

Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*

GUISSONI, A.C.P.¹; SILVA, I.G.¹; GERIS, R.²; CUNHA, L.C.¹; SILVA, H.H.G.^{1*}

¹Universidade Federal de Goiás, 1ª. Avenida s/n, Setor Universitário, CEP 74605-050, Caixa Postal 131, Goiânia, GO. *garciaheloisa@yahoo.com.br, ²Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo, 147, Campus de Ondina, CEP 40170-115, Salvador, BA.

RESUMO: A busca por substitutos para os inseticidas sintéticos tem estimulado muitos trabalhos científicos contemplando inclusive a utilização de óleos, extratos, ou constituintes ativos provenientes de plantas. Esta procura pode ser justificada pelo potencial inseticida associado à fácil degradação de seus constituintes, menor toxicidade ao homem e uma alternativa mais segura para o meio ambiente. Após a coleta e aquecimento dos frutos de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) a 40°C, obteve-se um líquido da castanha de caju (LCC) que, depois de testado quanto à sua atividade larvicida, foi fracionado em coluna de sílica gel dando origem a oito frações, as quais foram codificadas como AO₁ a AO₈ e submetidas a ensaios larvicidas. Avaliou-se também sua toxicidade oral aguda em *Rattus norvegicus*. O LCC e as frações AO₂ e AO₃ apresentaram atividade larvicida para *Aedes aegypti*. As concentrações letais, CL₅₀ e CL₉₀ do LCC foram, respectivamente, de 6,55 e 10,98 ppm. Para AO₂ e AO₃, as CL₅₀ e CL₉₀ foram de 3,18 e 7,80 ppm, e de 3,57 e 10,47 ppm, respectivamente. Não foi observada nenhuma toxicidade do LCC e das frações para *R. norvegicus*. O LCC e as frações foram administrados por via oral na dose de 2000 mg/kg. Esses produtos apresentaram potencial larvicida sobre *Ae. aegypti* e nenhum sinal de toxicidade foi evidenciado nos parâmetros analisados.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*, *Aedes aegypti*, larvicida, toxicidade aguda.

ABSTRACT: Larvicidal activity of *Anacardium occidentale* as an alternative to control *Aedes aegypti* and its toxicity in *Rattus norvegicus*. The search for substitutes for synthetic pesticides has been the subject of many scientific publications, including considering the use of oils, extracts and active constituents from plants. This demand can be justified by the insecticide potential associated with an easy degradation of its constituents, lower toxicity to humans and, consequently, a safer alternative for the environment. After collecting and heating the *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) fruits at 40°C, they were tested to confirm their larvicidal activity. Then, it was fractionated in a silica gel column. The fractionation resulted in eight fractions, which were coded as AO₁ to AO₈. In this paper, the cashew nut shell liquid (CNSL) and its fractions were evaluated as to their biological activity in the third instar larvae of *Aedes aegypti*. The acute oral toxicity in *Rattus norvegicus* also was evaluated. CNSL and the AO₂ and AO₃ fractions presented larvicidal activity. The lethal concentrations, LC₅₀ and LC₉₀, of CNSL were, respectively, 6.55 and 10.98 ppm. The active fractions, AO₂ and AO₃, presented LC₅₀ and LC₉₀ of 3.18 and of 7.80 ppm, and 3.57 and 10.47 ppm, respectively. The LCC and the fractions were orally administered at a dose of 2000 mg/kg. These products showed larvicidal potential against *Ae. aegypti* and no sign of toxicity was evident in the parameters analyzed.

Keywords: *Anacardium occidentale*, *Aedes aegypti*, larvicidal, acute toxicity.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença causada por um arbovírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, que apresenta quatro sorotipos infectantes (Figueiredo, 2000; WHO, 2009). O vetor mais

importante em toda faixa intertropical do globo terrestre é o *Aedes aegypti* (Tauil, 2001; Braga & Valle, 2007; WHO, 2009). Como ainda não estão disponíveis medicamentos antivirais para tratamento,

nem uma vacina eficaz para uso humano, o controle da dengue se baseia, principalmente, em aplicações de inseticidas (WHO, 2009). O uso continuado de inseticida fez surgir populações resistentes de *Ae. aegypti* (Macoris et al., 2003), dificultando o êxito dos programas de controle.

Compostos derivados de plantas têm sido apresentados como alternativas ao controle de vetores, não só como novos agentes inseticidas, mas também por serem ambientalmente mais seguros (Mendonça et al. 2005; Omena et al. 2007; Garcez et al., 2009; Mukhopadhyay et al. 2010; Santos et al. 2010). No entanto, para serem registrados como inseticidas, os compostos devem ser avaliados em relação aos seus efeitos toxicológicos, conforme padronização internacional (Zucker, 1985; OECD, 2004).

Anacardium occidentale (Anacardiaceae) é uma planta conhecida popularmente por cajueiro; pertence à família Anacardiaceae e apresenta grande importância econômica no Brasil. Seu pedúnculo é confundido com o fruto, sendo muito apreciado pela suculência. No entanto, o fruto é a castanha e dela se retira um líquido escuro, quase preto, denominado por Mazetto et al. (2009) de líquido da castanha do caju (LCC) ou *cashew nut shell liquid* (CNSL). Para a obtenção do LCC, empregam-se diferentes processos como a extração a frio, extração por solventes (Correia et al., 2006) ou processo térmico-mecânico, onde o próprio LCC quente é utilizado para aquecer as castanhas a 190°C. Quando submetido a altas temperaturas o ácido anacárdico sofre reação de descarboxilação convertendo-se a cardanol, produzindo o denominado LCC técnico (Lopes, 2005; Rios, 2008).

Apresentam-se, neste trabalho, o estudo da atividade larvicida do LCC e de frações de *A. occidentale* sobre o *Ae. aegypti*, e também a toxicidade oral aguda em *Rattus norvegicus*, visando encontrar alternativas naturais, de baixa toxicidade para vertebrados, sem impacto ambiental, que possam ser utilizadas no controle desse mosquito.

MÉTODOS E MÉTODOS

Material botânico

Frutos de *A. occidentale* L. foram colhidos no setor Pedro Ludovico, em Goiânia, GO, Brasil, no mês de outubro de 2008. Uma exsicata foi autenticada pelo Professor José Ângelo Rizzo e depositada no Herbário da Unidade de Conservação, sob nº 43.180, no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Obtenção e Fracionamento do Líquido da Castanha de *A. occidentale*

No Laboratório de Bioatividade de Plantas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG, dois kg de frutos foram colocados em estufa de ventilação forçada, a 40°C, por 7 dias. Com esse procedimento foram obtidos 600g de um líquido de coloração marrom e de odor forte, denominado líquido da castanha do caju (LCC). Inicialmente, 50g do líquido obtido de *A. occidentale* foram submetidos a uma filtração a vácuo, em um funil de placa sinterizada, com diâmetro interno de 9cm e uma altura de gel de sílica (70-230 mesh) de 15cm. As frações foram eluídas, seguindo a técnica de gradiente com n-hexano, acetato de etila e metanol, totalizando oito frações. Estas foram denominadas, em ordem crescente, AO₁ a AO₈ e submetidas aos ensaios larvicidas.

Bioensaios em Laboratório

Os bioensaios foram realizados com larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*, por serem as mais tolerantes em relação aos demais estádios (Silva et al., 2003). O líquido e/ou as frações foram primeiramente pesados e pré-solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A quantidade de solvente utilizada para o preparo da solução foi previamente determinada por ensaios de tolerância sem mortalidade das larvas, e foi de 0,4%. Para cada uma das amostras a serem testadas preparou-se uma solução-mãe, acrescentando-se água, num volume suficiente para obter a concentração de 100ppm para o líquido e as frações. A partir destas soluções uma série de diluições foi preparada a fim de se obterem concentrações menores de 80, 60, 40, 20, 10, 5 e 2,5ppm ($C_1.V_1 = C_2.V_2$). Os bioensaios foram realizados em copos com capacidade para 30 mL. Nestes, foram colocados 25 mL de cada uma das soluções e em seguida 20 larvas de 3º estágio. Todos os bioensaios foram realizados em triplicata com duas repetições.

As leituras da mortalidade foram feitas após 24h de exposição das larvas às soluções. Todos os experimentos foram acompanhados de uma série controle, contendo o mesmo número de larvas e o mesmo volume de DMSO e água destilada.

A avaliação de toxicidade aguda foi realizada em *R. norvegicus* (linhagem Wistar) de ambos os sexos, oriundos do biotério central da UFG. Os animais eram adultos jovens, com 8 a 12 meses de idade e o peso de cada um não excedeu a 20% da média do grupo, que foi de 300g para machos e 280g para fêmeas.

Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) da Faculdade de Farmácia da UFG. Foram alimentados com ração balanceada

e água filtrada. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Goiás (Protocolo nº 292/10), seguindo as diretrizes da OECD (2004). Para realização do experimento, dois grupos foram formados, com três machos e três fêmeas cada um. Por se tratar de um extrato de origem vegetal com finalidade inseticida e pela inexistência de casos de intoxicação, os experimentos foram realizados na dose única de 2000mg/kg de LCC, considerada limite superior para vegetais. Administrou-se 1mL da solução para cada 100g de peso corporal, por via oral, a cada animal. Simultaneamente, o grupo controle foi realizado com o mesmo número de animais, e solução de água e DMSO (0,4%). As observações foram feitas, seguindo o *screening* hipocrático (atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reposta ao toque, reposta ao aperto da cauda, contorção, força para agarrar, tremores, convulsões, salivação, lacrimejamento, micção, defecação, piloereção, morte) por um período de 14 dias. No 15º dia, os ratos foram pesados, anestesiados, pela via intraperitoneal, com cetamina a 5% e xilazina a 10%, depois, eutanasiados e os órgãos foram analisados macroscopicamente.

As observações do *screening* hipocrático foram registradas em protocolo impresso com a lista dos sinais investigados. As intensidades dos eventos foram tabuladas de zero a quatro, correspondendo, respectivamente a ausente (0), raro (1), pouco (2), moderado (3) e intenso (4), até o décimo quarto dia (Malone & Robichaud, 1962).

Os dados obtidos da mortalidade x concentração (ppm) foram analisados pelo programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas), Versão 9.1, em gráfico de Probit, para determinar as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) e os respectivos intervalos de confiança (IC). A toxicidade aguda foi analisada pelo teste de *Student* (*t*), ao nível de 5%, através do programa Signa Plot.

RESULTADOS

Utilizando-se como método de obtenção o aquecimento das castanhas a 40°C, obteve-se, neste trabalho, um rendimento de 30% de LCC. As concentrações letais do LCC sobre larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* foram de 6,55 e 10,98 ppm, respectivamente, para CL_{50} e CL_{90} . Após a separação cromatográfica foi possível obter concentrações letais mais baixas com as frações AO_2 e AO_3 (Tabela 1).

Do fracionamento do LCC obtiveram-se 8 frações, mas somente AO_2 e AO_3 apresentaram atividade larvicida e o rendimento foi de 43% e 15,7%, respectivamente.

A toxicidade oral aguda LCC avaliada em

TABELA 1: Atividade larvicida, em laboratório, do líquido e das frações de *Anacardium occidentale* sobre larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.

Frações	CL_{50} (IC 95%) ppm	CL_{90} (IC 95%) ppm
LCC	6,55 (6,09 – 6,98)	10,98 (10,04 -12,44)
AO_2	3,18 (2,70 – 3,64)	7,80 (6,77 – 9,31)
AO_3	3,57(2,99 – 4,13)	10,47(8,71–13,49)

LCC – Líquido da castanha do caju; CL - Concentração Letal; IC – Intervalo de Confiança a 95%
ppm – partes por milhão; AO - *Anacardium occidentale*

R. norvegicus pelo *screening* hipocrático, na dose administrada de 2000mg/kg, não causou nenhum sinal significativo de intoxicação aos animais, quando comparado ao grupo controle, pelo teste *t*, ao nível de 5%.

DISCUSSÃO

Há no mundo uma crescente preocupação relacionada à preservação do meio ambiente. Liderado pelas nações mais desenvolvidas, um movimento de nova consciência ambiental se espalha, gerando organizações, reuniões e discussões entre países para promover mudanças de condutas para um novo modelo de vida. Com isso, tem aumentado progressivamente estudos com plantas com diferentes finalidades. Dentre essas, a atividade inseticida das plantas e a sua baixa toxicidade para mamíferos tem sido motivos de várias investigações. Existem outros fatores que, associados aos motivos anteriores, criam expectativas maiores, com os subprodutos da indústria alimentícia, como é o caso do líquido da castanha do caju (LCC), cujo potencial inseticida foi avaliado nesse trabalho.

Segundo Rios (2008), o LCC é uma das maiores fontes de lipídios fenólicos de origem natural, tendo como componentes majoritários o ácido anacárdico, cardanol, cardol e 2-metilcardol. Quando submetido a temperaturas em torno de 180°C, o ácido anacárdico converte-se a cardanol, produzindo o chamado LCC técnico.

A atividade larvicida do LCC técnico, obtido com o aquecimento das castanhas a 190°C, foi avaliada por Lomonaco et al. (2009) sobre *Ae. aegypti*, e a CL_{50} encontrada foi de 51ppm, sendo cerca de 8 vezes maior do que a encontrada neste trabalho. Se o aquecimento converte o ácido anacárdico a cardanol e diminui a atividade, podemos supor que este ácido seja o responsável por uma maior atividade larvicida. O LCC obtido no presente estudo, com aquecimento a 40°C, provavelmente tenha maior concentração de ácido anacárdico, responsável pela maior atividade.

O fracionamento de extratos vegetais, guiado por bioensaios, foi utilizado na tentativa de se potencializar a atividade biológica e, posteriormente, conseguir o isolamento do princípio ativo (Silva et al., 2007; Geris et al., 2008). Porém, isso nem sempre acontece, pois alguns trabalhos mostraram que as substâncias puras isoladas eram menos ativas que suas frações de origem (Simas et al., 2004; Silva et al., 2007). Isto sugere um efeito sinérgico de compostos presentes na fração. Neste trabalho, o fracionamento originou uma fração mais ativa que o LCC inicial.

Os resultados da atividade larvicida do LCC e das frações, obtidos neste trabalho, foram significativos para o controle de *Ae. aegypti*, quando comparados a outros trabalhos pertinentes da literatura, para a mesma espécie de mosquito (Mendonça et al., 2005; Omena et al., 2007; Farias et al., 2009; Mukhopadhyay et al., 2010; Tripathiy et al., 2011)

As concentrações letais obtidas com o LCC foram menores do que as encontradas por Silva et al. (2007), com o óleo resina de *Copaifera reticulata*, de 8,6 e 59,4ppm, para as CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente.

Esses resultados favoráveis estimulam a continuidade do estudo, visando o isolamento do princípio ativo e, principalmente, formas que viabilizem o seu uso prático para o controle de *Ae. aegypti*.

A estimativa da dose letal mediana oral para causar a morte de 50% dos animais (L₅₀) foi maior que 2000 mg/kg. Segundo as diretrizes da OECD (2004), este valor permite classificar o LCC, na classe 5, ou seja, substância de muito baixa toxicidade. O LCC e as frações AO₂ e AO₃ apresentaram atividade larvicida para *Ae. aegypti* com potencial a ser candidato nas ações de controle desse vetor. O uso do LCC é interessante pela possibilidade de aproveitamento de subprodutos da indústria da castanha, ou, ainda, pela conveniência de ser um recurso renovável e não apresentar nenhum sinal de toxicidade dentro dos parâmetros analisados neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ângelo Rizzo do Departamento de Botânica da UFG, pela identificação do material botânico e a FAPEG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA

- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Histórico do Controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.2, p.113-18, 2007.
- CORREIA, S.J. et al. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1287-300, 2006.
- FARIAS, D.F. et al. Insecticidal action of sodium anacardate from brazilian cashew nut Shell liquid against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.25, n.3, p.386-89, 2009.
- FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v.2, n.13, p.1643-49, 2000.
- GARCEZ, W.S. et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. **Bioresource Technology**, v.100, n.24, p.6647-50, 2009.
- GERIS, R. et al. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.1, p.25-8, 2008.
- LOMONACO, D. et al. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. **Green Chemistry**, v.11, n.1, p.31-3, 2009.
- LOPES, A.A.S. **Síntese de um aditivo tiofosforado a partir do líquido da casca da castanha de caju (Anacardium occidentale Lin)**. 2005. 125p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MACORIS, M.L. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.5, p.703-8, 2003.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. **A hipocratic screen for pure or crud drug materials**. *Loydia*, 1962. p.320-32.
- MAZZETTO, S.L. et al. Óleo da Castanha de caju: Oportunidades e Desafios no Contexto do desenvolvimento e Sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v.32, n.3, p.732-41, 2009.
- MENDONÇA, F.A.C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v.76, n.7, p.629-36, 2005.
- MUKHOPADHYAY, A.K. et al. Larvicidal properties of cashew nut shell liquid (*Anacardium occidentale* L.) on immature stages of two mosquito species. **Journal Vector Borne**, v.47, n.12, p.257-60, 2010.
- OECD-ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals (OECD-423)**. Paris: OECD/OCDE, 2004. 275p.
- OMENA, M.C. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian plants. **Bioresource Technology**, v.98, n.13, p.2549-56, 2007.
- RIOS, M.A. **Síntese e aplicabilidade de antioxidantes derivados do cardanol hidrogenado**. 2008. Tese (Doutorado – área de concentração Química Inorgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- SANTOS, E. et al. Oviposition activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in response to different organic infusions. **Neotropical Entomology**, v.39, n.2, p.299-302, 2010.
- SILVA, H.H.G. et al. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinioideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.3, p.264-67, 2007.

- SILVA, I.G. et al. Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre o *Aedes aegypti* em criadouros artificiais. **Revista de Patologia Tropical**, v.32, n.1, p.73-86, 2003.
- SIMAS, N.K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v.27 n.1, p.46-9, 2004.
- TAUIL, P.L. Urbanização e ecologia do dengue. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, n.suppl, p.99-102, 2001.
- TRIPATIY, A. et al. The mosquitocidal activity of methanolic extract os *Lantana cramera* Root and *Anacardium occidentale* Leaf: role glutathione s-transferase in insecticide resistance. **Journal Medical Entomology**, v.48, n.2, p.291-295, 2011.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue guidelines treatment, prevention and control**. New ed. Geneva: World Health Organization, 2009. 147p.
- ZUCKER, E. **Standard evaluation procedure acute toxicity test for freshwater fish**. Washington: USEPA, 1985. 17p.