



AVALIAÇÃO DO RISCO DO BETA-CARIOFILENO PARA A BIOTA AQUÁTICA

Mariana de Oliveira **Nascimento**¹; Mara Denise Luck **Mendes**²; José Henrique **Vallim**³; Sonia Claudia do Nascimento de **Queiroz**⁴; André **May**⁴; Claudio Martín **Jonsson**⁵

Nº 24411

RESUMO – O controle químico é a principal estratégia adotada para o controle de pragas e doenças agrícolas. No entanto, o uso indiscriminado de pesticidas pode levar a resistência de pragas a estes compostos, prejuízos ao ambiente e impactos à saúde humana. Os bioinsumos de origem vegetal constituem uma alternativa ambientalmente favorável ao controle de pragas e doenças agrícolas. Entretanto, dependendo da (concentração), podem representar um risco aos seres que habitam os compartimentos aquáticos. O beta-cariofileno, um sesquiterpeno bicíclico, é um dos compostos produzidos pelas plantas como parte de seu mecanismo de defesa, ao qual é atribuído propriedades antimicrobianas e inseticidas. A fim de avaliar possíveis danos para a biota aquática, foram avaliados os efeitos adversos do beta-cariofileno para as espécies aquáticas Raphidocelis subcapitata (microalga), Lemna minor (macrófita), Daphnia magna (microcrustáceo), Artemia salina (microcrustáceo) e Panagrolaimus sp. (nematoide), através de uma relação concentração-resposta. Dentre os organismos-teste avaliados quanto aos efeitos adversos do beta-cariofileno, as microalgas foram os mais sensíveis, demonstrando que o composto apresenta um valor de concentração efetiva média (inibição de crescimento em 168 h, CE50-168h) equivalente a 0,97 (0,52 - 1,57) mg/L. A concentração hipotética de risco para somente 5% das espécies de uma comunidade (HC5) foi determinada com valor equivalente a 0,026 mg/L. Este dado auxilia no estabelecimento de uma concentração máxima permissível nos compartimentos aquáticos associada ao uso de beta-cariofileno.

Palavras-chaves: Ecotoxicologia, Bioinsumo, Toxicidade, Bioindicador, Organismos aquáticos, Biopesticida

1 Autor: Bolsista CNPq (PIBIC), Graduação em Zootecnia, UNESP; mo.nascimento@unesp.br

2 Colaborador: Técnico, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

3 Colaborador: Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

4 Colaborador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br



ABSTRACT – Chemical control is the main strategy adopted to control agricultural pests. However, the indiscriminate use of pesticides can lead to pest resistance to these compounds, harm to the environment and impacts on human health. Botanical biopesticides represent an environmentally favorable alternative to controlling agricultural pests. However, depending on the concentration, may represent a risk to the non-target organisms that inhabit the aquatic environment. Beta-caryophyllene, a bicyclic sesquiterpene, is one of the compounds produced by plants as part of their defense mechanism, which is attributed with antimicrobial and insecticidal properties. The adverse effects of beta-caryophyllene were evaluated on the aquatic species Raphidocelis subcapitata (microalgae), Lemna minor (macrophyte), Daphnia magna (microcrustacean), Artemia salina (microcrustacean) and Panagrolaimus sp. (nematode), through a concentration-response relationship. Among the test-organisms evaluated for the adverse effects of beta-caryophyllene, microalgae were the most sensitive, demonstrating the compound's median effective concentration value (growth inhibition in 168 h, EC50-168h) equivalent to 0.97 (0.52 - 1.57) mg/L. The hypothetical risk concentration for only 5% of the species in a community (HC5) was determined with a value equivalent to 0.026 mg/L. This data helps the establishment of a maximum permissible concentration in aquatic compartments associated with the use of beta-caryophyllene.

Keywords: Ecotoxicology, Bioinput, Toxicity, Bioindicator, Aquatic organisms, Biopesticide

1. INTRODUÇÃO

O controle químico é a principal estratégia adotada para o controle de pragas e doenças agrícolas. No entanto, o uso indiscriminado de pesticidas pode levar a resistência de pragas a estes compostos, prejuízos ao meio ambiente e impactos à saúde humana. Assim, a utilização de compostos naturais se mostra como uma alternativa ambientalmente favorável ao controle de pragas e doenças agrícolas devido a suas propriedades inseticidas e antimicrobianas (Tavares et al., 2021). Porém, a presença desses bioinsumos nos ecossistemas aquáticos pode, dependendo da concentração, representar um risco aos seres que habitam estes compartimentos ambientais, não existindo na prática, o que se possa chamar de risco zero (Miura et al., 2021).

Para o estabelecimento inicial de concentrações máximas permissíveis dos bioinsumos é recomendada a realização de ensaios de ecotoxicidade com organismos bioindicadores. Estes por sua vez, são considerados como organismos que respondem de um modo sensível a poluentes ambientais, alterando suas funções vitais, e com isso tornam-se ferramentas úteis na avaliação de risco de um bioinsumo em questão (Zagatto, 2008).

Terpenos ($C_{15}H_{24}$) representam a maior classe de compostos químicos presentes em óleos essenciais que podem ser usados como bioinsumos (Viegas Junior, 2003).

O beta-cariofileno (Figura 1), um sesquiterpeno bicíclico, é um dos compostos produzido pelas plantas como parte de seu mecanismo de defesa, ao qual é atribuído propriedades antimicrobianas e inseticidas (Dahham et al., 2015; Chohan et al., 2023). Entretanto, existe uma carência de dados na literatura a respeito do risco deste composto para a biota aquática quando de seu uso para o controle de pragas e doenças agrícolas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade do beta-cariofileno para espécies aquáticas de diferentes níveis tróficos e determinar uma concentração de baixo risco do composto para a biota aquática, ou seja, uma concentração que em teoria afeta somente uma baixa percentagem (5%) dos organismos de uma comunidade aquática.

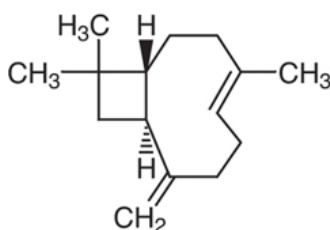


Figura 1. Estrutura química do beta-cariofileno

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material-teste

As soluções-teste contendo beta-cariofileno (0,0; 0,01; 0,10; 1,00, 10 e 100,00 mg/L) foram preparadas a partir de um produto comercial (Sigma-Aldrich, W225207-1KG-K), usando como coadjuvante de solubilização Tween 20 (BIOGRADE, AR5142-G1L).

2.2. Avaliação da toxicidade e da concentração de baixo risco

De acordo com as metodologias descritas por Castro et al. (2022; 2018), foram realizados estudos de dose-resposta com os organismos-teste *Raphidocelis subcapitata*, *Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Artemia salina* e *Panagrolaimus* sp.



Após o período de exposição foram determinados os valores de Concentração Efetiva que causa efeito inibitório da mobilidade em 50% da população de organismos (CE50) referente aos períodos de exposição por 48 h para *Daphnia magna* e *Artemia salina*, e por 96h para *Panagrolaimus* sp. Juntamente com os valores de CE50, foram determinados os intervalos de confiança com nível de certeza 95%. Para isto, utilizou-se o módulo de “Análise de Probit” do programa estatístico Statgraphics Centurion XVII, versão 1. 17. 04 (StatPoint Technologies).

Analogamente aos invertebrados acima citados, foram determinados os valores de CE50 (com intervalos de confiança 95%) referente a 168 h de exposição de modo a avaliar a fitotoxicidade para *Raphidocelis subcapitata* e *Lemna minor* através da medida da densidade celular e do número de frondes, respectivamente. Para isto, utilizou-se o modulo "Regressão Simples" contido no programa citado anteriormente.

A concentração hipotética de risco para somente 5% das espécies de uma comunidade (HC5) foi determinada com base numa distribuição log-logística dos valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1995; Wheeler et al., 2002). A HC5 foi calculada com base no intervalo de confiança (limite inferior) da regressão "Frequência acumulada vs Log CENO" a nível de 50% de certeza (Maltby et al., 2005; Cardwell et al., 2018) utilizando o programa Statgraphics Centurion XVII, versão 1. 17. 04 (StatPoint Technologies). Os valores de CENO foram determinados pela relação CE50/10 (Elmeggard; Akkerhuis, 2000) ou pelo limite superior do intervalo de confiança da CE10 (concentração efetiva em 10%) (Hoekstra; Van Ewijk, 1993).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O organismo-teste mais sensível aos efeitos do beta-cariofileno foi a microalga *Raphidocelis subcapitata* (Tabela 1 e Figura 2), sendo o composto classificado como "altamente tóxico", pois o valor de CE50-168h encontra-se na faixa 0,1–1,0 mg/L (Smith et al., 1988; USEPA, 2023). *Artemia salina* e *Panagrolaimus* sp demonstraram valores de CE50 >100 mg/L, o que classifica o composto como "praticamente não toxico". Em termos de crescimento demonstrado pela inibição de número de frondes, de peso úmido e do teor de clorofila total em *Lemna minor*, o beta-cariofileno foi classificado como "levemente tóxico", assim como para *Daphnia magna* em termos de mobilidade. Esta classificação se fundamentou em que os valores de CE50 estiveram na faixa >10 – 100 mg/L (USEPA, 2023).

Na ficha de avaliação de segurança do produto (Sigma Aldrich, 2024) descreve-se como “não perigoso para o ambiente aquático”, reportando valores de CE50-48h e CE50-72h de >0,17 mg/L e >0,033 mg/L para *Daphnia magna* e para *Raphidocelis subcapitata*, respectivamente. Observa-se

que estes dados não permitem elaborar uma conclusão a respeito do risco do composto. Entretanto, Api et al. (2020) descreveram valores de EC50 de 0,329 e 0,281 mg/L em *Daphnia magna* e algas, respectivamente, para o óxido de cariofileno. Este composto resultante do metabolismo da cariofileno é utilizado na fabricação de cosméticos (Fidyt et al., 2016). Os autores estimaram uma "Concentração Preditiva Sem Efeito" (CPSE) adverso para as comunidades aquáticas na faixa de 0,00089 – 0,0281 µg/L.

Portanto, o valor de CE50 referente à inibição de crescimento algáceo apresentado no presente trabalho foi muito próximo ao descrito por Api et al. (2020) para o óxido de cariofileno. Estes autores constataram semelhante grau de toxicidade para algas e para microcrustáceos, porém este fato não foi constatado em nossos resultados onde a *Daphnia magna* demonstrou ser bem menos sensível (Tabela 1). Uma possível explicação para isto seria uma menor metabolização do beta-cariofileno para óxido de cariofileno pelo microcrustáceo, comparativamente às microalgas.

Na Figura 3 é demonstrada a função log-logística da sensibilidade acumulada de acordo com os valores de CENO para diferentes organismos-teste. A variabilidade de sensibilidade para as diferentes espécies gerou diferentes valores de CENO que permitiram calcular um valor de HC5 equivalente a 0,026 mg/L. Fatores de segurança de 1 - 5 podem ser aplicados a este valor (ECHA, 2008) obtendo-se valores de CPSE na faixa de 0,026 a 0,0052 mg/L.

Tabela 1. Suscetibilidade dos organismos-teste ao beta-cariofileno demonstrada por valores de concentração efetiva média (CE50) referentes aos tempos de exposição.

Efeito avaliado			CE50 (mg/L)
<i>Raphidocelis subcapitata</i> (microalga)	inibição de crescimento celular	(168 h) / densidade	0,97 (0,52, - 1,57)
<i>Lemna minor</i> (macrófita)	inibição de crescimento	(168 h) / número de frondes	99,46 (59,26 - 189,54)
	inibição de crescimento	(168 h) / peso úmido	16,46 (14,03 - 19,98)
	inibição de crescimento	(168 h) / clorofila total	13,86 (12,24 - 15,90)
<i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo)	imobilidade (48 h)		49,07 (36,76 - 67,86)
<i>Artemia salina</i> (microcrustáceo)	imobilidade (48 h)		101,70 (n.d. - n.d.)
<i>Panagrolaimus sp</i> (nematóide)	imobilidade (96 h)		>100 (n.d. - n.d.)

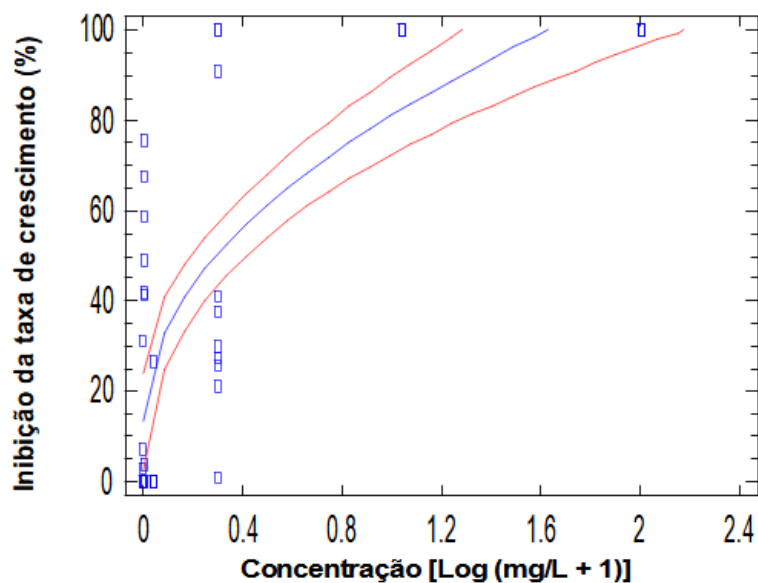


Figura 2. Efeito do beta-cariofileno na taxa de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações durante 168 horas. — intervalos de confiança 95% (inferior e superior); — curva de regressão.

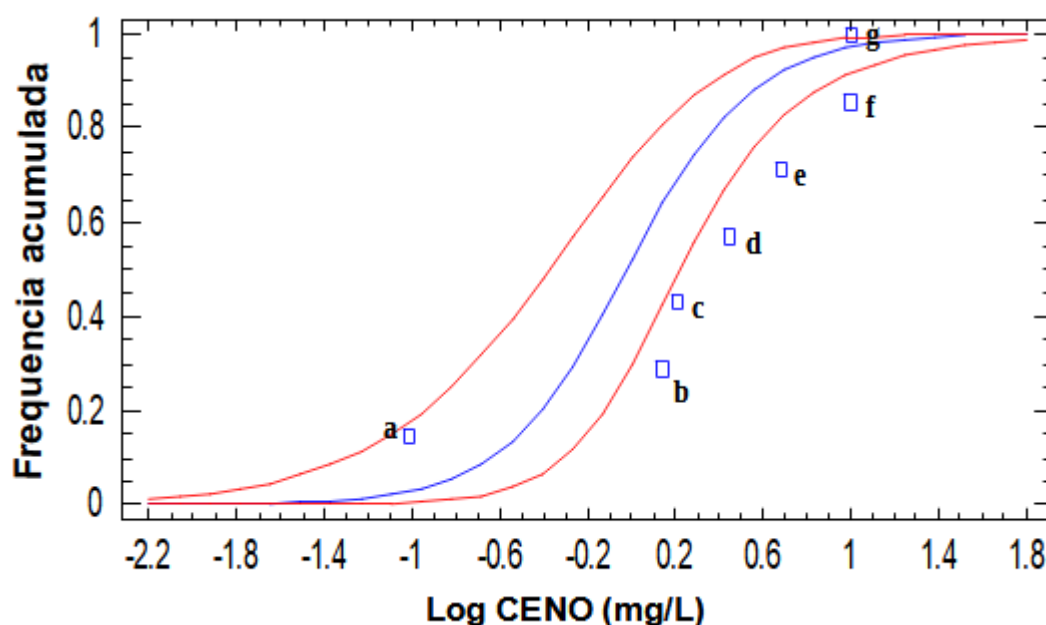


Figura 3. Curva de distribuição da sensibilidade de acordo com os valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) do beta-cariofileno para os organismos-teste: a- microalga *Raphidocelis subcapitata* (crescimento); b-macrófito *Lemna minor* (clorofila); c- macrófito *Lemna minor* (peso úmido); d- macrófito *Lemna minor* (número de frondes); e- microcrustáceo *Daphnia magna* (imobilidade); f- nematoide *Panagrolaimus sp* (imobilidade); g- microcrustáceo *Artemia salina* (imobilidade). — intervalos de confiança 50 % (inferior e superior); — curva de regressão. HC5 = 0,026 mg/L



4. CONCLUSÃO

Dentre os organismos-teste avaliados quanto aos efeitos adversos do beta-cariofileno, as microalgas foram os mais sensíveis. O grau de sensibilidade foi de ordem de grandeza semelhante ao metabolito óxido de cariofileno, conforme descrito pela literatura.

A determinação de um valor de parâmetro de risco (HC5) para o ambiente aquático realizado com organismos de diferentes níveis tróficos auxilia para o estabelecimento de uma concentração máxima permissível em corpos de água associada ao uso de beta-cariofileno.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica para a primeira autora, à Embrapa Meio Ambiente pela disponibilização de recursos e oportunidade de desenvolvimento da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- API, A. M. et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, caryophyllene oxide, CAS Registry Number 1139-30-6. **Food and Chemical Toxicology**, v. 138, suppl 1, 111102, 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2019.111102
- CARDWELL, A. S. et al. Chronic toxicity of aluminum, at a pH of 6, to freshwater organisms: empirical data for the development of international regulatory standards/criteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n.1, p. 36-48, 2018.
- CASTRO, V. L.; JONSSON, C. M.; SILVA, M. S. G. M. Estimates of AgNP toxicity thresholds in support of environmental safety policies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 24, n. 1, 9, p. 1-20, 2022.
- CASTRO, V. L. et al. Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.37, n. 7, p. 1998-2012, 2018.
- CHOHAN, T. A. ET AL. Insecticidal Potential of α -Pinene and β -Caryophyllene against *Myzus persicae* and Their Impacts on Gene Expression. **PHYTON - International Journal of Experimental Botany**, V. 92, N. 7, 1943-1954, 2023.
- DAHAM, S. S. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -Caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p.11808–11829, 2015.
- ECHA. **Guidance on information requirements and chemical safety assessment**. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration] response for environment, 2008. Disponível em: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r10_en.pdf/bb902be7-a503-4ab7-9036-d866b8ddce69. Acesso em: 31 maio 2024.
- ELMEGGARD, N.; AKKERHUIS, G. A.J. M. **Safety factors in pesticide risk assessment: differences in species sensitivity and acute-chronic relations**. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325, 2000 p.54.



FIDYT, K. et al. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide - natural compounds of anticancer and analgesics properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n.10, p. 3007-3017, 2016.

HOEKSTRA, J. A.; VAN EWIJK, P. H. The bounded effect concentration as an alternative to the NOEC. **Science of the Total Environment**, v.134, n. 1, p. 705- 711, 1993.

MALTBY, L.; BLAKE, N.; BROCK, T. C. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n.2, p. 379-388, 2005.

MIURA, P. T. et al. Ecological risk assessment of *Piper aduncum* essential oil in non-target organisms. **Acta Amazonica**, v. 51, p. 71-78, 2021.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document for aquatic effects assessment**. Paris: OECD, 1995. (Environment Monographs, 92). Disponível em: <https://web.archive.oecd.org/2012-06-15/153739-34290206.pdf>. Acesso em: 31 maio 2024.

SIGMA ALDRICH. Safety data sheet – β -caryophyllene. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/sds/ALDRICH/W225207?userType=undefined>. Acesso em: 31 maio 2024.

SMITH, S. B.; SAVINO, J. F.; BLOUIN, M. A. Acute toxicity to *Daphnia Pulex* of six classes of chemical compounds potentially hazardous to great lakes aquatic biota. **Journal of Great Lakes Research**, v. 14, n. 4, 394-404, 1988.

TAVARES, W. R.; BARRETO, M. C.; SECA, A. M. L. Aqueous and ethanolic plant extracts as bio-insecticides establishing a bridge between raw scientific data and practical reality. **Plants (Basel)**, v.10, n. 5, p. 920, 2021. doi: 10.3390/plants10050920.

USEPA. Technical overview of ecological risk assessment - analysis phase: ecological effects characterization. Washington: United States Environmental Protection Agency, 2023. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Acesso em: 02 julho 2024.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Química Nova**, v. 26. n.3, p. 390-400, 2003.

WHEELER, J. R. et al. Species sensitivity distributions: data and model choice. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 192-202, 2002.

ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. [S.l.]: Editora APGIQ, 2008. 472 p.