR et al., 2002; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; SOARES, 2013). Deste modo, o processo de preparação das emulsões deve ser otimizado.

O processo de sulfonação e seu produto, bem como emulsão de LCCt+LCCtSNa, deram origem ao pedido de patente BR 10 2017 027264 8 (JORGE et al., 2017) (**Anexo I**).

3.3.4. Caracterização Molecular

3.3.4.1. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Na **figura 8** são apresentados os espectros de FTIR para o cardanol e LCCt. No cardanol, a banda larga, em torno de 3392 cm⁻¹, caracteriza a deformação axial O-H em fenóis. Na literatura é descrito o sinal em 3025 cm⁻¹, que pode ser atribuído às deformações axiais das ligações C-H aromáticas e olefínicas (SOARES, 2013). No entanto, este sinal descrito não expressou intensidade observável para a amostra de cardanol testada. Contudo, é possível verificar a existência desta vibração na amostra de LCCt.

As bandas em 2916 e 2848 cm⁻¹ podem ser atribuídas à deformação axial de ligações C-H de carbonos sp³. Bandas relativas à deformação axial C=C do anel aromático expressam-se em 1587 cm⁻¹. As bandas na região de 1200-1000 cm⁻¹, correspondem às vibrações de estiramento nas ligações C-O (SOARES, 2013; THIRUKUMARAN et al., 2016). Todas as bandas descritas foram observadas para o LCCt, ainda que com intensidades distintas, o que se deve à sua composição, apresentando cerca de 60-65% de cardanol (LOMONACO et al., 2009).

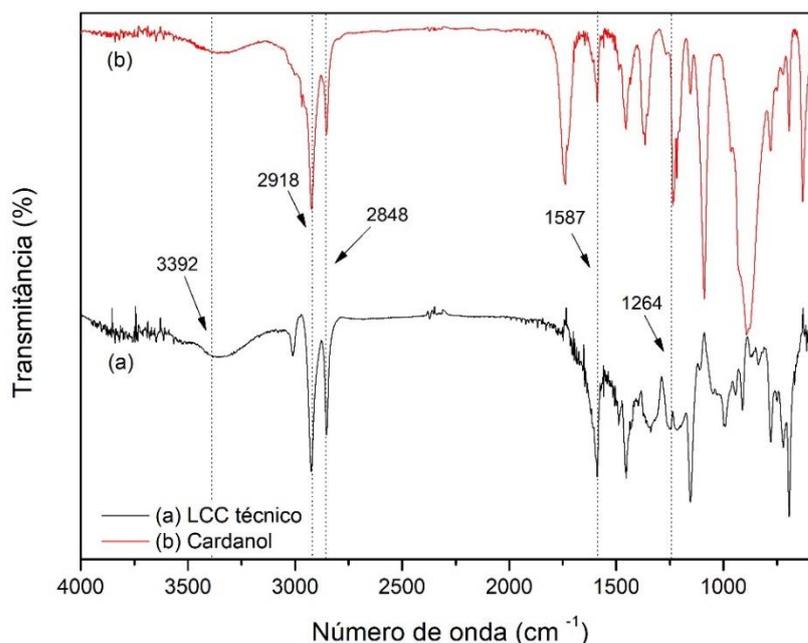


Figura 8. Espectros de FTIR-ATR para as amostras de cardanol e LCC técnico.

A análise do espectro de FTIR do cardanol sulfonato de sódio, apresentado na **figura 9**, permitiu a identificação de uma banda larga, característica de deformação axial O-H em 3485 cm^{-1} e bandas em 2925 e 2854 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial de ligações C-H de carbonos sp^3 . As bandas relativas à deformação axial C=C do anel aromático encontram-se no comprimento de onda de 606 cm^{-1} . Em 1137 cm^{-1} foi observada a deformação axial da ligação C-O do grupo fenol e o sinal relativo à deformação S=O em 1010 cm^{-1} , o que confirma a sulfonação do cardanol. Os valores observados apresentam mínimas diferenças relativamente aos da literatura (SOARES, 2013). Estas variações não são significativas, podendo atribuir-se à realização dos ensaios em equipamentos diferentes.

No LCCtSNa verificou-se a presença das mesmas bandas, com intensidades ligeiramente diferentes das apresentadas no espectro do CSNa.

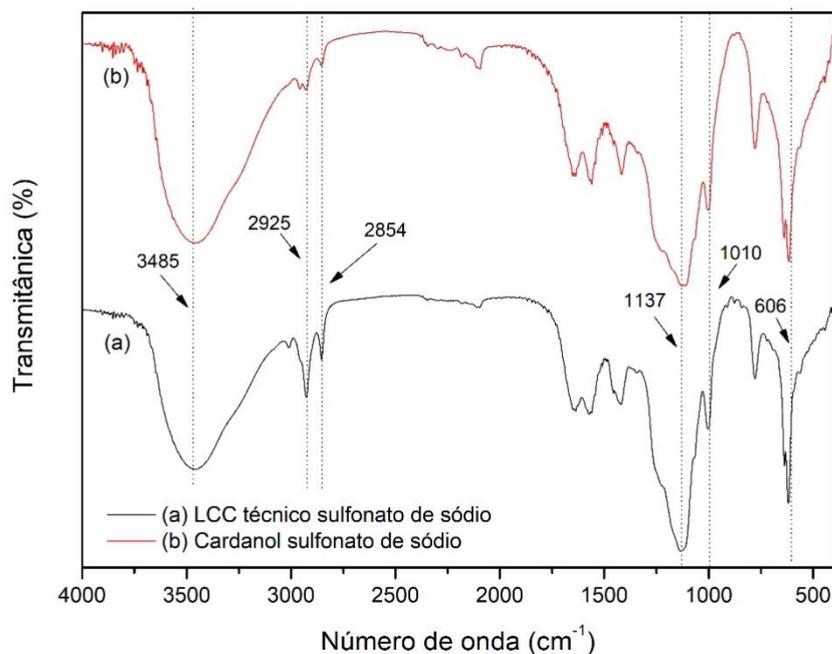


Figura 9. Espectros de FTIR-KBr para as amostras de cardanol sulfonato de sódio e LCC técnico sulfonato de sódio.

3.3.5. Atividade biológica

3.3.5.1. Bioensaios de toxicidade em larvas de *Aedes aegypti*

Na **tabela 3** são apresentados os resultados de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* L3/L4 nas leituras realizadas após 24h de exposição a cardanol, e na **tabela 4** após 24, 48 e 72h de exposição a LCCt, em concentrações estabelecidas a partir dos estudos de Guissoni e colaboradores (2013) e Oliveira e colaboradores (2011), respectivamente. Após a realização de ensaios prévios com as concentrações testadas inicialmente para LCCt, constatou-se que as mesmas concentrações para cardanol eram demasiado elevadas, pelo que houve a necessidade de estabelecer uma linha base de susceptibilidade diferente para cada composto.

Tabela 3. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24h de exposição de larvas L3 e L4 de *Ae. aegypti* a cardanol.

		Cardanol							
		Concentração (mg L ⁻¹)							
		8,75	11,4	14,8	19,25	25,0	32,55	42,3	50,0
Tempo de exposição (h)	24	2,0 (1,4)	11,0 (5,7)	22,5 (6,4)	38,0 (12,7)	75,5 (6,4)	92,0 (11,3)	93,5 (9,2)	96,0 (5,7)

Tabela 4. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de *Ae. aegypti* a LCC técnico.

		LCC técnico				
		Concentração (mg L ⁻¹)				
		35,0	42,0	50,4	60,48	72,57
Tempo de exposição (h)	24	11,0 (6,8)	23,0 (6,8)	42,0 (5,2)	76,0 (7,3)	96,0 (3,3)
	48	23,0 (6,8)	40,0 (5,7)	60,0 (11,8)	87,0 (6,8)	99,0 (2,0)
	72	49,0 (6,8)	70,0 (8,3)	95,0 (3,8)	100	100

As análises de toxicidade para o cardanol e LCCt mostraram que o cardanol possui maior toxicidade que o LCCt, induzindo a morte de 96% da população a 50,00 mg L⁻¹ em 24h, enquanto o LCCt apresenta a mesma porcentagem de mortalidade somente na concentração de 72,57 mg L⁻¹.

Os resultados obtidos demonstram que o LCC apresenta atividade biológica, i.e. inseticida/larvicida. Estes resultados corroboram os dados apresentados na literatura em diferentes estudos realizados (DOURADO et al., 2015; GUISSONI et al., 2013; LOMONACO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; PAIVA et al., 2017).

Nas **tabelas 5 e 6** são apresentados os resultados relativos à mortalidade das larvas nos bioensaios realizados com CSNa e LCCtSNa, em concentrações estabelecidas a partir dos estudos de Guissoni e colaboradores (2013), para as leituras realizadas em 24, 48 e 72h.

Tabela 5. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de *Ae. aegypti* a CSNa.

		CSNa				
		Concentração (mg L ⁻¹)				
		52,4	104,8	209,6	419,2	838,4
Tempo de exposição (h)	24	2,0 (2,8)	0	0	1,0 (2,0)	0
	48	2,0 (2,8)	0	0	1,0 (2,0)	0
	72	2,0 (2,8)	0	0	1,0 (2,0)	0

Tabela 6. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de *Ae. aegypti* a LCCTsNa.

		LCCTsNa				
		Concentração (mg L ⁻¹)				
		52,4	104,8	209,6	419,2	838,4
Tempo de exposição (h)	24	10,5 (5,2)	11,0 (5,1)	22,5 (5,2)	13,0 (4,7)	16,5 (5,0)
	48	11,0 (5,1)	11,50 (5,0)	23,0 (6,3)	16,0 (4,8)	17,0 (5,1)
	72	11,0 (5,1)	13,0 (6,7)	25,5 (7,4)	16,5 (5,0)	20,0 (5,7)

As análises de toxicidade mostraram que a reação de sulfonação reduziu consideravelmente a atividade larvicida original do LCCT, tendo anulado a atividade do cardanol.

Na **tabela 7** são apresentadas as concentrações letais para 50% da população (CL₅₀) para os quatro produtos testados, obtidos a partir dos bioensaios de toxicidade com larvas de *Ae. aegypti* após 24h de exposição.

Tabela 7. Concentrações letais para 50% da população (CL_{50}) ($mg L^{-1}$) obtidas para cardanol, LCC técnico e respectivos sulfonatos sobre larvas de *Ae. aegypti* após 24h de exposição.

Produto	CL_{50} (IC _{0,05})	$b \pm EP$	χ^2	gl
C	22,3 (17,2 – 34,2)	8,7±0,0	1,8	3
LCCt	50,4 (48,8 – 52,1)	10,5±0,0	3,1	3
CSNa	>838,4	ND*	ND*	ND*
LCCtSNa	>838,4	ND*	ND*	ND*

IC - intervalo de confiança; b - coeficiente angular; EP - erro padrão; χ^2 - qui-quadrado; gl - graus de liberdade; ND* - Não determinado, devido à baixa mortalidade em 24h.

Lomonaco e colaboradores (2009) determinaram para LCCt CL_{50} de $51,0 \pm 0,6 mg L^{-1}$. Este valor confirma o resultado obtido nos ensaios realizados no presente estudo. Para cardanol, a CL_{50} determinada foi de $32,9 \pm 0,3 mg L^{-1}$, superior à obtida neste estudo.

As CL_{50} obtidas neste estudo para cardanol e LCCt mostram o potencial de utilização do resíduo/biomassa industrial ou dos fenóis lipídicos isolados do resíduo industrial para preparação de derivados do LCC técnico para controle de imaturos de *Ae. aegypti*, corroborando os resultados disponíveis da literatura. Neste cenário, cardanol e LCCt possuem atividade tóxica para larvas de *Ae. aegypti*. Silva e colaboradores (2004) sugerem que CL_{50} inferiores a $50,0 mg L^{-1}$ indicam potencial para uso como inseticida/larvicida. Considerando os resultados apresentados, a utilização dos sulfonatos sódicos de LCCt e cardanol como larvicidas é inviável.

A atividade biológica deve-se à presença de insaturações na cauda apolar dos fenóis lipídicos, tornando-os aptos a alterar a permeação da membrana celular e induzir a toxicidade para larvas de *Ae. aegypti* e microrganismos dos criadouros (LOMONACO et al., 2009; PAIVA et al., 2017). A redução drástica da atividade biológica, i.e. inseticida/larvicida nos CSNa e LCCtSNa em relação aos intermediários iniciais foi, deste modo, possivelmente causada a partir da alteração/redução das insaturações da cauda apolar. Os resultados obtidos sugerem que esta porção insaturada pode sofrer alteração por introdução do grupo sulfônico (sulfonação), devido às suas características reacionais.

No sentido de recuperar a atividade larvicida original do cardanol e LCCt, conferir-lhes a solubilidade necessária à sua aplicação nos criadouros, e manter a atividade surfactante resultante da sulfonação, foram formuladas emulsões de cardanol e LCCt, utilizando como emulsificante LCCtSNa. O LCCtSNa foi selecionado, em detrimento do CSNa, uma vez que

para a sua obtenção não é necessário proceder ao isolamento dos componentes, simplificando o processo e reduzindo os custos de produção, e que a sua atividade larvicida foi superior, ainda que pouco intensa.

Os resultados relativos à mortalidade das larvas nos bioensaios de toxicidade realizados com as emulsões cardanol+LCCtSNa e LCCt+LCCtSNa, em concentrações estabelecidas a partir do estudo de Guissoni e colaboradores (2013), nas leituras realizadas em 24, 48 e 72h, são apresentados nas **tabelas 8 e 9**.

Tabela 8. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de *Ae. aegypti* a cardanol+LCCtSNa.

		Cardanol+LCCtSNa				
		Concentração (mg L ⁻¹)				
		6,55	13,1	26,2	52,4	104,8
Tempo de exposição (h)	24	4,0 (5,7)	7,0 (4,1)	37,0 (6,4)	100	100
	48	8,0 (8,4)	14,0 (3,7)	43,0 (6,9)	100	100
	72	10,0 (8,3)	23,0 (8,5)	49,0 (6,5)	100	100

Tabela 9. Porcentagem média de mortalidade (%) (desvio-padrão) após 24, 48 e 72h de exposição de larvas L3 e L4 de *Ae. aegypti* a LCCt+LCCtSNa.

		LCCt+LCCtSNa				
		Concentração (mg L ⁻¹)				
		6,55	13,1	26,2	52,4	104,8
Tempo de exposição (h)	24	6,0 (2,1)	42,0 (9,3)	82,0 (9,5)	94,0 (6,0)	100
	48	11,5 (7,8)	52,0 (12,6)	89,0 (8,9)	97,0 (2,8)	100
	72	21,0 (9,5)	67,0 (13,5)	92,0 (7,4)	99,0 (2,0)	100

As análises dos resultados dos bioensaios de toxicidade mostraram que a mistura dos óleos (cardanol e LCCt) com o LCCtSNa aumentou consideravelmente a atividade larvicida quando comparada com a atividade do LCCtSNa isolado e do cardanol e LCCt como ativos inseticidas livres, descrita anteriormente.

A **tabela 10** apresenta as CL_{50} das duas emulsões testadas, obtidas a partir dos bioensaios de toxicidade com larvas de *Ae. aegypti* após 24h de exposição.

Tabela 10. Concentrações letais para 50% da população (CL_{50}) ($mg.L^{-1}$) obtidas para as emulsões de cardanol/LCCt e LCCtSNa sobre larvas de *Ae. aegypti* após 24h de exposição.

Produto	CL_{50} (IC _{0,5})	$b \pm EP$	χ^2	gl
Cardanol+LCCtSNa	27,5 (25,0 – 30,2)	-1,7 \pm (-1,0)	6,8	19
LCCt+LCCtSNa	15,8 (14,4 – 17,2)	0,2 \pm 0,4	43,5	37

IC - intervalo de confiança); b - coeficiente angular; EP - erro padrão; χ^2 - qui-quadrado; gl - graus de liberdade.

Os resultados apresentados mostraram um aumento considerável da toxicidade da emulsão LCCt+LCCtSNa quando comparada com o cardanol e LCCt, CSNa e LCCtSNa, e emulsão cardanol+LCCtSNa, apresentado CL_{50} 1,4, 3,2, pelo menos 53 (ambos os sulfonatos) e 1,7 vezes inferior aos demais, respectivamente e, portanto, atividade larvicida mais intensa.

A emulsão de LCCt+ LCCtSNa apresentou-se como uma excelente alternativa para a reversão da perda de atividade larvicida do LCCt após a sulfonação sobre larvas de *Ae. aegypti*. Apesar da recuperação da atividade larvicida com a emulsão do cardanol em LCCtSNa, a sua CL_{50} foi ligeiramente superior à do cardanol livre (27,5 e 22,3 $mg L^{-1}$, respectivamente). A CL_{50} da emulsão LCCt+LCCtSNa foi consideravelmente inferior à CL_{50} obtida para o LCCt livre (15,8 e 50,4 $mg L^{-1}$, respectivamente) e também inferior à do cardanol livre.

Estes resultados mostraram possível efeito aditivo na toxicidade e/ou potencialização de efeito inseticida do cardanol e LCCt quando apresentados na forma de emulsão, em relação aos valores disponíveis na literatura e comprovados nos resultados dos ensaios apresentados.

A **figura 10** apresenta a síntese dos possíveis mecanismos de toxicidade de LCCt emulsionado com LCCtSNa sobre larvas de *Ae. aegypti*.

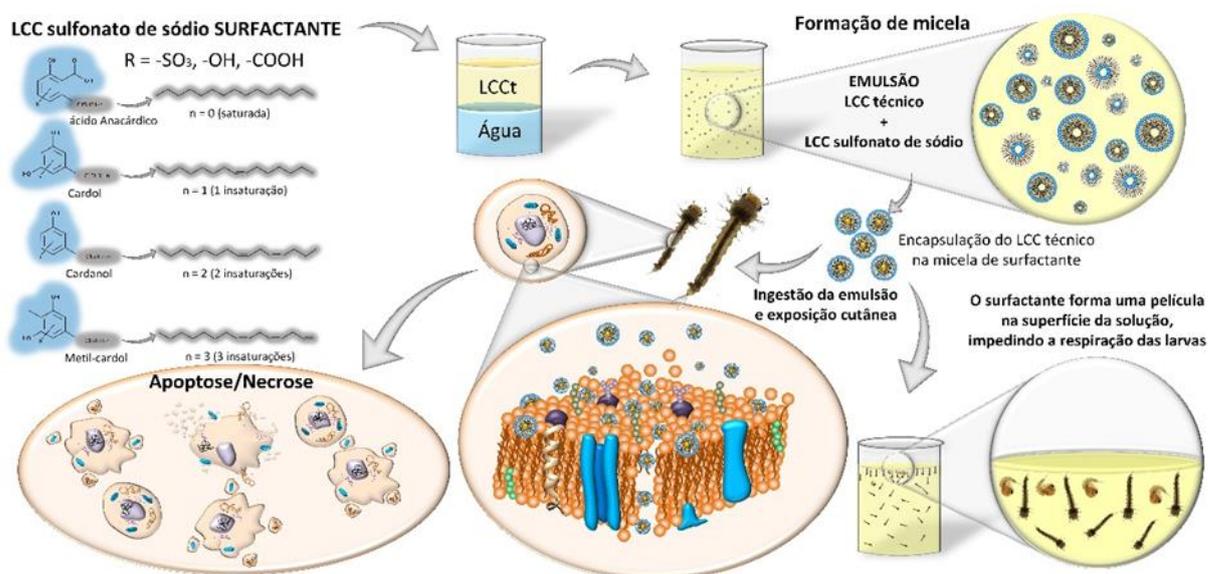


Figura 10. Resumo gráfico da atividade biológica de LCC técnico emulsionado com LCC técnico sulfonato de sódio sobre larvas de *Ae. aegypti*

3.3.5.2. Atividades Bacteriostática e Bactericida

A microbiota intestinal de *Ae. aegypti* e a microbiota dos criadouros apresentam-se como fatores de extrema importância para a sobrevivência da espécie, principalmente devido à sua contribuição na cadeia alimentar, desempenho de funções digestivas e influência sobre a seleção de sítios de oviposição (criadouros) pelas fêmeas do inseto, podendo também contribuir para a sua adaptabilidade e aumento da competência vetorial. Além disso, a microbiota dos criadouros desempenha um papel essencial ao desenvolvimento/reprodução dos mosquitos (ARRUDA et al., 2011; DAVID et al., 2016; RODRIGUES, 2009).

Nestes sentido, foi realizada a avaliação da atividade bacteriostática, por meio da determinação da concentração inibitória mínima, para cardanol, LCCt, CSNa, LCCtSNa, cardanol+LCCtSNa e LCCt+LCCtSNa, utilizando sete bactérias ATCC, de modo a aferir a possibilidade de realizar um controle secundário do vetor, afetando as condições bacteriológicas dos criadouros. Os resultados são apresentados na **tabela 11**.

Tabela 11. Concentrações inibitórias mínimas (mg L^{-1}) para cardanol (C), LCCt, CSNa, LCCtSNa, cardanol+LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa (LCCt+LCCtSNa).

Bactéria / Produto	C	CSNa	LCCT	LCCtSNa	C+ LCCtSNa	LCCT+ LCCtSNa
Gram +						
<i>Staphylococcus aureus</i>	500,0	—	500,0	—	250,0	250,0
<i>Bacillus cereus</i>	—	—	—	—	250,0	125,0
Gram -						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	1000,0	—	—	1000,0	—	—
<i>Proteus mirabilis</i>	—	—	—	—	1000,0	1000,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	—

Os resultados experimentais indicam que o cardanol e LCCT apresentam atividade bacteriostática a partir de concentrações de 500,0 mg L⁻¹ para bactérias do tipo cocos Gram+, particularmente *S. aureus*, como referido nos estudos de Gonçalves (2007) e Kubo e colaboradores (1993). O cardanol apresentou atividade para *E. coli* a partir de 1000,0 mg L⁻¹.

Após a sulfonação, à semelhança do comportamento observado para as larvas de *Ae. aegypti*, nenhum dos produtos manteve a atividade anteriormente apresentada. Apenas o LCCtSNa apresentou atividade inibitória para *E. coli* em concentrações iguais ou superiores a 1000,0mg.L⁻¹. Assim, relativamente à atividade antimicrobiana, tanto o cardanol isolado como a mistura (LCCT) e respectivos sulfonatos revelaram-se ineficazes na inibição do crescimento bacteriano para as espécies testadas.

Relativamente às emulsões, os resultados obtidos indicam que LCCT+LCCtSNa possui atividade bacteriostática para bactérias do tipo Gram +, *B. cereus* a partir de 125,0 mg L⁻¹ e *S. aureus* desde 250,0 mg L⁻¹. Para cardanol+LCCtSNa, em ambos os organismos a concentração de inibição mínima verificada foi 250,0 mg L⁻¹. As emulsões apresentaram também atividade inibitória sobre *P. mirabilis*, ainda que em concentrações elevadas.

Deste modo, foi possível observar o aumento considerável da atividade bacteriostática das emulsões comparativamente com cardanol e LCCT sem modificação, apresentando atividade inibitória para mais dois microrganismos. Todavia, as concentrações inibitórias mínimas continuam a ser elevadas comparativamente com a CL₅₀ obtida para as larvas de *Ae. aegypti*.

Para os produtos que apresentaram atividade inibitória nos microrganismos testados, realizou-se um ensaio para determinação da concentração bactericida mínima. Nenhum deles apresentou atividade bactericida.

3.3.6. Caracterização Físico-Química

3.3.6.1. Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica

O método da gota pendente é utilizado para caracterizar a tensão superficial de líquidos puros ou soluções, e permite avaliar a efetividade de um surfactante (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; DALTIM, 2011). Isto é, possibilita verificar se determinado produto apresenta a capacidade de reduzir a tensão superficial de um líquido ou a tensão interfacial entre líquidos, permitindo a sua solubilização/emulsão.

Na **figura 11** e **tabela 12** são apresentados os resultados das medições de tensão superficial da solução de LCCTsNa e emulsões de cardanol+LCCTsNa e de LCCT+LCCTsNa, nas cinco concentrações testadas, bem como os valores para a água, e cardanol e LCCT sem diluição, obtidos em temperatura ambiente de 25°C.

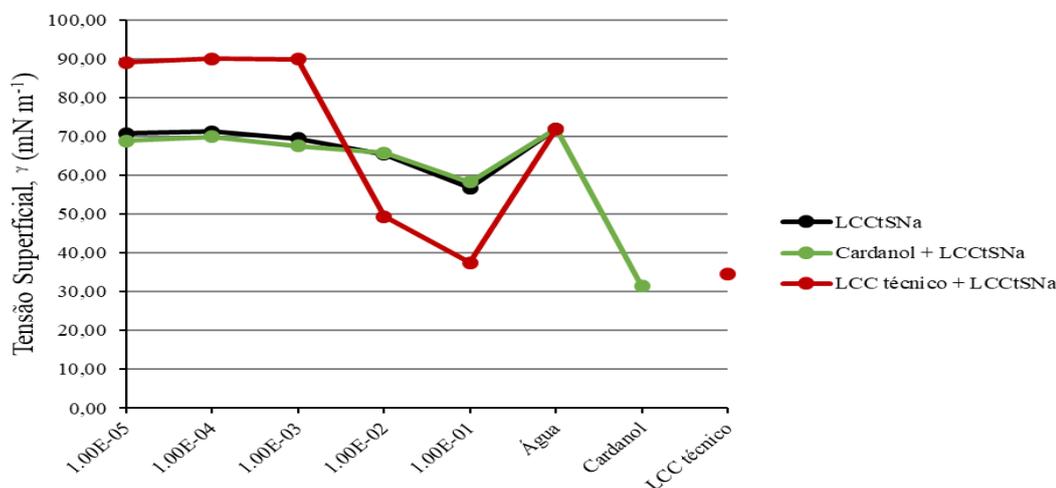


Figura 11. Tensão superficial da solução de LCCTsNa e emulsões cardanol+LCCTsNa e LCCT técnico+LCCTsNa a 25°C.

Tabela 12. Tensão superficial e desvio-padrão da solução de LCCtSNa e emulsões cardanol+LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa (25°C).

TENSÃO SUPERFICIAL (mN m ⁻¹)			
Concentração (M)	Produto		
	LCCtSNa	Cardanol+LCCtSNa	LCCt+ LCCtSNa
1,00.10 ⁻⁵	70,78±1,45	68,85±1,22	89,08±1,42
1,00.10 ⁻⁴	71,24±0,19	69,96±0,22	90,02±0,91
1,00.10 ⁻³	69,49±0,46	67,55±1,55	89,92±0,67
1,00.10 ⁻²	65,49±3,61	65,78±0,96	49,43±0,87
1,00.10 ⁻¹	56,75±0,27	58,30±1,70	38,27±1,44
Água		71,99±0,50	
Cardanol		31,44±1,79	
LCC técnico		34,64±0,13	

De acordo com os resultados apresentados na **figura 11** e **tabela 12**, a tensão superficial diminuiu à medida que a concentração das amostras aumentou. O LCCtSNa, nas soluções preparadas apenas com água, e nas emulsões de cardanol, provocou a diminuição da tensão superficial em relação à água. No entanto, este efeito foi bastante reduzido nas concentrações inferiores a 10⁻² M. Relativamente à emulsão de LCCt, o LCCtSNa proporcionou uma redução acentuada da tensão superficial, comparativamente com a água, até concentrações entre 10⁻² e 10⁻³ M, tendo-se verificado um aumento da tensão superficial em concentrações iguais ou inferiores a 10⁻³ M, comparativamente com a água.

De acordo com a literatura, as tensões superficiais mínimas de dodecilbenzeno sulfonato e cardanol sulfonato são 28 mN m⁻¹ (15% m/v) e 32,25 mN m⁻¹ (20% m/v), respectivamente. Estes resultados demonstram que a redução da tensão superficial do cardanol sulfonato não é significativamente diferente da do sulfonato de dodecilbenzeno (PEUNGJITTON et al., 2009). Nos experimentos realizados registrou-se uma tensão superficial mínima de 38,27 mN m⁻¹ (4,055% m/v) para a emulsão LCCt+LCCtSNa, não diferindo substancialmente dos valores apresentados na literatura para os dois sulfonatos referidos. Assim, esta emulsão é aceitável para aplicação comercial como um surfactante aniônico comum, para fins domésticos ou industriais, mas principalmente para formulação de emulsões inseticidas, incluindo LCCt e outros inseticidas naturais e convencionais para controle de *Ae. aegypti*.

A **figura 12** apresenta os resultados do ensaio de condutividade elétrica realizado com vista à determinação das concentrações micelares críticas das amostras e controles: a) controle de LCCt, C, H₂O, papel de filtro e ar, b) solução de LCCtSNa, c) emulsões de cardanol+LCCtSNa, e d) emulsões de LCCt+LCCtSNa, nas cinco concentrações testadas.

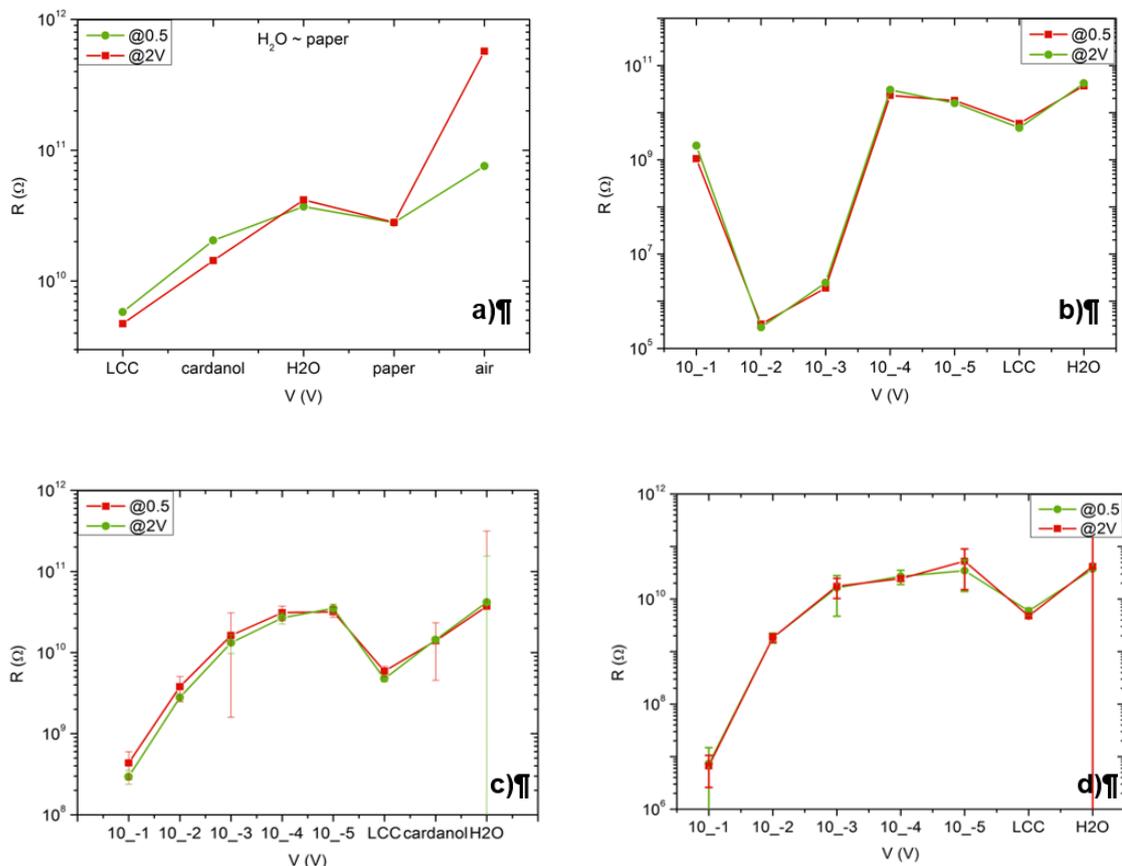


Figura 12. Resistência elétrica (Ω) dos (a) controles, (b) LCCtSNa, e emulsões (c) cardanol+LCCtSNa e (d) LCC técnico+LCCtSNa nas tensões 0,5 e 2V.

A partir dos resultados experimentais foi possível avaliar a propriedade do meio, das espécies presentes e das micelas em conduzir a corrente elétrica. O comportamento das espécies presentes foi avaliado a partir da análise da resistência, sendo que quanto maior a resistência, menor a condutividade elétrica da espécie/micela.

As CMC's para o LCCtSNa e emulsões de cardanol/LCCt e LCCtSNa podem ser determinadas através da análise da resistência elétrica dos produtos nas diferentes concentrações, uma vez que existe uma diminuição brusca na resistência elétrica quando as soluções atingem esta concentração.

Os resultados sugeriram que as tensões superficiais do LCCTsNa e emulsões de cardanol/LCCT+LCCTsNa diminuíram com o aumento da concentração de LCCTsNa, até a concentração atingir um valor conhecido como concentração micelar crítica. Verificou-se que a CMC para o LCCTsNa é de aproximadamente 10^{-2} M, enquanto que para ambas as emulsões a CMC é igual ou superior a 10^{-2} M, considerando o desvio-padrão apresentado. A tensão superficial (γ) da emulsão LCCT+LCCTsNa nesta concentração é, portanto, próxima da tensão superficial mínima ($\gamma_{\min.}$).

Peungjitton e colaboradores (2009) determinaram para o dodecilbenzeno sulfonato de sódio e cardanol sulfonato valores de CMC de 0,435 e 0,372 M, respectivamente. Assim, comparativamente, a CMC do LCCTsNa é inferior às destes sulfonatos, apresentando maior efetividade, e as CMC's de ambas as emulsões são inferiores ou semelhantes, apresentando efetividade similar.

A performance de um surfactante é avaliada através da CMC e da tensão superficial e interfacial dos líquidos, que refletem eficiência e efetividade, respectivamente (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; DALVIN, 2011). Deste modo, o LCCTsNa apresenta-se como um surfactante eficaz, com propriedades semelhantes ao dodecilbenzeno sulfonato, permitindo a emulsificação do LCCT e cardanol podendo, tanto o LCCTsNa como as emulsões, ser utilizados em sua substituição.

3.3.6.2. Tamanho, distribuição de tamanho e potencial Zeta das micelas

O espalhamento dinâmico de luz foi utilizado de forma a determinar o tamanho das micelas, por meio do cálculo do seu diâmetro hidrodinâmico médio, expresso em nm, e a distribuição de tamanho, calculando o índice de polidispersão (PDI).

A **tabela 13** apresenta os resultados das medições de diâmetro hidrodinâmico médio das partículas/micelas dispersas nas soluções de LCCTsNa, e emulsões de cardanol+LCCTsNa e LCCT+LCCTsNa, nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M, e respectivos índices de polidispersão (PDI), bem como a sua carga superficial (potencial Zeta), expressa em mV.

Tabela 13. Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta das soluções de LCCtSNa e emulsões de cardanol/LCC técnico e LCCtSNa.

DIÂMETRO (nm)			
Produto			
Concentração (M)	LCCtSNa	Cardanol+LCCtSNa	LCCt+LCCtSNa
10 ⁻⁵	812,2±367,6	321,7±73,6	322,8±49,6
10 ⁻⁴	833,2±344,6	250,3±14,2	339,3±9,4
10 ⁻³	567,1±16,9	184,4±9,2	136,7±3,9
PDI			
Produto			
Concentração (M)	LCCtSNa	Cardanol+LCCtSNa	LCCt+LCCtSNa
10 ⁻⁵	0,7±0,2	0,5±0,1	0,4±0,1
10 ⁻⁴	0,8±0,2	0,5±0,0	0,5±0,1
10 ⁻³	0,8±0,0	0,4±0,1	0,5±0,1
POTENCIAL ZETA (mV)			
Produto			
Concentração (M)	LCCtSNa	Cardanol+LCCtSNa	LCCt+LCCtSNa
10 ⁻⁵	-36,9±2,7	-44,8±3,0	-43,8±2,1
10 ⁻⁴	-41,5±2,3	-50,4±4,4	-45,7±3,0
10 ⁻³	-42,7±1,9	-51,5±10,9	-48,5±1,6

A distribuição de tamanho das micelas pode apresentar-se como unimodal, apresentando uma única população; multimodal, apresentando várias populações; mododispersa ou polidispersa, contendo uma distribuição de tamanhos estreita ou larga, respectivamente (GAUMET et al., 2008).

O valor de PDI indica o grau de homogeneidade da suspensão/emulsão e pode variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 0 maior a homogeneidade da população de partículas. Pelo contrário, valores mais próximos de 1 indicam maior heterocidade na distribuição de tamanho, sugerindo uma ampla distribuição de tamanho e/ou a existência de várias populações (GAUMET et al., 2008). Para análise do tamanho e distribuição de tamanho das partículas foi apenas considerada a maior população para cada amostra/concentração.

O LCCtSNa e as emulsões apresentaram índices de polidispersão elevados ($PDI \geq 0,4$) nas três concentrações testadas, sendo consideravelmente maiores nas soluções de LCCtSNa

comparativamente com as emulsões ($PDI \geq 0,7$). Estes dados sugerem uma distribuição de tamanho de partículas multimodal e polidispersa.

Além disso, o tamanho das partículas é de ordem nanométrica em todas as amostras e concentrações testadas, registrando-se diâmetros muito superiores nas soluções de LCCtSNa, comparativamente com as emulsões nas diferentes concentrações, mesmo considerando os valores de desvio-padrão extremamente elevados. A inclusão de óleo (cardanol ou LCCt) para formulação das emulsões provocou uma redução no tamanho das micelas resultantes. Contudo, os tamanhos registrados são superiores a 100 nm, pelo que as micelas não podem ser consideradas nanopartículas (DE MATTEIS; RINALDI, 2018). A adequação do processo de emulsão, recorrendo a métodos de agitação mecânica mais intensa, ou cisalhamento, poderá reduzir o tamanho das partículas das emulsões, aumentando a sua capacidade de permeação celular e efeito tóxico.

No entanto, com o aumento da concentração verificou-se uma diminuição acentuada no tamanho das micelas nos três produtos testados, sendo que foi na emulsão LCCt+LCCtSNa, na maior concentração testada (10^{-3} M), que se registraram as partículas de menor diâmetro, $136,7 \pm 3,9$ nm.

O tamanho das partículas, bem como a sua forma, carga superficial e solubilidade influenciam as respostas biológicas. Partículas com áreas superficiais superiores por unidade de volume ou massa são quimicamente mais reativas e biologicamente mais ativas do que partículas maiores da mesma substância/composto (DE MATTEIS; RINALDI, 2018).

Deste modo, partículas com diâmetros inferiores tendem a penetrar mais facilmente as células e provocar danos celulares resultando em apoptose/necrose, o que pode explicar a maior toxicidade apresentada pela emulsão LCCt+LCCtSNa para larvas de *Ae. aegypti*, comparativamente com o LCCtSNa ou a emulsão cardanol+LCCtSNa.

A estabilidade das soluções de LCCtSNa e emulsões foi determinada através da medição do potencial Zeta. Este constitui uma medida indireta da estabilidade física das partículas que pode interferir no destino biológico dos compostos, uma vez que quando as partículas apresentam carga positiva tendem a ser atraídas por cargas negativas de superfícies e componentes biológicas, e o contrário (TAMJIDI et al., 2013).

A estabilidade física de um sistema pode, assim, ser definida pela magnitude do potencial Zeta. Quanto mais elevado for o seu valor, negativa ou positivamente, maior será a repulsão entre as partículas e menor será a tendência para a formação de agregados. Partículas

fisicamente estáveis apresentam valores de potencial zeta inferiores a -30 mV e superiores a 30 mV. Se uma suspensão apresentar potencial zeta de cerca de 20 mV (valor absoluto), a sua estabilidade será apenas a curto prazo. No entanto, suspensões podem ser estáveis quando apresentam valores de potencial Zeta da ordem de 20 mV ou inferiores sob determinadas condições como, por exemplo, quando são utilizados surfactantes de elevado peso molecular (MISHRA et al., 2009).

De acordo com os resultados apresentados na **tabela 13**, verificou-se que todos os produtos apresentaram valores de potencial Zeta inferiores a -30 mV, mesmo considerando os desvios-padrão, o que indica que as soluções de LCCtNSa e as emulsões de cardanol+LCCtNSa e LCCt+LCCtSNa possuem a capacidade de permanecer estáveis, não apresentando tendência para criar agregados.

Todas as amostras analisadas apresentam valores negativos de potencial Zeta. Tal facto pode ser explicado pela natureza aniônica do surfactante. Quando as soluções e emulsões são preparadas com surfactantes aniônicos, isto é, que possuem carga negativa, os valores de potencial Zeta serão negativos e apresentarão maior valor absoluto do que quando são utilizados surfactantes não iônicos (MARŠÁLEK, 2008; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Phulkerd e colaboradores (2014) demonstraram no seu estudo que o surfactante cardanol-formaldeído sulfonato, também aniônico, apresenta valores negativos inferiores a -30mV de potencial Zeta, tal como o LCCtSNa. Assim, o LCCtSNa constitui um surfactante capaz de conferir estabilidade às emulsões, devido à similaridade química dos componentes, sem a necessidade de isolamento dos constituintes do LCC técnico.

De acordo com De Matteis e Rinaldi (2018), a absorção de partículas carregadas positivamente é mais evidente do que partículas com carga negativa ou neutra. Deste modo, possuem maior capacidade de induzir danos celulares, resultando em maior toxicidade para os seres vivos, pelo que surfactantes aniônicos normalmente não apresentam efeitos tóxicos. Este fato sugere que a carga das partículas influencia a sua absorção pelas células, o que permite explicar a ausência de toxicidade do LCCtSNa para larvas de *Ae. aegypti* no intervalo de concentrações testado.

3.4. Conclusão

O LCC técnico constitui uma fonte renovável de fenóis lipídicos e tem origem na indústria produtiva do caju. As vantagens de utilização estão na sua disponibilidade, baixo custo, biodegradabilidade e comprovada atividade biológica em larvas de *Ae. aegypti*. Estas características tornam atrativa a sua utilização e modificação química, particularmente sulfonação, para a produção de compostos ativos multiucionais. Comparativamente com o cardanol, apesar deste apresentar atividade larvicida mais intensa, o LCCt mostra-se uma opção mais econômica e prática, pois não existe a necessidade de um processo de isolamento oneroso e de rendimento variável.

O processo de sulfonação dos fenóis lipídicos permite conferir-lhes solubilidade, importante para o exercício da toxicidade. No entanto, a atividade biológica foi reduzida em pelo menos 53 vezes após este processo. Tal efeito pode dever-se à redução/alteração das insaturações das caudas apolares, responsáveis por induzir toxicidade.

Assim, a utilização dos sulfonatos livres para controle de *Ae. aegypti* revelou-se inviável. O LCCtSNa constitui, no entanto, um surfactante eficiente para emulsões de fenóis lipídicos, podendo recorrer-se à sua utilização como surfactante em conjunto ou em substituição de surfactantes químicos convencionais, ou como emulsificante para outros inseticidas naturais e/ou convencionais.

Neste sentido, cardanol e LCCt foram emulsionados utilizando LCCtSNa, na tentativa de recuperar a atividade larvicida original. A tecnologia é simples e com baixo custo associado. A emulsão LCCt+LCCtSNa apresentou performance superior aos restantes produtos testados. Os resultados mostraram que o produto é simultaneamente inseticida/larvicida e surfactante.

O uso de emulsões de LCCt+LCCtSNa apresenta-se como uma estratégia promissora para o controle populacional de mosquitos (culicídeos), facilitando a adesão da população e a aplicação doméstica do produto, e representando uma alternativa para o controle doméstico do inseto vetor, i.e. *Ae. Aegypti*.

Capítulo 4

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DANOS GENÉTICOS PROVOCADOS POR PRODUTOS INSETICIDAS E SURFACTANTES PRODUZIDOS A PARTIR DE LIQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU TÉCNICO

4.1. Introdução

O líquido da casca da castanha de caju técnico (LCCt) é obtido no processamento industrial da castanha de caju, por via térmica, por meio de tostagem a 180-190°C (LOMONACO et al., 2009) e constitui o subproduto mais abundante e pouco valorizado na cadeia de produção de caju, sendo disponibilizado em grandes quantidades, na ordem das centenas de toneladas por ano (LOMONACO et al., 2009; PIMENTEL et al., 2009; VASAPOLLO et al., 2011). O LCCt contém cardanol, seu constituinte majoritário, ácido anacárdico, cardol e metilcardol (DOURADO et al., 2015; KUMAR et al., 2002; LOMONACO et al., 2009; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

O LCCt e produtos derivados apresentam propriedades que os tornam únicos para diversas aplicações. Estas propriedades possibilitam a formulação de produtos de ação biológica como inseticidas (DOURADO et al., 2015; GUISSONI et al., 2013; LOMONACO et al., 2009), extremamente necessários atualmente de forma a controlar a propagação de vetores como o mosquito *Ae. aegypti*, responsável pela transmissão de doenças como dengue, zica, febre amarela e chikungunya, que constituem uma grave ameaça à saúde pública no Brasil e outros países tropicais/subtropicais (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016).

Na tentativa de controle do vetor, a estratégia mais utilizada recai no uso massivo de inseticidas químicos sintéticos organofosforados e piretróides. No entanto, estas estratégias são ineficazes, limitadas e ineficientes, devido ao aumento dos níveis de resistência do inseto, não adesão da população ao controle e falta de saneamento, não se verificando a redução dos surtos e/ou incidência das doenças de forma duradoura (BRAGA; VALLE, 2007; CAMPBELL et al., 2015; GUZMAN et al., 2010; OMS, 2009). Neste cenário, são desejáveis novas estratégias e produtos inseticidas alternativos para o controle de formas imaturas de vetores (larvas) nos criadouros (OMS, 2009).

O LCCt constitui um intermediário natural para sulfonação, resultando em LCCtSNa. Este apresenta estrutura similar aos produtos utilizados para a produção de surfactantes de

origem petroquímica, como o dodecilbenzeno sulfonato, apresentando propriedades surfactantes semelhantes, conforme apresentado no **Capítulo 3** do presente estudo.

O LCCTsNa não apresenta atividade inseticida quando utilizado de forma independente. Deste modo, de acordo com o estudo apresentado no **Capítulo 3**, o LCCT foi emulsionado usando LCCTsNa, formando um produto multifuncional, com atividade larvicida e surfactante conjunta ($CL_{50}=15,8 \text{ mg L}^{-1}$) com vista à substituição comercial dos produtos de limpeza já integrados nas rotinas diárias da população e também de inseticidas convencionais, permitindo o controle dos criadouros do insetos a partir do escoamento das águas residuais e acúmulo do produto, na sequência da realização da higienização de superfícies e espaços domésticos.

O efluente doméstico contendo o produto poderá atingir o meio aquático, bem como os solos. Assim, faz-se necessário conhecer a sua ecotoxicidade para organismos não-alvo, permitindo caracterizar a natureza e magnitude dos riscos para a saúde humana e receptores ecológicos do produto.

A avaliação ecotoxicológica de substâncias pode ser realizada por meio da observação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, utilizando diversos métodos: estudo das exposições acidentais a uma substância a uma substância, decorrentes, por exemplo, de descargas, derramamentos e/ou vazamentos de produtos tóxicos na atmosfera, cursos de água, solo; estudos *in vitro* usando células/linhagens de células; e exposição *in vivo* em animais/plantas experimentais (PARASURAMAN, 2011). A toxicidade de uma substância depende, não só da sua natureza, mas de fatores físico-químicos como temperatura, pH, salinidade, assim como do organismo-teste utilizado, concentração da substância, tempo de exposição e condições de realização do teste (ROZMAN; DOULL; HAYES JR., 2010).

Os ecossistemas naturais são constituídos por vários níveis tróficos de organismos que interagem. O dano a qualquer um desses organismos pode ter um impacto em todo o ecossistema (FAO, 2010). Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a ecotoxicidade da emulsão LCCT+LCCTsNa e seus constituintes individualmente, recorrendo a vários organismos-teste de diferentes ambientes e níveis tróficos. Os dados obtidos nos testes ecotoxicológicos permitirão conhecer a toxicidade do produto, podendo auxiliar na derivação de padrões para qualidade ambiental e contribuir para a avaliação de risco ecotoxicológico do novo inseticida/surfactante (EUROPEAN COMMISSION, 2011; OECD, [s.d.]; US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, OFFICE OF CHEMICAL SAFETY AND POLLUTION PREVENTION, [s.d.]).

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Compostos-teste

O LCCt utilizado nos ensaios foi disponibilizado pela empresa Resibrás, Fortaleza-CE, Brasil. Trata-se de um produto com composição variável, devido às possíveis variações de fonte e origem, temperatura de tostagem da castanha, bem como de outros parâmetros físico-químicos, da planta e solo. O LCCt apresenta solubilidade em solventes orgânicos, mas não em água.

O LCCtSNa (surfactante) foi obtido através da sulfonação de LCCt com ácido sulfúrico fumegante (65,5-68% SO₃), pelo processo descrito no pedido de patente BR 10 2017 027264 8 (JORGE et al., 2017), apresentado no **Anexo I**. A emulsão LCCt+LCCtSNa (na proporção mássica 1:6 (LCC:LCCtSNa)) foi preparada de acordo com a metodologia descrita no item **3.2.3 do Capítulo 3** do presente trabalho. Tanto o surfactante como a emulsão apresentam solubilidade em água.

4.2.2. Ensaio de inibição de crescimento algal em *Raphidocelis subcapitata*

Os ensaios de toxicidade em *R. subcapitata* foram realizados segundo os protocolos OECD (2006) e ABNT (2011). A cultura algal foi mantida em laboratório segundo ABNT (2011). Uma população de algas foi exposta a diferentes concentrações de LCCt e emulsão LCCt+LCCtSNa (1:6) (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹), e LCCtSNa (0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 mg L⁻¹). Como controle negativo foi utilizado meio de cultivo (Oligo)+água deionizada e como controle solvente meio de cultivo+DMSO a 1%. As concentrações foram diluídas em meio de cultivo a partir de soluções estoque preparadas com as amostras e DSMO. A concentração inicial de inóculo algal em cada réplica foi entre 1x10⁴ e 1x10⁵ células mL⁻¹, como recomendado pela ABNT (2011). Os testes foram realizados em condições de esterilidade em Erlenmeyers de vidro contendo 45 mL do meio de cultivo. Os Erlenmeyers ficaram sob condições controladas de luminosidade (luz branca, 4500 lux), temperatura (23 a 27°C) e agitação (160 rpm) por um período de 72h. Após este período, o número de algas de cada concentração foi contado em Câmara de Neubauer no microscópio e comparado com o controle negativo. A inibição de crescimento foi o indicativo de toxicidade e foi utilizada para determinação da Concentração de Inibição (CI₅₀). Para validação dos ensaios

o número final de células no controle negativo foi no mínimo 16 vezes maior em relação ao inóculo inicial do teste.

Os resultados foram submetidos a análise estatística no software ICp (versão 2.0) (NORBERG-KING, 1993) para determinação da CI_{50} . Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG), na Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (FT/UNICAMP), Campinas-SP.

4.2.3. Ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*

Os testes de toxicidade aguda com *D. similis* foram realizados de acordo com os protocolos OECD (2004) e ABNT (2016). A cultura foi mantida em laboratório segundo ABNT (2016). Os organismos com entre 6 e 24h de idade foram expostos a diversas concentrações de LCCT e emulsão LCCT+LCCTsNa (1:6) (0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg L⁻¹), e LCCTsNa (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 mg L⁻¹), por 48h em temperatura controlada (21±1°C). Como controle negativo foi utilizado meio de cultivo (Meio MS) e como controle solvente meio de cultivo+DMSO a 1%, para LCCT e emulsão, e meio de cultivo+DMSO a 0,5% para LCCTsNa. As concentrações foram diluídas em meio de cultivo a partir de soluções estoque preparadas com as amostras e DMSO. Para cada diluição, inclusive nos controles, foram adicionados 20 organismos, escolhidos e distribuídos aleatoriamente em quatro réplicas com volumes iguais a 10 mL, com os recipientes fechados e sem alimentação. A quantidade de organismos imóveis em cada concentração testada foi registrada no final do ensaio e foi calculada a porcentagem de imobilidade para cada uma. Os testes foram validados quando, no seu término, a porcentagem de organismos imóveis no controle negativo não ultrapassou 10%.

O número de organismos imóveis em cada concentração testada foi utilizado para calcular a concentração que causou efeito em 50% dos organismos (CE_{50}), utilizando o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977), através do software JSPEAR.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG), na Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (FT/UNICAMP), Campinas-SP.

4.2.4. Ensaio de toxicidade aguda em *Danio rerio*

Os ovos da espécie *Danio rerio* utilizados são provenientes de matrizes (peixes adultos) mantidas no Laboratório Especial de Toxicologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan, São Paulo-SP, de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2016b). Após a coleta, os ovos foram transferidos para o Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN), São Paulo-SP, onde foram realizados os ensaios, de acordo com o protocolo nº 263 da OECD (2013).

Com o auxílio de uma lupa binocular, os ovos fecundados foram separados dos não fecundados, e usados nos ensaios de ecotoxicidade aguda no estágio embrionário. Os ovos foram expostos por um período de 96h a LCCt, LCCtSNa e LCCt+LCCtSNa nas concentrações 12,5, 25,0, 50,0, 75,0 e 100,0 mg L⁻¹, utilizando meio de cultivo MS para as diluições. Para cada tratamento/concentração foram realizados três ensaios, em triplicata, cada um com 60 ovos, totalizando 180 ovos por tratamento, além do controle negativo (meio de cultivo MS) e controle solvente (DMSO a 1%), submetidos às mesmas condições. Os ovos foram colocados em placas de 24 poços e mantidos à temperatura de 26±1°C.

Foram analisados os parâmetros: eclosão das larvas, deformidades, coagulação de ovos fertilizados e falta de batimentos cardíacos. A letalidade/toxicidade aguda foi determinada a partir de um resultado positivo nos últimos dois indicadores referidos e a CL₅₀ foi calculada utilizando o método estatístico não paramétrico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977), por meio do software JSPEAR. As deformidades observadas nos organismos durante o teste foram avaliadas pelo teste *t* de Student, com nível de significância de 0,05. Os testes foram validados quando no término dos ensaios a porcentagem de organismos mortos no controle não ultrapassou 10%.

O uso de *Danio rerio* no presente estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IPEN), sob coordenação do Centro de Biotecnologia (CB), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), sob o parecer nº 139/14/CEUA-IPEN/SP.

4.2.5. Ensaio de fitotoxicidade em *Allium cepa*

O ensaio de *A. cepa* foi realizado de acordo com Fiskejő (2008), Grant (1982) Ma e colaboradores (1995). As sementes utilizadas neste trabalho foram adquiridas comercialmente

da Marca Isla® (Isla Sementes Ltda., Brasil), isentas de agroquímicos (variedade Baia Periforme).

Sementes de *A. cepa* foram continuamente expostas por um período de 96h a LCCT em concentrações entre 25,0 e 500,0 mg L⁻¹, LCCTsNa em concentrações entre 150,0 e 2500,0 mg L⁻¹ e LCCT+LCCTsNa na proporção 1:6, em concentrações entre 25,0/150,0 e 500,0/2500,0 mg L⁻¹. Foram colocadas para germinação em papel germitest, à temperatura 23±2°C, com fotoperíodo de 12:12h. Para cada tratamento/concentração foram realizadas três repetições, cada uma com 30 sementes, totalizando 90 sementes por tratamento, além do controle negativo (Água MiliQ) e controle veículo (DMSO a 1%), submetidos às mesmas condições.

Os efeitos tóxicos foram avaliados por meio do cálculo do índice de germinação (IG) - proporção de sementes com protrusão da radícula visível, e aferição do comprimento médio das raízes (CRM) com auxílio de paquímetro digital marca Digimess®, de acordo com as **equações 3 e 4**:

$$IG = \frac{\text{Número de sementes germinadas}}{\text{Número total de sementes}} \times 100$$

Equação 3. Cálculo do índice de germinação (IG), em porcentagem.

$$CRM = \frac{\sum \text{Valores comprimentos da raízes}}{\text{Número de sementes germinadas}}$$

Equação 4. Cálculo da média de crescimento das raízes (CRM), em mm.

Após o período de exposição, as raízes foram fixadas em Solução *Carnoy* 3:1 (álcool/ácido acético), por 8 horas, posteriormente transferidas para novo fixador Carnoy e armazenadas a 4 °C para análise. Após fixação, as raízes foram lavadas com água destilada e hidrolizadas em HCl 1N a 60°C por 10 minutos. Em seguida, as raízes foram lavadas novamente 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 suas regiões meristemáticas seccionadas, colocadas nas lâminas com 1,0ml de solução de carmim acético a 2% para contracoloração, e maceradas (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Para cada tratamento foram preparadas cinco lâminas, e realizadas fotos das mesmas em microscópio óptico Nikon, no aumento de 400x. Posteriormente, foi realizada a contagem de 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células por tratamento, com o auxílio do *software* Fiji Cell Counter (DE VOS, 2001). Na contagem foram consideradas células sem alteração, em

processo de mitose, e células com diferentes tipos de alterações nucleares e formação de micronúcleos.

A avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e efeitos clastogênicos e aneugênicos foram realizadas por meio do cálculo dos índices mitótico (IM), de alterações cromossômicas (IAC) e de mutagenicidade (IMC), recorrendo às **equações 5, 6 e 7**, respectivamente:

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

Equação 5. Cálculo do índice mitótico (IM), em porcentagem.

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

Equação 6. Cálculo do índice de alterações cromossômicas (IAC), em porcentagem.

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

Equação 7. Cálculo do índice de mutagenicidade (IMN), em porcentagem.

Os resultados foram analisados estatisticamente recorrendo ao software R 3.1.1. Após teste de normalidade Shapiro-Wilk, dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, e dados com distribuição normal foram analisados recorrendo ao teste paramétrico ANOVA *one-way*, para análise de variância de índice de germinação, comprimento das raízes, e da frequência de células em mitose, alterações cromossômicas e micronúcleos. Quando verificadas diferenças estatísticas, as análises de variância foram seguidas de teste *à posteriori* de Dunn ou de Tukey, respectivamente, para comparação de pares de médias, considerando um nível de significância de 5%.

4.3. Resultados

4.3.1. Toxicidade em *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia similis* e *Danio rerio*

Para a introdução de inseticidas no circuito comercial, diversas organizações governamentais mundiais como a USEPA, OECD ou Comissão Europeia, exigem o seu registro, documentado com resultados de estudos toxicológicos realizados pela indústria. Estes,

e outros estudos de ampla gama de laboratórios ambientais e estudos de campo disponíveis na literatura científica pública apresentam valores de toxicidade e permitem o estabelecimento de valores de referência para a qualidade da vida aquática e terrestre, sendo também utilizados nas avaliações de risco ecológico realizadas pelas organizações (EUROPEAN COMMISSION, 2011; OECD, [s.d.]; USEPA, OCSPP, [s.d.]).

Os resultados relativos aos testes de toxicidade da emulsão LCCt+LCCtSNa, bem como de cada um dos seus constituintes isolados, com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos, e também em plantas terrestres superiores, são a seguir apresentados.

Os valores brutos dos testes de toxicidade em organismos aquáticos podem ser consultados no **Apêndice A**. Os resultados são apresentados na **tabela 14**.

Tabela 14. Concentração inibitória (CI), efetiva (CE) ou letal (CL) para 50% dos indivíduos das espécies *R. subcapitata*, *D. similis* e *D. rerio*, respectivamente, expostos a LCC técnico, LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa, com nível de confiança de 95%.

Organismo	Endpoint	LCCt (mg L ⁻¹)	LCCtSNa (mg L ⁻¹)	LCCt+LCCtSNa (mg L ⁻¹)
<i>R. subcapitata</i>	CI ₅₀	0,33 (0,30-0,37)	7,10 (5,60-15,40)	0,30 (0,28-0,31)
<i>D. similis</i>	CE ₅₀	0,12 (0,09-0,15)	0,75 (0,64-0,89)	0,15 (0,13-0,18)
<i>D. rerio</i>	CL ₅₀	>100 (ND*)	>100 (ND*)	69,11 (57,41-83,18)

ND* - Não determinado, devido à baixa mortalidade em 96h nas concentrações testadas.

Foi possível observar que *D. similis* foi o organismo mais sensível aos três produtos testados. O LCCtSNa, produto obtido após sulfonação do LCCt, foi menos tóxico que o produto que lhe deu origem e que a mistura de ambos. Para *R. subcapitata* e *D. similis*, notou-se que os valores dos *endpoints* apresentaram diferenças reduzidas entre LCCt e LCCt+LCCtSNa. Assim, verifica-se que o surfactante (LCCtSNa) pouco contribui para a toxicidade da emulsão quando comparado com o LCCt.

D. rerio apresentou-se como a espécie mais resistente aos produtos testados, não tendo sido possível determinar a CL₅₀ para LCCt e LCCtSNa devido à baixa mortalidade verificada após o período de exposição nas concentrações testadas, sendo deste modo superior a 100 mg L⁻¹. A letalidade foi avaliada recorrendo à observação de coagulação dos ovos e ausência de batimentos cardíacos, conforme referido na metodologia. Relativamente aos parâmetros taxa de eclosão e deformidades, não foram identificadas alterações nos organismos teste

comparativamente com o controle negativo, pelo que não se verificaram diferenças estatísticas de acordo com os resultados do teste t de Student.

A mistura LCCT+LCCTsNa, na proporção 1:6, apresentou-se como o produto mais tóxico para todos os organismos testados, sugerindo a existência de uma relação de sinergismo entre os seus produtos constituintes. Estes resultados confirmam o padrão de toxicidade obtido nos ensaios de toxicidade em larvas L3/L4 de *Ae. aegypti*, apresentados no item **3.3.4.1** do **Capítulo 3** do presente estudo. Deste modo, os produtos podem ser ordenados por ordem crescente de toxicidade da seguinte forma: LCCTsNa < LCCT < LCCT+LCCTsNa.

4.3.2. Ensaio de fitotoxicidade em *Allium cepa*

Os efeitos tóxicos de LCCT, LCCTsNa e LCCT+LCCTsNa (proporção 1:6) em sementes de *A. cepa* foram avaliados recorrendo ao índice de germinação (IG) e comprimento médio das raízes (CMR). Os dados são apresentados nas **tabelas 15** e **16**, respectivamente.

Tabela 15. Média e desvio-padrão do índice de germinação (IG), em percentagem, observado em sementes de *Allium cepa* expostas a LCC técnico, LCCT sulfonato de sódio e LCC técnico+LCCT sulfonato de sódio.

IG (%)			
Concentração (mg L ⁻¹)	LCCT	LCCTsNa	LCCT+ LCCTsNa
0	28,89±5,09 ^{aA}	46,67±10,00 ^{aA}	46,67±10,00 ^{aA}
27,5 / 165,0	22,22±12,62 ^{abA}	34,44±7,70 ^{aA}	33,30±6,67 ^{abA}
55,0 / 330,0	24,44±8,39 ^{abA}	24,44±6,94 ^{aA}	40,00±10,00 ^{aA}
165,0 / 990,0	21,11±10,72 ^{abA}	35,56±9,62 ^{aA}	36,67±6,67 ^{abA}
220,0 / 1320,0	8,89±3,85 ^{cA}	48,89±11,71 ^{abB}	32,22±6,94 ^{abB}
440,0 / 2640,0	12,22±1,92 ^{bcA}	36,67±10,00 ^{abB}	16,67±8,82 ^{bcA}
0*	7,78±3,85 ^{cA}	—	6,67±3,33 ^{cA}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma linha não apresentam diferença estatística entre si (p<0,05). 0 – controle negativo; 0* - controle veículo; Soluções de LCCTsNa foram preparadas apenas com água, não sendo assim apresentados resultados para 0* (—).

Tabela 16. Média e desvio-padrão do comprimento médio das raízes (CMR), em mm, observado em sementes de *Allium cepa* expostas a LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa.

CMR (mm)			
Concentração (mg L ⁻¹)	LCCT	LCCTsNa	LCCT+ LCCTsNa
0	5,43±1,47 ^{aA}	6,00±0,54 ^{aA}	6,00±0,54 ^{aA}
27,5 / 165,0	4,80±0,66 ^{aA}	7,86±1,75 ^{aB}	5,48±0,78 ^{aAB}
55,0 / 330,0	3,64±0,56 ^{abA}	6,16±1,79 ^{aA}	6,29±0,69 ^{aA}
165,0 / 990,0	3,83±0,97 ^{abA}	6,70±1,39 ^{aB}	5,90±0,39 ^{aAB}
220,0 / 1320,0	3,24±0,23 ^{ba}	7,04±2,25 ^{aB}	5,97±1,15 ^{aAB}
440,0 / 2640,0	2,63±0,74 ^{ba}	6,11±1,35 ^{aB}	4,12±0,96 ^{aAB}
0*	5,77±2,92 ^{aA}	—	5,79±0,85 ^{aA}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma linha não apresentam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). 0 – controle negativo; 0* - controle veículo; Soluções de LCCTsNa foram preparadas apenas com água, não sendo assim apresentados resultados para 0* (—).

De acordo com a **tabela 15**, concentrações até 165,0 mg L⁻¹ de LCCT não influenciaram significativamente a germinação das sementes de *A. cepa*, comparativamente com o controle negativo, bem como o crescimento das raízes (**tabela 16**), não apresentando toxicidade. No entanto, em concentrações superiores a 220,0 mg L⁻¹ verificou-se toxicidade.

Com a sulfonação ocorreu a diminuição da toxicidade do LCCT, sendo que o LCCTsNa não apresentou diferença estatística para o controle negativo em qualquer concentração testada até 2640,0 mg L⁻¹, tanto no IG como no CMR.

Na emulsão de LCCT+LCCTsNa (preparada na proporção 1:6), produto que apresentou maior toxicidade para *Ae. aegypti* e para os organismos utilizados nos restantes testes de toxicidade, verificou-se a ausência de toxicidade para *A. cepa* em todas as concentrações testadas.

Na **tabela 17** são apresentados os índices de divisão celular dos meristemas expostos aos três produtos nas diferentes concentrações, calculados por meio da análise de células em divisão nas diferentes fases (prófase, metáfase, anáfase e telófase).

Tabela 17. Média e desvio-padrão do índice mitótico (IM), em porcentagem, observado em sementes de *Allium cepa* expostas a LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa.

IM (%)			
Concentração (mg L ⁻¹)	LCCT	LCCtSNa	LCC+LCCTsNa
0	93,97±2,84 ^{abcA}	98,07±0,84 ^{abB}	98,07±0,84 ^{abB}
27,5 / 165,0	94,68±1,58 ^{abcA}	91,17±1,14 ^{baA}	92,98±4,18 ^{bcA}
55,0 / 330,0	95,70±2,21 ^{abcA}	92,91±1,23 ^{baA}	94,22±2,55 ^{baA}
165,0 / 990,0	96,50±1,29 ^{abcA}	92,91±2,61 ^{baA}	86,70±4,64 ^{cbB}
220,0 / 1320,0	92,83±1,75 ^{adA}	94,07±1,08 ^{baB}	96,39±1,42 ^{abB}
440,0 / 2640,0	91,62±6,54 ^{abdA}	92,77±2,40 ^{baA}	96,06±1,59 ^{abA}
0*	90,77±2,95 ^{da}	—	96,55±1,57 ^{abB}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma linha não apresentam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). 0 – controle negativo; 0* - controle veículo; Soluções de LCCtSNa foram preparadas apenas com água, não sendo assim apresentados resultados para 0* (—).

Observou-se que o LCCT não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas, não havendo diferença estatística entre elas e o controle negativo. O maior valor de IM verificou-se na concentração 165,0 mg L⁻¹.

Células metistemáticas expostas a LCCtSNa em todas as concentrações testadas apresentaram redução estatisticamente significativa do índice mitótico comparativamente com o controle negativo ($p < 0,05$).

Na emulsão LCCt+LCCtSNa, até à concentração de 165,0+990,0 mg L⁻¹, o índice mitótico é significativamente inferior ao verificado no controle negativo à medida que a concentração aumentou. Contudo, nas concentrações de 220,0+1320,0 mg L⁻¹ e 440,0+2640,0 mg L⁻¹, este efeito foi revertido, havendo um aumento do IM, aproximando-se do observado no controle negativo ($p > 0,05$), contrariamente ao verificado nos seus constituintes isolados. O aumento do IM nestas concentrações em comparação com concentrações inferiores indicou que o aumento da concentração teve um impacto positivo no processo de divisão celular. No entanto, devem ser considerados os elevados desvios-padrão verificados nas três menores concentrações comparativamente com as duas maiores, que foram consideravelmente superiores.

Neste trabalho foram também avaliados os efeitos genotóxicos do LCCT, LCCtSNa e emulsão LCCt+LCCtSNa, por meio da análise da frequência de alterações cromossômicas (IAC) em células do meristema das raízes de *A. cepa*, especificamente C-metáfase, ponte

cromossômica, brotamento nuclear, núcleo lobulado, anáfase multipolar, células poliplóides, células binucleadas e perda cromossômica (**tabela 18**).

Tabela 18. Média e desvio-padrão do índice de alterações cromossômicas (IAC), em porcentagem, observado em sementes de *Allium cepa* expostas a LCC técnico, LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa.

Concentração (mg L ⁻¹)	IAC (%)		
	LCCT	LCCtSNa	LCC+LCCtSNa
0	0,36±0,24 ^{acA}	0,16±0,15 ^{aA}	0,16±0,15 ^{abA}
27,5 / 165,0	0,29±0,29 ^{abA}	0,36±0,27 ^{aA}	0,08±0,08 ^{aA}
55,0 / 330,0	0,20±0,15 ^{abA}	0,18±0,16 ^{aA}	0,28±0,14 ^{abA}
165,0 / 990,0	0,27±0,21 ^{abcA}	0,43±0,27 ^{bA}	0,08±0,11 ^{aA}
220,0 / 1320,0	0,14±0,15 ^{baA}	0,59±0,19 ^{cB}	0,24±0,11 ^{abA}
440,0 / 2640,0	0,08±0,08 ^{baA}	0,53±0,25 ^{cB}	0,39±0,29 ^{abAB}
0*	0,52±0,17 ^{cA}	—	0,10±0,14 ^{abB}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma linha não apresentam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). 0 – controle negativo; 0* - controle veículo; Soluções de LCCtSNa foram preparadas apenas com água, não sendo assim apresentados resultados para 0* (—).

Em concentrações superiores a 165,0 mg L⁻¹, observou-se diminuição significativa da frequência de alterações cromossômicas para LCCT relativamente ao controle negativo, não se apresentando genotóxico em qualquer concentração testada.

Para LCCtSNa, registrou-se um aumento estatisticamente significativo na frequência de alterações cromossômicas comparativamente com o controle negativo em concentrações acima de 990,0 mg L⁻¹. Deste modo, o LCCtSNa é genotóxico a partir da terceira maior concentração quando considerada a proporção 1:6.

A emulsão, tal como o LCCT, não apresentou efeito genotóxico em qualquer concentração testada.

As atividades clastogênica e aneugênica dos compostos foram avaliadas recorrendo à análise da frequência de micronúcleos (IMT) nas raízes. Os micronúcleos são originários de fragmentos cromossômicos (clastogênese) ou cromossomos inteiros (aneugênese) que não podem ser incluídos nos núcleos-filhos na conclusão da telófase durante a mitose. Estes cromossomos ou fragmentos são envolvidos por uma membrana nuclear e apresentam uma morfologia

semelhante aos núcleos, exceto pelo seu tamanho mais reduzido (FENECH et al., 2011; PESNYA, 2013) (tabela 19).

Tabela 19. Média e desvio-padrão do índice de mutagenicidade (IMT), em porcentagem, observado em sementes de *Allium cepa* expostas a LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa.

IMT (%)			
Concentração (mg L ⁻¹)	LCCT	LCCTsNa	LCCT+LCCTsNa
0	0,20±0,14 ^{acA}	0,10±0,17 ^{abcA}	0,10±0,17 ^{aA}
27,5 / 165,0	0,12±0,13 ^{abcA}	0,28±0,33 ^{abcA}	0,08±0,08 ^{aA}
55,0 / 330,0	0,14±0,20 ^{abcA}	0,06±0,09 ^{abA}	0,26±0,32 ^{aA}
165,0 / 990,0	0,29±0,26 ^{acA}	0,23±0,11 ^{acA}	0,10±0,12 ^{aA}
220,0 / 1320,0	0,02±0,04 ^{bA}	0,28±0,23 ^{acA}	0,18±0,08 ^{aA}
440,0 / 2640,0	0,08±0,13 ^{abA}	0,12±0,13 ^{abcA}	0,14±0,19 ^{aA}
0*	0,12±0,13 ^{acA}	—	0,12±0,13 ^{aA}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma linha não apresentam diferença estatística entre si ($p < 0,05$). 0 – controle negativo; 0* - controle veículo; Soluções de LCCTsNa foram preparadas apenas com água, não sendo assim apresentados resultados para 0* (—).

Relativamente a danos genéticos permanentes, decorrentes da formação de micronúcleos nas células (IMT), observou-se que para LCCT, na concentração de 220,0 mg L⁻¹, houve uma redução significativa da frequência de micronúcleos, comparativamente com o controle negativo. Para as restantes concentrações e demais produtos analisados, a frequência de micronúcleos registrada não apresentou diferença estatística relativamente ao controle negativo ($p > 0,05$), indicando que qualquer um dos produtos não representa risco de mutagenicidade para *A. cepa*.

O ensaio em *A. cepa* permitiu verificar que os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e clastogênicos/aneugênicos do LCCT e LCCTsNa isolados, verificados a partir de determinadas concentrações, são revertidos quando se emulsionam os dois compostos.

4.4. Discussão

Apesar da grande quantidade de efluentes gerados no processamento de castanha de caju pela indústria, e das diversas aplicações industriais e farmacêuticas do LCCt e cardanol, seu maior constituinte, estes não têm sido alvo de muitos estudos de ecotoxicidade.

O estudo de Pimentel e colaboradores (2009) foi o primeiro a avaliar a toxicidade dos efluentes da indústria de beneficiamento da castanha de caju, brutos e tratados, bem como dos componentes cardanol e cardol isolados a partir do LCCt, testando a sua toxicidade aguda em *Artemia* sp. A CL₅₀ média do cardanol foi de 0,42 mg L⁻¹, ao final de 48h de exposição.

O cardanol é o maior constituinte do LCCt e é um composto amplamente conhecido e utilizado, encontrando-se registrado pela *European Chemicals Agency* (ECHA) sob o CAS nº 8007-24-7 (ECHA, [s.d.]). No dossier de registro constam resultados de ensaios de toxicidade em organismos marinhos, realizados sem recorrer a qualquer substância veículo: alga *Skeletoma costatum*, CE₅₀ (biomassa)=250,0 mg L⁻¹ (210,0-300,0mg.L⁻¹) e CE₅₀ (taxa de crescimento)=1300,0 mg L⁻¹; invertebrado *Acartia tonsa*, CL₅₀>1000,0 mg L⁻¹; e peixe *Cyprirodon variegatus* (juvenil), CL₅₀>1000,0 mg L⁻¹. Neste sentido, o cardanol não apresenta toxicidade aguda no limite de solubilidade na água (0,3 mg L⁻¹) para os organismos apresentados. Entre os resultados apresentados para cardanol notam-se diferenças significativas na toxicidade para organismos marinhos, tendo a *Artemia* sp. apresentado muito maior sensibilidade que os restantes organismos, também eles de água salgada.

Nos resultados de toxicidade obtidos em larvas da espécie *Ae. aegypti* nos ensaios apresentados no **Capítulo 3** do presente estudo (CL₅₀ de 22,3 e 50,4 mg L⁻¹ para cardanol e LCCt, respectivamente), e nos resultados da literatura (CL₅₀ de 32,9 e 50,4 mg L⁻¹ para cardanol e LCCt, respectivamente) (LOMONACO et al., 2009), o cardanol apresenta maior toxicidade que o LCCt. De acordo com estes dados, caso fossem realizados ensaios com LCCt nos mesmos organismos marinhos usados para determinar a toxicidade do cardanol (*Skeletoma costatum*, *Acartia tonsa*, *Cyprirodon variegatus* e *Artemia* sp.), os valores determinados poderiam ser superiores, devido à menor toxicidade do LCCt.

No estudo realizado por Leite e colaboradores (2015) foi observado o crescimento radicular em bulbos de *A. cepa* expostos a concentrações de LCCt até 69,5 mg L⁻¹, assim como índice mitótico, índice de alterações cromossômicas e frequência de micronúcleos nas células meristemáticas das raízes. Nas concentrações testadas, não se registraram efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos ou mutagênicos sobre *A. cepa*.

O ensaio descrito no presente estudo foi realizado com sementes de *A. cepa*, em vez de bulbos, como descrito no estudo anteriormente apresentado (LEITE et al., 2015). No entanto, os resultados citados corroboram os resultados obtidos e apresentados, não tendo sido verificada genotoxicidade em qualquer concentração de LCCT testada.

O LCCTsNa, resultante da sulfonação do LCCT, também não inibiu a germinação das sementes e o crescimento das raízes. Contudo, verificou-se diminuição estatisticamente significativa na divisão celular das células meristemáticas das raízes de *A. cepa*, ainda que a diferença para o controle negativo em qualquer concentração testada tenha sido inferior a 10%. Relativamente a alterações cromossômicas e micronúcleos, o produto não influenciou a sua ocorrência.

A emulsão LCCT+LCCTsNa (1:6) apresentou citotoxicidade em concentrações superiores a 165,0+990,0 mg L⁻¹, comparativamente com o controle negativo. No entanto, à exceção desta concentração em particular, os valores de IM registrados na emulsão foram superiores aos dos seus constituintes isolados com diferença estatística, pelo que não se pode afirmar que a emulsão seja citotóxica. O efeito genotóxico do LCCTsNa não se manteve após a mistura com LCCT.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a adição de um surfactante, uma vez que aumenta a solubilidade do óleo (LCCT) na água, potencializa a sua toxicidade não só em organismos-alvo, como nos restantes seres vivos. Desta forma, a emulsão apresentou toxicidade superior ao LCCT isolado nos três organismos aquáticos testados, *R. subcapitata*, *D. similis* e *D. rerio*.

Nos testes realizados em *A. cepa*, verificou-se que os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e clastogênicos e/ou aneugênicos são muito similares para LCCT isolado e emulsão LCCT+LCCTsNa. Importa salientar que as concentrações testadas são muito superiores à concentração letal para 50% dos indivíduos da espécie *Ae. aegypti* determinada nos ensaios de toxicidade apresentados no **Capítulo 3**. Deste modo, dificilmente seriam encontradas no ambiente após diluição do produto aplicado, pelo que tanto a emulsão LCCT+LCCTsNa como os seus constituintes isolados não são fitotóxicos para o modelo terrestre estudado. À semelhança dos resultados dos testes de toxicidade em organismos aquáticos, o LCCTsNa apresentou-se menos tóxico que os restantes produtos.

Os organismos usados nos ensaios, *R. subcapitata*, *D. similis*, *D. rerio* e *A. cepa*, mostraram-se adequados para a determinação da toxicidade do produto multifuncional

analisado, bem como dos seus componentes isolados, verificando-se um padrão na toxicidade apresentada: $LCCtSNa < LCCT \leq LCCT+LCCtSNa$.

4.5. Conclusão

Dentre os organismos aquáticos testados, *D. similis* foi o organismo mais sensível para os três produtos: LCCT, LCCTSNa e LCCT+LCCTSNa, enquanto o *D. rerio* se mostrou mais resistente. Os valores de CI_{50} e CE_{50} obtidos para *R. subcapitata* e *D. similis*, e a avaliação de fitotoxicidade em *Allium cepa* para LCCT foram similares à mistura LCCT+LCCTSNa, mostrando que a toxicidade da mistura é majoritariamente devida ao óleo. Deste modo, o produto da sulfonação foi menos tóxico do que o produto que lhe dá origem para todos os organismos testados. Para *D. rerio* não foi possível determinar a CL_{50} exata para estes dois compostos devido à baixa mortalidade observada nas concentrações testadas. A emulsão LCCT+LCCTSNa revelou-se mais tóxica que os seus constituintes isolados (LCCT e LCCTSNa) para os organismos aquáticos testados. Em *A. cepa*, não foi observada toxicidade em qualquer produto.

O ensaio de *A. cepa* demonstrou que os compostos não apresentam riscos para a integridade do material genético nas concentrações testadas.

Outros estudos devem ser realizados de forma a compreender os mecanismos envolvidos na toxicidade da emulsão proposta para o controle de criadouros e larvas de *Ae. aegypti*, que se pretende comercializar como produto multifuncional inseticida/surfactante.

Os dados obtidos servem como base para a futura derivação de critérios para qualidade ambiental, de forma a avaliar o risco ecotoxicológico do novo produto caso venha a ser comercializado.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O produto multifuncional com atividade larvicida e surfactante conjunta, LCCt+LCCtSNa, proposto neste estudo, constitui uma alternativa aos inseticidas convencionais para o controle populacional de mosquitos vetores, especificamente *Ae. aegypti*, em criadouros domésticos, principais locais de oviposição, podendo contribuir para a redução dos surtos de doenças causadas pelos vírus transmitidos por estes insetos.

A sua atividade surfactante permite uma fácil aplicação e a substituição dos surfactantes convencionais de origem petroquímica, facilitando a adesão da população à sua utilização, recorrendo ao escoamento das águas residuais domésticas para atingir um grande número de criadouros.

Os ensaios toxicológicos realizados permitem conhecer a toxicidade do produto para os ecossistemas e potencial de danos genéticos, fornecendo subsídios para a derivação de critérios de qualidade ambiental, de modo a avaliar o seu risco ecotoxicológico e, futuramente, permitir a sua produção em escala comercial, disponibilização aos órgãos de controle de zoonoses e mercado/comercialização para aplicações de controle epidemiológico, visando a segurança de organismos não-alvo e ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALMANZOR, B. L. J.; HOWELL, T. H.; CARVAJAL, T. M. Ecdysis period and rate deviations of dengue mosquito vector, *Aedes aegypti* reared in different artificial water-holding containers. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, p. 37-45, 2016.
- ALMEIDA, M. L. DE. **Estabilidade de emulsões de água-em-óleo na presença de campo elétrico externo**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p.103, 2014.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry: theory and practice**. Oxford University Press, 1998.
- ARDUINO, M. DE B.; ÁVILA, G. DE O. DE. Aspectos físico-químicos da água de criadouros de *Aedes aegypti* em ambiente urbano e as implicações para o controle da dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 89–100, 2 abr. 2015.
- ARRUDA, E. J. DE et al. Evaluation of toxic effects with transition metal ions, EDTA, SBTI and acrylic polymers on *Aedes aegypti* (L., 1762) (Culicidae) and *Artemia salina* (Artemidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 503–509, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648:2011: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**, p.28, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:2016: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**, p.27, 2016a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088:2016: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae)**, p.25, 2016b
- BAR-ILAN, O. et al. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Small**, v. 5, n. 16, p. 1897–1910, 17 ago. 2009.
- BARBOSA, A. A.; SILVA, M. A. N. DA. Preferência por local de oviposição de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae), em relação à presença de imaturos da própria espécie, sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 4, p. 1147–1152, 2002.
- BARÇANTE, M. F. D. S. **Estudo de emulsões água em óleo para formação de hidratos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Departamento de Engenharia Mecânica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p.143, 2016.
- BARNETT, E. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, p. 850–856, 15 mar. 2007.
- BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007.
- BEATRIZ, A. et al. **Processo eficiente de purificação do cardanol isolado do líquido da**

casca de castanha de caju (LCC) e produção de derivados de interesse industrial. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número de registro: BR1020140300023, Data de depósito: 24/11/2014. Data de publicação: 31/05/2016. Instituição de registro: Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

BERTHET, B. Reference species. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks.** 2015. p. 205–227.

BERTOLETTI, E.; DOMINGUES, D. F. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, PEDRO A. BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2ª ed. São Carlos: Rima, 2006. p. 153 – 184.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 7 abr. 2013.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007a.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179–293, dez. 2007b.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N. DA; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572–1577, 2010.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. 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.

C., M. L. **Novel applications of cashew nut shell liquid in the polymer field.** Tese (Doutorado) - Department of Polymer Science and Rubber Technology, Cochin University of Science and Technology. Kochi, p.240, 2007.

CABRERA, G. .; RODRIGUEZ, D. M. . Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211–214, 19 maio 1999.

CAMPBELL, L. P. et al. Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1665, 5 abr. 2015.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 3, p. 617–620, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Yellow fever: history, epidemiology, and vaccination information**, Atlanta, GA: 2010. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/travel-training/local/HistoryEpidemiologyandVaccination/>>. Acesso em: 19 mar. 2018

- CHADEE, D. D. Oviposition strategies adopted by gravid *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies (2002–2006). **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 279–283, 1 set. 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M26-A Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline**. Wayne, PA, p.14, 1999.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07-A10 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard**. 10th ed. Wayne, PA, p.15, 2015.
- DAI, Y.-J. et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11–17, 1 jan. 2014.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1^a ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 2011.
- DAVID, M. R. et al. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 9, p. 577–587, 25 ago. 2016.
- DE MATTEIS, V.; RINALDI, R. Toxicity assessment in the nanoparticle era. In: SAQUIB, QUAISER FAISAL, M.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; ALATAR, A. A. **Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles**. Springer, 2018. p. 1–19.
- DE VOS, K. **Fiji Cell Counter**. Sheffield: University of Sheffield, 2001.
- DHAR-CHOWDHURY, P. et al. Socioeconomic and ecological factors influencing *Aedes aegypti* prevalence, abundance, and distribution in Dhaka, Bangladesh. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1223–33, 2016.
- DÍAZ, T. G. et al. Líquido da Casca de Castanha de Caju em dietas para ruminantes. **Campo Digit@l: Revista de Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 1–10, ago. 2015.
- DOURADO, D. M. et al. Effects of cashew nut shell liquid (CNSL) component upon *Aedes aegypti* Lin. (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 9, p. 829–834, 4 mar. 2015.
- DUA, R. et al. Green Chemistry and Environmentally Friendly Technologies: A Review. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11, n. 7, p. 846–855, 2012.
- EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. **Cashew (*Anacardium occidentale*) Nutshell Extract, Decarboxylated, Distilled - Registration Dossier**. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14106>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- EUROPEAN COMMISSION. **Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC) Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards**. p.204, 2011.

- FAIRMAN, R. et al. **Environmental risk assessment: approaches, experiences and information sources**. European Environment Agency, 1998.
- FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1089–1093, 1 jan. 2011.
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas — yet another arbovirus threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 18 fev. 2016.
- FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por Bacillus subtilis LAMI005 a partir do suco de caju**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p.103, 30 jul. 2012.
- FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 1 jan. 2011.
- FERREIRA, S. G. et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 456, p. 190–196, 15 out. 2015.
- FILLINGER, U. et al. Identifying the most productive breeding sites for malaria mosquitoes in The Gambia. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 62, 10 abr. 2009.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 14 fev. 2008.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. The importance of addressing the problem of obsolete pesticide stocks. In: **FAO Pesticide Disposal Series 11 - Country guideline**. 2010.
- FRANCO, P. R. M. et al. Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187125, 10 nov. 2017.
- GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 1 maio 2008.
- GETACHEW, D. et al. Breeding sites of *Aedes aegypti*: potential dengue vectors in Dire Dawa, East Ethiopia. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2015, p. 1–8, 7 set. 2015.
- GIDDINGS, J. C.; KELLER, R. A. **Chromatography**. Encyclopaedia Britannica. 2016. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/chromatography>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

- GONÇALVES, A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, p.193, 17 dez. 2007.
- GOPALAKRISHNAN, R. et al. Physicochemical characteristics of habitats in relation to the density of container-breeding mosquitoes in Asom, India. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 50, p. 215–219, 2013.
- GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in allium: a report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273–291, 1 nov. 1982.
- GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 9, p. 717–724, 1 set. 2002.
- GUISSONI, A. C. P. et al. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 363–367, 2013.
- GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, v. 352, p. i657, 2 fev. 2016.
- GUO, D. et al. Joint acute and endocrine disruptive toxicities of malathion, cypermethrin and prochloraz to embryo-larval zebrafish, *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 166, p. 63–71, 1 jan. 2017.
- GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 8 mar. 2016.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 1 dez. 2010.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714–719, jul. 1977.
- HASSELLÖV, M. et al. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 344–361, 16 jul. 2008.
- HILL, A. J. et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 1 jul. 2005.
- HOCK, B.; ELSTNER, E. **Plant toxicology**. Marcel Dekker, 2005.
- HOLT, E. A.; MILLER, S. W. Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts | Learn science at scitable. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 8, 2010.
- JORGE, M. R. et al. **Processo para síntese de surfactantes de LCC técnico, emulsões inseticidas e derivados de LCC para controle populacional do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e insetos de ciclo reprodutivo similar e/ou susceptíveis**. BR 10 2017

027264 8. 2017; Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número de registro: BR1020170272648. Data de depósito: 18/12/2017. Instituto de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39–47, 2017.

KINYANJUI, T.; ARTZ, W. E.; MAHUNGU, S. Emulsifiers | Organic emulsifiers. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2nd. ed. Academic Press, 2003. p. 2070–2077.

KUBO, I. et al. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 1016–1019, jun. 1993.

KUMAR, G. et al. Impact of container material on the development of *Aedes aegypti* larvae at different temperatures. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, p. 144–148, 2016.

KUMAR, P. P. et al. Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4705–8, 31 jul. 2002.

LEITE, A. DE S. et al. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 626835, 10 mar. 2015.

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, 1 jul. 2009.

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

LIMA, A. et al. Evidence for an Overwintering Population of *Aedes aegypti* in Capitol Hill Neighborhood, Washington, DC. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 231–235, 2016.

LIMA, C. A. DE A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P. DE A. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 358–362, dez. 2000.

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, 1 jan. 2009.

MA, T.-H. 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, 1 abr. 1995.

MADEIRA, N.; MACHARELLI, C.; CARVALHO, L. Variation of the oviposition preferences of *Aedes aegypti* in function of substratum and humidity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 415–420, abr. 2002.

MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO FILHO, A. DA S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MARŠÁLEK, R. The influence of surfactants on the Zeta potential of coals. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 31, n. 1, p. 66–75, 2 dez. 2008.

MAZZETTO, E. S.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo de castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 737–741, 2009.

MCCORMICK, P. V.; CAIRNS, J. Algae as indicators of environmental change. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 5–6, p. 509–526, dez. 1994.

MISHRA, P. R. et al. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 182–189, 17 abr. 2009.

MITCHELL-FOSTER, K. et al. The influence of larval density, food stress, and parasitism on the bionomics of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): implications for integrated vector management. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 1, p. 221–229, 1 jun. 2012.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 29 jan. 2010.

NEFIC, H. et al. Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* L. Induced by alprazolam. **Medical Archives**, v. 67, n. 6, p. 388–92, dez. 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NORBERG-KING, T. J. **A linear interpolation method for sublethal toxicity: the Inhibition Concentration (ICp) approach (Version 2.0) - Technical Report 03-93**. Duluth, Minnesota: National Effluent Toxicity Assessment Center. p.39, 1993.

OFFICE OF CHEMICAL SAFETY AND POLLUTION PREVENTION - USEPA. **Aquatic Life Benchmarks and Ecological Risk Assessments for Registered Pesticides**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk#benchmarks>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

OLAYEMI, I. K. et al. Distribution of mosquito larvae in relation to physico-chemical characteristics of breeding habitats in Minna, north central Nigeria. **Reviews in Infection**, v. 1, p. 49–53, 2010.

OLIVEIRA, A. H. **Avaliação do potencial antioxidante do líquido da castanha de caju (LCC) para materiais asfálticos através de diferentes métodos de envelhecimento**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Transportes) - Departamento de Engenharia de Transportes - Universidade Federal do Ceará, p.140, 20 ago. 2014.

OLIVEIRA, M. S. C. et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v. 117, n. 3, p. 165–170, 1 mar. 2011.

OMAR, W. M. W. Perspectives on the use of algae as biological indicators for monitoring and protecting aquatic environments, with special reference to Malaysian freshwater ecosystems. **Tropical Life Sciences Research**, v. 21, n. 2, p. 51–67, dez. 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Pesticides and sustainable pest management: Vision for the future**. Paris, France: OECD, Disponível em: <<https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/OECD-Pest-Vision-Final.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2018

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No.202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test**. OECD Publishing, p.12, 2004.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test**. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, 11 jul. 2006.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No.236: Fish Embryo Toxicity (FET) Test**. OECD Publishing, p.22, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides - Guidelines for the Registration of Pesticides**. Rome: FAO/WHO. p. 42, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Vector resistance to pesticides: Fifteenth report of the WHO expert committee on vector biology and control**. Geneva. p.68, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Yellow fever – Brazil**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/don/20-march-2017-yellow-fever-brazil/en/>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva. p.160, 2009.

ORTEGA, J. A. T. Sulfonation/Sulfation Processing Technology for Anionic Surfactant Manufacture. In: NAWAZ, Z. **Advances in Chemical Engineering**. 1st. ed. InTech, 2012. p. 269–294.

PAIVA, D. R. et al. A potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 89, n. 891, p. 373–382, 2017.

PANGHAL, M.; KAUSHAL, V.; YADAV, J. P. In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 21, 20 maio 2011.

PARASA, L. S. et al. In vitro - antimicrobial activity of cashew (*Anacardium occidentale*, L.) nuts shell liquid against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 436–440, 2011.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74–9, abr. 2011.

- PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 1 nov. 2016.
- PENTEADO, J. C. P.; SEOUD, O. A. EL; CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno sulfato linear: uma abordagem ambiental e analítica. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 1038–1046, 2006.
- PESNYA, D. S. Cytogenetic effects of chitosan-capped silver nanoparticles in the *Allium cepa* test. **International Journal of Cytology Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 663, p. 275–281, 2013.
- PEUNGJITTON, P. et al. Sodium cardanol sulfonate surfactant from cashew nut shell liquid. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 12, n. 2, p. 85–89, 22 maio 2009.
- PHULKERD, P. et al. Coal water slurry using dispersant synthesized from cashew nut shell liquid (CNSL). **Fuel Processing Technology**, v. 119, p. 256–262, mar. 2014.
- PIMENTEL, M. F. et al. Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 43, p. 363–368, 2009.
- PONNUSAMY, L. et al. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 27, p. 9262–9267, 2008.
- PONNUSAMY, L. et al. Species composition of bacterial communities influences attraction of mosquitoes to experimental plant infusions. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 1, p. 158–173, 30 jan. 2010.
- PONNUSAMY, L. et al. Oviposition responses of *Aedes* mosquitoes to bacterial isolates from attractive bamboo infusions. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 486, 23 dez. 2015.
- RAMSDORF, W. A. et al. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, p. 77–85, 2009.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. [s.l.] Hemisphere Pub. Corp, 1985.
- RANK, J.; NIELSEN, M. . *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. 1–2, p. 121–127, 24 abr. 1997.
- RAO, B. B. et al. Characteristics of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse (Diptera:Culicidae) breeding sites. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, n. 5, p. 1077–82, set. 2011.
- REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 261–273, 12 jun. 2007.
- RIBEIRO, G. S.; KITRON, U. Zika virus pandemic: a human and public health crisis. **Revista**

da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 1–3, fev. 2016.

RODRIGUES, E. DE A. **Microbiota intestinal de *Aedes aegypti*: atividade proteolítica e influência na seleção de sítios de oviposição**. Monografia (Licenciatura em Biologia), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense. Campos de Goytacazes-RJ, p.61, 2009.

RODRIGUES FILHO, M. G. **Cardanol e Eugenol Modificados - Uso como Antioxidantes no Controle do Processo Oxidativo do Biodiesel Etilico de Algodão**. Tese (Doutoramento em Química) - Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p.161, 2010.

ROSSI, C. G. F. T. et al. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1–2, p. 73–95, 2006.

ROZEBOOM, L.E; L. ROSE, J. IKEDA. Observations on oviposition by *Aedes (S.) albopictus* Skuse and *A.(S.) polynesiensis* marks in nature. **Journal of Medical Entomology**, v. 10, n. 4, p. 397-339, 1973.

ROZMAN, K. K.; DOULL, J.; HAYES JR., W. J. Dose and time determining, and other factors influencing, toxicity. In: KRIEGER, R. I.; DOULL, J.; VEGA, H. **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology Volume 1**. 3rd. ed. Elsevier, 2010. p. 3–101.

SALAGER, J. L. Emulsion properties and related know-how to attain them. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical Emulsions and Suspensions**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000.

SANTOS, M. L. DOS; MAGALHÃES, G. C. DE. Utilisation of cashew nut shell liquid from *Anacardium occidentale* as starting material for organic synthesis: a novel route to lasiodiplodin from cardols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 1, p. 13–20, jan. 1999.

SATYAVANI, G. et al. Toxicity assessment of expired pesticides to green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **International Scholarly Research Notices Toxicology**, v. 2012, p. 247072, 14 nov. 2012.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications**. Wiley-VCH, 2006.

SILVA, G. H.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicity assessment of silica nanoparticles on *Allium cepa*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, n. 1, p. 25–31, 13 abr. 2017.

SILVA, H. H. G. DA et al. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 396–399, 2004.

SOARES, R. DE O. **Reações de substituição eletrofílica no cardanol e derivados hidrogenados. Efeito de impurezas na reatividade de matérias-primas renováveis brasileiras**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p.110, 2013.

STASIUK, M.; BARTOSIEWICZ, D.; KOZUBEK, A. Inhibitory effect of some natural and

semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 996–1001, 1 jun. 2008.

TADROS, T. F. Critical Micelle Concentration. In: TADROS, T. F. (Ed.). **Encyclopedia of colloid and interface science**. Berlin: Springer, 2013.

TAIWO, E. A. Cashew nut shell oil — a renewable and reliable petrochemical feedstock. In: PATEL, V. **Advances in Petrochemicals**. InTech, 2015.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 1 jul. 2013.

THIRUKUMARAN, P. et al. Synthesis and characterization of new polybenzoxazines from renewable resources for bio-composite applications. **Polymer Composites**, v. 37, n. 6, p. 1821–1829, 1 jun. 2016.

THORN, R. M. S.; REYNOLDS, D. M.; GREENMAN, J. Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 258–264, 1 fev. 2011.

TSUJIMOTO, K. et al. Anacardic acids and ferric ion chelation. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 710–716, 2007.

TYMAN, J. H. P.; BRUCE, I. E. Surfactant properties and biodegradation of polyethoxylates from phenolic lipids. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 7, n. 2, p. 169–173, abr. 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. 4th ed. Washington, DC: USEPA, 2002. p.350.

VAN LEEUWEN, C. J.; VERMEIRE, T. G. **Risk assessment of chemicals: an introduction**. 2nd. ed. Dordrecht: Springer, 2007.

VANI, J. M. et al. 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**, v. 13, n. 3, p. e0193509, 19 mar. 2018.

VASAPOLLO, G. et al. Use of novel cardanol-porphyrin hybrids and their TiO₂-based composites for the photodegradation of 4-Nitrophenol in water. **Molecules**, v. 16, p. 5769–5784, 2011.

VASCONCELOS, P. F. DA C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9–10, 2015.

VOSYLIENĖ, M. Z. Review of the methods for acute and chronic toxicity assessment of single substances, effluents and industrial waters. **Acta Zoologica Lituanica**, v. 17, n. 1, 2007.

WANG, W. Higher plants (Common duckweed, lettuce, and rice for effluent toxicity assessment. In: GORSUCH, J. W. et al. (Eds.). **Plants for Toxicity Assessment**. Philadelphia: ASTM, 1991. p. 77–100.

Referências

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - Princípios e aplicações**. 2^a ed. São Carlos: Rima, 2006.

ZARA, A. L. DE S. A. et al. Aedes aegypti control strategies: a review. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.

ZHANG, C.; WILLETT, C.; FREMGEN, T. Zebrafish: an animal model for toxicological studies. In: **Current Protocols in Toxicology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003. v. 17.

APÊNDICE A

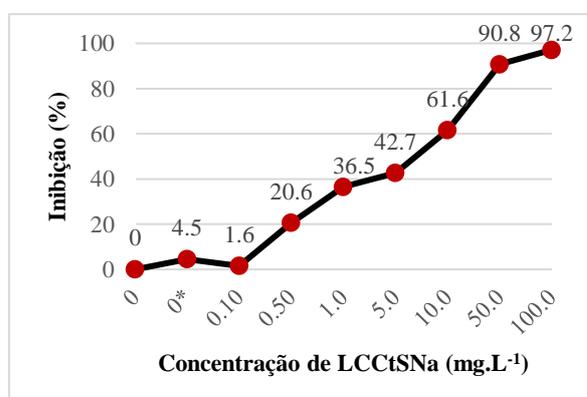
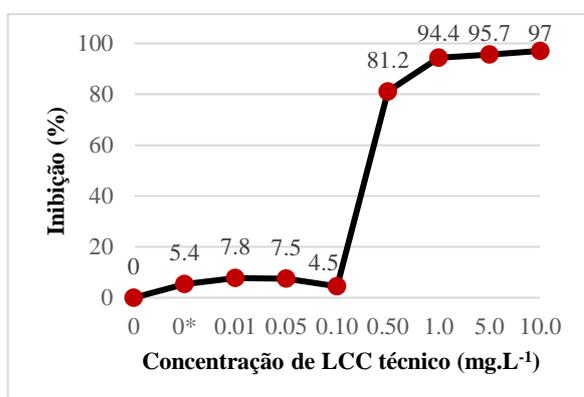
Dados dos testes de toxicidade

Ensaio de inibição do crescimento algal em Raphidocelis subcapitata

Tabela 20. Média de células (desvio-padrão) observadas no ensaio de inibição do crescimento algal de LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa em *Raphidocelis subcapitata* após 72h de exposição.

LCCt		LCCTsNa		LCCT+LCCTsNa	
Concentração (mg.L ⁻¹)	MC (dp) (10 ⁴ cél.ml ⁻¹)	Concentração (mg.L ⁻¹)	MC (dp) (10 ⁴ cél.ml ⁻¹)	Concentração (mg.L ⁻¹)	MC (dp) (10 ⁴ cél.ml ⁻¹)
0	361 (21)	0	399 (81)	0	360 (25)
0*	342 (56)	0*	381 (45)	0*	323 (14)
0,01	333 (54)	0,1	393 (46)	0,01+0,06	383 (58)
0,05	334 (25)	0,5	317 (17)	0,05+0,3	333 (4)
0,1	345 (17)	1,0	253 (40)	0,1+0,6	327 (16)
0,5	68 (41)	5,0	229 (8)	0,5+3,0	22 (8)
1,0	20 (3)	10,0	153 (57)	1,0+6,0	16 (3)
5,0	16 (4)	50,0	37 (14)	5,0+30,0	11 (1)
10,0	11 (1)	100,0	11 (2)	10,0+60,0	10 (1)

MC – média de células; dp – desvio-padrão; “0” – controle; “0*” – controle solvente.



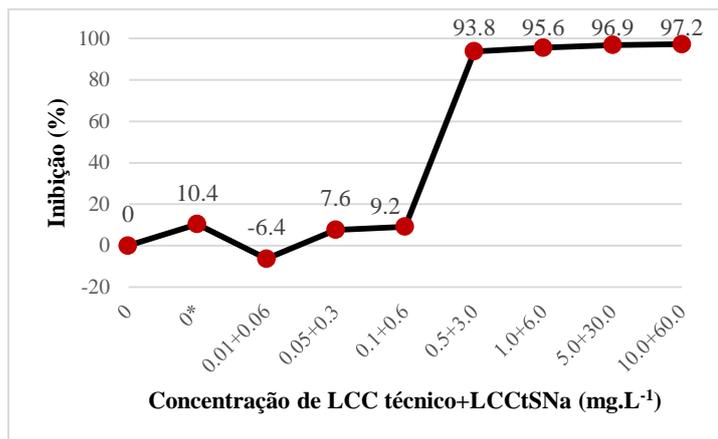


Figura 13. Inibição de crescimento (%) de *Raphidocelis subcapitata* em função das concentrações de (a) LCC técnico, (b) LCCtSNa e (c) LCC técnico+LCCtSNa, após 72h de exposição. “0” – controle; “0*” – controle solvente.

Ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*

Tabela 21. Número total de organismos imóveis (desvio-padrão) observados no ensaio de toxicidade aguda de LCC técnico, LCCtSNa e LCC técnico+LCCtSNa em *Daphnia similis* após 48h de exposição.

LCCT		LCCtSNa		LCCt+LCCtSNa	
Concentração (mg.L ⁻¹)	OI (dp)	Concentração (mg.L ⁻¹)	OI (dp)	Concentração (mg.L ⁻¹)	OI (dp)
0	0	0	0	0	0
0*	0	0*	0	0*	0
0,0003	0	0,1	0	0,0003+0,0018	0
0,001	0	0,5	1 (0,5)	0,001+0,006	0
0,003	0	1,0	17 (0,5)	0,003+0,018	0
0,01	0	2,5	20	0,01+0,06	0
0,03	0	5,0	20	0,03+0,18	0
0,1	7 (0,5)	10,0	20	0,1+0,6	2 (0,6)
0,3	20	15,0	20	0,3+1,8	20

OI – Organismos imóveis; dp – desvio-padrão; “0” – controle; “0*” – controle solvente.

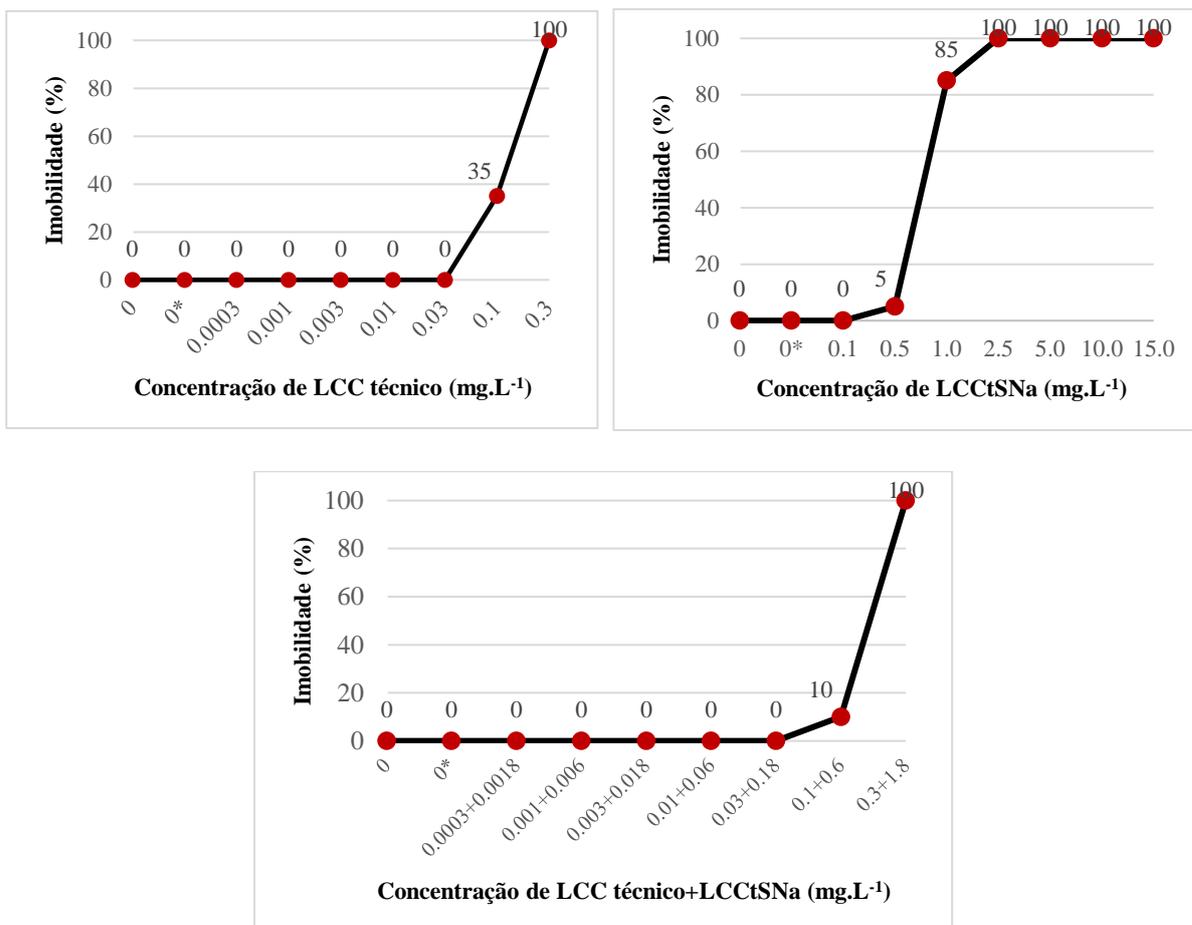


Figura 14. Curvas de imobilidade (%) de *Daphnia similis* em função das concentrações de (a) LCC técnico, (b) LCCTsNa e (c) LCC técnico+LCCTsNa, após 48h de exposição. “0” – controle; “0*” – controle solvente.

Ensaio de toxicidade aguda em *Danio rerio*

Tabela 22. Número total de organismos mortos (desvio-padrão) observados no ensaio de toxicidade aguda do LCC técnico, LCCTsNa e LCC técnico+LCCTsNa em *Danio rerio* em estágio embrionário após 96 de exposição.

LCC técnico		LCCTsNa		LCC técnico+LCCTsNa	
Concentração (mg.L ⁻¹)	OM (dp)	Concentração (mg.L ⁻¹)	OM (dp)	Concentração (mg.L ⁻¹)	OM (dp)
0	12 (1,00)	0	13 (1,53)	0	14 (1,15)

0*	10 (2,52)	0*	11 (2,08)	0*	9 (2,65)
12,5	20 (4,73)	12,5	13 (1,15)	12,5+75,0	44 (8,32)
25,0	18 (1,73)	25,0	23 (1,15)	25,0+150,0	41 (2,52)
50,0	38 (3,79)	50,0	21 (1,00)	50,0+300,0	53 (3,51)
75,0	31 (2,89)	75,0	25 (2,08)	75,0+450,0	74 (2,52)
100,0	40 (2,08)	100,0	46 (2,08)	100,0+600,0	180

OM – Organismos mortos; dp – desvio-padrão; “0” – controle; “0*” – controle solvente

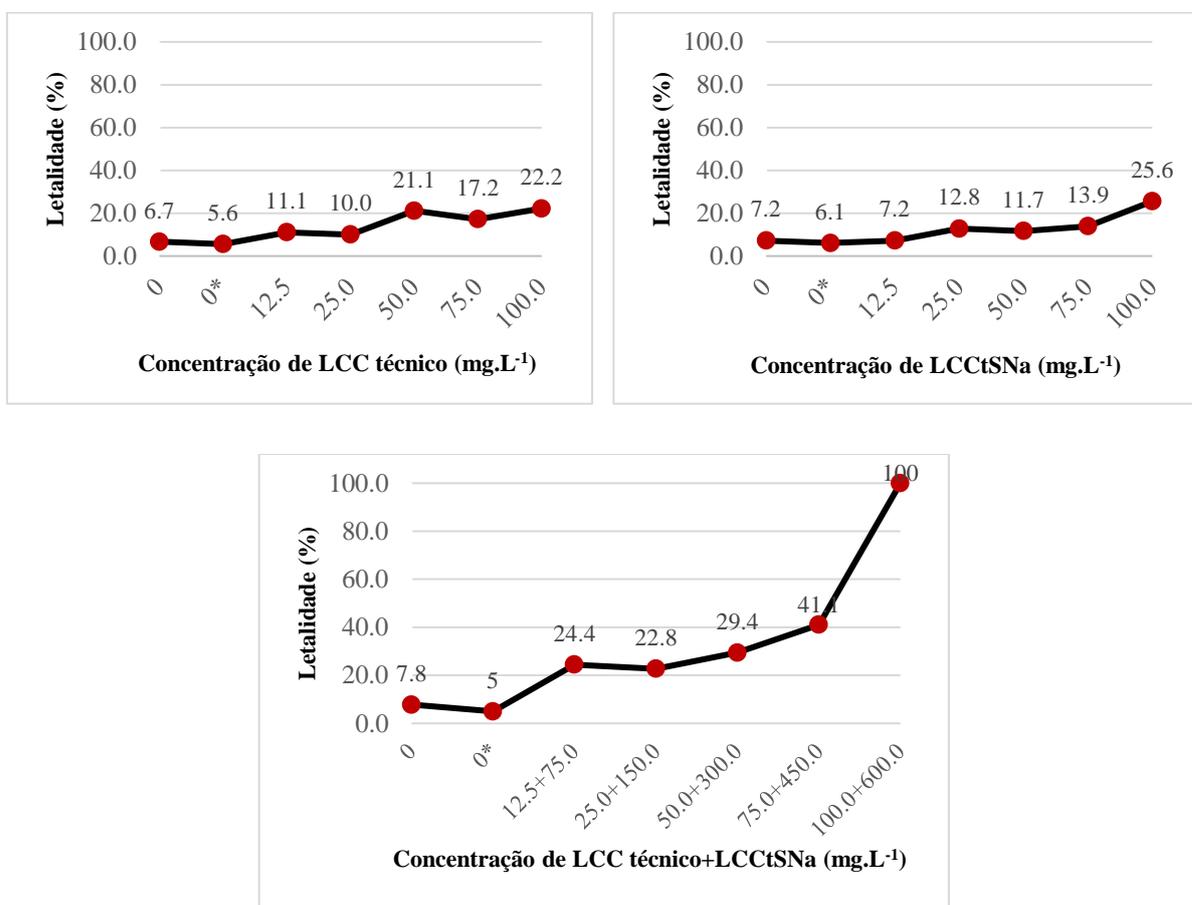


Figura 15. Curvas de letalidade (%) de *Danio rerio* em função das concentrações de (a) LCC técnico, (b) LCCTsNa e (c) LCC técnico+LCCTsNa, após 96h de exposição. “0” – controle; “0*” – controle solvente.

ANEXO I

Pedido de Patente BR 10 2017 027264 8

PROCESSO PARA SÍNTESE DE SURFACTANTES DE LCC TÉCNICO, EMULSÕES INSETICIDAS E DERIVADOS DE LCC PARA CONTROLE POPULACIONAL DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E INSETOS DE CICLO REPRODUTIVO SIMILAR E/OU SUSCEPTÍVEIS

Setor técnico

[001] A presente invenção se refere a produção de compostos, composições e emulsões formuladas a partir do reaproveitamento de resíduos industriais para produção de substâncias com relevância para a saúde pública, utilizadas no controle de insetos vetores de doenças.

Estado da técnica

[002] A Ordem Diptera reúne insetos como as moscas, mosquitos, borrachudos, mutucas, e mosca da fruta, entre outros, com cerca de 120.000 espécies divididas em mais de 100 famílias. Muitos destes apresentam-se como vetores de doenças.

[003] Os insetos estão em constante contacto com materiais em decomposição (fezes, lixo e outros) e podem ser contaminados durante o seu ciclo de vida ou na hematofagia, transportando microrganismos como bactérias, vírus e fungos, causando incômodo e sérios prejuízos à saúde pública, com consequentes impactos sociais, econômicos e ambientais. Na área da saúde destacam-se os insetos hematófagos que transmitem malária, dengue, febre-amarela, chikungunya, zica, tifo, disenteria, encefalite, entre outras doenças.

[004] Ao longo dos últimos anos têm surgido diversas alternativas ao uso de inseticidas químicos sintéticos e inseticidas biológicos, como os inseticidas produzidos a partir de produtos da biomassa para o controle populacional de insetos vetores, principalmente, culicídeos e outros de ciclos reprodutivos similares.

[005] A patente **FR 2958500-A1** descreve uma composição inseticida, repelente de insetos, ovicida e larvicida que compreende: pelo menos um óleo essencial com pelo menos um grupo ácido; pelo menos uma enzima proteolítica; um surfactante; e opcionalmente uma ou mais alcoolaturas.

[006] A Patente **US 9220273 B2** descreve composições larvicidas para larvas de mosquito formuladas a partir de um óleo mineral e óleo de coco metilado, podendo ainda conter um silicone e pelo menos um tensoativo, bem como métodos para o controle de mosquitos, como o revestimento da superfície de um corpo de água.

[007] A Patente **BR 10 2012 018737-0 A2** descreve um produto larvicida contra o *Ae. aegypti* que tem como componentes óleos essenciais de plantas e um pesticida, baseando-se no sinergismo entre estes quando preparados com um agente surfactante ou solvente adequado. Estas composições podem ser elaboradas associadas ou incorporadas a polímeros, materiais micro ou nanoestruturados, matrizes poliméricas por sol-gel, cerâmica ou sílica.

[008] A Patente **BR 10 2014 030551-3 A2** descreve a formulação/composição de um produto larvicida contra *Ae. aegypti* contendo óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e nanocompósitos, que favorecem a solubilidade do óleo em meio aquoso e a liberação do mesmo.

[009] O pedido de patente **PI 0901733-0 A2** descreve uma composição sólida e atóxica constituída de sais inorgânicos, óleos vegetais e aromas, e um selante, usada para combater larvas e ovos de vetores transmissores de doenças, como *Ae. aegypti*.

[010] O pedido de patente **PI 9900889-0 A2** descreve a preparação de um inseticida usando como princípio ativo o Líquido de Castanha de Caju (LCC), mediante combinação com um agente tensoativo (ADVS) e água.

[011] A síntese destes produtos mostra-se de acordo com a crescente preocupação ambiental, abrangendo fatores como redução do impacto ambiental, busca por intermediários da biomassa, emprego de tecnologia limpa, e valorização dos recursos naturais para emprego e renda de comunidades. Assim, a proposta de novos inseticidas, apresentando baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, produzidos através da modificação de produtos da biomassa, apresenta-se como uma alternativa promissora capaz de contribuir para as demandas atuais e futuras de saúde pública com a aplicação dos princípios da “Química Verde” para redução dos impactos ambientais (Lenardão et al. Green Chemistry: os 12 Princípios da Química Verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quím. Nova*, São Paulo, 26(1), 2003; Ferreira et al., An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing na essential oil. *J. Colloid Int. Sci.* 456, 190-196, 2015; Alisson - Agência FAPESP, Biolarvicide obtained from sugarcane bagasse kills larvae of *Aedes aegypti*. 29 jun. 2016; Silva et al., Biosurfactants as versatile molecules: a new concept of product for biorefineries and for action against neglected tropical diseases phase 1: screening of yeasts, fermentative production and physicochemical characterization. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. 2015-2017).

[012] O líquido da casca da castanha de caju (LCC) é uma mistura de fenóis lipídicos: ácido anacárdico, cardanol, cardol, entre outros, e pode ser classificado em dois tipos: LCC *in natura*,

constituído majoritariamente por ácido anacárdico, e extraído da castanha de caju por uso de solventes, pressão e baixa temperatura; e LCC técnico, extraído da casca a altas temperaturas (180-190°C), obtido no processo de tostagem industrial da castanha de caju, em que a maior parte do ácido anacárdico se converte em cardanol. Este subproduto industrial ainda é pouco valorizado na cadeia produtiva do caju (Vasapollo et al., Use of novel cardanol-porphyrin hybrids and their TiO₂-based composites for the photodegradation of 4-nitrophenol in water. *Molecules*. 16(7), 5769, 2011), sendo produzido em grandes quantidades. Somente no estado do Ceará (CE) são produzidas cerca de 30 mil toneladas por ano (Lomonaco et al., Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chemistry*, 11(1), 31, 2009).

[013] O LCC técnico, cardol, cardanol e análogos hidrogenados apresentaram excelente atividade larvicida contra *Ae. aegypti* (Lomonaco et al., Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chemistry*, 11(1), 31, 2009). A literatura mostra também a importância das insaturações e/ou modificações estruturais para a potencialização da atividade inseticida (Paiva et al. A potent larvicidal agent against *Ae. aegypti* mosquito from cardanol. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* (2017). Lomonaco et al. (2009) mostram que as insaturações da cauda apolar são responsáveis pela lipossolubilidade, permeação da membrana celular e exercício da toxicidade dos compostos fenólicos.

[014] Além disso, o LCC técnico apresenta atividade antimicrobiana (incluindo a atividade biológica/inseticida/larvicida abrangente para outros microrganismos e protozoários dos criadouros dos culicídeos e outros insetos) (Kubo et al., Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acid. *Jour. Agr. Food Chem.*, 41(6), 1016-1019, 1993; Lima et al., Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce ccp-76 e ccp-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. *Cienc. Tecn. Alim.*, 20, 358-362, 2000; Gonçalves, Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais. 209 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 2007; Parasa et al., *In vitro* - antimicrobial activity of cashew (*Anacardium occidentale*, L.) nuts shell liquid against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 2011). Esta ação pode estar associada ao caráter anfipático dos lipídios fenólicos constituintes do óleo (LIMA et al., 2000; Diaz, Avaliação *in vitro* da inclusão do líquido da casca da castanha de caju em dietas para

ruminantes. 59f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR. abr. 2013).

[015] Os LCC's apresentam afinidade às bicamadas lipídicas das membranas bacterianas, devido à interação dos grupos hidroxila do anel aromático com fosfolipídios, enquanto as cadeias alquílicas potencializam a solubilidade das porções fenólicas nas regiões lipídicas. Os lipídios fenólicos, já incorporados nas membranas celulares, interagem e alteram a dinâmica das interações intermoleculares com as proteínas, aumentando a permeabilidade e permitindo o extravasamento do citoplasma e constituintes celulares, por lise celular. O grupo hidroxila reage com o sítio ativo das enzimas, formando ligações de hidrogênio, e inibindo as atividades dos microrganismos (Lima et al., 2000; Diaz, 2013).

[016] Os LCC's possuem também capacidade de quelar o ferro (Fe^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e outros metais bioativos/micronutrientes, que participam nos processos de respiração celular e metabolismo energético, reduzindo assim a sua biodisponibilidade para os microrganismos (Tsujiimoto et al., Anacardic acids and ferric ion chelation. *Journ. of Biosc.*, 62, 710-716, 2007; Diaz, 2013).

[017] A patente **US 8338638 B2** descreve as propriedades antimicrobianas dos derivados de ácido anacárdico, incluindo atividade bacteriostática e bactericida, e o método para a sua preparação.

[018] A patente **PI 0700927-5 A2** descreve uma composição antimicrobiana compreendendo um ácido graxo hidroxilado ou um triglicéride contendo ácidos graxos hidroxilados na sua composição em combinação com líquido de castanha de caju e/ou qualquer um dos seus componentes (cardol, cardanol e ácido anacárdico) e/ou ácidos orgânicos, para aplicação em pessoas, animais, plantas ou fermentações, para a prevenção ou tratamento de doenças provocadas por bactérias, fungos e protozoários.

[019] O LCC técnico e, em particular, o maior constituinte cardanol (> 65%), apresentam uma estrutura similar a produtos surfactantes de origem petroquímica, nomeadamente o dodecilbenzeno e o nonilfenol, atualmente os tensoativos mais utilizados para limpeza doméstica e higiene pessoal. Apesar do nonilfenol hoje ter menor utilização nas formulações para uso doméstico devido aos impactos ambientais e na mimetização de hormônios, ainda é muito utilizado na área industrial. Deste modo, o LCC apresenta também propriedades semelhantes às destes para a produção de tensoativos/surfactantes.

[020] Assim, e acompanhando a crescente preocupação com a contaminação ambiental resultante dos produtos petroquímicos, o LCC técnico/cardanol apresentam-se como produtos

“verdes” passíveis de substituir os derivados petroquímicos com performance equivalente no processo de limpeza (Soares, Reações de substituição eletrofílica no cardanol e derivados hidrogenados. Efeito de impurezas na reatividade de matérias-primas renováveis brasileiras. 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013).

[021] A patente **GB 2466476 (A)** descreve a produção de materiais tensoativos com um grupo $-O-CH_2CH_2-OSO_3H$ em vez dos grupos hidroxifenólicos, a partir da reação entre sais de sódio e potássio de lipídios fenólicos obtidos a partir do líquido da casca da castanha de caju, em particular 3-pentadecilfenol, cardanol e cardol, e sulfato de etileno; ou a reação dos lipídios fenólicos com carbonato de etileno para obter intermediários hidroxiéter para sulfonação/sulfatação para gerar materiais tensoativos.

[022] A patente **CN 101898097 (A)** descreve um novo tensoativo de cardanol sódico e o seu método de preparação, em que o cardanol é extraído das cascas de castanha de caju, apresentando-se como um surfactante inócuo, compatível com o ambiente, com excelente desempenho, forte detergência, espuma moderada, boa dissolução, baixa irritação da pele, boa biodegradabilidade e boa compatibilidade com outros surfactantes, que pode ser obtido por reação de sulfonação da biomassa regenerativa e neutralização alcalina.

[023] A patente **CN 102304069 (A)** descreve um método para sintetizar um surfactante saturado de cardanol sulfonato para deslocamento de óleo, por meio de uma reação de sulfonação, utilizando cardanol saturado como matéria-prima, ácido sulfúrico fumante como agente sulfonante e diclorometano como solvente, e obter ácido sulfônico saturado de cardanol por destilação sob pressão reduzida; e seguida de uma reação de neutralização, utilizando ácido sulfônico saturado de cardanol e hidróxido de sódio como matérias-primas e etanol como solvente; filtrar a mistura obtida sob pressão negativa e secar para obter o surfactante saturado de cardanol sulfonato, podendo ser utilizado como um tensoativo de deslocamento de óleo favorável ao ambiente.

[024] A patente **CN 104028163 (A)** descreve um método para sintetizar um surfactante de amônio quaternário de cardanol, tendo como benefício o fato de o cardanol, que serve como matéria-prima principal, ser um recurso renovável prontamente disponível e de baixo preço, e o surfactante de amônio quaternário de cardanol ser seguro, verde, rico em funcionalidade, elevado em estabilidade química e, particularmente, com elevada atividade superficial.

[025] A patente **US 2014371120 A1** descreve a preparação de um detergente de fenato de cálcio sulfurado através da reação do LCC hidrogenado destilado com um sal de cálcio e enxofre na

presença de um solvente promotor; e reação desse produto com sal de cálcio e um promotor adicionais, e com um co-tensoativo, seguido de carbonatação; e opcionalmente, carbonatação adicional da mistura reacional para se obter fenato de cálcio sulfurado sobrebasificado.

Problemas existentes

[026] Atualmente, os mosquitos são os vetores de maior importância para a Saúde Pública no mundo. A dengue apresenta-se como uma das mais importantes doenças transmitidas pelo mosquito *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) principalmente devido ao grande número de casos notificados (Braga e Valle, *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16(4), 285, 2007) e pela vasta competência vetorial do inseto, capaz de transmitir múltiplas doenças, como: febre amarela urbana, chikungunya e zika virus. No caso da dengue estima-se que ocorram cerca de 50 a 100 milhões de casos anuais de dengue no mundo (World Health Organization. dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 2009), com crescente agravamento à saúde da população, aumento de gastos governamentais, prejuízos socio-econômicos e sobrecarga aos sistemas de saúde pública.

[027] As alterações climáticas favoráveis à disseminação de insetos vetores (Campbell et al., *Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors*, *Phil. Trans. R. Soc.*, 2015) e a facilidade de circulação de doentes e pessoas infectadas entre países e continentes tornam a disseminação e impactos das doenças imprevisíveis.

[028] Além da dengue, o *Ae. aegypti* chama a atenção pela transmissão do vírus da chikungunya e do vírus da zica. O Brasil enfrenta a introdução e um rápido processo de dispersão destes vírus, que se acredita terem sido introduzidos durante a Copa do Mundo de 2014 (Vasconcelos, *Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?*, *Rev Pan-Amaz Saude*, 6(2), 2015; Lima et al., *Evidence for an overwintering population of Aedes aegypti in Capitol Hill Neighborhood*, *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 94(1), 2015).

[029] Os casos de infecção pelos vírus da chikungunya e da zica vêm aumentando e a Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu, em 2015, um alerta epidemiológico sobre a associação da infecção pelo vírus da zica com malformações congênitas e síndromes neurológicas (World Health Organization, *The Weekly Epidemiological Record*, 90, 609, 2015). No Brasil, o Ministério da Saúde confirmou a relação entre o vírus da zica e casos de microcefalia (Zanluca, C. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 569, 2015), tendo declarado, em outubro de 2015, “(...) emergência nacional de saúde pública, devido ao aumento no número de crianças nascidas com microcefalia no Estado do Pernambuco.” (Ribeiro e

Kitron, Zika virus pandemic: a human and public health crisis, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 49(1), 2016). Rapidamente foram notificados grande número de casos em outros estados brasileiros.

[030] Até à 49ª semana epidemiológica de 2016 (dezembro) foram registrados: 1.487.673 casos prováveis de dengue no Brasil, apresentando uma taxa de incidência de 727,6 casos/100 mil habitantes; 263.598 casos prováveis de chikungunya, com uma taxa de incidência de 128,9 casos/100 mil habitantes; e 211.760 casos prováveis de zica, apresentando uma taxa de incidência de 103,6 casos/100 mil habitantes (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico. v. 47, nº 38, 2016). Até 21 de fevereiro de 2017 foram confirmados 292 casos de febre amarela urbana no Brasil, com 212 mortes, sendo a maioria dos casos em Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (Portal da Saúde, *Ministério da Saúde atualiza casos notificados de febre amarela no país*. 21 de fevereiro de 2017).

[031] Na tentativa de controle do vetor, a estratégia mais utilizada atualmente recai no uso massivo de inseticidas químicos organofosforados e piretróides. Além destes, têm sido também usados inseticidas biológicos ou bio-inseticidas que possuem como ingredientes ativos fungos, bactérias e vírus, por exemplo, *Beauveria bassiana*, *Insectonrum sporothrix*, *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus anticarsia*.

[032] As estratégias de redução populacional do vetor através de inseticidas químicos ou biológicos não têm reduzido os surtos e/ou incidência da dengue, chikungunya e zica virus de forma duradoura. Além disso, o uso intensivo de inseticidas convencionais provoca o aparecimento de populações resistentes e a reemergência de doenças transmitidas por vetores (Braga e Valle, *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16(4), 285, 2007), bem como problemas ambientais, riscos acrescidos à saúde e uma percepção negativa da opinião pública, devido à ineficácia do controle e do surgimento de novos casos de doença.

[033] As opções de controle populacional do vetor e redução da incidência das doenças por meio do manejo integrado são limitadas devido ao aumento dos níveis de resistência do inseto, rejeição por parte da população ao tratamento das águas para consumo, dificuldade em alcançar níveis elevados e regulares de cobertura, falta de saneamento/infraestrutura, bem como às dificuldades operacionais e econômicas de implementação e manutenção de infraestruturas para programas de controle de insetos vetores (Guzman et al., Dengue: a continuing global threat. *Nature Rev. Microbiol.*, 8, S7-S16, 2010).

[034] Assim, o uso de inseticidas convencionais não tem permitido alcançar um controle prolongado dos insetos vetores e surtos de doença, originando impactos negativos no ambiente e saúde humana.

Objetivos da invenção

[035] A presente invenção tem como objetivo sintetizar produtos com atividade surfactante e inseticida/larvicida/antimicrobiana conjunta, a partir de um produto da biomassa, para controle populacional de insetos vetores de doenças, i.e. *Ae. aegypti*, e/ou outros insetos de ciclo reprodutivo similar.

[036] Os produtos e emulsões formuladas a partir deles destinam-se a ser utilizados em residências e/ou indústrias em substituição dos detergentes habitualmente utilizados na higienização de espaços/superfícies/objetos, já integrados nas rotinas da população; e/ou lavouras, como solubilizante de produtos para controle de pragas, permitindo o seu escoamento junto com as águas residuais, atingindo os criadouros e possibilitando o controle prolongado do vetor e a redução da incidência das doenças.

[037] Devido à sua origem natural e conseqüente redução do preço comparativamente aos inseticidas químicos, estes produtos reduzem os impactos ambientais e na saúde pública e possibilitam a adesão de todos os segmentos da população ao controle doméstico dos vetores, por meio da inserção dos produtos nas suas atividades do cotidiano e devido à sua acessibilidade.

Novidade

[038] Os produtos apresentados são inovadores uma vez que combinam múltiplas funcionalidades, como ação surfactante e atividade inseticida/larvicida/antimicrobiana. Visto que um dos maiores problemas associados aos inseticidas convencionais é a resistência à sua utilização por parte da população e a necessidade da sua aplicação específica, os produtos sintetizados substituem os detergentes que fazem parte das rotinas da população permitindo, através da realização das atividades de limpeza, o seu escoamento para os criadouros domésticos de vetores, principais focos de transmissão, proporcionando um controle mais eficaz e prolongado dos vetores e conseqüente redução dos surtos de doenças.

[039] Além disso, devido à sua atividade antimicrobiana, os produtos permitem realizar um controle secundário das larvas do mosquito, uma vez que as moléculas podem interferir na cadeia alimentar, contaminar e alterar a qualidade/disponibilidade de alimento nos criadouros, como matéria orgânica e eliminar/inviabilizar os microorganismos presentes no intestino médio das larvas que influenciam o processo digestivo, e até reduzir a atratividade das fêmeas aos

criadouros para oviposição devido à interferência sobre a produção de substâncias voláteis atrativas via microbiota do meio que são sinalizadores para atração e oviposição.

Breve Descrição

[040] A presente invenção trata da síntese de tensoativos/surfactantes de LCC técnico/derivados sulfonatos, formulações e preparação de emulsões para utilização como produtos saneantes com atividade biológica conjunta (larvicida/antimicrobiana) para controle populacional de insetos vetores de doenças, i.e. *Ae. aegypti*, e/ou outros insetos de ciclo reprodutivo similar.

[041] Deste modo, os produtos reúnem várias funcionalidades, possibilitando o controle dos criadouros domésticos dos vetores, e conseqüentemente das doenças, por meio da disponibilização de produtos de baixo custo, de fácil utilização e que substituam ou sejam utilizados conjuntamente com outros já integrados nas rotinas diárias da população, como por exemplo produtos de limpeza, estimulando a adesão da sociedade, uma vez que a forma mais promissora de alcançar o controle do vetor a longo prazo e de forma duradoura é através da mudança de comportamento da população para realização do controle doméstico do vetor.

[042] Os produtos podem ser utilizados puros ou em emulsões - LCC técnico+LCC sulfonato, cardanol+LCC sulfonato, LCC técnico+cardanol sulfonato, cardanol+cardanol sulfonato, ou LCC sulfonato/cardanol sulfonato+inseticidas convencionais, e outros sistemas similares que possam potencializar a sua atividade biológica/inseticida.

Descrição detalhada

[043] A presente invenção se refere a composições multifuncionais com atividade biológica (inseticida/larvicida/antimicrobiana) e surfactante, e métodos de utilização das mesmas, com a finalidade do controle de populações de insetos vetores de doença de forma eficaz, seletiva e segura. As composições compreendem LCC técnico ou pelo menos um dos seus constituintes (cardanol e cardol) e serão produzidas por reação química entre estes, ácido sulfúrico fumegante e neutralizados com sais sódicos e/ou cúpricos.

[044] Os produtos aqui descritos podem ser aplicados individualmente ou na forma de misturas ou emulsões, nos objetos, superfícies, pisos, solos, plantas e possíveis reservatórios de água, de forma a atingirem os criadouros dos insetos.

[045] As composições multifuncionais são formuladas para realização de controle primário dos insetos, inviabilizando/matando larvas, através da formação de um filme ou revestimento uniforme na superfície dos criadouros ou redução da tensão superficial da água, prejudicando

a respiração larval, e pela permeação da membrana celular, devido às insaturações dos compostos fenólicos, garantindo toxicidade.

[046] Os produtos proporcionarão também um controle secundário, uma vez que as moléculas podem interferir na cadeia alimentar, contaminar e alterar a qualidade/disponibilidade de alimento nos criadouros, como matéria orgânica e eliminar/inviabilizar os microorganismos presentes no intestino médio das larvas que influenciam o processo digestivo, e até reduzir a atratividade das fêmeas aos criadouros para oviposição devido à interferência sobre a produção de substâncias voláteis atrativas via microbiota destes.

[047] Atualmente, um dos maiores problemas que resultam na ineficácia do controle dos mosquitos transmissores de doenças e, conseqüentemente, no aumento de casos de doença, é a resistência da população ao uso dos inseticidas sintéticos, tanto pelo receio das possíveis conseqüências para a sua saúde, como pelo seu elevado custo. Também, a falta de informação/formação de grande parte da população brasileira relativa ao inseto e suas condições/locais ideais de reprodução representa uma lacuna importante para um controle eficiente, visto que a maioria dos criadouros se encontram em ambiente doméstico.

[048] Assim, recorrendo às propriedades químicas do LCC e derivados, similares às dos surfactantes de origem petroquímica comumente utilizados, e através da sulfonação seguida de neutralização destes produtos, as composições apresentarão duas funcionalidades, inseticida de grande abrangência e surfactante. Neste sentido, e uma vez que os surfactantes são muito usados em ambientes domésticos e urbanos, estas composições poderão ser facilmente inseridas nas rotinas das populações, combinadas com outros surfactantes ou substituindo-os totalmente.

[049] Deste modo, o uso destes produtos na higienização de superfícies e espaços em ambiente doméstico permite, a partir do escoamento das águas residuais, o controle de espaços/reservatórios que possam servir de criadouros dos insetos, aumentando a disseminação do inseticida e alcançando maior número de criadouros, potencializando o controle do vetor e das doenças, tendo em conta aspectos ecológicos e sócio-econômicos e as preferências da espécie vetora.

[050] A utilização das referidas composições permitirá a redução da poluição gerada pela grande quantidade de produtos de origem petroquímica e outros químicos sintéticos atualmente utilizados e extremamente prejudiciais para o ambiente e para a saúde humana, recorrendo a um produto da biomassa, o LCC técnico, ou seus constituintes modificados ou não. Este constitui um subproduto industrial produzido em abundância, de baixo custo e impacto ambiental, capaz de originar composições com múltiplas funcionalidades, ambientalmente

sustentáveis, com excelente desempenho, solúveis, biodegradáveis, compatíveis com outros surfactantes, de reduzido custo e que não causam irritações significativas na pele.

[051] A produção de LCC técnico ocorre majoritariamente no Nordeste brasileiro, região desfavorecida com altas taxas de incidência de doenças, deficiências ao nível da prestação de cuidados de saúde e de saneamento, e com número insuficiente de postos de trabalho. O seu reaproveitamento proporcionará não só a redução dos riscos para a saúde pública, dos gastos governamentais com meios de diagnóstico/tratamento das doenças e impacto ambiental, em todo o país, como também o aumento de postos de trabalho na região para a produção industrial das referidas composições, otimizando recursos, tendo em conta preço do transporte das matérias primas *versus* preço do produto final, garantindo o aumento da renda das comunidades e, conseqüentemente, da qualidade de vida das populações.

[052] A seguir são apresentados os métodos utilizados para a síntese dos sulfonatos de LCC técnico e cardanol, avaliação de toxicidade em larvas de *Ae. aegypti* e microrganismos relevantes para o seu desenvolvimento.

Isolamento do cardanol

[053] O isolamento do cardanol é realizado segundo o método descrito na patente **BR 10 2014 030002 3** “Processo eficiente de purificação do cardanol isolado do líquido da casca de castanha de caju (LCC) e produção de derivados de interesse industrial”.

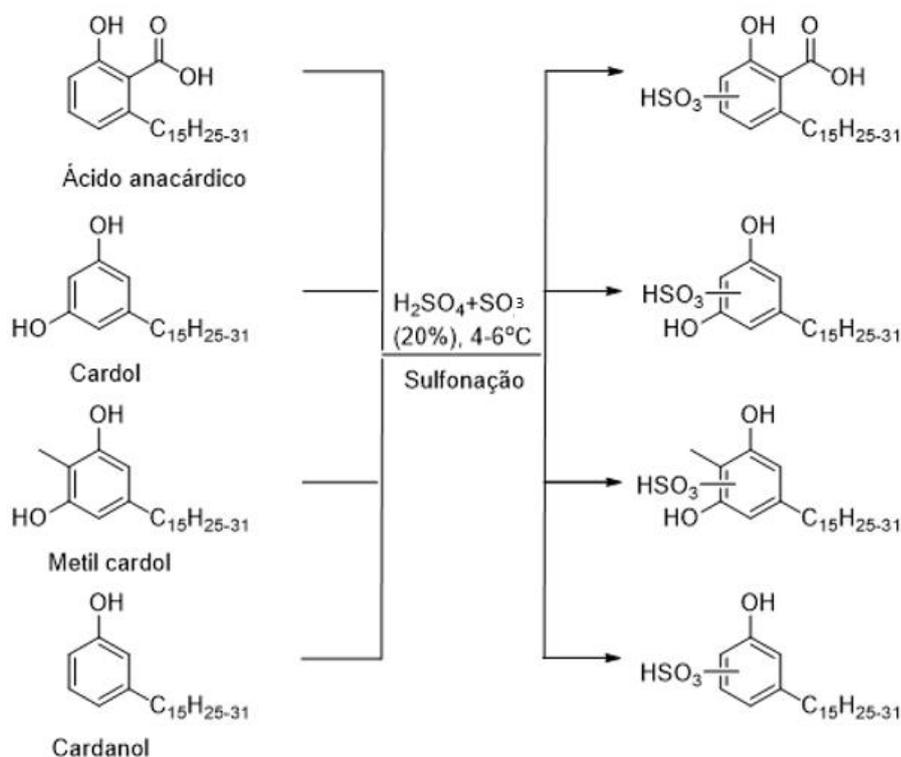
Síntese dos tensoativos

[054] O tensoativo de cardanol é sintetizado por tratamento com ácido sulfúrico fumegante e neutralizado a sal sódico e/ou cúprico de acordo com a metodologia proposta por Peungjitton et al. (Sodium cardanol sulfonate surfactant from cashew nut shell liquid. *J. Surfact Deterg.* 12, 85-89, may 2009).

[055] O tensoativo de LCC técnico é sintetizado segundo o processo de síntese do sulfonado de cardanol, com modificações.

[056] Em um erlenmeyer são dissolvidos 10g de LCC técnico, previamente diluído em hexano (1:1) e filtrado, em 100 mL de metanol. A solução é esfriada num banho de água-gelo até aproximadamente 10°C e mantida no máximo a 0°C enquanto, através de um funil de adição, é adicionado lentamente à solução ácido sulfúrico fumegante (10,5 g), ao longo de 2 horas com agitação constante. A mistura reacional é deixada em agitação a atingir a temperatura ambiente durante pelo menos 3 horas e, em seguida, é neutralizada com 35 mL de hidróxido de sódio 5M. Após agitar durante 1 hora, a mistura é extraída com hexano. O resíduo sólido é separado da fase aquosa, e a porção insolúvel removida por filtração e lavada com acetona. O sólido

obtido é seco à temperatura ambiente ou em estufa até 50°C, resultando em sulfonato de sódio de LCC técnico, reação descrita no esquema abaixo.



Bioensaios de toxicidade em larvas de *Ae. aegypti*

[057] Os bioensaios de toxicidade do LCC técnico e cardanol, dos seus sulfonatos e das emulsões em larvas do 3º e 4º estádios de *Ae. aegypti* foram realizados por metodologia padronizada da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13p. 2005), com adaptações. Alíquotas dos produtos, em solução com até 3,5% de DMSO, nas concentrações de 1 até 1.000 mg mL⁻¹ foram preparadas em H₂O para realização dos bioensaios. Grupos de 25 larvas de *Ae. aegypti* foram colocados em frascos individuais de 200 mL em quadruplicatas à temperatura ambiente. Após 24, 48 e 72 horas de exposição a mortalidade foi determinada. O número de larvas mortas foi contado e a percentagem letal calculada. Foram consideradas mortas as larvas que permaneceram imóveis no fundo do recipiente e/ou na superfície aquática após o toque com um pincel. Os controles negativo e positivo foram feitos utilizando H₂O mineral, DMSO até 3,5% e temefós a 0,012 mg L⁻¹. Os ensaios foram repetidos em triplicata em dias diferentes. O delineamento experimental foi casualizado. As concentrações letais CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₉ foram determinadas de acordo com Probit, com intervalos de confiança de 95%.

Bioensaios de toxicidade em microrganismos

[058] A atividade antimicrobiana do LCC técnico e cardanol, respectivos sulfonatos e emulsões foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita na norma M7 - A9 do Clinical Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard 9. ed. Edition. CLSI document M7-A9 (ISBN 1-56238-587-9), 2012). Foram utilizadas bactérias da coleção padrão da American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Proteus mirabilis* (ATCC 35659).

[059] Os compostos foram dissolvidos em água e, em seguida, por diluições sucessivas (1:2) foram obtidas concentrações inicial de 1000 µg mL⁻¹ e final de 1,9 µg mL⁻¹. O inóculo foi preparado em solução salina estéril ajustada na concentração de 0,5 da escala de McFarland (108 UFC mL⁻¹). Logo após, foram adicionados 100 µL do meio de cultivo (Caldo Mueller Hinton) e 100 µL de inóculo. As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C por 24 horas; após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano e leitura espectrofotométrica em uma leitora de Elisa no filtro de 570 nm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do extrato no qual os microrganismos não apresentaram crescimento visível após incubação (Paghal e Kaushal. *In vitro* antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, 101-200, 2010).

REIVINDICAÇÕES

1. **Processo para Síntese de Surfactantes de LCC Técnico, Emulsões Inseticidas e Derivados de LCC para Controle Populacional do Mosquito *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) e Insetos de Ciclo Reprodutivo Similar e/ou Susceptíveis** caracterizado por formulação/produção/síntese de ativos multifuncionais de LCC técnico e derivados, incluindo LCC-sulfonatos e emulsões LCC/derivados + LCC/derivados-sulfonatos, com ação surfactante e atividade inseticida/larvicida/antimicrobiana conjunta.
2. **Processo para Síntese de Surfactantes de LCC Técnico, Emulsões Inseticidas e Derivados de LCC para Controle Populacional do Mosquito *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) e Insetos de Ciclo Reprodutivo Similar e/ou Susceptíveis** caracterizado por uso dos produtos na forma líquida ou sólida dispersos em polímeros naturais e/ou sintéticos, puros ou misturados em surfactantes petroquímicos, ou para emulsionar LCC técnico e derivados, inseticidas convencionais, bem como outros produtos com ação biológica, para aplicação em diferentes proporções mássicas/molares, e controle prolongado dos criadouros de culicídeos.
3. **Processo para Síntese de Surfactantes de LCC Técnico, Emulsões Inseticidas e Derivados de LCC para Controle Populacional do Mosquito *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) e Insetos de Ciclo Reprodutivo Similar e/ou Susceptíveis** caracterizado por utilização dos compostos/emulsões como tensoativos domésticos ou industriais, para lavagem/limpeza de têxteis, pisos, paredes, superfícies, louças ou quaisquer outros objetos, de forma a permitir o escoamento do produto juntamente com as águas residuais, atingindo os criadouros dos insetos e permitindo o controle populacional dos vetores.
4. **Processo para Síntese de Surfactantes de LCC Técnico, Emulsões Inseticidas e Derivados de LCC para Controle Populacional do Mosquito *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) e Insetos de Ciclo Reprodutivo Similares e/ou Susceptíveis** caracterizado por utilização dos produtos contidos em dispositivos e/ou impregnados em dispositivos poliméricos, cerâmicos ou argilosos, ou pellets, para a fabricação de telhas, tijolos, vasos, recipientes, pisos, cápsulas, artefatos domésticos entre outros possíveis, passíveis de representarem criadouros, para liberação em contacto com líquidos, para controle do vetor nas residências, espaços públicos, repartições ou indústrias.
5. **Processo para Síntese de Surfactantes de LCC Técnico, Emulsões Inseticidas e Derivados de LCC para Controle Populacional do Mosquito *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) e Insetos de Ciclo Reprodutivo Similares e/ou Susceptíveis** caracterizado por

utilização dos produtos contidos em dispositivos ou aplicados livres por dispersão, puros ou em mistura com LCC técnico e derivados, e/ou outros surfactantes, inseticidas, bactericidas, fungicidas, nematocidas, em diferentes concentrações, em plantações, lavouras ou espaços produtivos para controle de culicídeos ou de outras espécies de insetos susceptíveis ou pragas agrícolas.

RESUMO

PROCESSO PARA SÍNTESE DE SURFACTANTES DE LCC TÉCNICO, EMULSÕES INSETICIDAS E DERIVADOS DE LCC PARA CONTROLE POPULACIONAL DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E INSETOS DE CICLO REPRODUTIVO SIMILAR E/OU SUSCEPTÍVEIS

A presente invenção se refere à produção de sulfonatos de LCC técnico e derivados, e sua utilização na forma pura ou em emulsões, em diferentes misturas molares, como produtos multifuncionais sustentáveis, com ação surfactante e inseticida/larvicida/antimicrobiana conjunta, para o controle populacional do *Ae. aegypti* e insetos de ciclo reprodutivo similar nos criadouros. Como tensoativos, os produtos poderão ser utilizados diariamente pela população nas atividades de limpeza domésticas ou industriais, bem como na lavagem de roupas e quaisquer outros têxteis. Deste modo, as águas residuais resultantes destas atividades dispersarão o produto, fazendo com que este atinja um grande número de criadouros e permitindo o controle abrangente e eficaz do vetor a partir das formas imaturas. Os produtos, formulações e emulsões poderão ser igualmente utilizados para impregnar objetos que possam servir de criadouros, sendo liberados gradualmente quando em contato com a água, ou aplicados em áreas agrícolas, em mistura com pesticidas, para controle conjunto de pragas agrícolas e insetos vetores de doenças. Devido à origem dos princípios ativos, os produtos apresentam-se como uma alternativa ecológica com grande potencial para o controle eficaz das populações de *Ae. aegypti* e outros insetos vetores, reduzindo a incidência de doenças, e permitindo a redução dos impactos ambientais e também na saúde pública resultantes da utilização tanto de surfactantes de origem petroquímica como de inseticidas químicos sintéticos.