

Universidade Federal de São Carlos
Rielly de Cássia Magalhães

Morfologia do coração de girinos de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), expostas ao piretro, encapsulado ou não em nanopartículas

Sorocaba - SP

2021
Rielly de Cassia Magalhães

**Morfologia do coração de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802),
expostas ao piretro, encapsulado ou não em nanopartículas.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientação: Profª. Dra. Monica Jones Costa

Coorientação: Profª. Dra. Raquel Fernanda

Salla Jacob

Sorocaba

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rielly de Cassia Magalhães

Morfologia do coração de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802),
expostas ao piretro, encapsulado ou não em nanopartículas

Trabalho de conclusão de curso apresentado na
graduação em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de São Carlos
Sorocaba-Sp, 29 de Junho de [2021].

Orientador(a)

Profa. Dra. Monica Jones
Universidade Federal de São Carlos

Coorientador(a)

Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Examinador(a)

Prof. MSc. Samuel Espinosa Dal-Medico
E.E Senador Vergueiro

Examinador(a)

Profa. Dra. Cristiane Oliveira Ronchi
COC Sorocaba - Santa Rosália / Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita

Examinador(a) - suplente

Profa. Dra. Heidi Samantha Moraes Utsunomiya

Resumo

O aumento das atividades agropecuárias, industriais e da emissão de efluentes urbanos sem tratamento têm gerado preocupação quanto à saúde dos corpos de água doce e dos organismos que nesses habitam devido ao aumento da presença de xenobióticos no meio aquático. Atualmente, avanços tecnológicos têm permitido a tomada de medidas com o intuito de mitigar os impactos dessas substâncias sobre organismos não-alvos. Dentre elas, os sistemas carreadores, a exemplo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), que são capazes de encapsular ativos, como os biocidas, e liberá-los de forma modificada e controlada. No entanto, são necessários maiores estudos para avaliação do potencial de risco, ação e toxicidade dos nanopesticidas em organismos aquáticos e terrestres, pois estes podem ocasionar a diminuição do valor adaptativo dos organismos, entre outros efeitos danosos à sua sobrevivência. O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfofisiologia cardíaca (diâmetro dos miócitos) em resposta à exposição (48h) às NLS e ao biocida piretro, isolados e associados. A análise dos resultados demonstrou que o diâmetro dos miócitos cardíacos dos indivíduos expostos a todos os xenobióticos foi aumentado ($P < 0,05$) com relação ao controle, o que indica uma hipertrofia cardíaca nestes animais. A hipertrofia foi mais acentuada ($P < 0,05$) quando o piretro estava internalizado nas NLS. Tais respostas devem resultar em um aumento do débito cardíaco dos animais ocasionados por um aumento do volume sistólico, o que parece ser uma estratégia do animal para aumentar o fluxo sanguíneo e, portanto, maximizar a destoxificação dos compostos. Portanto, foi aqui demonstrado que tais compostos resultam em respostas adaptativas na espécie estudada mesmo a concentrações subletais e curto período de exposição, o que nos leva a sugerir fortemente que as concentrações dessas substâncias sejam revisadas e controladas a fim de minimizar o declínio nas populações de anfíbios.

Palavras-Chave: miócitos; biocidas; nanocarreadores; anfíbios anuros.

Abstract

The increase in agricultural and industry activities, as well as in the emission of urban effluents with no treatment have been an issue of particular concern regarding the health of freshwater bodies and their organisms due to the increase of xenobiotics in the aquatic environments. Currently, technological advances have allowed action to be taken to mitigate the impacts of these substances on non-target organisms. Among them, it is worthy to mention the nanocareer-systems (as the solid lipid nanoparticles – SLN), which encapsulate active components, such as pesticides, liberating them in a modified and more controlled manner. However, additional studies are still needed to evaluate the potential risk, mechanism of action and toxicity of nanopesticides on non-target organisms, considering that these pollutants can lead to a reduction of the adaptive value of organisms, among other negative impacts to their survival. The aim of this work was to evaluate the cardiac morphophysiology (myofibrils' diameter) in response to the exposure (48 h) to SLN and to the biocide pyrethrum, isolated and associated. The results demonstrated that the diameter of cardiac myofibrils increased ($P < 0.05$) in response to the exposure to all xenobiotics in relation to the control, indicating a cardiac hypertrophy. Indeed, the hypertrophy was more accentuated ($P < 0,05$) in the cardiac myocytes of the individual exposed to the pyrethrum associated to the SLN than was these compounds were tested isolated. This alteration may result in an increase in the cardiac output by increases in the systolic volume, representing a strategy to raise the blood flux to organs, maximizing the xenobiotics detoxification process. Therefore, we demonstrated that pyrethrum and solid lipidic nanoparticles, isolated and associated, result in adaptive responses in the species even at sublethal concentrations and under acute exposure. It can be strongly suggested that these substances should be controlled to minimize the decline in amphibians' populations.

Keywords: myofibrils; biocides; nanocareers; anuran amphibians.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1.Introdução | 7 |
| 2. Objetivo | 9 |
| 3. Materiais e Métodos | 10 |
| 3.1 Obtenção dos animais e manutenção em laboratório | 10 |
| 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS | 10 |
| 3.2.1 Determinação da CL50 | 10 |
| 3.2.2 Bioensaios com Piretro e NLS | 11 |
| 3.3. Determinação do diâmetro das miofibrilas. | 12 |
| 3.4. Procedimentos estatísticos | 13 |
| 4. Resultados e discussão | 13 |
| 6. Conclusões | 20 |
| Referências | 20 |

1. Introdução

Apesar da classe Amphibia apresentar ampla diversidade de espécies, com mais de 8.000 espécies descritas (AMPHIBIA WEB, 2019), nas últimas três décadas tem sido observado um drástico declínio de suas populações em todo o mundo (COLLINS, STORFER, 2003; RELYEA, 2003; BLAUSTEIN *et al.*, 2003). As causas para tal declínio abrangem inúmeros fatores, isolados ou associados, como perda ou fragmentação de habitats, mudanças climáticas, doenças infecciosas e poluição ambiental (BLAUSTEIN *et al.* 2003; COLLINS E STORFER, 2003 RELYEA. 2003; PARK e KIDD, 2005; COSTA *et al.*, 2012).

As atividades agropecuárias convencionais geram diversos impactos ambientais por meio do uso de agrotóxicos e fertilizantes, plantio de monoculturas, aumento da degradação do solo e erosão em terras cultiváveis. (DETHIER; EFFENBERGER, 2011; VELTEN *et al.*, 2015). Atividades agropecuárias, industriais e efluentes urbanos são responsáveis pela emissão de grandes quantidades de substâncias tóxicas em ambientes de água doce. (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Esses mesmos ambientes sujeitos ao despejo de poluentes são um dos principais habitats dos anfíbios anuros, onde a maioria das espécies se reproduz e sofre metamorfose (BRODEUR; CANDIOTI, 2017) (Figura 1).

Os anfíbios são organismos notadamente sensíveis a contaminantes ambientais devido às características de sua biologia, como a pele altamente permeável e vascularizada, importante para a respiração; metabolismo relativamente mais baixo em comparação aos das aves e dos mamíferos, possuindo, assim, menores taxas de depuração e destoxificação de xenobióticos, resultando em uma maior bioacumulação de compostos exógenos. Além disso, como a reprodução, parte o desenvolvimento embrionário e a metamorfose da maioria dos anfíbios ocorre no ambiente aquático, esses animais estão suscetíveis a contaminantes e patógenos em todas as duas fases de desenvolvimento (BRODEUR, CANDIOTI, 2017).

Figura 1: Imagem de um espécime de girino de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), popularmente conhecido como Rã-Touro. Barra: 1cm.

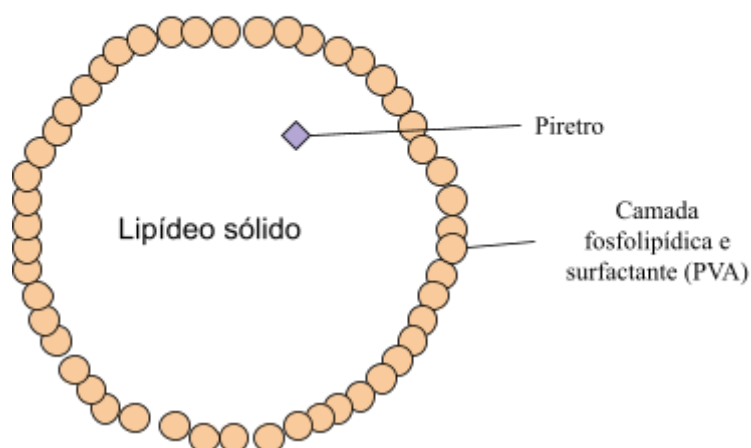


Fonte: Me Bruno Fernando Santos de Souza

Dentre os contaminantes que afetam os anuros, podemos citar os metais-traço, os surfactantes, os fármacos e, notadamente, os pesticidas. Estima-se que anualmente são despejados no ambiente cerca de $2,7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de pesticidas provenientes da produção agrícola, os quais acabam alcançando os corpos d'água por meio de processos físicos e químicos, como lixiviação e escoamento superficial (BOTELHO *et al.*, 2012). No entanto, avanços tecnológicos têm permitido que sejam tomadas medidas com o intuito de mitigar o impacto dessas substâncias sobre organismos não-alvos. Dentre elas, vale ressaltar os sistemas carreadores, que são capazes de encapsular ativos e liberá-los de forma modificada e controlada, a exemplo as nanopartículas lipídicas sólidas (NSL) (KUMAR, 2000; RIEHEMANN *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012). Não obstante, ainda são necessários maiores estudos com o objetivo de avaliar o potencial de risco, a ação e a toxicidade dos nanomateriais carreadores de pesticidas em organismos aquáticos e terrestres.

Figura 2: Representação das nanopartículas lipídicas sólidas associadas ao piretro.

Autoria: própria



Estudos têm demonstrado que, quando expostos a xenobióticos de forma isolada ou associadamente, podem ser observados em anfíbios efeitos cardíacos e fisiológicos (COSTA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2015), histológicos, celulares (OLIVEIRA *et al.*, 2016; PEREZ-IGLESIAS *et al.*, 2016 PEREZ-IGLESIAS *et al.*, 2019; RISSOLI *et al.*, 2016) e bioquímicos (RICHARDS E KENDALL, 2002; VAN METER *et al.*, 2019), inclusive quando expostos a pesticidas como o piretro.

Nanomateriais em espécies aquáticas podem gerar respostas citotóxicas e fisiológicas (MAGESKY E PELLETIER, 2018; MANSANO *et al.*, 2018), além de genotoxicidade e alterações hematológicas (SHALUEI *et al.*, 2013; VIGNARDI *et al.*, 2015).

Em rãs de espécie *Xenopus laevis* as nanopartículas de carbono ocasionam anormalidades nos movimentos de natação, assim como diminuição do crescimento dos girinos e alterações histológicas no rim (MOUCHET *et al.*, 2008). Em estudos utilizando nanopartículas de cobre de dióxido de titânio e óxido de zinco em girinos de *X. laevis* foram observadas malformações e lesões histopatológicas no intestino (BACCHETTA *et al.*, 2012). Outros estudos utilizando nanopartículas de óxido de zinco observaram alta incidência de

malformações, em particular intestino mal dobrado e edema abdominal em girinos de *X. laevis* (BONFANTI *et al.*, 2015).

No estudo “Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles” (OLIVEIRA, CR *et al.*, 2016) utilizando nanopartículas de quitosana-alginato foi observado o aumento no número de centros de melanomacrófagos em relação ao controle.

Outros xenobióticos de modo isolado e associado ocasionam danos aos organismos expostos. O estudo “Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS)” Jones Costa *et al.*, 2018 obteve como resultado o aumento da MRV (massa ventricular relativa) do grupo exposto ao Sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS), sendo essa decorrente da hipertrofia do músculo cardíaco.

Diante desse contexto, hipotetizamos para este trabalho que ocorrerá hipertrofia cardíaca nos animais expostos ao Piretro isolado, à Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) isoladas e ao Piretro associado à Nanopartícula Lipídica Sólida, uma vez que a exposição aos xenobióticos resultará em um aumento da performance cardíaca dos animais.

2. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a morfofisiologia cardíaca de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) expostos por 48h às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) isoladas, e ao biocida piretro tanto isolado quanto internalizado (PIR) nas NLS

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção dos animais e manutenção em laboratório

Os animais utilizados no presente estudo, girinos recém-eclodidos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), foram adquiridos em um ranário comercial na cidade de Santa Bárbara D'Oeste (-22.781257; - 47.4073489) e imediatamente transportados ao Laboratório de Fisiologia da Conservação da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba, onde os experimentos foram conduzidos pela MSc Thaís Deluno Garcia e pela Profa. Dra. Cristiane Ronchi de Oliveira.

Os animais foram mantidos em aclimatação até que atingissem o estágio 25 de Gosner (1960), correspondente ao estágio pré-metamórfico, fase em que se inicia a alimentação independente (~10 dias). Os girinos foram aclimatados em aquários com capacidade de 60 L com circulação contínua de água dechlorada, aeração constante, temperatura ambiente (21 ± 2 °C) e fotoperíodo natural (~12h claro:12h escuro). Os animais foram alimentados *ad libitum* com folhas de espinafre orgânico maceradas e cozidas, suspensas 48h antes do início dos ensaios ecotoxicológicos.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

3.2.1 Determinação da CL₅₀

Os piretróides são compostos que podem variar amplamente em suas concentrações subletais de acordo com a classe e a espécie utilizada. Dessa forma, fez-se necessário determinar previamente a concentração a ser utilizada nos ensaios a partir da determinação da CL₅₀ (concentração letal que leva a mortalidade de 50% da população) para o composto natural piretro. Tal determinação foi realizada previamente pela Profa. Dra. Cristiane Ronchi de Oliveira e pela MSc Thaís Deluno Garcia, assumindo como referencial a concentração de 100 µg.L⁻¹, a qual foi utilizada por França e colaboradores (2015) para a determinação da CL₅₀ do piretróide permetrina para a mesma espécie modelo. Com base nessa concentração

modelo selecionou-se as concentrações de 130 µg.L⁻¹ , 170 µg.L⁻¹ , 190 µg.L⁻¹ , 220 µg.L⁻¹ , 400 µg.L⁻¹ e 580 µg.L⁻¹.

A exposição dos animais (n=64) ocorreu de maneira individual, utilizando garrafas plásticas anteriormente utilizadas para consumo humano, essas foram higienizadas seguindo a metodologia de Nunes *et al.*, (2008). Os grupos de indivíduos expostos (n=24) seguiram a densidade de 1 girino por L de água, ou seja, cada recipiente de água declorinada recebeu 1 indivíduo e cada grupo possuía 24 indivíduos. Os ensaios foram realizados durante o período de 48h em triplicata e durante todo esse período de exposição a mortalidade dos indivíduos e o comportamento foram analisados diariamente.

A partir da análise dos dados observados com os valores transformados em logaritmo, durante a exposição por 48h em sistema estático e com alimentação suspensa dois dias antes do ensaio, determinou-se que a CL₅₀ para os girinos *L. catesbeianus* expostos ao biocida foi de 400 µg.L⁻¹, sendo esta concentração quatro vezes maior do que a concentração relatada para a mesma espécie por França *et al.* (2015).

3.2.2 Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas

O preparo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) ocorreu no laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Unesp de Sorocaba em parceria da MSc. Thaís Deluno Garcia com a Dr Cristiane Ronchi de Oliveira. Para o processo foi utilizado o método de emulsificação / evaporação do solvente estabelecido por Vitorino *et al.* (2011).

Na fase lipídica inicial foram utilizados 250 mg de tripalmitato de glicerol e 0,5 mL de piretro dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. Posteriormente, essa fase foi inserida em solução aquosa previamente separada de 30 mL, contendo, 1,25% (375 mg) de PVA (surfactante - álcool polivinílico), e a mistura levada ao sonicador (DES500) por 4 min com potência de 40 W.

Finalizou-se o procedimento com a solução levada ao Ultra-Turrax por um período de 7 min a 14.000 rpm. O clorofórmio foi removido utilizando o evaporador rotativo e a emulsão foi concentrada até atingir o volume de 10 mL (VITORINO *et al.*, 2011).

3.2.3 Bioensaios com Piretro e NLS

Os bioensaios e a análise dos biomarcadores foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC) do Departamento de Biologia da UFSCar pela MSc. Thaís Deluno Garcia, enquanto a confecção das lâminas das miofibrilas foram feitas no Laboratório de Anatomia da Unesp de São José do Rio Preto em parceria com a Dra. Lilian Franco-Belussi e com o Prof. Dr. Classius de Oliveira.

O Projeto da MSc. Thaís Deluno Garcia foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (protocolo CEUA #1472160516). Em decorrência da origem exótica da espécie, não houve necessidade de autorização do SiSBio para coleta dos animais utilizados no presente estudo.

Durante a realização dos ensaios toxicológicos, os animais (n = 96) foram divididos em quatro grupos experimentais:

- 1) **Grupo controle** (CT=24);
- 2) grupo exposto ao **biocida piretro isolado** (PIR=24; 400 µg.L⁻¹);
- 3) grupo exposto às **nanopartículas isoladas** (NLS=24; [?]);
- 4) grupo expostos a **nanopartículas associadas ao biocida piretro** (PIR+NLS=24; [?]).

Após a exposição, os girinos foram pesados e tiveram seu comprimento determinado, sendo posteriormente eutanasiados, seguindo as normas da AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition, que consistiu na realização de uma fratura crânio-cervical.

3.2.4 Determinação do diâmetro das miofibrilas.

Para realização da coleta e fixação dos órgãos foram utilizados seis indivíduos ($n = 6$) por grupo, tais indivíduos tiveram o coração removidos e colocados em fixador Karnovsky (tampão de fosfato $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ em pH 7,2, tampão de fosfato de Sorensen $0,1 \text{ M}$, glutaraldeído em 2,5% e paraformaldeído em 5%) durante o período de 24 h a 4°C .

Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão para então serem desidratadas em concentrações crescentes de soluções alcoólicas (50%, 70%, 85%, 90%, 95%, 100%), mantidas durante 1h em cada uma dessas concentrações. Essas amostras ficaram em álcool 100% overnight, para então serem embebidas (24h) e incluídas em historesina. Após a inclusão das amostras utilizando um micrótomo RM 2265 (Leica, Suíça), foram obtidas secções histológicas de $2 \mu\text{m}$ das amostras.

Após esse processo as lâminas foram posicionadas no fotomicroscópio com aumento de 40x, buscando a distribuição dos miócitos mais diversas possível. Os arquivos foram analisados por meio da ferramenta de software Image - Pro Plus 6.0.

Para a análise do diâmetro das miofibrilas, foram realizadas dez medidas convertidas posteriormente em valores logarítmicos, em 20 fotos de cada indivíduo, totalizando assim 600 fotos e 6.000 análises. Para a medição foram escolhidos diferentes locais em que as fibras estivessem preferencialmente horizontalmente dispostas e delimitando o diâmetro com o auxílio de uma reta disponibilizada no programa Image Pro Plus sendo, por fim, determinada a média geral.

3.2.5 Procedimentos estatísticos

Para realização das análises estatísticas utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.

As médias foram obtidas através de dez medidas de miócitos em 20 fotos para cada indivíduo, (totalizando em 600 fotos e 6.000 dados), os quais foram submetidos ao teste de

Kolmogorov com o objetivo de testar a normalidade dos dados.

Posteriormente, considerando que os dados não apresentam distribuição normal adotamos o teste estatístico não-paramétrico de comparação denominado Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns, com o objetivo de que todos os grupos fossem comparados com o controle e entre si.

4. Resultados e discussão

A análise dos resultados demonstra um aumento no diâmetros dos cardiomiócitos de todos os grupos experimentais expostos aos xenobióticos em comparação com o grupo controle; tanto os indivíduos expostos às NLS e ao piretro isolados quanto os indivíduos expostos ao PIR+NLS apresentaram valores de diâmetro dos cardiomiócitos significativamente maiores ($P < 0,05$) em relação aos indivíduos do grupo controle.

O teste de comparação de Dunns demonstrou que o efeito hipertrófico ocorreu de modo mais acentuado ($P < 0,05$) no grupo NLS + Piretro do que nos grupos NLS isolado e PIR isolado. O grupo NLS + PIR não apresentou diferenças significativas ($P < 0.05$) em relação ao grupo NLS. No entanto, o grupo NLS + PIR apresentou diferenças significativas ($P < 0.05$) quanto ao grupo de Piretro isolado. A representação gráfica de tais resultados pode ser observada na Figura 2. Na figura 3 é apresentada uma prancha histológica dos resultados obtidos.

Figura 3: Diâmetro das miofibrilas (μm) dos grupos Controle, NLS, Pireto e NLS+Pireto. indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo CT e denota diferença significativa entre os grupos pireto e NLS + Pireto.. Valores médios \pm DP.

Fonte: Autoria própria

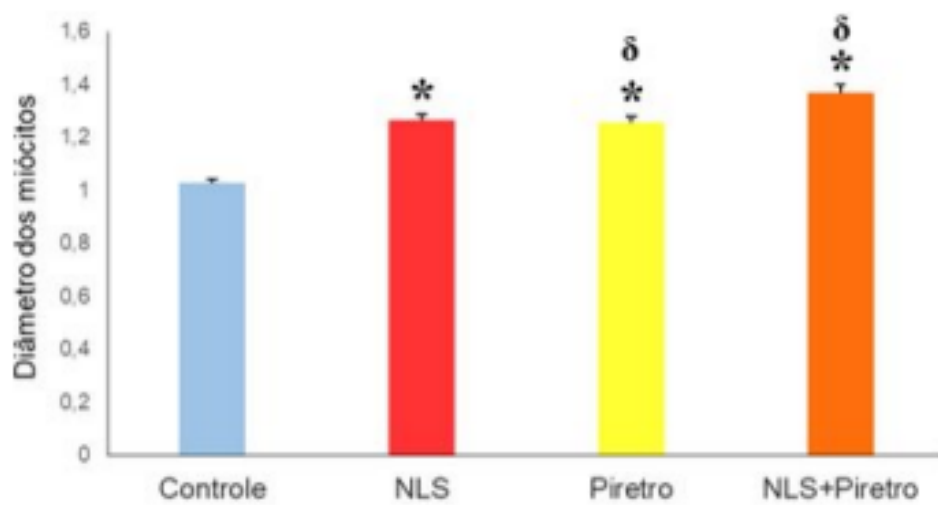
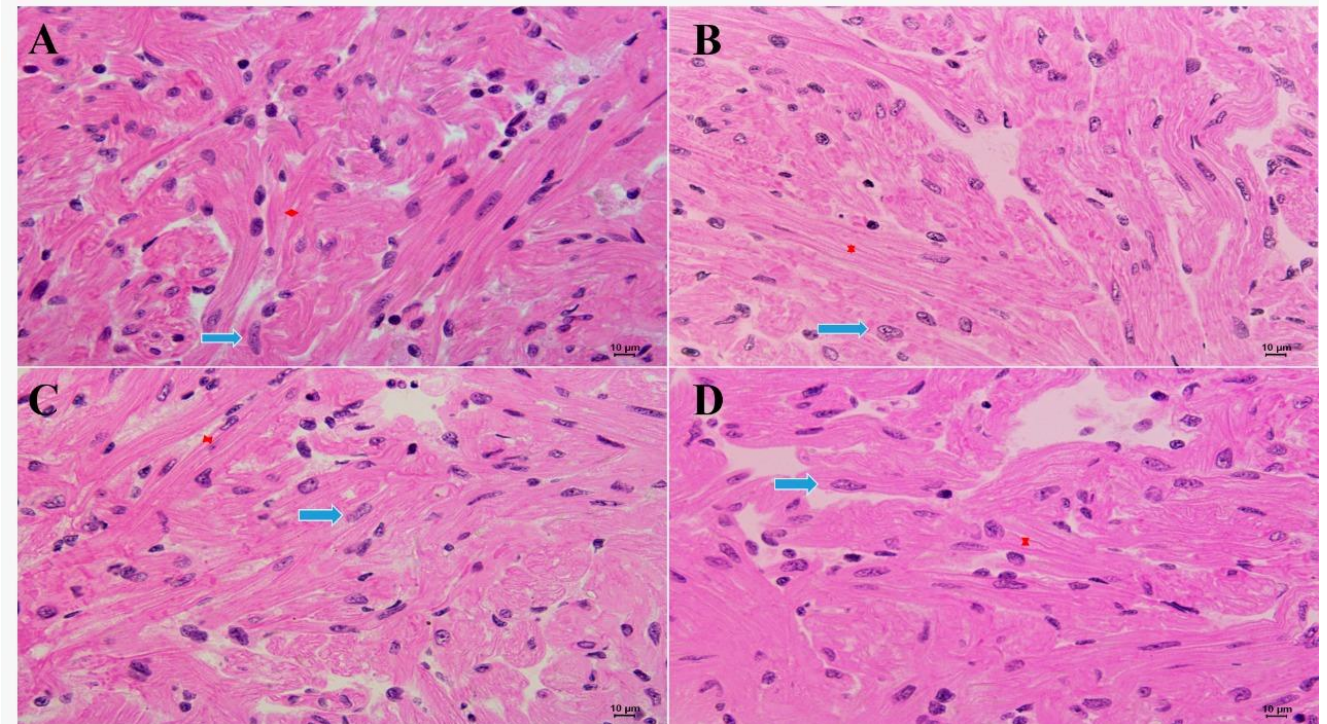


Figura 4: Micrografias das miócitos de *L. catesbeianus* sendo os grupos Controle na primeira coluna (A), NLS na segunda coluna (B), Piretro na terceira coluna (C) e NLS+Piretro na quarta coluna (D). Podem ser observadas as alterações para as miócitos em vermelho e em azul a seta marca as alterações nucleares.



Os ajustes fisiológicos que ocorrem nos animais expostos a xenobióticos, como os observados no presente estudo, podem ocasionar a diminuição do valor adaptativo das populações em decorrência do acúmulo de alterações morfológicas. Estudos como “Metamorphic acceleration following the exposure to lithium and selenium on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*)” VIDAL *et al.*, 2021 corrobora esse fato, pois os resultados demonstram que níveis considerados seguros, pelos órgãos reguladores brasileiros, de lítio e selênio foram responsáveis pelo desencadeamento de respostas fisiológicas em girinos de rã-touro americana.

No estudo, discute-se que as alterações observadas são compatíveis com a de animais que passaram pelo encurtamento de período metamórfico. O encurtamento da metamorfose devido a exposição desses animais pode resultar em animais menores na fase adulta e com capacidade reduzida de sobrevivência (BURRACO *et al.*, 2017), bem como de reprodução; caça e fuga de predadores (Hayes, 1995; Loman, 1999; Márquez-García *et al.*, 2009). De forma que quando considerados em uma perspectiva de longo prazo, podem comprometer a sobrevivência da espécie, resultando em declínios no nível populacional.

Para a compreensão do impacto de tais alterações são necessárias avaliações quantitativas desses parâmetros biológicos que podem estar alterados em decorrência da

exposição do organismo a substâncias genotóxicas. Nesse sentido, a avaliação do diâmetro das miócitos é uma excelente técnica para analisar alterações no tecido cardíaco de organismos que foram expostos a substâncias contaminantes (SALLA *et al.*, 2015), como NLS e o Piretro, encapsulado ou não em nanopartículas.

A partir da análise de miócitos ou fibras cardíacas, localizadas no interior dos cardiomiócitos, é possível avaliar eficientemente alterações como hipertrofia ou atrofia cardíaca em organismos expostos a variadas substâncias. (SALLA *et al.*, 2015).

Apesar da interação actomiosínica, ou seja, os mecanismos contráteis e sua regulação pelo cálcio serem muito similares nos diferentes grupos de vertebrados, a morfologia dos miócitos mostra-se bastante diferenciada em vertebrados basais com relação àquela observada para mamíferos (BERS *et al.*, 2001).

Em vertebrados basais, os cardiomiócitos apresentam tamanho relativamente menor, além de miócitos periféricamente arranjados (BOSSSEN, SOMMER, 1984; FARRELL, JONES, 1992; VORNANEN, 1997), com estriações transversais devido à alternância de faixas claras e escuras em decorrência da presença da actina e miosina (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). O músculo estriado é ativado por uma série de eventos que são coletivamente denominados acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C) (SPERELAKIS, 1998). Essa interação actomiosínica e sua regulação pelo Ca^{2+} são responsáveis pela contração cardíaca (DRIEDZIC, GESSER, 1994).

Estudos demonstram que a exposição a poluentes pode ocasionar aumento da performance cardíaca dos organismos. Dessa forma, a hipertrofia de miócitos cardíacos pode ser observada como um ajuste a estresses fisiológicos, mesmo quando em curtos períodos de exposição (CALORE *et al.*, 2007), mostrando-se um biomarcador bastante precoce e sensível a poluentes. A hipertrofia ventricular aqui observada para todos os animais expostos também foi anteriormente observada em estudos morfométricos, mostrando-se uma resposta adaptativa para retomar a homeostasia (CALORE *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o piretro, também conhecido como piretrina, composto extraído de sementes ou flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum cinereum*, pertencentes à família botânica Asteraceae, apresenta genotoxicidade em animais a ele expostos (DIONÍZIO MOREIRA *et al.*, 2017). Ao longo da história da humanidade, o uso do

piretro vem sendo descrito em diversos momentos, tendo sido mencionado desde a antiga China, passado para a Europa durante o decorrer das rotas da seda (SUN *et al.*, 2020). As propriedades inseticidas do piretro foram reconhecidas pelo mundo ocidental em meados do século 19, quando um americano chamado Junticoff descobriu que muitas tribos de Caucuses o usavam para controlar os piolhos do corpo.

Com o aumento do uso do piretro em diversas atividades humanas, como em pós-secos e sprays líquidos usados para tratamento no nível do solo em pequena escala ou aplicação aérea em grande escala, as piretrinas, compostos sintético do piretro, também passaram a ser formuladas em outros produtos, como loções e espirais contra mosquitos para proteção pessoal contra insetos (LYBRAND *et al.*, 2020).

Atualmente, estudos relatam ação do piretróide deltametrina sobre o tecido cardíaco de ratos, sendo posteriormente observado desorganização, desgaste e ruptura dos miócitos cardíacos (YALIN *et al.*, 2012). Em anfíbios da espécie *Rana cameroni* observou-se desorganização dos miócitos após inalação do piretróide cipermetrina (ÇOSKUN *et al.*, 2004). Foram observados aumento da duração do potencial de ação e alterações na dinâmica dos canais de sódio cardíacos em miócitos ventriculares de gatos (*Felis catus*) expostos à deltametrina o que, segundo os autores, pode resultar em arritmias cardíacas em decorrência do prolongamento do intervalo das ondas QT. (DE LA CERDA *et al.*, 2002)

Diversos fatores estressores podem levar a um aumento no diâmetro das miócitos aumentando, assim, a força contrátil cardíaca para ajudar nos processos de destoxificação por um aumento no débito cardíaco (ANDERSEN *et al.*, 2005; CALORE *et al.*, 2007; KOPF *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2009; DUCHMAN E WIENS, 2012). Vale ressaltar que resultados semelhantes aos observados no presente estudo foram observados por Salla *et al.* (2015) em girinos da mesma espécie aqui estudada (*Lithobates catesbeianus*) quando infectados pelo fungo quitrídio, *Batrachochytrium dendrobatidis*, resposta esta atribuída pelos autores como uma tentativa de combate a infecção.

Contudo, vale ressaltar que um aumento da função cardíaca dos animais leva a um aumento de consumo de energia para a mesma, desviando energia de outras funções, como crescimento, reprodução ou resposta de fuga (GARCIA *et al.*, 2018), podendo originar

organismos pós-metamórficos menores e mais facilmente predáveis.

Em associação às NLS, o composto piretro pode ter sua volatilidade e degradação diminuídas pela ação das NLS. É de conhecimento que o piretro, assim como seus compostos sintéticos piretróides, apresentam efeitos cardiotoxicos com ação principalmente nos canais de sódio, que, assim como os de cálcio, estão presentes no tecido cardíaco, além de prolongar o potencial de ação, causando hiperexcitabilidade do sistema cardíaco (SANTOS *et al.*, 2007).

Outro efeito relatado em estudos foi o estresse oxidativo (SILVA *et al.* 2012) em duas linhagens de fibroblastos expostos a NLS e a piretróides (ANSARI *et al.*, 2008), que estudaram eritrócitos de espécies de peixe *Channa punctatus* expostos à deltametrina, observando uma correlação positiva entre estresse oxidativo e genotoxicidade.

Apesar de ser em geral aceito que os piretróides apresentam baixa capacidade de bioacumulação, além de apresentarem baixo potencial tóxico (SANTOS, 2008), há alguns estudos, como o de Ansari *et al.* (2011), que comprovaram a genotoxicidade dos piretróides pelo aumento da ocorrência de micronúcleo para o peixe *Channa punctatus*. Tal fato é corroborado Campana *et al.* (1998) com o estudo para o peixe *Cheirodon interruptus interruptus* exposto à cipermetrina e por Muranli & Güner (2011) para o peixe *Gambusia affinis* exposto à λcialotrina.

A observação de que quando as NLS foram associadas ao piretro (NLS + Piretro), o diâmetro dos miócitos foi maior que nos dois compostos isolados, possivelmente pelo sinergismo existente entre os compostos quando associados, sendo essa observação importante, pois no grupo NLS+Piretro a hipertrofia observada no nível subcelular (miócitos) deve aumentar mais a força de contração cardíaca (volume sistólico) neste grupo e, portanto, resultar em um maior aumento do débito cardíaco dos girinos que nos animais expostos às nanopartículas ou ao piretro isolados. Já foi descrito por Deluno (2018), utilizando outros biomarcadores, que a exposição de girinos *L. catesbeianus* às partículas de NLS associadas ao Piretro não possui potencial benéfico aos indivíduos. Outra hipótese que devemos levar em consideração é que quando o NLS encontra-se associado ao piretro o surfactante PVA (álcool polivinílico), tensoativo que encontra-se presente nas nanopartículas, pode sofrer alterações com potencial toxicológico aos animais expostos, assim como devemos considerar o potencial

genotóxico dos outros componentes utilizados na emulsificação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) .

Corroborando com essa hipótese, estudos como “Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS)” (MONICA *et al.*, 2018) mostra os efeitos cardíacos do surfactante LAS nos girinos, sendo um desses efeitos a hipertrofia cardíaca corroborada pelo aumento dos miócitos cardíacos, assim como visto nos resultados do presente estudo.

Estudos anteriores mostram que a espécie *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) apresenta alterações no cronotropismo cardíaco em resposta a outros xenobióticos (DAL-MÉDICO *et al.*, 2014; JONES-COSTA *et al.*, 2018), mesmo após exposições rápidas (48h); no entanto, no estudo realizado por Deluno (2018), não foram observadas alterações na frequência cardíaca dos animais expostos a piretro e às nanopartículas lipídicas sólidas, tanto isoladas, quanto associadas. Assim, nosso estudo mostra que a espécie se utiliza de um aumento do diâmetro dos miócitos como resposta a esses xenobióticos, o que resulta em um aumento do débito cardíaco por meio de um aumento do volume sistólico e não por um aumento da frequência cardíaca. Dessa forma, a análise morfométrica das miofibrilas se mostrou precoce e sensível, indicando alterações sobre o tecido cardíaco que foi exposto às NLS, Piretro e NLS+Piretro (BARILLET *et al.*, 2010).

6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo após exposição dos girinos *L. catesbeianus* por 48h a uma concentração subletal do composto piretro e de nanopartículas, isolados ou associados:

1. Alterações no diâmetro das miofibrilas, principalmente quando expostos a NLS + PIR
2. Alterações no desempenho cardíaco de girinos.

Dessa forma, são necessários maiores estudos quanto à proteção que as nanopartículas lipídicas sólidas oferecem a degradação de poluentes. Sugerimos fortemente que as concentrações dessas substâncias sejam revisadas e controladas a fim de minimizar o declínio nas populações de anfíbios.

Referências

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**. 343:121-135. 1995.

AMPHIBIA WEB. Science Zone of The Dasa. Disponível em: < <https://amphibiaweb.org/> >
Acesso em: 25/06/2019.

ANSARI, R.A. et al. Genotoxic and Oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctate* Bloch. **Environmental Toxicology**. v.24, p. 429-436. 2008.

ANSARI, R.A. et al. In vivo cytogenetic and oxidative stress-Inducing effects of cypermethrin in freshwater fish. *Channa punctata* Blo ch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.74, p.150-156. 2011.

BARILLET, S.et al. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. **Aquatic Toxicology**. v. 100, p. 295–302. 2010.

BERS, D.M. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, 2ed. Dordrecht, **Kluwer Academic Publishers**, p.258. 2001.

BOSSSEN, E.H. & SOMMER, J.R. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. **Tissues Cell**, v. 16, n. 2, p. 173-178. 1984.

Botelho, R.G., et al., 2012. Herbicides and the aquatic environment. In: Naguib, M., Hasaneen, A.E. (Eds.), Herbicides: Properties, Synthesis and Control of Weeds. Croatia, vol. 9. Intech Open, pp. 149-164.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 20 out. 2018, 2005.

BRODEUR, J. C.; CANDIOTI, J. Vera. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: Potential biomonitor/bioindicator species for the Pampa region of Argentina. In: **Ecotoxicology and Genotoxicology**. 2017. p. 163-194.

Burraco *et al.*, 2017 Different effects of accelerated development and enhanced growth on oxidative stress and telomere shortening in amphibian larvae **Sci. Rep.**, 7 (2017), pp. 1-11, 10.1038/s41598-017-07201-z

CALORE, E.E., PEREZ, N.M., HERMAN, M.M. Morphometric studies of cardiac myocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v. 66, p. 447-450. 2007

CAMPANA, M.A et al. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in the erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Elsevier. Mutation Research**. p.155-161. 1998.

Collins, J.P., Storfer, A., 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Divers. Distrib.* 9, 89–98.

Costa TRN, Carnaval ACOQ, Toledo LF. 2012. Mudanças climáticas e seus impactos sobre os anfíbios brasileiros. *Braz Biol J* 8:33–37

COSTA, M.J *et al.* Oxidative stress biomarkers and changes in heart function of bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles exposed to the herbicide Roundup® (glyphosate). **Ecotoxicology** .v.17, p.153-163.2008.

COSTA, C. R.; OLIVI, P., BOTTA, C. M., ESPÍNDOLA, E. L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

Costa, M.J., et al., 2015. Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methylparathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Braz. J. Biol.* 72, 100-106.

Costa MJ, Monteiro DA, Rantin FT, Oliveira-Neto AL, Kalinin AL. 2008. Oxidative stress biomarkers and changes in heart function of bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles exposed to the herbicide Roundup1 (glyphosate). **Ecotoxicol** 17:153–163.

ÇOSKUN, B. et al. Evaluation of the toxic effects of cypermethrin inhalation on the frog heart. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.57. p. 220-225. 2004.

DAL-MEDICO, S.E et al. Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.104, p. 168-174. 2014.

DE LA CERDA, E., NAVARRO-POLANCO, R.A., SANCHES-CHAPULA, J.A. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroids insecticide deltamethrin. **Archives of Medical Research**. v.33. p.448-454. 2002.

DETHIER, J.J; EFFENBERGER, A. Agriculture and Development: A Brief Review of the Literature. *Econ. Syst. Res.*, v. 36, n. 2, p. 175-205, 2012. DOI: 10.1016/j.ecosys.2011.09.003

DRIEDZIC, W.R. & GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiological**. Review. v. 74, p. 221-258. 1994.

FARRELL, A.P. & JONES, D.R. The Heart. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & FARRELL, A.P. *Fish Physiology: The Cardiovascular System*. v. 12A. **New York: Academic Press Inc**. p. 1-88, 1992.

Fraker SL, Smith GR. 2004. Direct and interactive effects of ecologically relevant concentration of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. **Environ Toxicol** 19:250–256

FRANÇA, F.M. et al. Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. **Journal of Environmental Science and Health. Part B.** v. 50, n. 6, p.406-410. 2015.

FRANCO-BELUSSI L, et al. Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record.** v.292, p.178–182. 2009.

FREIRE, M.M. et al. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **O ecologia Brasiliensis.** v.12. n.3. p. 347-354. 2008

F. Mouchet, P. Landois, E. Sarremejean, G. Bernard, P. Puech, E. Pinelli, E. Flahaut, L. Gauthier. Caracterização e avaliação da ecotoxicidade in vivo de nanotubos de carbono de parede dupla em larvas do anfíbio *Xenopus laevis* . **Aquat. Toxicol.**, 87 (2) (2008), pp. 127-137

GARCIA, T. D. Análise de função cardíaca de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos à piretrina, associada ou não a nanopartículas. 2018. 97 f. Exame de Defesa de Mestrado (Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, 2018

JONES-COSTA, M. et al. Cardiac Biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effect of anionic surfactant linear alkybenzene sulfonate (LAS). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v.151. p.184-190. 2018.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular.* 7. ed. Rio de Janeiro: Editora ... Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008.

Kumar, M.N.V.R., 2000. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J. Pharm. Pharm. Sci.** 3 (2), 234-258.

Magesky, A., Pelletier, E., 2018. Cytotoxicity and physiological effects of silver nanoparticles

on marine invertebrates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1048, 285e309. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_17.

Mansano, A.S., et al., 2018. Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. *Environ. Pollut.* 243 (Pt A), 723e733. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.020>.

Oliveira, C.R., et al., 2016. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 149, 304e313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.076>.

Park BJ, Kidd KA. 2005. Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life states of mink frogs and green frogs in the wild and in situ. *Environ Toxicol Chem* 24(8):2027–2036

Perez-Iglesias, J.M., *et al.*, 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 1e10. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>.

Perez-Iglesias, et al., 2019. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: bufonidae)

P. Bonfanti, E. Moschini, M. Saibene, R. Bacchetta, L. Rettighieri, L. Calabri, A. Colombo, P. Mantecca. Do nanoparticle physico–chemical properties and developmental exposure window influence nano ZnO embryotoxicity in *Xenopus laevis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12 (8) (2015), pp. 8828-8848.

Neotropical tadpoles. *Environ. Pollut.* 244, 733e746. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>.

Relyea, R.A., 2003. Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecol. Appl.* 13 (6), 1515–1521.

Rissoli, R.Z., et al., 2016. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. **Chemosphere** 156, 37-44.

Richards, S.M., Kendall, R.J., 2002. Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. **Environ. Toxicol. Chem.** 21 (9), 1826e1835. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210910>.

Riehemann, K., et al., 2009. Nanomedicine-challenge and perspectives. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (5), 872e897. <https://doi.org/10.1002/anie.200802585>.

RONCHI DEOLIVEIRA, Cristiane *et al.* Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, [s. l.], v. 149, p. 304-313, 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0045653516300765?via%3Dihub#bib12>. Acesso em: 16 ago. 2021.

R. Bacchetta, N. Santo, U. Fascio, E. Moschini, S. Freddi, G. Chirico, M. Camatini, P. Mantecca. Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. **Nanotoxicology**, 6 (4) (2012), pp. 381-398.

SALLA, R.F., et al. Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere. Science Direct**. v.144, p.1862- 1868. 2015.

Silva, M.S., et al., 2012. Efeito da associação do herbicida clomazone a nanoesferas de alginato/quitosana na sorção em solos. *Quim. Nova* 35 (1), 102e107. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100019>

Shaluei, F., et al., 2013. Effect of subacute exposure to silver nanoparticle on some hematological and plasma biochemical indices in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*).

Hum. Exp. Toxicol. 32 (12), 1270e1277. <https://doi.org/10.1177/0960327113485258>.

SPERELAKIS, N. Cell Physiology. 1998. In: RODRIGUES, A.P.O. Estudo dos efeitos de osmólitos de ocorrência natural “Betáia e óxido de trimetilamina” na transmissão neuromuscular, na junção mioneural e no processo de acoplamento excitação-contração de músculo estriado esquelético de mamíferos. 2006. (Dissertação de Pós-graduação). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

SANTOS, L.R.S.; OLIVEIRA, C. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 24, n. 26, p.64-70. 2007.

SILVA, A.H et al. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles, **Science Total Environmental**. v. 432. p.382–388.2012.

Van Meter, R.J., et al., 2019. Agrochemical mixtures and amphibians: the combined effects of pesticides and fertilizer on stress, acetylcholinesterase activity and bioaccumulation in a terrestrial environment. **Environ. Toxicol. Chem.** 1-30. <https://doi.org/10.1002/etc.4375>.

VELTEN, S. et al. What Is Sustainable Agriculture? A Systematic Review. **Sustainability**, v. 7, p. 7833-7865, 2015. doi:10.3390/su7067833.

VIDAL, Felipe Augusto Pinto *et al.* Metamorphic acceleration following the exposure to lithium and selenium on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY**, [s. l.], v. 207, 1 jan. 2021. DOI 10.1016/j.ecoenv.2020.111101. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0147651320309404?via%3Dihub>. Acesso em: 11 ago. 2021.

Vignardi, C.P., et al., 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of C.R. Oliveira et al. / **Environmental Pollution** 253 (2019) 1009e1020 1019 titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). **Aquatic. Toxicol.**

158, 218e229. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.008>.

VORNANEN, M. Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **American Journal of Physiology**. v. 272, n. 41, p.1432-R1440. 1997.

Withers PC, Hillman SS. 2001. Allometric and ecological relationships of ventricle and liver mass in anuran amphibians. **Function Ecol** 15:60–69.