

## **Análise de testes toxicológicos *Artêmia Salina* e *Allium cepa* em membranas de quitosana com líquido da Castanha do Cajú (LCC)**

### **Analysis of toxicological tests *Artemia Salina* and *Allium cepa* in chitosan membranes with Cajú Chestnut liquid (LCC)**

DOI:10.34117/bjdv7n4-036

Recebimento dos originais: 07/03/2021

Aceitação para publicação: 01/04/2021

#### **Maura Vieira dos Santos Sousa**

Mestranda em Ciência e Engenharia de Materiais no Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais - PPCEM  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
Cidade Universitária, s/n, Conj. Pres. Castelo Branco III, João – Pessoa, PB, Brasil  
E-mail:mauraallabbiomat@gmail.com

#### **Tácio Fragoso Pereira**

Mestrando em Ciência e Engenharia de Materiais no Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais - PPCEM  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
Cidade Universitária, s/n, Conj. Pres. Castelo Branco III, João – Pessoa, PB, Brasil  
E-mail:taciofragoso29@gmail.com

#### **Haroldo Reis Alves de Macêdo**

Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Instituto Federal do Piauí - PPGEM/IFPI  
Avenida Pedro Marques de Medeiros, S/N, bairro Pantanal, Picos - PI, Brasil  
E-mail:haroldoram@ifpi.edu.br

#### **Marina de Oliveira Cardoso Macêdo**

Doutora Em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Instituto Federal do Piauí - PPGEM/IFPI  
Avenida Pedro Marques de Medeiros, S/N, Bairro: Pantanal, Picos - PI, Brasil  
E-mail: marinalabplasma@gmail.com

## **RESUMO**

Com a eficácia de membranas de quitosana no tratamento de feridas, pesquisadores tem investido no seu aperfeiçoamento com a finalidade de potencializar seus efeitos biológicos. Um método que tem sido utilizado é a incorporação de compostos com potencial farmacológico adicional às membranas. O LCC, por exemplo, é um composto que possui vários componentes que o atribui propriedades biológicas, com exceção de

um, o cardol, que o torna tóxico. Entretanto, há estudos que comprovam uma tolerância de 5g/kg dessa substância. Assim, o objetivo deste trabalho foi formar membranas de quitosana com LCC, possuindo baixa toxicidade e efeitos biológicos estáveis e potencializados, além de analisar técnicas de toxicidade viáveis para sua análise. Como resultado, foi possível obter membranas de quitosana com diferentes proporções de LCC, e para a escolha do melhor teste de toxicidade aplicado as membranas foram feitas análises de toxicidade com testes de *Allium cepa* e artêmia salina. Entretanto, não foi possível obter os resultados esperados com estes testes.

**Palavras-chave:** Membranas de quitosana com LCC, *Allium cepa*, Artêmia salina, Toxicidade.

## ABSTRACT

With the effectiveness of chitosan membranes in the treatment of wounds, a researcher has invested in its improvement with the capacity to enhance its biological effects. One method that has been used is the incorporation of compounds with additional pharmacological potential to the membranes. LCC, for example, is a compound that has several components that give it biological properties, with the exception of one, cardol, which makes it toxic. However, there are studies that prove a tolerance of 5g / kg of this substance. Thus, the objective of this work was to form chitosan membranes with LCC, having low toxicity and stable and enhanced biological effects, in addition to analyzing viable toxicity techniques for their analysis. As a result, it was possible to obtain chitosan membranes with different proportions of LCC, and in order to choose the best toxicity test applied as membranes, toxicity analyzes were performed with tests for *Allium cepa* and saline brine. However, it was not possible to obtain the expected results with these tests.

**Keywords:** Chitosan membranes with LCC, *Allium strain*, Saline brine, Toxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais tem sido utilizados para a cicatrização de tecidos desde o século XX após a segunda guerra mundial e de lá para cá, estes vem sendo aperfeiçoados ao longo do tempo. Um exemplo destes, é a membrana de quitosana, que a cerca de quatro décadas vem sendo utilizada como pele artificial para cicatrização de ferimentos (MACEDO et al., 2010; MACEDO et al., 2014; ROLIM et al., 2016). Isso porque a quitosana possui várias propriedades biológicas que a tornou o biopolímero mais utilizado para essa finalidade (SOUSA et al., 2016), além de sua matéria prima, a quitina, ser extremamente abundante na natureza, lhe atribuindo baixo custo.

Tendo em vista a melhoria das membranas de quitosana, pesquisadores tem procurado por métodos que venham a aperfeiçoa-la. Entre esses métodos, o que tem ganhado ênfase, é a “incorporação de compostos com potencial farmacológico adicional” (SOUSA et al., 2016), em que o uso de substancias bioativas tem se destacado. Um

composto que pode ser utilizado para essa finalidade é o Líquido da castanha do caju, conhecido comumente por LCC. Este é um subproduto da agroindústria do caju, muito abundante no nordeste brasileiro e em alguns outros países. Este líquido é constituído de ácido anacárdico, cardanois, cardois e 2-metil-cardol, onde a proporção de cada constituinte depende da forma de extração do líquido (MAZZETTO e LOMONACO, 2009). Ainda dependendo da sua forma de extração, esse líquido pode ser classificado como técnico (extraído a altas temperaturas) ou natural (extraído através de prensas ou solvente).

O LCC do tipo técnico possui um grande teor de cardanois em detrimento de uma reação de descarboxilação dos ácidos anacárdicos, convertendo-os em cardanois quando submetidos a temperaturas superiores a 180°C. Com este processo, o cardanol torna-se o componente majoritário do líquido, o que é de grande valia, visto que este por ser capaz de desnaturar proteínas de microrganismos como bactérias e fungos é responsável por atribuir características biológicas ao LCC (MAZZETTO e LOMONACO, 2009; OSMARI, et al, 2015). Outra vantagem do LCC do tipo técnico, é que este apresenta um teor de cardol inferior ao natural, o que é benéfico, dado que este atribui toxicidade ao LCC. Embora o cardol seja tóxico, este está presente no líquido com baixo teor. Além disso, estudos comprovaram uma tolerância de 5g/kg dessa substância(MAZZETTO E LOMONACO, 2009).

Outro precursor das propriedades biológicas do LCC, é a presença abundante de lipídeos fenólicos não isoprenoides de origem natural, que apresenta excelentes atividades biológicas como antibacteriana (que é eficiente tanto contra bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas), antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, anticolinesterásica e larvicida (MAZZETTO e LOMONACO, 2009; ARAÚJO, 2010). Em seu trabalho, Bastos (2016), buscando uma mistura capaz de aperfeiçoar as membranas de quitosana potencializando seus efeitos biológicos, tomou conhecimento do LCC, entretanto, utilizou apenas um dos seus constituintes, o cardanol. Para tanto, se utilizou do método da cromatografia líquida em coluna clássica para a separação dos componentes do LCC. A separação dos constituintes do líquido através deste método aumenta a mão de obra e o custo do desenvolvimento das membranas com esta mistura. Dessa forma, uma alternativa viável seria utilizar o LCC puro, uma vez que seus constituintes lhe atribuem propriedades biológicas. Neste pensamento, Sousa, et al. (2019) utilizou o LCC técnico, com a finalidade de potencializar os efeitos biológicos das

membranas de quitosana, para tanto, desenvolveram misturas com proporções que possuíssem teor de cardol dentro da tolerância conhecida.

Nesta perspectiva, este trabalho tem por objetivo formar membranas de quitosana com diferentes proporções do LCC técnico, de acordo com a metodologia de Sousa et al. (2019), com baixa toxicidade e efeitos biológicos estáveis e potencializados, desenvolvendo um biomaterial com baixa toxicidade, identificando uma técnica de análise toxicológica viável para sua análise.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PREEPARO DAS MEMBRANAS

Para o desenvolvimento das membranas, fez-se necessário os seguintes materiais: quitosana, LCC do tipo técnico, Ácido acético, balança analítica, agitador, filtro de nylon, filtro Mille Millipore® (41µm), filtro de papel, placas de petri e estufa. A quitosana utilizada foi adquirida pela empresa Polymar Ltda, Fortaleza, Brasil, com grau de desacetilação de 85%, pH igual a 8,4 e densidade igual a 1,805 g/L. Já o LCC utilizado foi do tipo técnico concedido através da Empresa EUROCAJU, situada na BR. 343, Zona Rural – Altos/PI. As membranas foram preparadas de acordo com a metodologia de Sousa et al. (2019), no laboratório de biomateriais (LaBioMat) do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologias do Piauí campus-Picos.

#### 2.1.1 Membranas de quitosana pura

Para a obtenção de membranas de quitosana pura, fez-se necessário em primeiro momento a obtenção da solução de quitosana pura. Para tal, a quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético a 2% (v/v) com agitação constante durante 24h. Após este período a solução de quitosana passou por duas filtrações para retirada de impurezas, uma em filtro com tela de nylon e outra em filtro Mille Millipore® (41µm). Logo após, um volume de 25 ml da solução foi vertido sobre as placas de petri e as mesmas foram acondicionadas em estufa por 24h em temperatura de 50°C. Posteriormente as membranas formadas foram neutralizadas com NaOH a 5%, e em seguida lavadas com água destilada para remoção de resíduos seguido de acomodação e secagem em temperatura ambiente por 24h.

#### 2.1.2 Membranas de quitosana com LCC a 5%, 10% e 15%

Para a obtenção das membranas de quitosana com proporções do LCC, a priori foi obtido as soluções de LCC, em que o LCC foi diluído em ácido acético puro obtendo

soluções de 5%, 10% e 15% (v/v) e em sequência foi filtrado em filtro de papel para remoção de impurezas. Em seguida as soluções de LCC foram adicionadas a solução de quitosana pura (já prontas) e postas em agitação por 24h. Após a preparação das soluções de quitosana com proporções de LCC, estas foram vertidas em placas de petri e em sequência foi realizado os mesmos procedimentos feitos na solução de quitosana pura para a formação das membranas.

## 2.2 ALLIUM CEPA

O teste Allium cepa foi realizado no Laboratório de Pesquisa I da Universidade Federal do Piauí campus-Picos. Os bulbos utilizados eram de tamanho pequeno, uniformes, de mesma origem, não germinadas e saudáveis. Os parênquimas centrais das coroas de brotamento foram retirados e em seguida os bulbos de cebola foram colocados em frascos com água destilada (figura 1a) a temperatura ambiente para enraizar. Os bulbos deveriam conter raízes com até 2 cm de comprimento (figura 1b) para serem colocados nas soluções de quitosana pura e nas soluções de quitosana com LCC para dar continuidade ao procedimento do teste.

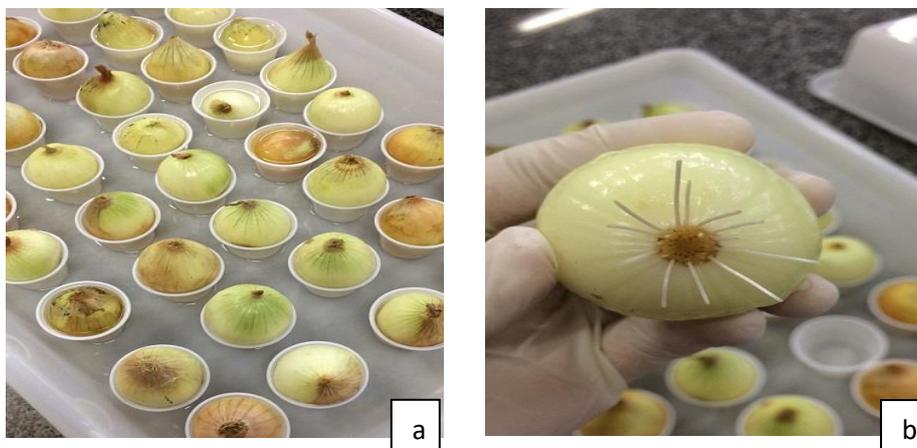


Figura 3- (a) Cebolas com bulbos imersos em água destilada e (b) raízes dos bulbos.

Fonte: autoria própria

## 2.3 ARTÊMIA SALINA

O teste da Artêmia Salina foi realizado no Laboratório de Pesquisa I da Universidade Federal do Piauí campus-Picos. Para a preparação da A. salina, os cistos do microcrustáceo foram adquiridos no mercado central de Teresina-PI, Brasil. Esta caracterização foi uma adaptação do método descrito por Meyer et al., (1982). Foram incubados cistos do microcrustáceo (Artêmia salina) em becker contendo uma mistura 50:50 de solução salina (água do mar artificial: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O,

4 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,3 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,7 g de KCl em 1 L de água destilada e ajustado para pH 8,5 utilizando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1N) e água mineral sob arejamento constante durante 48 h a 27 ± 3° C.

Após incubação, os náuplios ativos livres de conchas do microcrustáceo foram recolhidos a partir da porção mais iluminada da câmara de incubação e utilizados para o ensaio. Dez náuplios foram retirados por meio de uma pipeta de Pasteur e inseridos em cada tubo de ensaio contendo 4,5 mL da solução salina. O experimento foi realizado por diluições seriadas, onde a concentração inicial da substância foi a mesma utilizada nas membranas de quitosana com LCC a 5%. Em cada experimento, adicionou-se 3 mL da amostra teste a 4,5 mL de solução de salina, mantendo a mesma temperatura de eclosão. Após, sob a luz seria realizada a contagem dos náuplios sobreviventes e em seguida a análise da taxa de mortalidade dos mesmos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 MEMBRANAS DE QUITOSANA COM MISTURAS DE LCC

Foram obtidas membranas de quitosana puras e com LCC com diâmetro de 68,7mm. As primeiras apresentaram-se translúcidas, enquanto as membranas com LCC possuíam coloração escura, característica da mistura. Na figura 3 é apresentado a coloração escurecida das membranas à medida que se aumenta as proporções do LCC.

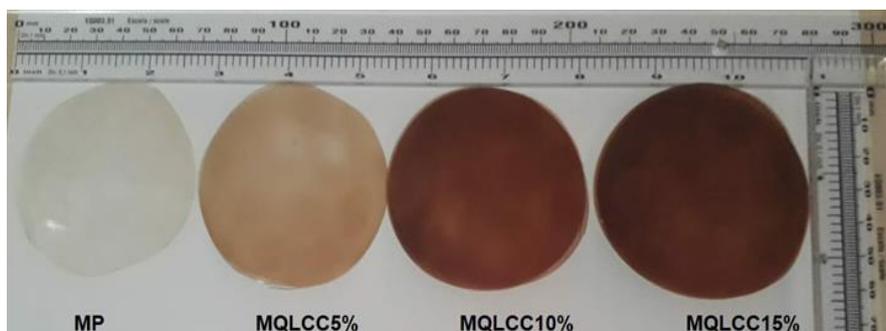


Figura 3 – Membranas de quitosana pura (MP) e membranas de quitosana proporções de LCC a 5% (MQLCC5%), 10% (MQLCC10%) e 15% (MQLCC15%).

Fonte: autoria própria

#### 3.2 ALLIUM CEPA

Como citado na metodologia deste trabalho, para a obtenção das proporções do LCC se faz necessário a diluição do mesmo em ácido acético. Este só deixa as soluções quando passa pelo processo de formação das membranas em estufa, onde parte dele é evaporado e a outra parte neutralizada em solução de NaOH. Entretanto, para a realização do teste do Allium cepa, faz-se necessário que as amostras estejam em estado líquido, o

que nestas condições possui a presença de ácido acético, impossibilitando a continuidade do procedimento do teste, visto que, e as raízes dos bulbos das cebolas apresentaram-se sensíveis a este, morrendo após a exposição com soluções por efeito do ácido acético.

### 3.3 ARTÊMIA SALINA

No teste da Artêmia Salina, não foi possível realizar a contagem dos náuplios sobreviventes, pois, assim como no teste do *allium cepa*, o teste teve que ser realizado com a solução base antes do processo de polimerização, entretanto a presença do ácido acético na solução tornou o teste inviável, uma vez que os náuplios morreram ao entrarem em contato com o ácido acético presente na solução.

## 4 CONCLUSÃO

Foi possível obter membranas de quitosana com diferentes proporções de LCC, em que estas possuíam coloração característica do LCC. No que diz respeito a toxicidade, os testes realizados nesse trabalho tornaram-se inviáveis em detrimento da presença do ácido acético na composição das soluções em estado líquido, assim não foi possível determinar a toxicidade das membranas obtidas. Dessa forma, para que as membranas de quitosana com LCC sejam utilizadas como um cicatrizante de ferimentos, e determinar se de fato este líquido pode melhorar suas propriedades biológicas, faz-se necessário a realização de testes biológicos e diferentes testes toxicológicos em que seja possível a utilização da membrana já pronta, pois dessa forma será possível obter o real nível de toxicidade das membranas.

## AGRADECIMENTOS

Ao LaBioMat do IFPI Campus-Picos, ao Laboratório de Pesquisa I da UFPI Campus-Picos, ao CNPq.

## REFERÊNCIAS

Araujo, C. R. M. **Síntese de fenilcarbamatos e carbamatos derivados do líquido da castanha do caju (LCC) e posterior a avaliação de suas atividades anticolininérgica e moluscicida.** Tese de doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biologia da Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2010.

Bastos, J. S. B. **Preparo e caracterização de membranas de quitosana com cardanol.** Dissertação mestrado (Engenharia de Materiais- PPGEM), Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologias do Piauí. Teresina 2016.

Macêdo, M. O. C. et al. Avaliação da modificação de membranas de quitosana tratadas por plasma de hidrogênio para aplicações biomédicas. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, 2010.

Macêdo, M. O. C. et al. Caracterização de membranas de quitosana tratadas por plasma de diferentes gases. **CBECiMat**, 2014.

Mazzetto, S. E et al. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Quím. Nova** vol.32 - São Paulo, 2009.

Osmari, M. P. et al. Líquido da casca da castanha de caju: características e aplicabilidades na produção animal. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, ISSN: 1982-1263, PubVet Maringá, v. 9, n. 3, p. 143- 149,2015.

Sousa, F. M. S et al. Caracterização de membranas de quitosana com extrato foliar aquoso de *Combretum duarteanum* cambes. **22º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, novembro de 2016, Natal, RN, Brasil.

Sousa, M. V. S. et al. Estudo da incorporação de LCC à Membrana de Quitosana. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 2, n. 4, p. 2762-2777, ISSN 2595-6825, jul./aug. 2019.

Rolim, A. E. H. et al. Arcabouços de quitosana - Propriedades físico-químicas e biológicas para o reparo ósseo. **Rev. Virtual Quím**, pp 211-228, 2018.