

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
Campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

THAIS DELUNO GARCIA

**ANÁLISE DA FUNÇÃO CARDÍACA DE GIRINOS DE RÃS-TOURO, *Lithobates*
catesbeianus, EXPOSTOS À PIRETRINA, ASSOCIADA OU NÃO A
NANOPARTÍCULAS**

Sorocaba
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
Campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

THAIS DELUNO GARCIA

ANÁLISE DA FUNÇÃO CARDÍACA DE GIRINOS DE RÃS-TOURO, *Lithobates catesbeianus*, EXPOSTOS À PIRETRINA, ASSOCIADA OU NÃO A NANOPARTÍCULAS

Defesa de Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia para a Sustentabilidade do *Campus* de Sorocaba, para obtenção do título de Mestre no PPGBMA (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental).

Orientação: Profa. Dra. Monica Jones Costa;

Coorientação: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto.

Sorocaba
2018

Deluno Garcia, Thais

Análise da função cardíaca de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus* expostos a piretrina, associada ou não a nanopartículas / Thais Deluno Garcia. -- 2018.

97 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Profa. Dra. Monica Jones Costa

Banca examinadora: Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta, Profa. Dra. Elaine C.M da Silva-Zacarin

Bibliografia

1. Ecotoxicologia aquática. 2. Biomarcadores. 3. Anfíbios. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

THAIS DELUNO GARCIA

ANÁLISE DA FUNÇÃO CARDÍACA DE GIRINOS DE RÃS-TOURO, *Lithobates catesbeianus*, EXPOSTOS À PIRETRINA, ASSOCIADA OU NÃO A NANOPARTÍCULAS

Defesa de Dissertação apresentada ao Centro de Ciências para a Sustentabilidade do *Campus* de Sorocaba, Universidade Federal de São Carlos, na qualificação para obtenção do título de Mestre no PPGBMA (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental);

Sorocaba, 09 de Março de 2018.

Orientadora

Profa. Dra. Monica Jones Costa
Universidade Federal de São Carlos *Campus* Sorocaba

Coorientador

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho *Campus* Sorocaba

Examinadora

Profa. Dra. Elaine C. Mathias da Silva Zacarin
Universidade Federal de São Carlos *Campus* Sorocaba

Examinadora

Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta
Faculdade de Tecnologia (FATEC) *Campus* Sorocaba

Sorocaba
2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a toda minha família, que sempre esteve ao meu lado em minhas decisões. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Amo vocês.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Profa. Dra. Monica Jones Costa por ter me dado essa oportunidade e confiado a mim para esse projeto. Obrigada pela orientação, dedicação, conhecimento a qual me passou durante esse tempo e por essa oportunidade maravilhosa.

Ao prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto pela coorientação e auxílio nesse projeto.

Agradeço aos meus pais, irmão e namorado por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

À Doutoranda Cristiane e Doutora Raquel por toda dedicação, paciência e experiência que me passaram nesse período, além do suporte nos momentos de necessidade.

À doutora Lilian por todo auxílio na análise dos dados e pela paciência, e por estar sempre disponível e disposta a me ajudar. Obrigada por todo o conhecimento adquirido.

Aos companheiros de mestrado Beatriz e Gregório por todo suporte sempre que precisei e a todos meus companheiros de laboratório, Andressa, Bruno, Felipe, que sempre de uma forma ou outra estiveram sempre apoiando uns aos outros em todos os momentos.

Agradeço à empresa Refriso pela doação de material utilizado nesse projeto.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental pela oportunidade e a todos os professores pelo conhecimento passado durante esse tempo.

À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio durante essa jornada.

Agradeço a todos vocês que tiveram participação direta ou indiretamente na minha formação. Sem vocês não teria chegado até aqui. Muito Obrigada.

RESUMO

GARCIA, T. D. Análise de função cardíaca de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, expostos á 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.

O crescente uso de agrotóxicos vem acarretando diversos distúrbios ambientais. Mais biodegradáveis e considerados menos tóxicos para organismos não-alvo estão os inseticidas botânicos, como o piretro (PIR). Sua liberação pode ainda ser modificada por meio de sistemas carreadores, as nanopartículas. A fim de avaliar se um possível impacto negativo ocasionado pelo PIR poderia ou não ser minimizado pelo uso de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), a toxicidade do PIR associado ou não às NLS para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) foi analisada por meio da determinação da frequência cardíaca *in situ* (f_H - bpm), do nível de atividade (NA - % do total de animais), da massa ventricular relativa (MVR - % da massa corpórea), do diâmetro das miofibrilas cardíacas (μm), além da genotoxicidade por meio do teste de micronúcleo e de outras anormalidades nucleares e da avaliação de alterações da pigmentação cutânea e interna do coração. Para tanto, a CL_{50} 48h para o PIR foi determinada e então utilizada uma concentração subletal correspondente a 1/5 da CL_{50} de $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$). As NLS isoladas tinham tamanho médio de 324 nm e de 258 nm quando associadas (NLS+PIR), com um índice de polidispersão de 0,19 e de 0,11 e potencial zeta de -11 mV e -10 mV (para as NLS e NLS+PIR, respectivamente). Não ocorreram alterações na f_H ou na MVR ($P > 0,05$), indicando que estes biomarcadores não são sensíveis à concentração subletal utilizada, tampouco ao curto período de exposição (48h). Contudo, o diâmetro das miofibrilas do grupo NLS foi menor ($P = 0,0104$) em relação ao grupo controle (CT), tendo também havido diferença entre PIR e NLS ($P = 0,0146$). Contudo, a despeito dessas alterações subcelulares nos cardiomiócitos (diâmetro das miofibrilas), elas não resultaram em atrofia cardíaca (redução da MVR). O NA do grupo PIR ($12,5 \pm 4,1\%$) foi inferior ($P = 0,0350$) àquele observado para o CT ($38,5 \pm 8,8\%$), o que corrobora os efeitos neurotóxicos do PIR reportados para outras espécies. A reversão da letargia quando o PIR foi associado às NLS indica um efeito protetivo das NLS para este biomarcador. Houve um aumento no número de eritrócitos micronucleados para os grupos NLS ($P = 0,0001$) e NLS+PIR ($P = 0,001$) em relação ao CT, havendo também diferença entre PIR e NLS ($P = 0,0332$) e um aumento da ocorrência de eritrócitos binucleados ($P = 0,0452$) para o grupo NLS em relação ao CT. As NLS quando isoladas apresentaram efeitos genotóxicos; porém, quando associadas ao PIR (NLS+PIR) os efeitos tóxicos foram menos drásticos. Todos os grupos aumentaram a pigmentação cutânea dos girinos em relação ao CT, que se mostrou um biomarcador de maior relevância ecológica, pois dispensa a eutanásia. Essa resposta parece exercer efeito protetivo sobre os órgãos internos, uma vez que a pigmentação do coração não aumentou nos grupos NLS ou NLS+PIR; inclusive reduzindo-se no grupo PIR em relação ao CT ($P = 0,0338$). Os resultados obtidos indicam que enquanto alguns biomarcadores são irresponsivos ao PIR ou às NLS, outros são impactados negativamente PIR isolado que, quando associado às NLS tem o efeito deletério diminuído ou revertido, o inverso também sendo verdadeiro., o que ressalta a necessidade de utilizar uma ampla gama de biomarcadores em diferentes níveis de organização (desde o subcelular até o indivíduo) para que se tenha uma visão mais acurada do efeito de xenobióticos sobre organismos não-alvo e do possível papel desempenhado por nanopartículas.

Palavras-chave: Biocida. Piretróides. Nanotecnologia. Anfíbios. Biomarcadores.

ABSTRACT

GARCIA, T. D. Analysis of cardiac function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, exposed to pyrethrin, associated or not with nanoparticles. 2018. 97 f. Exame de Defesa de Mestrado (Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, 2018.

The increasing use of agrochemicals has been causing several environmental disturbances. As a result, botanical insecticides, such as pyrethrum (PYR), have been created because they are considered biodegradable and less toxic to non-target organisms. Indeed, the modified release of these biocides through systems carriers, for example nanoparticles, is another theoretically less harmful. To test the hypothesis that PIR, when associated to solid lipid nanoparticles (SLN) becomes less toxic to bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*), the *in situ* heart rate (f_H - bpm), activity level (AL -% of total animals), relative ventricular mass (RMV -% body mass), diameter of cardiac myofibrils, in addition to the genotoxicity analysis by means of the micronucleus test and other cellular abnormalities and the evaluation of possible alterations of the cutaneous and internal pigmentation of the heart were analyzed in response to PIR and SLN isolated or in association. The determination of the LC50 48h for the pyrethrum was previously performed and, thereafter, a sublethal concentration corresponding to 1/5 of the LC50 of 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (80 $\mu\text{g.L}^{-1}$) was used. The SLN used in the present study had an average size of 324 nm when isolated and 258 nm when associated (NLS + PIR), with a polydispersity index of 0.19 for NLS and 0.11 for SLN + PIR and potential zeta of -11 mV for SLN and -10 mV for SLN + PIR. No changes in f_H and RVM ($P > 0.05$), indicating that these biomarkers are not sensitive enough to respond to the sublethal concentration used, in addition to the short exposure period (48h). However, the diameter of the myofibrils of the group SLN alone was lower ($P = 0.0104$) than that of the control (CT), there was also a difference between PIR and NLS ($P = 0.0146$). Thus, despite the subcellular changes in cardiomyocytes (decrease in myofibrils' diameter), they did not result in cardiac atrophy (MVR). The AL of PIR group ($12.5 \pm 4.1\%$) was lower ($P = 0.0350$) than that observed for CT ($38.5 \pm 8.8\%$). This lethargy corroborates the neurotoxicity of PIR already reported for other species and its reversal when the PIR was associated with the SLN indicates a protective effect of the SLN for this biomarker. An increase in the number of micronucleated erythrocytes for the SLN ($P = 0.0001$) and SLN + PIR ($P = 0.001$) compared to CT was observed, and there was also a difference between PIR and SLN ($P = 0.0332$). It was also observed an increase in the occurrence of binucleated erythrocytes ($P = 0.0452$) for SLN in relation to CT. Therefore, SLN when isolated showed genotoxic effects, but when associated to PIR (SLN + PIR) its toxic effects were less drastic. Exposure to all groups increased tadpoles' skin pigmentation, pointing this biomarker as the one of greater ecological relevance, since it is not necessary to euthanize organisms. This response seems to exert a protective effect on the internal organs, since the pigmentation of the heart did not increase in the SLN or in SLN + PIR in relation to CT. These results indicate that while some biomarkers are irresponsive to PIR or SLN, others are particularly negatively impacted by PIR isolated that, when associated with SLNs has its deleterious effects diminished or reversed, the inverse also being true. These results highlight the need to use a wide range of biomarkers at different levels of organization (from the subcellular to the individual) to have a more accurate view of the effect of xenobiotics on non-target organisms and the possible role played by nanoparticles.

Keywords: Biocides. Pyrethroid. Nanotechnology. Amphibians. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de contaminação dos ambientes aquáticos após aplicação de agroquímicos.	18
Figura 2: Estrutura química do composto natural piretro.....	19
Figura 3: Níveis de organização biológica e resposta aos efeitos de contaminantes	23
Figura 4: Esquema demonstrando a estrutura de uma nanopartícula lipídica sólida (NLS).	31
Figura 5: Morfologia externa do girino de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) demonstrando coloração típica do corpo do animal.....	34
Figura 6: Setor de desenvolvimento no ranário comercial.	35
Figura 7: Setor de eclosão no ranário comercial.	35
Figura 8: Sistema para determinação da CL ₅₀ , composto por garrafas plásticas com distribuição de ar para que os animais recebessem oxigênio.	37
Figura 9: Concentrações indicando que a CL ₅₀ determinada para o princípio ativo piretro foi a de 400 µg.L ⁻¹ indicada em Log pelo asterisco (*).	38
Figura 10: Nível de atividade dos girinos de <i>L. catesbeianus</i> . A) Estado ativo; B) Estado de flutuar passivamente e C) Estado estacionários dos indivíduos no fundo do aquário.....	39
Figura 11: Visão da cavidade celomática após incisão na região ventral dos indivíduos para exposição do coração e contagem visual dos batimentos cardíacos. Coração (CR), Pericárdio (PR) e presença de melanócitos cardíacos (seta preta).....	41
Figura 12: Dissecção do ventrículo dos animais após eutanásia para pesagem e determinação da MVR.	42
Figura 13: Área de referência dorso-caudal pré-determinada para análise da pigmentação cutânea. Em vermelho nota-se a região analisada nos girinos de <i>L. catesbeianus</i>	44
Figura 14: Valores da Massa Ventricular Relativa (MVR) dos grupos controle (CT; n = 10) e grupos expostos ao piretro (PIR; n = 10), às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; n = 10) e à associação entre o piretro e às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR; n= 10) por 48h. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores dos grupos expostos não foram diferentes (P > 0,05) em relação ao grupo controle (CT).	46
Figura 15: Valores da frequência cardíaca (f_H) dos girinos de rãs touro grupos controle (CT; n = 10) e grupos expostos ao piretro (PIR; n = 10), às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; n = 10) e à associação entre o piretro e às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR; n = 10) por 48h. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores dos grupos expostos não foram diferentes (P > 0,05) em relação ao grupo controle (CT).	48

Figura 16: Valores do nível de atividade dos grupos controle (CT; n = 10) e grupos expostos ao piretro (PIR; n = 10), às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; n = 10) e a associação entre o piretro e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR; n = 10) após 48h. Valores médios \pm 1 E.P.M. O asterisco (*) acima da barra de erro indica que o grupo piretro sofreu alteração significativa em relação ao grupo controle ($P = 0,0350$).	50
Figura 17: Micrografias do ventrículo de <i>L. catesbeianus</i> indicando as miofibrilas em corte longitudinal (fm), corte transversal (fm*), núcleo (N) e seta indicando as estrias. Marcações das miofibrilas em: A) do grupo controle (D5, D6, D7 e D10); B) do grupo piretro (D1, D2, D3 e D4); C) do grupo das nanopartículas (D1, D2, D3, D4 e D5) e D) do grupo das nanopartículas associadas ao Piretro (D1, D2, D3, D4, D5 e D6). Coloração: Hematoxilina-Eosina em aumento de 100X.	52
Figura 18: Boxplot da análise morfométrica do diâmetro das miofibrilas do tecido ventricular de <i>L. catesbeianus</i> indicando que ocorreu uma diminuição no diâmetro das miofibrilas nos grupos das nanopartículas (NLS) em relação ao controle (CT) ($P = 0,0104$) e ao (PIR) ($P = 0,0146$). O asterisco (*) indica o grupo das NLS que sofreu alteração em relação ao CT e o (+) indica a alteração das NLS em relação ao PIR.	53
Figura 19: Alterações nucleares observadas nos eritrócitos de girinos de <i>L. catesbeianus</i> . A) presença de micronúcleo; B) alteração nuclear <i>Bud</i> ; C) célula anucleada; D) célula binucleada. As alterações estão indicadas pela seta preta. Coloração Rosenfeld em aumento de 1000X.	56
Figura 20: Boxplot indicando aumento de micronúcleo em eritrócitos de girinos <i>L. catesbeianus</i> nos grupos expostos a nanopartículas isoladas (NLS) ($P = 0,0001$) e associadas ao piretro (NLS+PIR) ($P = 0,001$) em relação ao grupo controle (CT). Foi também observada diferença entre o grupo piretro (PIR) em relação ao grupo das nanopartículas isoladas (NLS) ($P = 0,0332$). O asterisco (*) indica os grupos das NLS, NLS+PIR que sofreram alterações em relação ao CT e o (+) indica a alteração entre PIR e NLS.	58
Figura 21: Boxplot indicando aumento de eritrócitos binucleados de girinos <i>L. catesbeianus</i> dos diferentes grupos experimentais indicando alteração no grupo das nanopartículas (NLS) em relação ao controle (CT) ($P = 0,0452$). O asterisco (*) indica uma diferença nas nanopartículas isoladas (NLS) em relação ao grupo controle (CT).	60
Figura 22: Boxplot indicando que não houve variação de eritrócitos anucleados de girinos <i>L. catesbeianus</i> nos grupos controle (CT) e expostos (PIR, NLS e NLS+PIR) ($P > 0,05$).	61

Figura 23: Boxplot indicando que não houve variação de eritrócitos com presença de <i>Bud</i> em girinos <i>L. catesbeianus</i> entre os grupos controle (CT) e expostos (PIR, NLS e NLS+PIR) ($P > 0,05$).....	61
Figura 24: Boxplot da somatória das alterações nucleares observadas para os eritrócitos de girinos <i>L. catesbeianus</i> expostos aos grupos PIR, NLS e NLS+PIR. O asterisco (*) indica que ocorreu aumento de todas as alterações nucleares em relação ao controle (CT) ($P < 0,001$)..	62
Figura 25: Pigmentação cutânea dos grupos expostos ao piretro (PIR), a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e a nanopartículas associadas ao piretro (NLS+PIR) em relação ao controle (CT). Os asteriscos acima das barras denotam diferença significativa ($P < 0,001$) dos tratamentos em relação ao controle. Todos os grupos expostos apresentaram maior pigmentação cutânea que o controle.....	63
Figura 26: Análise da pigmentação do coração de <i>L. catesbeianus</i> coradas com H.E, indicando na seta (preta) a presença de pigmento melanina. A) grupo controle (CT); B) grupo piretro (PIR); C) grupo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e D) grupo das nanopartículas associadas ao piretro (NLS+PIR). Coloração: hematoxilina – eosina em aumento de 100X.....	67
Figura 27: Proporção da pigmentação interna do coração nos diferentes grupos experimentais. O grupo PIR apresentou diminuição da pigmentação em relação ao grupo CT ($P = 0,0338$). O asterisco (*) denota uma diferença significativa do PIR com relação ao controle (CT).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de CL50 para diferentes piretróides em várias espécies de peixes e anfíbios.	28
Tabela 2: Caracterização da NLS e NLS+PIR e as respectivas médias dos parâmetros medidos em função do tempo (0 – 120 dias).....	33
Tabela 3: Parâmetros físicos e químicos da água declorinada que os girinos foram aclimatados e do ranário onde foram coletados.....	35
Tabela 4: Tabela 3: Parâmetros físicos e químicos da água (Médias \pm 1 E.P.M.) em 48h de girinos de <i>L. catesbeianus</i> para os grupos controle (CTR), piretro (PIR), nanopartícula lipídica sólida (NLS) e nanopartícula lipídica sólida associada ao piretro.....	36
Tabela 5: Concentrações utilizadas para a determinação da CL ₅₀ 48h, assim como a mortalidade e comportamento em 48h dos indivíduos expostos ao princípio ativo piretro.	38
Tabela 6: Massa e comprimento corpóreos (Médias \pm 1 E.P.M.) dos indivíduos de <i>L. catesbeianus</i> dos grupos controle (CT) e expostos ao piretro (PIR), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e piretro associado às nanopartículas (NLS+PIR).	40
Tabela 7: Resumo sistemático dos resultados observados para os diferentes biomarcadores para os grupos expostos, comparando-os com seus respectivos controles, MVR: massa ventricular relativa; f_H : frequência cardíaca; NA: nível de atividade; MF: miofibrila ventricular; PB: pigmentação cutânea; PH: pigmentação cardíaca.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acoplamento E-C: Acoplamento excitação-contração

AChE: Acetilcolinesterase

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

AN: Anucleada

BN: Binucleada

Ca²⁺: Cálcio

CT: Controle

EROs: Espécie reativa de Oxigênio

***f_H*:** Frequência cardíaca

MN: Micronúcleo

MVR: Massa ventricular relativa

NA: Nível de atividade

Na⁺: Sódio

NLS: Nanopartícula lipídica sólida

NLS+PIR: Nanopartícula lipídica sólida associada ao piretro

PIR: Piretro

RS: Retículo sarcoplasmático

SNC: Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos específicos.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 <i>Biomarcadores</i>	22
3.2 <i>Biocidas</i>	26
3.3 <i>Nanotecnologia na agricultura</i>	29
3.3.1 <i>Nanopartículas lipídicas sólidas</i>	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 <i>Preparo e caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas</i>	32
4.2 <i>Organismo teste</i>	33
4.3 <i>Bioensaios toxicológicos com girinos de rã-touro</i>	34
4.3.1 <i>Obtenção dos animais e manutenção em laboratório</i>	34
4.3.2 <i>Delineamento experimental para os ensaios ecotoxicológicos</i>	36
4.3.2.1 <i>Determinação da CL₅₀ 48h</i>	36
4.3.2.2 <i>Realização dos ensaios ecotoxicológicos a concentrações subletais (1/5 da CL₅₀)</i>	38
4.3.3 <i>Determinação da frequência cardíaca "in situ"</i>	40
4.3.4 <i>Determinação da Massa Ventricular Relativa (MVR)</i>	41
4.3.5 <i>Teste de micronúcleo (MN) e de outras alterações nucleares</i>	42
4.3.5.1 <i>Confecção das lâminas do Teste de Micronúcleo (MN)</i>	43
4.3.6 <i>Análise da pigmentação da pele (Body darkness)</i>	43
4.3.7 <i>Processamento de amostra para análise do diâmetro das miofibrilas e pigmentação do coração</i>	44
4.3.7.1 <i>Confecção e análise das lâminas histológicas para determinação do diâmetro das miofibrilas e da pigmentação do coração</i>	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 <i>Nível de atividade, Massa Ventricular Relativa e Frequência Cardíaca "in situ"</i>	46
5.2 <i>Diâmetro das miofibrilas</i>	50
5.3 <i>Genotoxicidade - teste de micronúcleo (MN) e outras alterações nucleares</i>	55
5.4 <i>Pigmentação cutânea (Body darkness)</i>	63
5.5 <i>Pigmentação Interna do Coração</i>	66
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO – A	97

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios têm seus representantes encontrados em praticamente todos os ambientes terrestres e de água doce, somente tendo como exceção às regiões mais quentes e frias, além das ilhas oceânicas mais distantes (FROST et al., 2007). A diversidade de anfíbios encontra-se atualmente em 7.809 espécies (AMPHIBIA WEB – <https://amphibiaweb.org/>, 20/02/2018), porém, vem ocorrendo um drástico declínio destes animais no mundo todo (FROST et al., 2007). Dentre as principais causas apontadas como causadoras desse declínio estão, isoladas ou em associação, a destruição de habitat, aumento da incidência da radiação UV-B, alterações climáticas, infecções parasitárias, introdução de espécies competidoras e o aumento do uso de pesticidas (BRIDGES, SEMLITSCH, 2000; BLAUSTEIN, KIESECKER, 2002; COLLINS, STORFER, 2003; BLAUSTEN, 2004; COLLINS, CRUMP, 2009; COLLINS, 2010, BLAUSTEN et al., 2011, VAN METER et al., 2014; SALLA et al., 2015), estando também os contaminantes aquáticos entre os causadores desse declínio (COLLINS, 2010; BLAUSTEN et al., 2011).

No que tange mais especificamente aos efeitos nocivos dos xenobióticos, os anfíbios são particularmente vulneráveis quando comparados aos demais vertebrados, por terem um ciclo de vida duplo (aquático/terrestre) na maioria das espécies, com a reprodução e metamorfose geralmente dependente do ambiente aquático, além de algumas características físicas, como a pele extremamente permeável para permitir a respiração cutânea (TOLEDO, 2009). Além disso, por serem ectotérmicos, seu metabolismo é proporcionalmente mais baixo que o das aves e mamíferos, tornando as taxas de depuração e eliminação de xenobióticos muito mais lenta, resultando em maior bioacumulação dos mesmos nos tecidos (GARDNER, OBERDÖSTER, 2005).

Sendo capazes de bioacumular no organismo, se biomagnificar ao longo da cadeia trófica e de se acumular no ambiente, os xenobióticos podem causar ainda efeitos tóxicos a curto e/ou em longo prazo nos organismos, além de degradação ambiental (PEREIRA, 2004), onde no ambiente aquático ocasionam a queda de qualidade de água e conseqüente redução da biodiversidade aquática em decorrência de alterações no ambiente físico-químico e nas comunidades biológicas (GOULART, CALLISTO, 2003).

Dentre os xenobióticos que têm sido apontados como causadores do declínio de anfíbios estão os agroquímicos (BRIDGES, SEMLITSCH, 2000) como os pesticidas, os quais

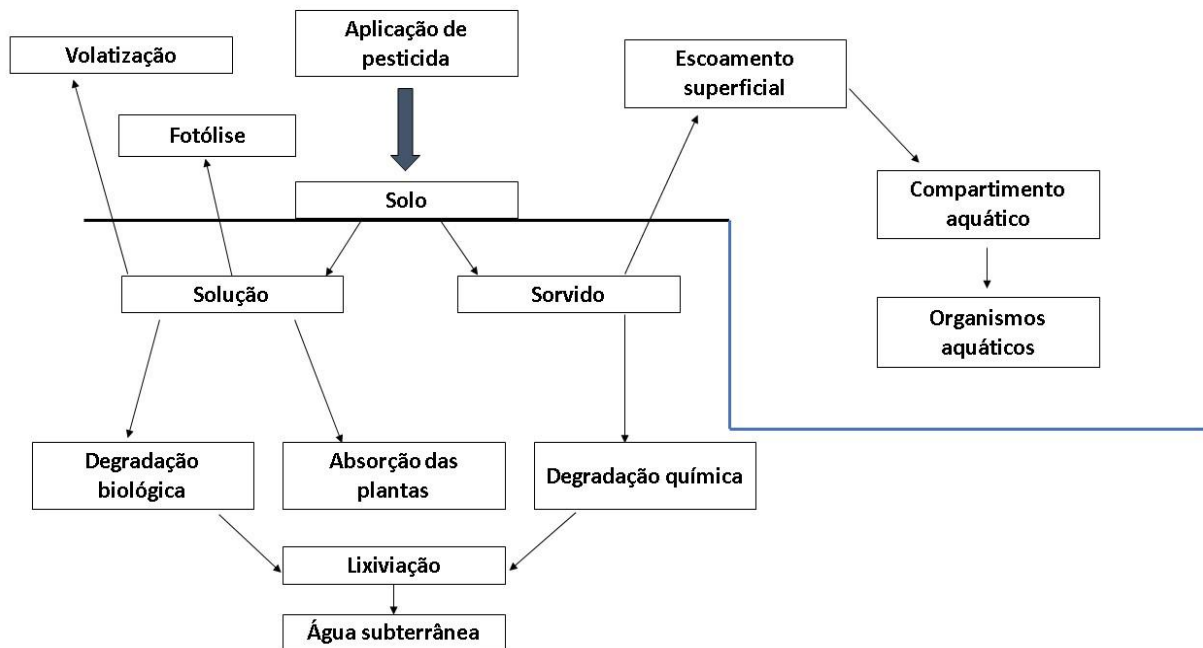
estão sendo correlacionados com a diminuição das espécies de anfíbios especialmente devido à proximidade das plantações agrícolas (DAVIDSON, SHAFER, JENNINGS, 2002).

Os pesticidas são substâncias ou misturas delas utilizadas deliberadamente pelo ser humano no ambiente com intuito de mitigar pragas (EATON, GILBERT, 2012), como insetos, plantas daninhas e fungos (LARINI, 1999), e foram empregados em escala mundial na década de 1920, onde começaram a ser utilizados na agricultura no Brasil de modo mais intensivo a partir da década de 1960, onde nessa época não se tinha conhecimento sobre os efeitos toxicológicos ocasionados por esses agroquímicos nos animais e para a população (OPAS, 1997).

Dentro da classe dos pesticidas, encontram-se ainda os inseticidas, que vêm sendo utilizados na agricultura para o combate de insetos, e são formulados a partir de compostos orgânicos sintéticos (KARERU, ROCH, MANA, 2013), estando entre os mais utilizados os organofosforados, carbamatos, organoclorados, neonicotenoídeos e os piretróides (OPAS, 1997; ITHO, 2002; TOMIZAWA, CASIDA, 2004; MENDES, 2005). Esses xenobióticos contribuem grandemente para o controle de pragas na produção agrícola, porém, devido ao seu uso indiscriminado, vêm sendo também letais para organismos não-alvos (AKTAR et al., 2009), tendo seus resíduos levados aos recursos hídricos (KOUL, WALIA, DHALIWAL, 2008), onde têm seu tempo de permanência dependente do modo de aplicação, mobilidade e persistência na água e no solo (QUEIROZ, MOURA E SILVA, TRIVINHO-STRIXINO, 2008).

Nesse contexto, vale ressaltar que a agricultura é responsável pelo maior consumo de água do mundo (QUEIROZ, MOURA E SILVA, TRIVINHO-STRIXINO, 2008) e, devido à ampla utilização de xenobióticos como pesticidas, estes poluentes podem contaminar os sistemas hídricos de maneira direta, que ocorre no momento da aplicação (BARBOSA, CARRER, RAMIRO, 2010; OLIVEIRA, MARTINEZ, 2011) ou ainda indireta, por meio do escoamento superficial, lixiviação do solo ou carreamento de resíduos pelas chuvas e ventos, contaminando as águas superficiais e/ou subterrâneas (Figura 1), podendo, inclusive, atingir locais anteriormente não impactados como as reservas naturais (BELLUTA, SILVA; 2008; QUEIROZ, MOURA, SILVA, TRIVINHO-STRIXINO, 2008; OLIVEIRA, MARTINEZ, 2011).

Figura 1: Esquema de contaminação dos ambientes aquáticos após aplicação de agroquímicos.



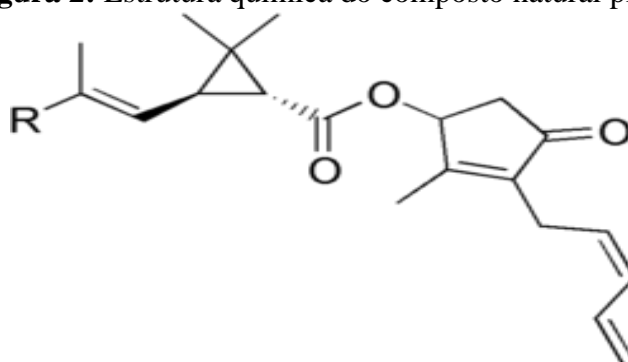
Fonte: Vieira et al., 2003. Adaptado pela autora.

Devido à contaminação dos recursos hídricos, os organismos aquáticos estão sempre em contato com substâncias tóxicas (QUEIROZ, MOURA E SILVA, TRIVINHO-STRIXINO, 2008), que podem estar presentes não somente na água como no sedimento e no alimento, entrando em contato com esses organismos principalmente por meio de exposição dérmica e tecidos respiratórios, além da exposição oral (COSTA et al., 2008). Essas substâncias podem interagir no ambiente, resultando em combinações que podem aumentar ou diminuir sua toxicidade sobre os organismos, podendo resultar em diferentes efeitos: a) aditivo, quando duas substâncias são administradas simultaneamente, representando a soma do efeito de cada substância isoladamente; b) sinérgico, quando o efeito combinado entre duas substâncias químicas tem seus efeitos maiores do que quando se encontram isoladas; e, c) antagonismo, quando a administração de duas substâncias simultaneamente interfere uma na outra devido a ligações químicas que inativam ou reduzem os efeitos de uma das substâncias (EATON, GILBERT, 2012). Esses contaminantes acabam ainda por alterar os parâmetros físicos e químicos da água, assim como a dinâmica natural das comunidades biológicas presentes nesses ecossistemas (GOULART, CALLISTO, 2003), além de provocarem múltiplos impactos em diferentes níveis de organização dos organismos não-alvos, desde o molecular e celular, até o

bioquímico, fisiológico, morfológico e, finalmente, no organismo como um todo (GRISOLIA, 2005).

Visando minimizar o impacto desses contaminantes no ambiente, atualmente vêm sendo utilizados inseticidas botânicos, que correspondem a substâncias naturais que tem seu extrato retirado de plantas, com objetivo de reduzir a toxicidade nos organismos não-alvos e também por serem mais espécie-específicos, de forma a atingir prioritariamente organismos-alvos, ou seja, as pragas agrícolas (ISMAN, 2008; SENTIL-NATHAN, 2013), devido a rápida biodegradação e menor permanência no ambiente. Com isso, os biocidas são considerados mais seguros que os compostos sintéticos (SENTIL-NATHAN, 2013). Dentre os biocidas existentes está o piretro (Figura 2) composto retirado da flor do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (COX, 2002) e que assim como outros biocidas tem ação sobre uma variedade de pragas, e não é considerado tóxico para alguns vertebrados que foram incluídos no teste de registro desses compostos (REGNAULT-ROGER, 2013). Entretanto, o piretro vem sendo utilizado para a produção de uma variedade de formulações, originando os compostos sintéticos denominados piretróides, os quais são utilizados também em áreas urbanas. Diante disso, surgiu a preocupação com o processo de escoamento superficial, o qual pode levar esses compostos até os ambientes aquáticos (USEPA, 2013), sendo, portanto, imprescindível analisar os efeitos desses compostos sobre os organismos aquáticos, como os anfíbios.

Figura 2: Estrutura química do composto natural piretro.



Fonte: Santos et al. (2007).

Outra ferramenta que mais recentemente vem sendo empregada com o intuito de minimizar o impacto negativo de xenobióticos é a nanotecnologia, área de estudo que busca desenvolver tecnologias que operam na menor escala possível, na ordem de nanômetros (RAJABI, 2015), tendo aplicações não apenas na área agrícola, mas também em diversos outros setores, como na área alimentar e farmacêutica (FEDERIC, SHAW, HANDY, 2007; WANG, DU, ZHENG, 2008). Por meio dela, têm sido criadas formulações com compostos

ativos de interesse agrícola (PERLATTI et al., 2013) com o intuito de aumentar a solubilidade dos compostos ativos, liberá-los de forma lenta e ainda protegê-los da degradação precoce (KAH, HOFMANN, 2013; MATTOS et al., 2017).

Desse modo, as nanopartículas são utilizadas como sistemas carreadores de substâncias, como os biocidas, sendo empregadas com intuito de diminuir o impacto dos compostos ativos no meio ambiente e diminuir as concentrações utilizadas nos campos agrícolas. Entretanto, pouco se sabe sobre os reais benefícios e riscos (MATTOS et al., 2017) que o uso da nanotecnologia traz para o ambiente e para os organismos não-alvos (KAH et al., 2013; KAH, HOFFMANN, 2013) podendo as nanopartículas ter sua difusão e transporte facilitado na atmosfera, água e solo, especialmente devido ao seu tamanho nanométrico, ou ainda entrarem e se acumularem nas células dos organismos. Ademais, escassas são as informações acerca toxicidade desses novos nanomateriais no ambiente e para a biota.

Assim sendo, o presente estudo propôs-se a avaliar o efeito do piretro e piretro associado a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) sobre biomarcadores comportamentais, morfofisiológicos e genotóxicos em girinos de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), com o intuito de testar a hipótese de que o piretro, quando utilizado isoladamente, terá efeitos deletérios e que quando associado a nanopartículas tais efeitos negativos serão minimizados ou desaparecerão.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar a toxicidade após 48h de exposição do biocida piretro (PIR) associado ou não a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), sobre girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), utilizando biomarcadores comportamentais, morfofisiológicos e de genotoxicidade, visando um melhor entendimento dos aspectos toxicológicos para o uso de nanopesticidas em agricultura, bem como, contribuir para estabelecimento de marcos regulatórios para o uso destes sistemas.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar a CL_{50} (48h) para girinos de rã-touro no estágio 25 de Gosner (1960);
- Avaliar a toxicidade do piretro (1/5 da CL_{50}) ou piretro associado ao sistema carreador (NLS) sobre os girinos da espécie por meio de diversos biomarcadores como nível de atividade, massa ventricular relativa, frequência cardíaca *in situ*, genotoxicidade por meio do teste de micronúcleo e outras anormalidades nucleares, bem como efetuar a análise morfométrica do tecido ventricular por meio da determinação do diâmetro das miofibrilas, além de analisar a pigmentação cutânea e interna do coração dos indivíduos.

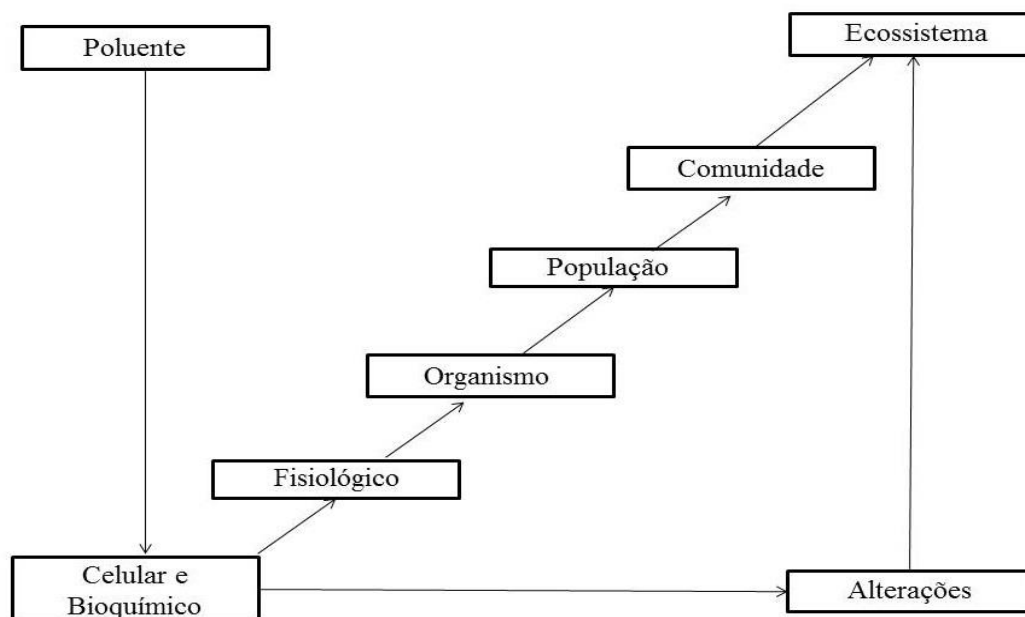
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Biomarcadores*

Os xenobióticos são capazes de alterar as atividades enzimáticas, assim como alterar a produção de substâncias endógenas pelo organismo que foi contaminado, além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, comprometendo a homeostasia e, assim, acarretando um quadro de estresse fisiológico (THOMAS, 1990; ARIAS, 2007). Diante disso, além das avaliações físicas e químicas dos recursos hídricos, atualmente vêm sendo realizados testes laboratoriais de toxicidade em animais modelo com intuito de avaliar os efeitos biológicos causados por xenobióticos nos organismos aquáticos, podendo, assim, determinar o efeito de uma dada substância química sobre estes organismos (RAND, PETROCELLI, 1985; BUSS, OLIVEIRA, BAPTISTA, 2008; Di GIULIO, NEWMAN, 2012).

Entre os ensaios laboratoriais mais utilizados na ecotoxicologia estão aqueles que utilizam biomarcadores, que demonstram as respostas biológicas ao estresse provocadas pelos xenobióticos nos organismos (DEN BESTEN, 1998, ARIAS, 2007, BERNARDI et al., 2008), os quais podem evidenciar alterações primárias (Figura 3) em diferentes níveis de organização, desde o celular, bioquímico ou fisiológico ou ainda em níveis secundários, como seus efeitos nas populações e comunidades ante a exposição a xenobióticos (MAGALHÃES, FILHO, 2008; Di GIULIO, NEWMAN, 2012). Dessa maneira, os biomarcadores são ferramentas essenciais para compreensão dos efeitos subletais causados pelos contaminantes e seus mecanismos de ação (COSTA et al., 2008), fornecendo sinais precoces de alerta quanto aos danos ecológicos iniciais (Di GIULIO, NEWMAN, 2012). Além disso, a utilização de vários biomarcadores é recomendada, já que a avaliação de uma determinada resposta biológica pode não indicar de forma ampla os danos que foram ocasionados nos organismos que foram expostos em um ambiente contaminado (ZORITA et al., 2008).

Figura 3: Níveis de organização biológica e resposta aos efeitos de contaminantes



Fonte: Magalhães Filho, 2008. Adaptada pela autora.

Os biomarcadores são importantes por permitirem, inclusive, a determinação dos impactos negativos de uma determinada concentração de poluentes antes mesmo de que seja observada mortalidade ou outros efeitos nocivos aos organismos que poderiam ocasionar um declínio populacional (CALORE et al., 2007; COSTA et al., 2008; ANDRADE-WALDEMARIN et al., 2012; ABDALLA et al., 2013; MARTINS et al., 2013; DAL-MÉDICO et al., 2014). Estudos avaliando os efeitos da exposição subletal a xenobióticos em diferentes biomarcadores já foram realizados em mamíferos (CALORE et al., 2007), peixes (ANDRADE-WALDEMARIN et al., 2012; MARTINS et al., 2013) e também em anfíbios (COSTA et al., 2008; DAL-MÉDICO et al., 2014; SALLA et al., 2015; OLIVEIRA, 2016; JONES-COSTA et al., 2018).

Entre os biomarcadores existentes, aqueles indicativos de desempenho cardíaco estão entre os mais sensíveis (DAL-MÉDICO et al., 2014), assim como constatado por Thomas et al. (2008), que avaliando os efeitos da exposição ao triclorfon em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), observaram que dentre os biomarcadores analisados (biomarcadores de estresse oxidativo, força de contração cardíaca *in vitro* e frequência cardíaca), aqueles indicativos da função cardíaca se mostraram os mais sensíveis.

Outros efeitos causados pelos contaminantes, e determinados por meio da utilização de biomarcadores fisiológicos cardíacos, foram demonstrados em diferentes estudos como de Costa et al. (2008), em que foi constatada a produção de espécies reativas do oxigênio em

girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos por 48 h ao herbicida Roundup Original® (glifosato), associado a um aumento do gasto energético devido a hiperatividade e taquicardia dos organismos expostos a uma concentração ambientalmente relevante do contaminante. Adicionalmente, um estudo publicado por Dal-Médico et al. (2014) após a exposição da mesma espécie por 2 e 16 dias ao cádmio ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$), indicou alterações como bradicardia devido a um relaxamento cardíaco incompleto e redução da força de contração, sendo que essas respostas ao contaminante se agravaram na exposição mais prolongada, acarretando em alterações no desenvolvimento dos girinos e nos processos homeostáticos que são responsáveis por respostas do organismo na presença dos xenobióticos.

Especialmente após a exposição crônica a contaminantes, muitas vezes nota-se uma hipertrofia cardíaca como uma estratégia homeostática para aumentar o débito cardíaco por meio de aumento do volume sistólico (CALORE et al., 2007; RISSOLI, 2012). Dentre os biomarcadores de hipertrofia cardíaca estão a massa ventricular relativa e ainda, em nível subcelular, o diâmetro das miofibrilas que, segundo SALLA et al. (2015), é uma excelente técnica para avaliar alterações no tecido cardíaco de organismos que foram expostos a substâncias contaminantes. Essa hipertrofia cardíaca resultante de alterações do diâmetro das miofibrilas deve resultar em um aumento da força de contração *in vivo* e, assim, em um aumento do débito cardíaco (SALLA et al., 2015). Inversamente, caso ocorra uma bradicardia, haverá uma redução do débito cardíaco em consequência da redução na frequência de despolarização do tecido marca-passo, da mesma forma que uma atrofia cardíaca pode também reduzir o mesmo, mas por meio da redução no volume sistólico (ANELLI JR, 2010).

Segundo Costa et al. (2008), os organismos aquáticos quando são expostos aos diversos fatores de contaminação ambiental, podem ativar o mecanismo de fuga, assim como mecanismos fisiológicos que acabam por neutralizar os efeitos causados pelo fator estressante. Conseqüentemente, podem ocorrer alterações na performance cardíaca e no nível de atividade desses organismos, indicando que os biomarcadores fisiológico de performance cardíaca são ideais para essa avaliação. Adicionalmente, outro biomarcador em outro nível de organização, o comportamental, é a determinação do nível de atividade do animal, uma vez que alterações do mesmo podem ser resultantes de efeitos diretos ou indiretos dos contaminantes (SPARLING et al., 2010), especialmente em xenobióticos que causam efeitos neurotóxicos, que são capazes de alterar o comportamento dos organismos expostos (FORDHAM et al., 2001), bem como reduzir o desempenho cardíaco (COSTA et al., 2008).

Outra ferramenta muito importante para os testes ecotoxicológicos é a avaliação do potencial genotóxico do contaminante por meio do teste de micronúcleo e outras alterações

nucleares em células sanguíneas (FENECH, 2000; SILVA et al., 2003). Existe uma variedade de metodologias para avaliação do teste de genotoxicidade, sendo essa análise importante para avaliar o potencial carcinogênico ou mutagênico de uma substância (RIBEIRO et al., 2004). Apesar dos micronúcleos também se originarem espontaneamente em situações em que o organismo se encontra saudável, aumentos na sua ocorrência são indicativos de danos ocasionados por xenobióticos (HEDDLE et al., 1983), assim como a presença de outras anormalidades celulares como células binucleadas, anucleada ou com presença de *bud*, entre outras alterações, as quais já foram constatadas em contaminação por xenobióticos com efeitos genotóxicos, citotóxicos ou ainda, com ação mutagênica (LAJMANOVICH et al., 2014); porém, o mecanismo de formação dessas outras anormalidades é pouco conhecido, mais ainda assim, são utilizadas como indicativo de genotoxicidade como complemento a presença de micronúcleos (GOKALP et al., 2011).

Segundo Pantaleão et al. (2006), micronúcleos são fragmentos de cromossomo ou cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica durante a divisão celular, portanto, não incorporados ao núcleo da célula-filha durante este processo, podendo ainda, permanecer por toda a vida da célula, além de serem alterações observáveis em diferentes organismos-modelo (BOLOGNESI et al., 2006; PANTALEÃO, 2006). A técnica de análise do micronúcleo tem a vantagem de, além de ser bastante sensível e responder precocemente à exposição a xenobióticos, é relativamente simples, pouco invasiva e pouco dispendiosa, representando uma excelente relação custo-benefício (VIARENGO et al., 2007, BOLOGNESI et al., 2006; Di GIULIO, NEWMAN, 2012).

Por fim, outro biomarcador extremamente importante é o de pigmentação. Os melanóforos são células que contêm organelas denominadas melanossomos, as quais produzem pigmento melanina que são responsáveis por produzir a cor escura ou clara do tegumento dos organismos, em decorrência de dispersão ou agregação do pigmento (SUGIMOTO, 2002; SKOLD et al., 2016), responsável pela coloração de peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos (KAUR e DUA, 2015).

A alteração da pigmentação ocorre como uma resposta adaptativa sob controle do sistema nervoso simpático ou endócrino, sendo mediada por receptores presentes na superfície dos cromatóforos (CHAPLEN et al., 2001). Essas alterações são essenciais para a sobrevivência dos organismos, possibilitando não somente a proteção contra predadores, como também aumentando as chances de alimentação (SUGIMOTO, 2002). Em ambiente contaminado por variadas substâncias ou sujeito a outros estressores ambientais, podem ser observados tanto aumentos como reduções da pigmentação corpórea de peixes e anfíbios

(CHAPLEN et al., 2001; DUKOVICIC et al., 2010; MASSAGAKI, FUJII, 1999; LOGAN et al., 2006). Essa análise da pigmentação tegumentar mostra-se um importante biomarcador de contaminação ambiental (PANDEY, 1985), assim como a pigmentação visceral, que uma vez presente em alguns órgãos e tecidos pode proteger as células contra a formação de radicais livres em decorrência de exposições a contaminantes (McGRAW, 2005; COLOMBO, 2011).

Considerando-se o anteriormente exposto, se faz importante a compreensão dos efeitos dos contaminantes nos organismos fazendo o uso de ensaios laboratoriais para que assim sejam propostas ferramentas para a preservação desses organismos (SILVA, 2002). A determinação de novos e diferentes biomarcadores sensíveis para xenobióticos é imprescindível para detectar precocemente o efeito de contaminantes podendo, assim, estabelecer estratégias de conservação antes que a mortalidade e o declínio das populações sejam observados (DEN BENSTEN, 1998; THOMAS, 1990). Tais fatores tornam, portanto, os biomarcadores ferramentas essenciais para identificação e compreensão dos efeitos dos contaminantes sobre organismos não-alvos (WINKALER et al., 2001), essenciais na avaliação de contaminações ambientais (Di GIULIO, NEWMAN, 2012).

3.2 Biocidas

Com a agricultura moderna, ocorreu o aumento do uso de biocidas, que são inseticidas provenientes de plantas e que vêm sendo utilizado no mundo todo para o combate de pragas e aumento da produtividade agrícola (MORAGAS, SCHNEIDER, 2003). Entre os biocidas mais utilizados, encontra-se o piretro, que tem seu princípio ativo obtido das flores do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum cinereum*) (COX, 2002).

Esse biocida é composto por piretrina do tipo I e tipo II (PAN, 2016) e, quando comparado a outros pesticidas, apresenta elevada eficiência em baixas concentrações, ação rápida, baixo poder residual no ambiente e supostamente baixa toxicidade para mamíferos (PIMPÃO, 2006), dentre eles o ser humano (MORAGAS, SCHNEIDER, 2003). Esses compostos são instáveis na presença de radiação ultravioleta (NPIC, 1998; PIMPÃO, 2006), e rápida degradação no ambiente (SVOBODOVÁ et al., 2003), com sua persistência no ambiente, em condições aeróbicas, de 8 dias e na água de 35 dias (PAN, 2016). São lipofílicos, apresentando baixa solubilidade em água (< 10 ppm), e elevada solubilidade em solventes, nos quais apresentam coeficiente de partição octanol-água (Kow) de 5,90 para piretrina I e 4,90 pKow para piretrina II a 25 °C (USEPA, 2006). Além disso, possuem baixa biodisponibilidade

(ROBERTS, REIGART, 2013) e não sofrem biomagnificação (SCHLEIER, PETERSON, 2011).

Em decorrência da instabilidade à luz, calor e oxigênio do composto natural (ROBERTS, REIGART, 2013), foram criadas formulações sintéticas (piretróides) a partir do composto natural, onde foram adicionados átomos de nitrogênio, halogênio e enxofre, tornando as moléculas mais estáveis à luz, prolongando seu efeito sobre organismos não-alvos, mas ainda mantendo relativamente baixa sua toxicidade aguda para mamíferos quando comparada àquela de outros compostos similares (CHEN, WANG, 1996; HEUDORF, ANGERER, 2001). Contudo, a toxicidade desse composto é dependente de sua estrutura química, que pode se tornar mais tóxica dependendo dos compostos a ela adicionados (SANTOS, AREAS, REYES, 2007).

Os piretróides/piretrina são utilizados na agricultura em plantações de arroz, café, batata, entre outros cultivos (SANTOS, AREAS, REYES, 2007), bem como na pecuária, na medicina veterinária (REBELO, 2006), como também em domicílio, para a prevenção de uma ampla faixa de pragas (REBELO, 2006; USEPA, 2013). Contudo, com seu uso abusivo, não apenas em áreas agrícolas, como também nas áreas urbanas, devido a sua elevada eficácia na eliminação de insetos rurais e domésticos, os piretróides vêm contaminando água, solo e atmosfera e sua toxicidade sobre organismos não-alvos têm se elevado significativamente (SANTOS, AREAS, REYES, 2007), inclusive sobre artrópodes, como abelhas e outros artrópodes aquáticos como lagostas e camarões (OSTI et al., 2007), além de peixes e girinos de anfíbios (USEPA, 2006, OSTI et al., 2007), no qual estes últimos, são afetados principalmente por meio do escoamento destes compostos para os ambientes aquáticos (USEPA, 2013).

Os piretróides exercem efeitos sobre o sistema nervoso central dos vertebrados, especialmente em peixes e anfíbios, podendo também ser cardiotoxicos (SANTOS, AREAS, REYES, 2007). Entre os efeitos cardiotoxicos observados em vertebrados após a intoxicação por piretro estão variações eletrocardiográficas (alterações no intervalo QT) e arritmia cardíaca (LUDOMIRSKI et al., 1982), que ocorrem devido ao aumento da duração do potencial de ação (DEJONCKHEERE et al., 1982). Os efeitos cardiotoxicos e neurotóxicos também são devidos à sua ação direta sobre os canais de sódio, impedindo seu fechamento prolongando a entrada de Na^+ nas células (SANTOS, AREAS, REYES, 2007), o que provoca alterações na cinética destes canais (DEJONCKHEERE et al., 1982), resultando em uma hiperexcitabilidade. Tais efeitos podem inclusive interromper a propagação do potencial de ação (BLOOMQUIST, 1996). Ademais, quando utilizado em concentrações elevadas, o piretro gera efeitos neurotóxicos por inibir o complexo receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA), o principal

neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), onde age bloqueando os canais de cloreto que são mediados pelo GABA, causando a hiperexcitabilidade do SNC devido à ausência da inibição sináptica (MANNA et al., 2004; BLOOMQUIST, 2016).

Apesar da literatura acerca dos efeitos dos piretróides sobre anfíbios ser escassa, já foi demonstrado que este composto é altamente tóxico para os anfíbios e para peixes (USEPA 2006), que vêm se mostrando altamente sensíveis aos piretróides (SÁNCHEZ - BAYO, 2012), especialmente devido à ampla faixa de concentrações em que esses compostos se apresentam, as quais vêm se mostrando altamente tóxicas para esses organismos, nas concentrações entre o mesmo piretróide e entre as espécies de peixes e anfíbios (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração de CL50 para diferentes piretróides em várias espécies de peixes e anfíbios.

Composto	CL₅₀	Concentração	Família	Espécie	Autor
Cipermetrina	96h	193 µg.L ⁻¹	Pimelodidae	<i>Rhamdia quelen</i>	Borges et al., 2007
	96h	400 µg.L ⁻¹		<i>Channa punctatus</i>	Kumar et al., 2009
	96h	139 µg.L ⁻¹	Cyprinidae	<i>Labeo rohita</i>	Das; Mukherje e, 2003
	96h	172 µg.L ⁻¹	Hylidae	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	Agostini et al., 2010
Deltametrina	48h	7,3 µg.L ⁻¹ (20%)	Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	Silva, 2011
	48h	0,078 µg.L ⁻¹	Cyprinidae	<i>Danio rerio</i>	Osti, 2005
	48h	0,75 µg.L ⁻¹ (50%)	Channidae	<i>Channa punctatus</i>	Sayeed et al., 2003
Permetrina	96h	100 µg.L ⁻¹	Ranidae	<i>Lithobates catesbeianus</i>	França et al., 2015
	22h	10 a 100 µg.L ⁻¹	Ranidae	<i>Lithobates pipiens</i>	Pan - Database

Fonte: da autora.

Há relatos descrevendo também elevada sensibilidade de peixes aos piretróides, pois, devido à sua elevada lipofilicidade, sua absorção por meio das brânquias é aumentada (SANTOS, AREAS, REYES, 2007), causando sérios efeitos neurotóxicos nestes organismos (SVOBODOVÁ et al., 2003). Tal efeito ainda não foi avaliado em anfíbios, mas pode-se pressupor que estes sejam ainda mais susceptíveis à contaminação por esse composto, pois, além da sua absorção pelas brânquias, a mesma ainda acontece através da pele extremamente

delgada e permeável (RISSOLI et al., 2012). Vale ressaltar que, além da elevada absorção dos piretróides por peixes e anfíbios, os mesmos, por serem ectotérmicos, ainda apresentem baixa metabolização destes compostos, tornando-os mais tóxicos para estes indivíduos (OSTI, 2007), diferentemente do que ocorre com mamíferos, que apresentam rápida biotransformação, e assim, toxicidade comparativamente bem menor que outros organismos (SANTOS, AREAS, REYES, 2007).

Considerando-se o anteriormente exposto, urge que sejam avaliados os efeitos do piretro sobre organismos não-alvos potencialmente mais susceptíveis, como os anfíbios, pois seu uso indiscriminado vem contaminando o solo, o ar e a água, provocando diversos efeitos nocivos para o meio ambiente (GRISOLIA, 2005) como, por exemplo, acumulação nos sedimentos de ambientes aquáticos (USEPA, 2013) e bioacumulação nos organismos (GUNASEKARA, 2005). Com isso, o uso desse biocida requer monitoramento, para que assim possamos saber os reais efeitos deste composto e seus resíduos para os organismos e para o meio ambiente (BARRIONUEVO, LANÇAS, 2001).

3.3 Nanotecnologia na agricultura

Embora os agrotóxicos apresentem grande importância econômica para a agricultura, reduzindo a incidência de pragas e aumentando a produtividade, estas substâncias geram um grande impacto no meio ambiente (FRACETO, 2015). Com isso, visando à diminuição do impacto desses xenobióticos no ambiente por meio da utilização de inseticidas botânicos (BRACK, 2013), tem sido crescente a utilização da nanotecnologia, a qual nos últimos tempos, vem atraindo uma gama de aplicações, especialmente para o setor agrícola (DASGUPTA et al., 2015; PARISI et al., 2015), como o desenvolvimento de nanomateriais como sistemas carreadores de agentes ativos (pesticidas, fertilizantes e nutrientes) (KIM et al., 2017). Os nanopesticidas (GRILLO et al., 2016) são formulações criadas para aumentar a estabilidade de compostos ativos, protegê-los da degradação, assim como para aumentar sua solubilidade e sua eficácia (KAH et al., 2013; MATTOS et al., 2017). Entre esses nanocarreadores, estão as nanopartículas (GRILLO et al., 2016), sistemas capazes ainda de diminuir o impacto causado pelos xenobióticos no meio ambiente, porém mantendo a produtividade nos campos agrícolas (ARMAS et al., 2007; NAIR et al., 2010; CHEN, YADA, 2011), bem como sua estabilidade e eficiência (CHENG et al., 2016; PRASAD et al., 2017). Essas nanopartículas podem ser

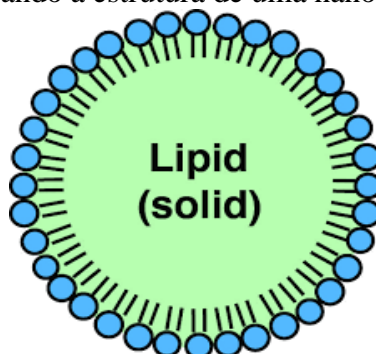
formuladas com diferentes matrizes, entre elas as poliméricas, lipídicas, ou ainda, proteínas biodegradáveis (KAH et al., 2013; GRILLO et al., 2016).

Entre as diversas nanopartículas existentes, estão as nanopartículas lipídicas sólidas, que vêm ganhando atenção no setor agrícola que permite que o composto encapsulado não degrade e ainda tenha sua liberação de forma modificada (CHEN; YADA, 2011; YOON, 2013) diminuindo, desta forma, o impacto no ambiente (GRILLO et al., 2014). Também devido às suas propriedades nanométricas, esses nanomateriais são adequados para desenvolvimento de ferramentas a serem utilizadas para uma agricultura mais sustentável (FRACETO et al., 2016), sendo uma excelente ferramenta para o desenvolvimento de novas formulações (CHENG et al., 2016; PRASAD et al., 2017). Entretanto, mesmo com o avanço do setor da nanotecnologia, ainda são necessários mais estudos acerca de possíveis efeitos adversos dos nanomateriais sobre o ecossistema e para saúde animal, já que o impacto que as nanopartículas possam vir a causar ainda é pouco conhecido (KIM et al., 2017). Desse modo, são necessários mais estudos avaliando a toxicidade desses novos nanomateriais (SHINDE et al., 2012).

3.3.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (Figura 4) são sistemas carreadores que controlam a liberação de substâncias ativas em função do tempo, além de poderem direcionar de forma mais eficiente a liberação do princípio ativo aos organismos-alvos (FRACETO et al., 2010; KARERU, ROTICH, MAINA, 2013) permitindo, assim, um aumento no desempenho e eficiência dos compostos bioativos (FRACETO, 2015). Sendo compostas por lipídeos sólidos em temperatura ambiente e corporal (CHEN et al., 2010), as NLS conferem menor mobilidade dos ativos a elas associados, permitindo a liberação lenta das substâncias no ambiente (CHEN, YADA, 2011; YOON, 2013).

Figura 4: Esquema demonstrando a estrutura de uma nanopartícula lipídica sólida (NLS).



Fonte: Kakadia e Conway (2014).

As formulações de nanopartículas com compostos bioativos têm a capacidade de diminuir as contaminações do meio ambiente, especialmente por utilizarem menores quantidades do bioativo para atingir os organismos-alvos (MOUSAVI, REZAEI, 2011; RAI, INGLE, 2012; PERLATTI et al., 2013). Além disso, somente parte do bioativo estará disponível imediatamente, sendo a maior parte liberado lenta e gradativamente devido ao mecanismo de liberação das nanopartículas (MOUSAVI, REZAEI, 2011; RAI, INGLE, 2012; PERLATTI et al., 2013). Diante disso, o princípio ativo apresenta uma permanência maior no solo e nas plantas em menores concentrações, aumentando a eficiência, diminuindo a toxicidade para o meio ambiente e organismos não-alvos (MOUSAVI, REZAEI, 2011; RAI, INGLE, 2012; PERLATTI et al., 2013). Na agricultura, esses sistemas carreadores têm sido amplamente utilizados, não apenas devido à sua propriedade de otimizar a liberação dos bioativos, mas também por tornarem necessárias menores concentrações dos compostos ativos nos campos agrícolas (CHEN, YADA, 2011; GRILLO et al., 2014).

Essas partículas compostas por lipídios sólidos apresentam tamanho nanométrico, variando de 150 a 300 nm (LIPPACHER et al., 2001; MAYNARD, 2011; YOON PARK, YOON, 2013), e devido à sua matriz lipídica, estas nanopartículas podem ser metabolizadas pelos organismos (MULLER et al., 2000; SOUTO et al., 2011). Outras vantagens desse sistema de carregamento são sua elevada estabilidade física, química e biológica, sendo resistentes à biodegradação e prevenindo a degradação da substância que foi encapsulada (MULLER et al., 2000; DAS et al., 2011), uma vez que na forma livre, o biocida pode ser modificado por alterações ambientais, como temperatura, umidade, luz e pH (BILIA et al., 2014). Tem sido ainda proposto que as nanopartículas lipídicas apresentam baixa toxicidade, são biocompatíveis e apresentam maior biodisponibilidade de ativos (DAS et al., 2011). Nesse sentido, devido à composição e solidez dos lipídios, as nanopartículas conferem menor mobilidade aos

compostos ativos a elas associados (MEHNERT, MADER, 2001), controlando a velocidade da liberação das substâncias encapsuladas (SILVA et al., 2011), reduzindo, desta forma, os potenciais efeitos tóxicos (GRILLO et al., 2014).

Contudo, se fazem ainda necessários estudos nanotoxicológicos para que possam ser avaliados os possíveis efeitos das nanopartículas em organismos não-alvos, uma vez que as mesmas podem ser reconhecidas como substâncias estranhas no organismo (KAHRU, DUBOUGUIER, 2010). Diante do anteriormente exposto e considerando-se os potenciais efeitos exercidos por piretróides em anfíbios, no presente estudo primeiramente foi determinada a concentração subletal do biocida piretro por meio do teste de CL₅₀ para que então fossem avaliados seus efeitos sobre os biomarcadores supracitados em girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, bem como se um possível efeito nocivo deste xenobiótico poderia ser alterado pela sua associação a nanopartículas lipídicas sólidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo e caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas no laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Unesp de Sorocaba em colaboração com a doutoranda Cristiane Ronchi de Oliveira. Basicamente, as nanopartículas lipídicas sólidas contendo piretro foram preparadas segundo método de emulsificação/ evaporação do solvente descrito por Vitorino et al. (2011).

Inicialmente, para fase lipídica foram utilizados 250 mg de tripalmitato de glicerol e 0,5 mL do princípio ativo piretro que foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. Após isso, a fase lipídica foi inserida em uma solução aquosa previamente separada de 30 mL, contendo, 1,25% (375 mg) de PVA (surfactante - álcool polivinílico), sendo que essa mistura foi levada ao sonicador (DES500) por 4 min a uma potência de 40 W. A fase lipídica foi então levada ao Ultraturrax por um período de 7 min a 14.000 rpm. Em seguida, o clorofórmio foi removido com um auxílio de um evaporador rotativo e a emulsão foi concentrada até atingir o volume de 10 mL (VITORINO et al., 2011). Em seguida, foi realizada a caracterização das NLS e NLS+PIR (Tabela 2), de acordo com trabalhos prévios do grupo (OLIVEIRA et al., 2016; COLA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018).

Tabela 2: Caracterização da NLS e NLS+PIR e as respectivas médias dos parâmetros medidos em função do tempo (0 – 120 dias).

PARÂMETROS	NLS	NLS+PIR
Tamanho (nm)	324	258
Polidispersão	0,19	0,11
Potencial Zeta (mV)	-11	-10
pH	5,3	5,6
Eficiência de encapsulação (%)	≥ 99	≥ 99

Fonte: Oliveira et al., 2018.

4.2 Organismo teste

Originária da América do Norte, a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) (SHAW, 1802) foi introduzida acidentalmente em várias partes do mundo e suas características, como hábito alimentar generalista, alta capacidade reprodutiva e por apresentar um porte avantajado, com os adultos chegando a atingir aproximadamente 20 cm, tornaram a invasão e estabelecimento desta espécie exótica bem-sucedida em diversos locais, inclusive no Brasil (HECNAR, M'CLOSKEY, 1997).

Pertencente à ordem Anura, família Ranidae, essa espécie apresenta coloração branca no ventre e no dorso variável entre verde escuro e verde claro e dimorfismo sexual, com os machos apresentando tímpanos maiores (BURY, WHELAN, 1984). Com preferência por corpos d'água permanentes, a rã-touro foi introduzida no Brasil na década de 1930 para que fosse instalado o primeiro ranário do país para cultivo comercial da carne de rã, que foi escolhida por apresentar rápido crescimento e grande número de ovos em cada desova (VIZOTTO, 1984). Por causa do sucesso adaptativo de *L. catesbeianus*, a prática da ranicultura foi estimulada, facilitando a dispersão desta espécie em diversas regiões do país. No Brasil, exemplares podem ser encontrados principalmente na Mata Atlântica e Cerrado (CUNHA, DELARIVA, 2009).

Alimentando-se desde pequenos invertebrados, aves, mamíferos e inclusive outros anfíbios (CUNHA, DELARIVA, 2009), essa espécie também está incluída dentre as principais causas de declínio de anfíbios nativos, considerada uma ameaça à fauna endêmica (KATS, FERRER, 2003) por causa da competição e/ou predação (PEAR et al., 1998). Com sua fácil adaptação e reprodução, a rã-touro também é muito utilizada em estudos laboratoriais como modelo-experimental em universidades e empresas (CUNHA, DELARIVA, 2009). No presente

estudo foram utilizados girinos de rã-touro no estágio 25 de Gosner (1960) (Figura 5) (Ver Anexo A).

Figura 5: Morfologia externa do girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) demonstrando coloração típica do corpo do animal.



Fonte: da autora.

4.3 Bioensaios toxicológicos com girinos de rã-touro

Uma vez no Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC) do Departamento de Biologia da UFSCar, foram realizados os ensaios ecotoxicológicos com os girinos de rã-touro e as análises dos biomarcadores, com exceção da preparação do material e confecção das lâminas das miofibrilas e da pigmentação cutânea que foram feitas no Laboratório de Anatomia da Unesp de São José do Rio Preto com auxílio da Doutora Lilian Franco-Belussi e do Dr. Classius de Oliveira. O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar antes do início dos experimentos (protocolo CEUA – Comitê de Ética no Uso de animais da Universidade Federal de São Carlos – nº 1472160516). Por ser uma espécie exótica, não houve necessidade de autorização do SiSBio para coleta dos animais utilizados no presente estudo.

4.3.1 Obtenção dos animais e manutenção em laboratório

Os girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner (1960), ou seja, estágio pré-metamórfico com início da alimentação independente (~10 dias), foram adquiridos em um ranário comercial na cidade de Santa Bárbara D'Oeste (-22.781257; -47.4073489) (Figura 6 e 7) e imediatamente transportados ao Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC) da UFSCar *campus* Sorocaba, onde os experimentos foram conduzidos. Os animais foram aclimatados por um período de cerca de cinco dias em aquários de 60 L com circulação contínua de água declorinada, aeração constante, temperatura ambiente (21 ± 2 °C) e

fotoperíodo natural (\cong 12h claro: 12h escuro), sendo alimentados *ad libitum* com folhas de espinafre orgânica maceradas e cozidas, as quais foram suspensas 48h antes do início dos ensaios ecotoxicológicos. Na Tabela 2 estão representados os parâmetros físicos e químicos da água utilizada para o bioensaio, como também do ranário onde os animais foram coletados.

Figura 6: Setor de desenvolvimento no ranário comercial.



Fonte: da autora.

Figura 7: Setor de eclosão no ranário comercial.



Fonte: da autora.

Tabela 3: Parâmetros físicos e químicos da água declorinada que os girinos foram aclimatados e do ranário onde foram coletados

Parâmetros	Temperatura °C	pH	Dureza Total (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CO ₂ (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	Amônia (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)
Água ranário	21	6,6	50-150/ Branda	22	3,50
Água aclimação	21	7,5	50-150/ Branda	1,48	0

Fonte: da autora.

Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados diariamente durante as 48 h de exposição e estão apresentados a seguir na Tabela 3. Os valores obtidos para os animais expostos aos diferentes compostos, tampouco a suas combinações, não diferiram daqueles encontrados para o seu respectivo controle e em relação às normativas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2000).

Tabela 4: Tabela 3: Parâmetros físicos e químicos da água (Médias \pm 1 E.P.M.) em 48h de girinos de *L. catesbeianus* para os grupos controle (CTR), piretro (PIR), nanopartícula lipídica sólida (NLS) e nanopartícula lipídica sólida associada ao piretro.

Grupos	Temperatura °C	pH	Dureza Total (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CO ₂ (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	Amônia (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)
CTR	19,9 \pm 0,1	7,5 \pm 0	50-150/ Branda	4,7 \pm 0,6	0,6 \pm 0,2
PIR	19,9 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1	50-150/ Branda	3,4 \pm 0,9	0,6 \pm 0,2
NLS	19,8 \pm 0,1	7,6 \pm 0	50-150/ Branda	2,8 \pm 0,5	0,5 \pm 0,1
NLS+PIR	19,7 \pm 0,1	7,5 \pm 0	50-150/ Branda	3,4 \pm 1,5	0,5 \pm 0,2

Fonte: Da autora.

4.3.2 Delineamento experimental para os ensaios ecotoxicológicos

4.3.2.1 Determinação da CL₅₀ 48h

Os testes foram realizados de acordo com a normativa da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2000), com as seguintes modificações: os animais (n = 64) foram individualmente expostos em garrafas plásticas (de consumo humano), que foram previamente lavadas com água, seguindo a metodologia proposta por Nunes et al., (2008). Cada recipiente foi completado com 1 L de água decolorada (Figura 8), contendo um animal por recipiente, sendo que cada grupo era composto por oito animais. Solução estoque de piretro (PIR) foi previamente preparada (anteriormente ao ensaio) e todos os ensaios tiveram um grupo controle

(animais expostos a meio aquoso não contaminado) e também o grupo contendo o veículo acetona.

Figura 8: Sistema para determinação da CL_{50} , composto por garrafas plásticas com distribuição de ar para que os animais recebessem oxigênio.



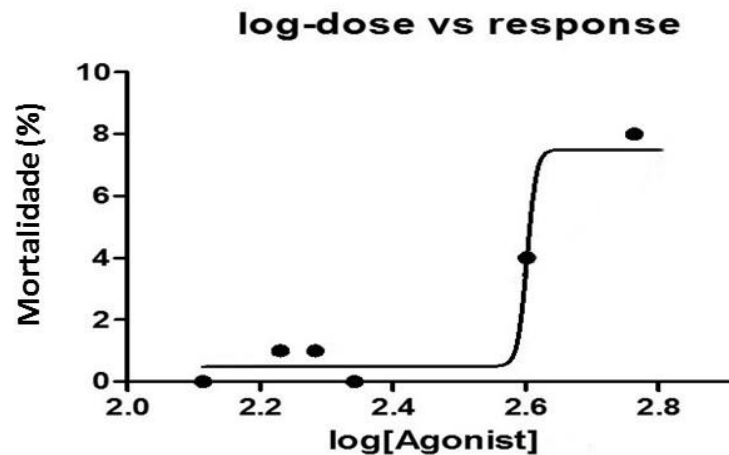
Fonte: da autora.

Devido ao fato de que os piretróides apresentam amplas variações em suas concentrações subletais de acordo com a classe de piretróide utilizada e também de acordo com a espécie, tornou-se necessário determinar previamente a concentração a ser utilizada para os ensaios a partir da CL_{50} (concentração letal que leva a mortalidade de 50% da população) para o composto natural piretro, tomando-se como referência a concentração para piretróide permetrina de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ para mesma espécie (FRANÇA et al., 2015). A partir dessa concentração, portanto, foram selecionadas as concentrações de $130 \mu\text{g.L}^{-1}$, $170 \mu\text{g.L}^{-1}$, $190 \mu\text{g.L}^{-1}$, $220 \mu\text{g.L}^{-1}$, $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $580 \mu\text{g.L}^{-1}$ utilizadas no presente estudo.

Os girinos foram expostos por 48h em sistema estático, sendo que a alimentação foi suspensa dois dias antes do ensaio. Durante as 48h de exposição, a mortalidade dos indivíduos e o comportamento foram determinados diariamente.

Os dados foram analisados pelo Graphpad Prism 5, onde primeiramente foram transformados em *Log*. A CL_{50} para os girinos *L. catesbeianus* expostos ao biocida foi de $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 9), ou seja, quatro vezes maior do que a concentração relatada para a mesma espécie por França et al., (2015). A mortalidade e o comportamento dos girinos para as diferentes concentrações de piretro podem ser observados na Tabela 4.

Figura 9: Concentrações indicando que a CL_{50} determinada para o princípio ativo piretro foi a de $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ indicada em *Log* pelo asterisco (*).



Fonte: Graphpad Prism 5.0.

Tabela 5: Concentrações utilizadas para a determinação da CL_{50} 48h, assim como a mortalidade e comportamento em 48h dos indivíduos expostos ao princípio ativo piretro.

Concentração	Mortalidade	Comportamento
Controle	0%	Normal
Controle+Acetona	0%	Normal
$130 \mu\text{g.L}^{-1}$	0%	Normal
$170 \mu\text{g.L}^{-1}$	12,5%	Normal
$190 \mu\text{g.L}^{-1}$	12,5%	Normal
$220 \mu\text{g.L}^{-1}$	0%	Normal
$400 \mu\text{g.L}^{-1}$	50%	Sobreviventes Letárgicos
$580 \mu\text{g.L}^{-1}$	100%	Letárgicos (antes de morrer)

Fonte: da autora.

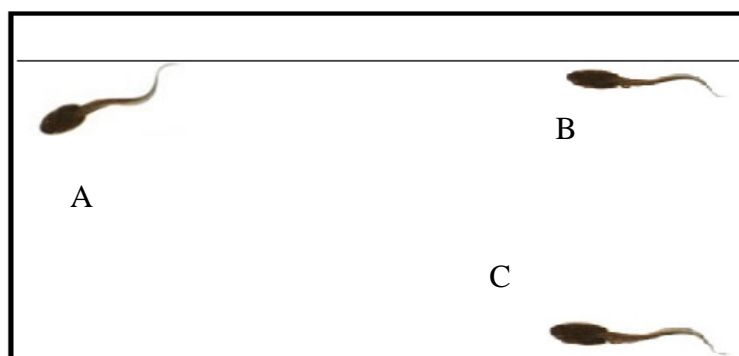
4.3.2.2 Realização dos ensaios ecotoxicológicos a concentrações subletais (1/5 da CL_{50})

Após determinação da CL_{50} , a concentração de piretro utilizada no presente estudo correspondeu a 1/5 da CL_{50} ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$) para a realização dos ensaios posteriores. Os girinos ($n = 96$) foram divididos em quatro grupos experimentais ($n = 24$ por grupo, à densidade de 1 girino por L de água de clorada), ensaiados por um período de 48h em triplicata ($n = 8$ por aquário): 1) grupo controle (CT); 2) grupo exposto ao biocida piretro (PIR); 3) grupo exposto

às nanopartículas (NLS); e, 4) grupo expostos a nanopartículas associadas ao biocida piretro (PIR+NLS). A água foi monitorada diariamente para garantir que os parâmetros físicos e químicos fossem mantidos dentro dos valores aceitáveis, como observado em grande parte das águas doces presentes no Brasil (pH; dureza total; dureza em carbonato; CO₂ e amônia) e dentro das normativas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2000).

Durante as 48h de exposição, o nível de atividade dos animais foi monitorado (duas vezes/dia) de acordo com a metodologia proposta por Franker e Smith (2004) para girinos de *Lithobates pipiens*. Os animais foram considerados ativos quando apresentavam constante movimento pelo aquário e a inatividade foi definida como o estado estacionário ou o de flutuar passivamente (sem movimento) (Figura 10). O número de indivíduos ativos foi apresentado como uma proporção em relação ao número total de animais (em %) para cada grupo experimental.

Figura 10: Nível de atividade dos girinos de *L. catesbeianus*. A) Estado ativo; B) Estado de flutuar passivamente e C) Estado estacionários dos indivíduos no fundo do aquário.



Fonte: Da autora.

Após a exposição, os girinos foram pesados e tiveram seu comprimento determinado (Tabela 5). Em seguida, foram eutanasiados seguindo as normas da *American Veterinary Medical Association* (AVMA, 2001), que consistiu na realização de uma fratura crânio-cervical. Não foram utilizados anestésicos, pois os mesmos poderiam interferir na determinação da frequência cardíaca *in situ*.

Tabela 6: Massa e comprimento corpóreos (Médias \pm 1 E.P.M.) dos indivíduos de *L. catesbeianus* dos grupos controle (CT) e expostos ao piretro (PIR), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e piretro associado às nanopartículas (NLS+PIR).

Grupos	Massa (g)	Comprimento (cm)
CT	3,1 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1
PIR	3,1 \pm 0,1	7,4 \pm 0,1
NLS	3,0 \pm 0,1	7,3 \pm 0,2
NLS+PIR	3,6 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2

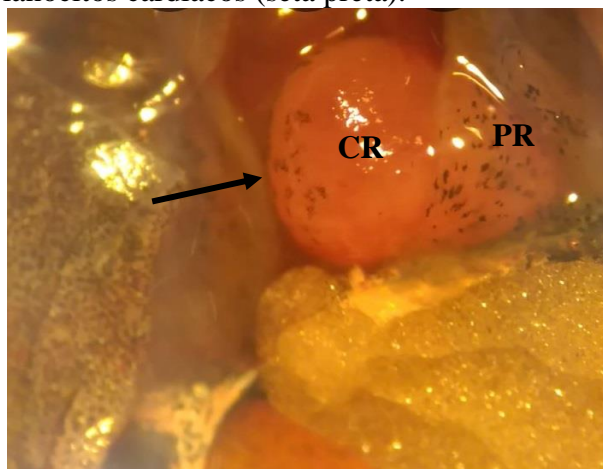
Fonte: da autora.

4.3.3 Determinação da frequência cardíaca "in situ"

Para determinação da frequência cardíaca, após a eutanásia, foi realizada uma incisão na região ventral dos indivíduos (n = 10 por grupo) para que o pericárdio fosse exposto (Figura 11) e pudesse ser feita a contagem visual dos batimentos cardíacos para a determinação da frequência cardíaca *in situ* (f_H – bpm). A utilização de tal metodologia justifica-se por permitir que seja obtida a frequência cardíaca basal dos indivíduos sem a interferência de possíveis efeitos beta-adrenérgicos que pudessem vir a ocorrer devido à implantação transcutânea de eletrodos de ECG (WASSERSUG et al., 1981; BURGGREN et al., 1983; FEDER et al., 1983).

Para a análise estatística os dados primeiramente passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov – Smirnov, e posteriormente foi utilizado o teste One-way ANOVA e pós-teste Tukey-Kramer para comparação múltipla entre os grupos por meio do programa Graphpad Instat 3. Um valor de *P* menor que 0,05 foi considerado significativo.

Figura 11: Visão da cavidade celomática após incisão na região ventral dos indivíduos para exposição do coração e contagem visual dos batimentos cardíacos. Coração (CR), Pericárdio (PR) e presença de melanócitos cardíacos (seta preta).

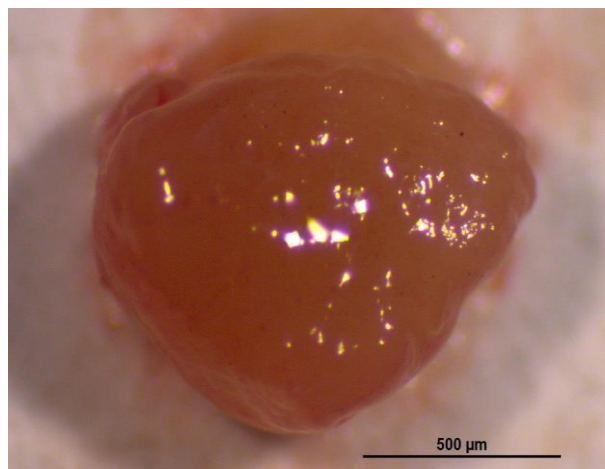


Fonte: da autora.

4.3.4 Determinação da Massa Ventricular Relativa (MVR)

Após a eutanásia, foi determinada a massa corpórea (W_b - g) dos animais ($n = 10$ por grupo) coletados ao acaso dos diferentes grupos. Em seguida, o coração foi cuidadosamente removido e o ventrículo dissecado (Figura 12) e pesado (W_v - g), para que assim a massa ventricular fosse expressa como uma porcentagem da massa corpórea (massa ventricular relativa, MVR - % de W_b). Para a análise estatística os dados primeiramente passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov – Smirnov, e posteriormente foi utilizado o teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey- Kramer para comparação múltiplas entre os grupos expostos e controle por meio do programa Graphpad Instat 3. Foi também realizado o teste de Pearson para analisar se ocorreu correlação entre a MVR e a f_H dos indivíduos CT e expostos. Para tanto, os dados foram transformados em *Log* para que a análise fosse realizada por meio do software R versão 3.2.0 (R Development Core Team), considerando-se um valor de significância de P de 0,05.

Figura 12: Dissecção do ventrículo dos animais após eutanásia para pesagem e determinação da MVR.



Fonte: da autora

4.3.5 Teste de micronúcleo (MN) e de outras alterações nucleares

Foram utilizados seis indivíduos (n = 6 por grupo) coletados ao acaso de cada grupo após o período de exposição, os quais foram anestesiados localmente com lidocaína para a retirada de amostras de sangue, por meio de punção cardíaca. A análise de genotoxicidade foi realizada por meio do teste de micronúcleo e de outras alterações nucleares.

Foram contados 1.000 eritrócitos de cada indivíduo. Foram considerados micronúcleos os corpúsculos presentes no citoplasma de eritrócitos e que, em relação ao núcleo principal da célula, apresentavam diâmetro inferior, membrana nuclear, mesma coloração e refringência, além de não estarem ligados ao núcleo principal. As células foram analisadas em objetiva de 100x, em óleo de imersão no microscópio de luz (óptico) de campo claro. Além da contagem dos micronúcleos, durante as análises também foi avaliada a presença de outras anormalidades nucleares, como presença de *Bud*, célula anucleada e binucleada, seguido o protocolo de Lajmanovich et al. (2014).

Para a análise estatística, os dados foram primeiramente transformados em *Log* e analisados por meio de ANOVA-One-Way e, em seguida, pelo teste *a posteriori* de Tukey de comparações múltiplas entre os grupos experimentais, sendo esse, realizados no programa R v. 3.3.2 (R Core Team, 2017). Para o teste de correlação do micronúcleo e outras anormalidades com a pigmentação interna e com a externa foi utilizado o teste de Pearson após os dados terem

sido transformados em *Log*. As análises foram realizadas usando o software R versão 3.0.2 (R Development Core Team) e um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4.3.5.1 Confeção das lâminas do Teste de Micronúcleo (MN)

As amostras de sangue retiradas foram transferidas para as extremidades das lâminas, sendo em seguida utilizada outra lâmina em 45°, posicionada em frente à gotícula, fazendo-se um movimento para que a gotícula deslizesse sobre a extensão da lâmina. Após esta etapa, as lâminas foram fixadas com metanol a 4 °C durante 20 minutos e secas para posterior coloração.

Para coloração foi utilizado o corante Rosenfeld, que é composto por uma mistura de dois corantes, Giemsa e May-Grunwald, sendo que a concentração de Giemsa utilizada foi adaptada seguindo o protocolo de Franco-Belussi et al. (2016). As lâminas foram cobertas por 15 gotas do corante May-Grunwald e deixadas a descansar por 3 a 4 minutos. Em seguida, foi adicionada a mesma quantidade de água destilada, deixando descansar por 1 minuto. Após isso, o resíduo das lâminas foi retirado e as mesmas foram cobertas com 15 gotas de Giemsa diluído em água corrente, deixando-se então descansar por 15 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas em fio de água corrente e secas em temperatura ambiente de um dia para o outro para posterior análise.

4.3.6 Análise da pigmentação da pele (Body darkness)

As imagens de todos os indivíduos ($n = 96$) foram obtidas antes da eutanásia e foram tratadas sob condição de luz padronizada para que pudessem ser analisadas pelo Adobe Photoshop 6.0, seguindo o protocolo de Svensson et al. (2005), adaptado para anuros por Franco-Belussi et al. (2016). As imagens foram convertidas para CIE $L^*a^*b^*$, onde L^* corresponde ao parâmetro de reflectância. O canal L foi primeiramente normalizado definindo a imagem preta total ($L^* = 0$) e a imagem branca total ($L^* = 255$).

Um ponto de referência foi determinado para assegurar que a mesma área fosse analisada em todos os indivíduos. Com isso, foram analisados 2 cm² de pele próxima à região dorso-caudal do girino (Figura 13) utilizando a ferramenta de retângulo. Os valores médios de reflectância da área pré-determinada foram medidos com base na ferramenta histograma,

enquanto que o escurecimento foi calculado como complemento da transparência. Os dados foram mostrados em porcentagem de escurecimento (preto = 100%), e então, foi realizado uma regressão Beta para analisar a interação entre cada um dos valores em proporção. Para cada animal foram utilizadas duas fotografias e então a média entre as duas foi determinada. As análises foram realizadas pelo programa R v. 3.3.2 (R Core Team, 2017) por ANOVA-One-Way e, em seguida, pelo teste *a posteriori* de Tukey para comparação entre os grupos experimentais.

Figura 13: Área de referência dorso-caudal pré-determinada para análise da pigmentação cutânea. Em vermelho nota-se a região analisada nos girinos de *L. catenatus*.



Fonte: da autora

4.3.7 Processamento de amostra para análise do diâmetro das miofibrilas e pigmentação do coração

Foram utilizados seis indivíduos ($n = 6$ por grupo) os quais tiveram os corações removidos e fixados no 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 24 h a 4°C . Após esse período, as amostras foram lavadas para que fosse retirado o excesso de fixador para posteriormente serem desidratadas em uma série de álcool (50% até 100% para completar a desidratação) sendo, por fim, incluídas na historesina.

4.3.7.1 Confeção e análise das lâminas histológicas para determinação do diâmetro das miofibrilas e da pigmentação do coração

Após a inclusão das amostras em historesina, utilizando um micrótomo RM 2265 (Leica, Suíça), foram obtidos cortes de $2\mu\text{m}$ das amostras, os quais foram corados com azul de toluidina e hematoxilina-eosina (H.E.) permitindo, desta forma, melhor visualização do tecido das amostras.

Utilizando o software Image - Pro Plus 6.0, as micrografias das lâminas feitas por fotomicroscópio puderam ser analisadas. Para análise do diâmetro das miofibrilas, foram realizadas dez medidas em 20 fotos de cada indivíduo, (totalizando 480 fotos e 4.800 análises) sendo, por fim, determinada a média geral. O protocolo seguido para determinação do diâmetro das miofibrilas foi o de Salla et al. (2015).

Seguindo o protocolo de Franco-Belussi et al. (2009) para análise de pigmentação de órgãos internos, foi realizada uma análise em 20 fotos de cada indivíduo (totalizando 480 fotos e 480 análises) por indivíduo, nas quais foi analisada desde a ausência de cor até a intensa coloração escura utilizando o software Image-Pro Plus 6.0, sendo então determinada a média geral. Em seguida, a área das fotos da pigmentação foi medida utilizando o mesmo software, assim obtendo a proporção entre a área total e a área pigmentada de todos os indivíduos, sendo por fim, determinada a média geral.

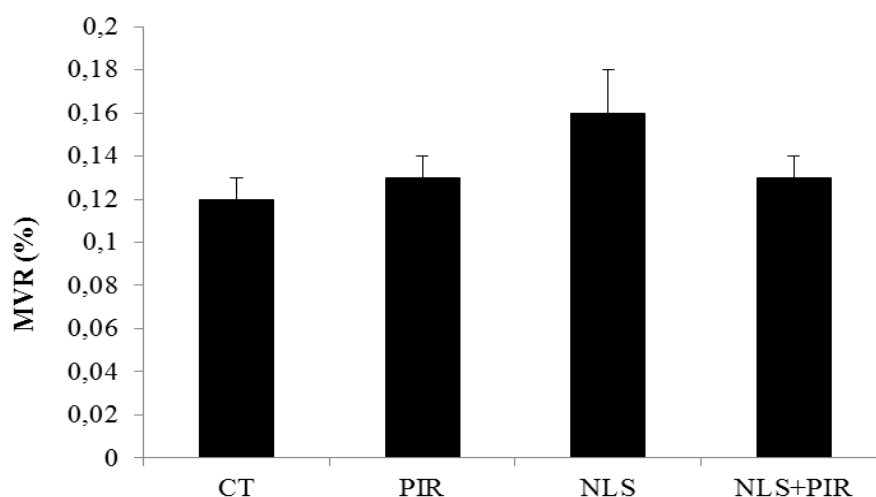
Os dados do diâmetro das miofibrilas foram transformados em *Log* e analisados no programa R v. 3.3.2 (R Core Team, 2017) por ANOVA-One-Way e, em seguida, pelo teste *a posteriori* de Tukey para comparação entre os grupos experimentais. Já para a pigmentação do coração, após a proporção ser realizada, foi avaliado a porcentagem de pigmentação (variável de resposta contínua) por meio de um modelo de efeito linear (GLM; Zuur et al., 2009) com probabilidade máxima restrita, incluindo o tratamento com um fator fixo. Esse modelo foi utilizado uma vez que a distribuição dos dados foi beta. Por fim, todas as análises foram analisadas no programa R v. 3.3.2 (R Core Team, 2017). Para o teste de correlação entre MVR e o diâmetro das fibras cardíacas e da pigmentação interna com a externa foi utilizado o teste de Pearson após os dados terem sido transformados em *Log*. Um valor *P* menor que 0,05 foi considerado significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Nível de atividade, Massa Ventricular Relativa e Frequência Cardíaca "in situ"

Quando expostos a poluentes, muitas vezes torna-se necessário um aumento da performance cardíaca dos animais. Dentre esses ajustes, muitas vezes é observada uma hipertrofia cardíaca, mesmo após apenas curtos períodos de estresse fisiológico, mas especialmente em organismos expostos cronicamente a variados compostos (CALORE et al., 2007). Contudo, no presente estudo, uma exposição de girinos de rãs-touros por 48h aos diferentes xenobióticos não provocou alteração ($P > 0,05$) da massa ventricular relativa (MVR - % da massa corpórea dos indivíduos) entre os grupos CT e expostos (NLS, PIR, NLS+PIR) (Figura 14). Isso provavelmente foi devido ao curto período de exposição dos animais aos diferentes compostos (48h).

Figura 14: Valores da Massa Ventricular Relativa (MVR) dos grupos controle (CT; n = 10) e grupos expostos ao piretro (PIR; n = 10), às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; n = 10) e à associação entre o piretro e às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR; n= 10) por 48h. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os valores dos grupos expostos não foram diferentes ($P > 0,05$) em relação ao grupo controle (CT).



De acordo com Whitters e Hillman (2001), o débito cardíaco corresponde ao produto do volume sistólico e da frequência cardíaca. Quando em exposições de organismos a xenobióticos pode ocorrer um aumento da frequência cardíaca para suprir o aumento da

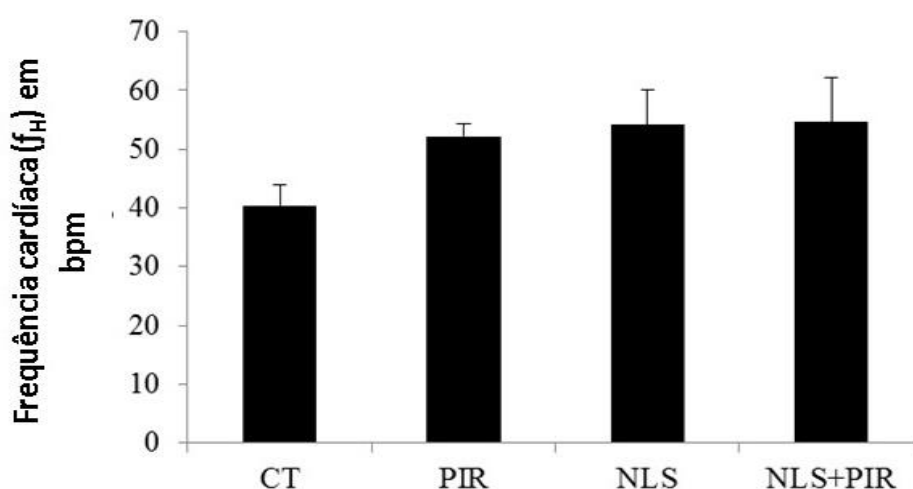
demanda energética oriunda da exposição ao fator estressor, tanto por uma resposta de escape, quanto decorrente da necessidade de mais energia para promover a desintoxicação e eliminação do xenobiótico.

Diante disso, ajustes no débito cardíaco ocasionados em resposta a exposição são necessários, em decorrência de alterações na contratilidade cardíaca e/ou na frequência cardíaca (COSTA et al., 2008). Essas mudanças ocorrem por meio de uma estimulação adrenérgica por causa da ocupação de β -receptores cardíacos, os quais produzem um efeito cronotrópico positivo, aumentando não somente a inclinação do pré-potencial de despolarização do tecido marca-passo cardíaco, como também por meio da ação da fosforilação da troponina I via AMPc. Com isso há o desligamento do cálcio da troponina C, resultando em um relaxamento mais rápido e consequente aumento da frequência cardíaca (BERS, 1991). Porém, não pudemos observar no presente estudo tais ajustes da frequência cardíaca que pudessem repercutir no débito cardíaco, uma vez que a mesma se manteve inalterada entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 15). Nesse sentido, e considerando-se que o piretro inibe a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (BÁLINT et al., 1995; KUMAR, 2008), poderia pressupor que a exposição dos girinos de rãs-touro ao piretro pudesse aumentar o tônus vagal, levando a uma bradicardia. Contudo, sabe-se que no estágio 25 de Gosner esses animais ainda carecem de inervação vagal (RIBEIRO, 2011). Essa hipótese, portanto, não deve ser levada em consideração. Nesse caso, a ausência de alterações na frequência cardíaca dos animais expostos quando em resposta ao piretro e às nanopartículas lipídicas sólidas, tanto isolada, quanto associada, deve ter ocorrido em consequência da baixa concentração utilizada, uma vez que já foi observado que a espécie 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).

Os resultados obtidos a partir da utilização do piretro natural foram diferentes dos relatos para piretróides sintéticos. Não há estudos da ação do piretro natural sobre função cardíaca em anfíbios e outros vertebrados, tampouco com nanopartículas lipídicas sólidas. Entretanto, Çoskun et al. (2004) observaram uma redução na frequência cardíaca de adultos de *Rana cameroni* por meio de análise eletrocardiográfica, quando exposta ao piretróide cipermetrina. Adicionalmente, Maciel (2011) também observou uma redução da frequência cardíaca em ratos Wistars expostos ao piretróide deltametrina em diferentes doses de DL₅₀ (10% de 3,2 mg, 25% de 8 mg e 100% de 32 mg). Tais resultados também foram corroborados por Santos (2008) para mesma linhagem de ratos, porém sob ação de deltametrina (5,5 mg.kg⁻¹, 2,2 mg.kg⁻¹ e 1,1 mg.kg⁻¹) e de permetrina (235,5 mg.kg⁻¹, 94,2 mg.kg⁻¹ e 47,1 mg.kg⁻¹). Em

contraste, uma elevação na frequência cardíaca após a exposição do peixe *Danio rerio* ao piretróide flumetrina ($0,046 \text{ mg.L}^{-1}$) foi observada por Carrison et al. (2013). Tais resultados demonstram que diferentes piretróides podem gerar diferentes efeitos sobre o cronotropismo cardíaco, o que também é espécie-dependente. Com isso, a ausência de alterações na frequência cardíaca dos girinos de rãs-touro no presente estudo não é surpreendente e pode também ter ocorrido com a utilização do piretro natural e não de outro piretróide, como também pode ter sido oriunda da baixa concentração de piretro e/ou do curto período de exposição. A f_H tampouco apresentou correlação com a MVR ($P > 0,05$) nos grupos CT ($P = 0,216$; $r = -0,429$) e expostos PIR ($P = 0,803$; $r = -0,90$), NLS ($P = 0,512$; $r = 0,235$) e NLS+PIR ($P = 0,600$; $r = 0,189$).

Figura 15: Valores da frequência cardíaca (f_H) dos girinos de rãs touro grupos controle (CT; $n = 10$) e grupos expostos ao piretro (PIR; $n = 10$), às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; $n = 10$) e à associação entre o piretro e às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR; $n = 10$) por 48h. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores dos grupos expostos não foram diferentes ($P > 0,05$) em relação ao grupo controle (CT).



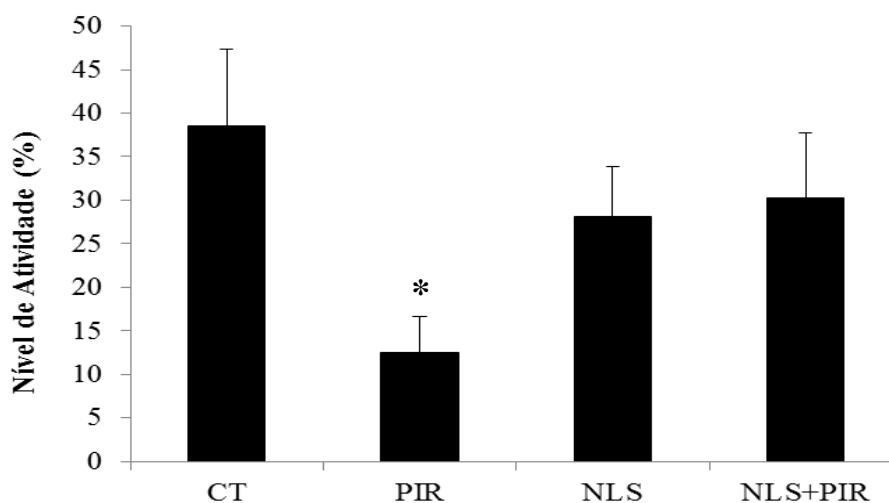
Em contraste, foi observada uma diminuição ($P = 0,0350$) do nível de atividade no grupo exposto ao piretro ($12,5 \pm 4,1\%$) em comparação ao grupo controle ($38,5 \pm 8,8\%$), o que já era esperado tendo-se em vista que já foi demonstrado que este composto é neurotóxico para outras espécies de vertebrados, sendo capaz de alterar o padrão de natação, bem como pode tornar os indivíduos expostos mais letárgicos, o que no ambiente os tornaria mais vulneráveis à predação (WERNER E MORAN, 2008). Adicionalmente, quando o piretro foi associado às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR), o composto apresentou diminuição do seu potencial tóxico, mostrando uma interação antagonista entre os dois compostos, voltando a

valores similares àqueles observados para o controle. Entre os demais grupos em comparação ao piretro e ao controle não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) (Figura 16).

Já foi demonstrado que os piretróides têm a capacidade de inibir a atividade da acetilcolinesterase (AChE), assim como mostrado por Bálint et al. (1995) para *Cyprinus carpio* expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de deltametrina e Kumar et al. (2008) para *Channa punctatus* expostos a $7,92 \mu\text{g.L}^{-1}$ de λ -cialotrina. No presente estudo, para o composto piretro pode ter ocorrido inibição da atividade da AChE em resposta à exposição a $80 \mu\text{g.L}^{-1}$; portanto, o mesmo foi menos tóxico do os compostos sintéticos citados anteriormente. Essa inativação da enzima AChE faz com que ocorra acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, gerando um potencial pós-sináptico hiperexcitatório, causando primeiramente estimulação e mais tarde o bloqueio do sistema colinérgico (MARIGOLDAR, AHMED, DAVID, 2009), ocorrendo alteração do padrão de natação devido a contrações musculares sequenciais, assim como alteração no padrão alimentar e ainda prejudicando o comportamento de escape dos organismos da fonte do estímulo estressor (BÁLINT et al., 1995; KUMAR et al., 2008). Apesar de não haver relatos na literatura, a mesma analogia pode ser utilizada para a placa nervosa terminal, levando à hiperexcitabilidade da musculatura esquelética e a contrações involuntárias, o que prejudicaria a performance natatória, também ocasionando letargia. A alteração no padrão de natação já foi relatada para trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) quando expostas ao piretróide cipermetrina, já que no início da exposição os animais apresentaram natação rápida e errática, seguida por perda de equilíbrio e, por fim, letargia (USEPA, 2005).

Outro efeito neurotóxico do piretro, com conseqüente alteração do nível de atividade dos girinos de *L. catesbeianus*, pode ter ocorrido em decorrência da interação com o complexo receptor GABA (ácido- γ -amiobutírico) (LUDOMIRSKY, 1982; BLOOMQUIST, 2007), bloqueando os canais de cloreto e assim ocasionando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central. Diante disso, o composto piretro pode ter interagido com o complexo receptor GABA, levando primeiramente à hiperexcitabilidade do SNC e, conseqüentemente, ao bloqueio do sistema devido à hiperestimulação, ocasionando alterações musculares e do nível de atividade dos indivíduos.

Figura 16: Valores do nível de atividade dos grupos controle (CT; n = 10) e grupos expostos ao piretro (PIR; n = 10), às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; n = 10) e a associação entre o piretro e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR; n = 10) após 48h. Valores médios \pm 1 E.P.M. O asterisco (*) acima da barra de erro indica que o grupo piretro sofreu alteração significativa em relação ao grupo controle ($P = 0,0350$).



Por fim, o biomarcador comportamental por meio da análise do nível de atividade dos indivíduos de *L. catesbeianus*, se mostrou um excelente biomarcador para o composto piretro, o qual, quando se encontrou associado às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR) não ocasionou alterações do NA provavelmente decorrente da liberação lenta proporcionada pelas NLS, ou seja, o biocida não foi liberado em quantidade suficiente para provocar alterações neste biomarcador, além de que uma possível interação entre os sítios reativos das NLS com os do piretro poder ter ocorrido. Tal fato é interessante, uma vez que isto pode ser uma alternativa para minimização de potencial de toxicidade do piretro. Estudo *in vitro* com células de fibroblastos dos autores Oliveira et al. (2015) mostrou que os herbicidas simazina e atrazina quando encapsulados com as NLS tiveram citotoxicidade reduzida em relação àquela observada para os compostos isolados, mostrando que as NLS podem ser um meio eficiente contra os efeitos desses compostos.

5.2 Diâmetro das miofibrilas

Segundo Salla et al. (2015), as miofibrilas ou fibras cardíacas, encontradas no interior dos cardiomiócitos, são excelentes para avaliar alterações como hipertrofia ou atrofia cardíacas em organismos que foram expostos a variadas substâncias no ambiente. A análise morfométrica (Figura 17) do presente estudo indicou que as miofibrilas dos animais expostos às NLS tiveram

uma redução em seu diâmetro em relação aos valores observados para o grupo CT ($P = 0,0104$) quanto em relação ao grupo PIR ($P = 0,0146$) (Figura 18). Ainda mais interessante foi observar que, quando associadas ao piretro (NLS+PIR) em relação ao CT, o diâmetro das miofibrilas foi maior ($P = 0,4814$) do que o grupo utilizando as NLS isoladamente. Dessa forma, apesar de no nível de organização maior (coração) não ter sido observada uma hipertrofia ou atrofia cardíaca, no nível subcelular (miofibrilas) já foram observadas alterações que poderiam reduzir a força de contração cardíaca (volume sistólico) e, portanto, reduzir o débito cardíaco dos girinos expostos às nanopartículas isoladas. Isso sugere que, a longo prazo, a exposição às NLS pode levar a uma atrofia cardíaca que pode ser revertida pela sua associação ao PIR. Este efeito antagonista é muito surpreendente, pois mostra que, diferentemente de nossa hipótese inicial, as NLS exercem um impacto negativo sobre este biomarcador que pode ser minimizado pelo biocida piretro. O teste de correlação também indicou não haver correlação entre o diâmetro das fibras cardíacas e a MVR em todos os grupos experimentais: CT ($P = 0,061$; $r = -0,860$); PIR ($P = 0,157$; $r = -0,735$); NLS ($P = 0,838$; $r = -0,127$) e NLS+PIR ($P = 0,447$; $r = 0,449$). Não obstante, essa ausência de correlação pode ainda ser explicada pelo fato de que os animais utilizados para a análise da MVR e da fibra cardíaca não terem sido os mesmos.

Figura 17: Micrografias do ventrículo de *L. catesbeianus* indicando as miofibrilas em corte longitudinal (fm), corte transversal (fm*), núcleo (N) e seta indicando as estrias. Marcações das miofibrilas em: A) do grupo controle (D5, D6, D7 e D10); B) do grupo pire piretro (D1, D2, D3 e D4); C) do grupo das nanopartículas (D1, D2, D3, D4) e D) do grupo das nanopartículas associadas ao Piretro (D1, D2, D3, D4, D5 e D6). Coloração: Hematoxilina-Eosina em aumento de 100X.

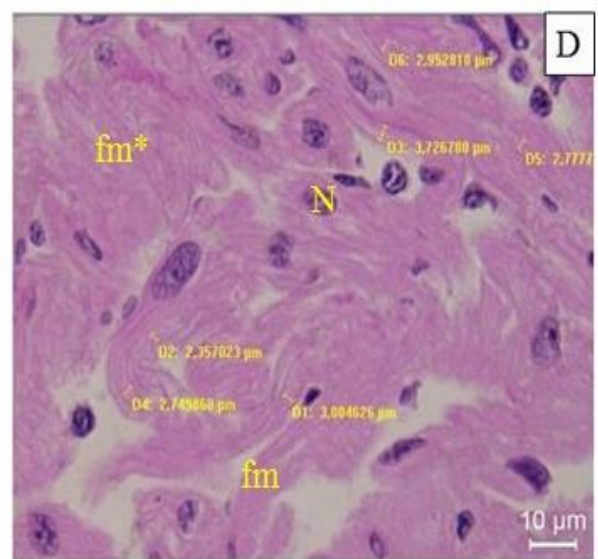
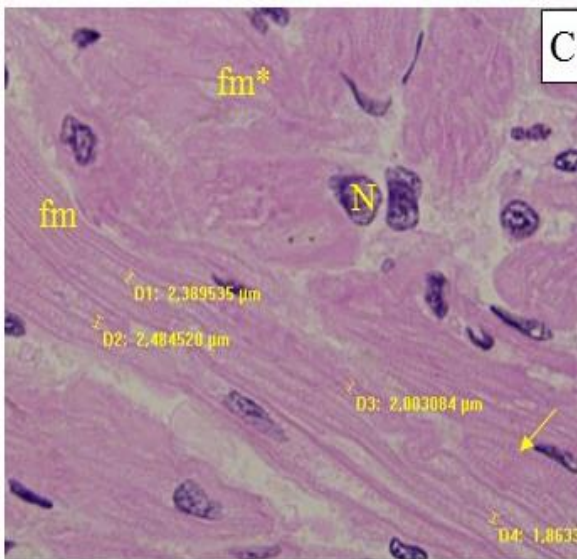
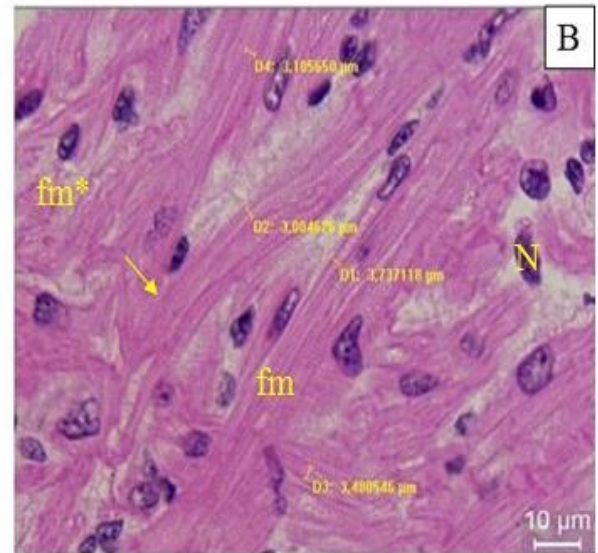
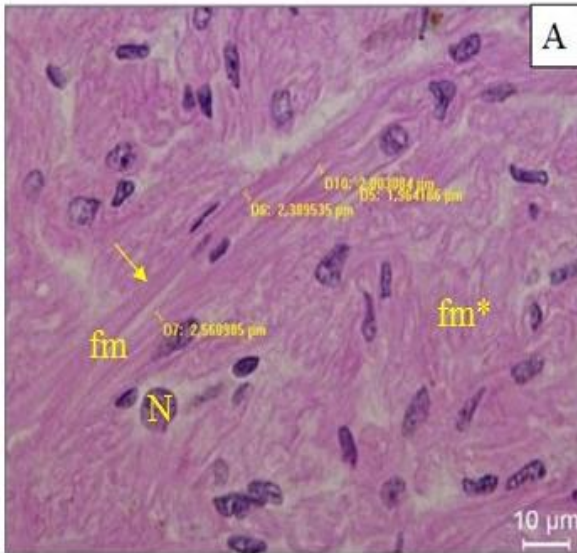
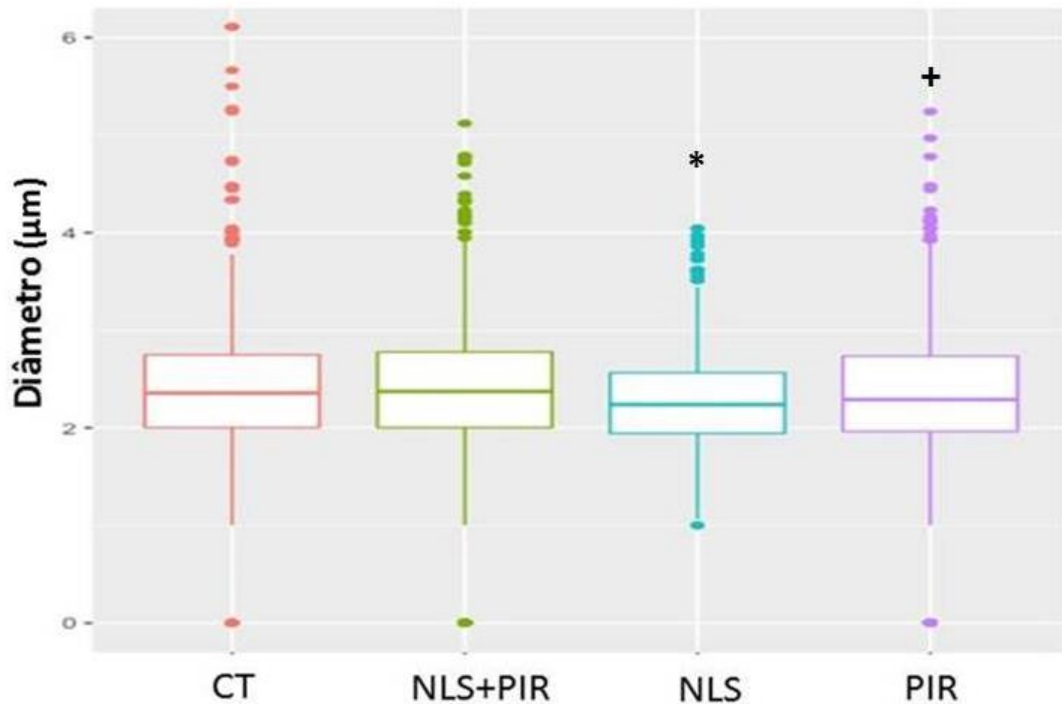


Figura 18: Boxplot da análise morfométrica do diâmetro das miofibrilas do tecido ventricular de *L. catesbeianus* indicando que ocorreu uma diminuição no diâmetro das miofibrilas nos grupos das nanopartículas (NLS) em relação ao controle (CT) ($P = 0,0104$) e ao (PIR) ($P = 0,0146$). O asterisco (*) indica o grupo das NLS que sofreu alteração em relação ao CT e o (+) indica a alteração das NLS em relação ao PIR.



Os mecanismos contráteis, ou seja, as interações actomiosínicas e sua regulação pelo cálcio são muito similares nos diferentes grupos de vertebrados (BERS, 2001). Contudo, a morfologia dos miócitos mostra-se bastante diferente em vertebrados basais (peixes, anfíbios e répteis) e derivados (aves e mamíferos). Em vertebrados basais, os cardiomiócitos apresentam tamanho relativamente menor, além de miofibrilas periféricamente arranjadas (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). Entretanto, os anfíbios apresentam algumas diferenças fisiológicas em relação à origem do Ca^{2+} -ativador, sendo a maior parte oriunda do meio extracelular nesses indivíduos e não do retículo sarcoplasmático (RS), como em mamíferos (TIBBITIS et al., 1991).

Não há estudos sobre a análise do diâmetro das miofibrilas com piretro, tampouco com as nanopartículas lipídicas sólidas. Entretanto, já é sabido 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). Diante do fato de que a f_H não foi alterada, futuros estudos serão necessários para avaliar o efeito desse xenobiótico sobre a contratilidade cardíaca *in vitro* a fim de verificar possíveis ações do mesmo sobre os mecanismos transportadores de Ca^{2+} nos miócitos.

Na literatura há relatos da ação do piretróide deltametrina sobre o tecido cardíaco de ratos, onde foi observada uma desorganização, desgaste e até a ruptura das miofibrilas cardíacas (YALIN et al., 2012), enquanto que em espécie de anfíbio *Rana cameroni* foi observada uma desorganização das miofibrilas após inalação do piretróide cipermetrina (ÇOSKUN et al., 2004). Já em trabalho do autor De la Cerda et al. (2002) foi descrito um aumento da duração do potencial de ação e alterações na dinâmica dos canais de sódio cardíaco 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 Q-T. Porém, inversamente ao relatado na literatura, no presente estudo o grupo que resultou na diminuição do diâmetro das miofibrilas foi o das NLS, as quais provocaram uma redução, não tendo sido observada alteração em tal biomarcador quando expostos ao PIR associado ou não a NLS. Essa alteração para o grupo das NLS isoladas pode ser explicada pelo fato das mesmas, quando isoladas, terem uma maior capacidade de interação com as células, o que pode não ter ocorrido tão facilmente quando se encontrou associada ao composto piretro. Ademais, quando isoladas, as NLS apresentam seus sítios ativos livres, podendo ocorrer interação com compostos celulares que podem ser os responsáveis pela alteração das miofibrilas ventriculares dos girinos de *L. catesbeianus*.

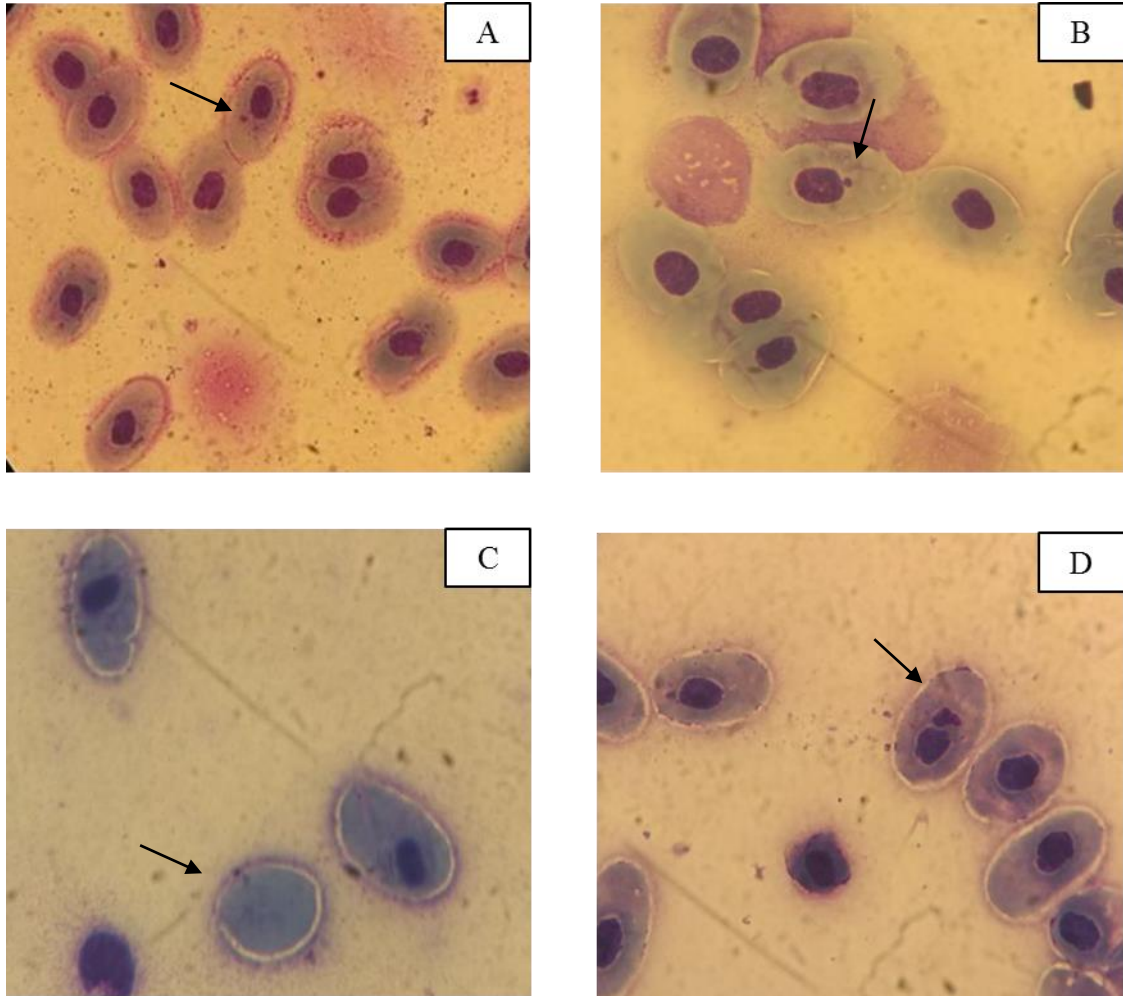
Segundo Barillet et al. (2010), atrofia muscular, alterações como quebra ou desorganização das miofibrilas, além de alterações na sarcolema e no retículo sarcoplasmático, vêm sendo descritas como resposta à exposição a contaminantes, como os pesticidas e os metais. Dessa forma, a análise morfométrica das miofibrilas ventriculares se mostrou precoce e sensível, indicando alterações sobre o tecido cardíaco que foi exposto às NLS.

5.3 Genotoxicidade - teste de micronúcleo (MN) e outras alterações nucleares

Os organismos aquáticos estão em constante contato com variadas substâncias na natureza, entre elas estão as potencialmente genotóxicas, ou seja, capazes de causar alterações no DNA, as quais podem passar para as gerações seguintes (FREIRE et al., 2008). No presente estudo foi observado um aumento na ocorrência de micronúcleos nas hemácias dos girinos expostos tanto às NLS isoladamente quanto quando associadas ao piretro (NLS+PIR) ($F = 11,95$; $P = 0,0001$ e $P = 0,001$ respectivamente), sendo que estas alterações foram maiores quando as NLS foram utilizadas isoladamente, indicando que as mesmas, quando isoladas, são potencialmente mais tóxicas do que quando associadas ao piretro. Em relação ao grupo CT e PIR não ocorreram alterações ($P > 0,05$). Entretanto, a comparação entre os tratamentos, com exceção do grupo CT, mostrou que houve diferenças significativas entre PIR e NLS ($P = 0,0332$).

Em relação às outras anormalidades nucleares, a ocorrência de células binucleadas foi maior nos grupos tratados com NLS com relação ao CT ($F = 3,575$; $P = 0,0452$), enquanto não foram observadas diferenças na ocorrência de células anucleadas ($F = 0,427$; $P > 0,05$) ou com presença de *Bud* ($F = 2,319$; $P > 0,05$) entre os grupos. As setas na figura a seguir (Figura 19) apontam os eritrócitos com micronúcleos e outras alterações nucleares em *L. catesbeianus*.

Figura 19: Alterações nucleares observadas nos eritrócitos de girinos de *L. catesbeianus*. A) presença de micronúcleo; B) alteração nuclear *Bud*; C) célula anucleada; D) célula binucleada. As alterações estão indicadas pela seta preta. Coloração Rosenfeld em aumento de 1000X.



Não há relatos na literatura acerca dos efeitos das NLS associadas ao piretro, tampouco do piretro isolado, sobre a genotoxicidade em quaisquer animais. Entretanto, um estudo desenvolvido por Cola et al. (2016) expondo a cebola (*Allium cepa*) a NLS isolada ou associada a fármacos como a ivermectina e o metopreno indicou um aumento de genotoxicidade em exposição a NLS isoladas em relação aos demais grupos, o que corrobora o efeito genotóxico das NLS observado no presente estudo, já que as NLS isoladas também se mostram mais tóxicas (Figura 20). Dessa forma, o ensaio de micronúcleo e outras alterações nucleares mostrou-se um biomarcador sensível e precoce, indicando efeitos nocivos das NLS mais marcantes do que os observados utilizando os outros biomarcadores avaliados no presente estudo.

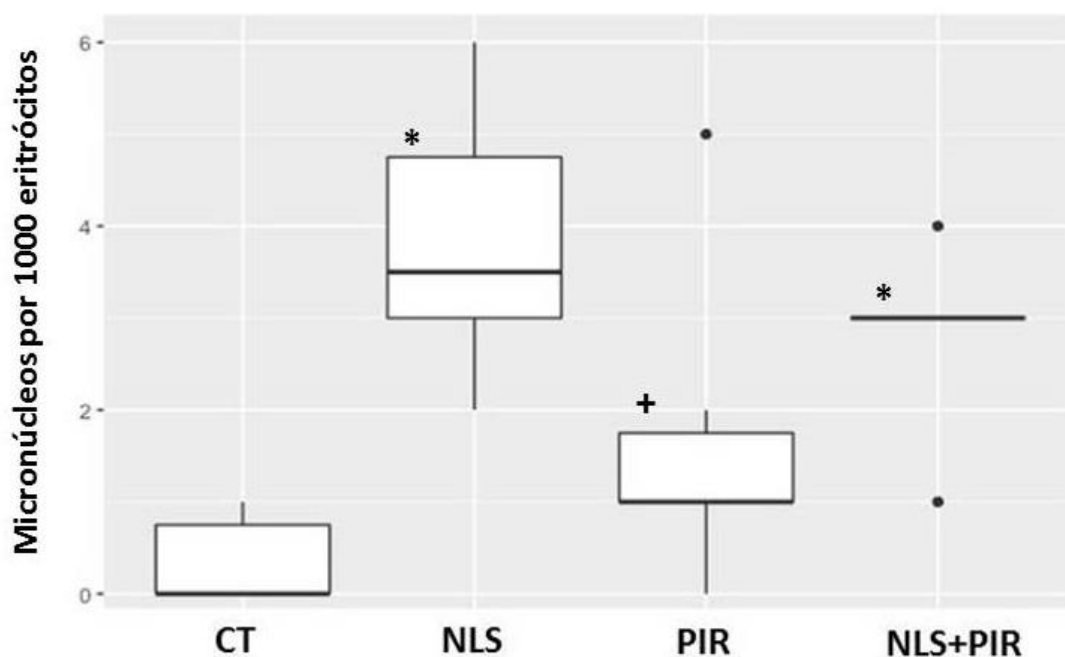
Segundo Doktorovova (2014), a genotoxicidade das NLS pode estar diretamente relacionada ao desencadeamento de estresse oxidativo ocasionado pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são danosas para o material genético e que vem sendo o principal efeito de toxicidade de diversas nanopartículas (JAIN et al., 2016). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs ultrapassa a capacidade das enzimas antioxidantes de prevenir contra os danos ocasionados em decorrência a exposição a compostos químicos (Di GIULIO, NEWMAN, 2012). Isso ocorre principalmente devido a alguns fatores, como tamanho das nanopartículas, sua composição, presença de elétrons reativos, além de interações celulares (JAIN et al., 2016). A indução do estresse oxidativo já foi relatada por Silva et al. (2012) em duas linhagens de fibroblastos expostos a NLS e para piretróides por 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. Outros estudos também analisaram o estresse oxidativo em eritrócitos de espécie de peixe *Channa punctatus* expostos à cipermetrina (ANSARI et al., 2011), em eritrócitos de espécie do peixe *Oreochromis niloticus* expostos à deltametrina (KAN et al., 2012) e por meio de análise de enzimas antioxidantes presentes no plasma de ratos Wistar expostos à cipermetrina (HUSSIEN et al., 2013).

O estresse oxidativo pode ainda diminuir a viabilidade celular (Di GIULIO, NEWMAN, 2012). Essa diminuição da viabilidade das células já foi observada por Cola et al. (2016) quando as NLS se encontravam sem a presença de ativo. Entretanto, quando associadas a fármacos, a viabilidade não foi alterada. Diante disso, o mesmo pode ter ocorrido no presente estudo. Não obstante, mais estudos avaliando os mecanismos pelos quais as NLS provocam genotoxicidade ainda são necessários.

Apesar de ser em geral aceito que os piretróides apresentam uma 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*. Isso também foi comprovado por Campana et al. (1998) para o peixe *Cheirodon interruptus interruptus* exposto à cipermetrina e por Muranli, Güner (2011) para o peixe *Gambusia affinis* exposto à λ -cicalotrina. Já em mamíferos, Chauhan et al. (2007) observaram que o piretróide deltametrina promove um aumento na incidência de micronúcleos em células sanguíneas de medula óssea de camundongos (*Mus musculus*) a despeito de não a ter observado em células germinativas nesta espécie.

De acordo com Santos (2008), em relação aos piretróides, o potencial genotóxico e/ou mutagênico de cada composto depende da sua estrutura química e molecular, assim como da duração da exposição e velocidade de degradação do composto potencialmente tóxico. Isso pode ter sido um fator determinante para ausência de efeitos genotóxicos em resposta à exposição do composto natural piretro no presente estudo. Ademais, quando isolado, esse composto tende a ficar mais instável e volátil, podendo sofrer rápido processo de degradação, o que não acarretaria em alterações genotóxicas. Já quando se encontra associado às NLS, o composto piretro pode ter sua volatilidade e degradação diminuída pela ação das NLS, o que explicaria o aumento de micronúcleo para o grupo das NLS+PIR. Por outro lado, as NLS quando isoladas podem apresentar maior estabilidade e devido ao seu menor tamanho apresenta facilidade em atravessar membranas, podendo chegar mais facilmente à corrente sanguínea, causando alterações como o estresse oxidativo e, portanto, pode causar alterações nos eritrócitos dos girinos de *L. catesbeianus*.

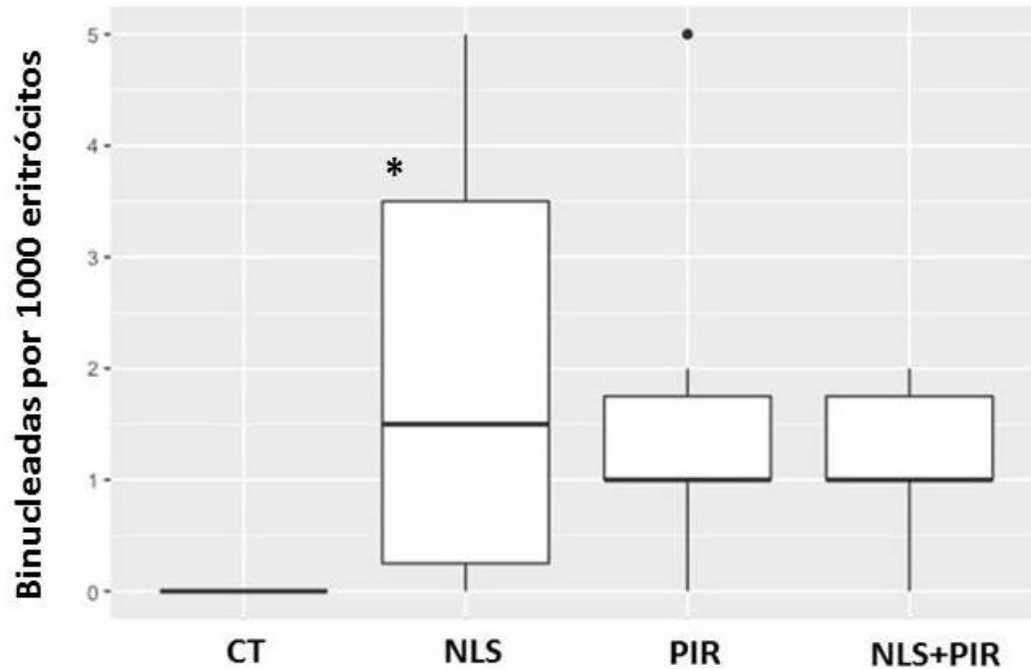
Figura 20: Boxplot indicando aumento de micronúcleo em eritrócitos de girinos *L. catesbeianus* nos grupos expostos a nanopartículas isoladas (NLS) ($P = 0,0001$) e associadas ao piretro (NLS+PIR) ($P = 0,001$) em relação ao grupo controle (CT). Foi também observada diferença entre o grupo piretro (PIR) em relação ao grupo das nanopartículas isoladas (NLS) ($P = 0,0332$). O asterisco (*) indica os grupos das NLS, NLS+PIR que sofreram alterações em relação ao CT e o (+) indica a alteração entre PIR e NLS.



Para as outras alterações nucleares, como presença de células anucleadas, binucleadas e *Bud*, não há relatos sobre a ação das NLS, tampouco para o princípio ativo piretro. Para células binucleadas, já foi observado um aumento em sua ocorrência em girinos de *Odontophrynus americanus* expostos ao piretróide cipermetrina (CABAGNA, 2006), como também para a espécie de peixe *Channa punctatus* exposta à deltametrina (ANSARI et al., 2009), diferente do observado no presente estudo, tendo-se em vista que aqui apenas foram observados aumento do número de células binucleadas no grupo exposto às NLS isoladas (Figuras 21) e não para o grupo do princípio ativo piretro. No estudo de Cola (2016) com *Allium cepa* expostas a NLS associadas ou não a fármacos, foi observado um aumento do índice mitótico para as NLS, indicando um estímulo à divisão celular. Isso pode explicar o aumento de células binucleadas no presente estudo. Assim como discutido para presença de MN, a ausência de aumento do número de células binucleadas para o grupo PIR pode ter ocorrido em decorrência da meia vida do composto natural, não vindo a apresentar alterações nos eritrócitos dos girinos de *L.catesbeianus*.

Outra hipótese para alteração de MN e de células BN pelas NLS poderia vir a ser explicada pela presença de seus componentes, como o surfactante, que é um tensoativo presente tanto nas NLS isoladas quanto associadas, e que pode estar resultando nestes efeitos genotóxicos. Quando as NLS se encontram associadas (NLS+PIR), o surfactante pode ter sua ação alterada pelo biocida piretro, explicando dessa forma as alterações ocorridas especialmente pelas NLS isoladas. Desse modo, o surfactante seria responsável pelos efeitos tóxicos, e não a estrutura lipídica das nanopartículas.

Figura 21: Boxplot indicando aumento de eritrócitos binucleados de girinos *L. catesbeianus* dos diferentes grupos experimentais indicando alteração no grupo das nanopartículas (NLS) em relação ao controle (CT) ($P = 0,0452$). O asterisco (*) indica uma diferença nas nanopartículas isoladas (NLS) em relação ao grupo controle (CT).



Segundo os autores Holland et al. (2008), a presença de células binucleadas pode representar uma resposta de citotoxicidade, já que é indicativa de alterações no processo de citocinese, ou ainda ser secundária a efeitos genotóxicos. Entretanto, não são ainda definidos os efeitos subsequentes do aparecimento desse tipo celular e o que poderia vir a causar nos indivíduos (HOLLAND et al., 2008). Em contraste, não há relatos sobre presença de células anucleadas (Figura 22) as quais já foram analisadas em decorrência de fatores de estresse, patologias e danos metabólicos (FIJAN, 2002), tampouco quanto à presença das alterações nucleares *Bud* (Figura 23) em exposição com piretro ou outros piretróides e as NLS. Entretanto, em exposições mais longas, essas anormalidades poderiam aparecer nos grupos expostos.

Figura 22: Boxplot indicando que não houve variação de eritrócitos anucleados de girinos *L. catesbeianus* nos grupos controle (CT) e expostos (PIR, NLS e NLS+PIR) ($P > 0,05$).

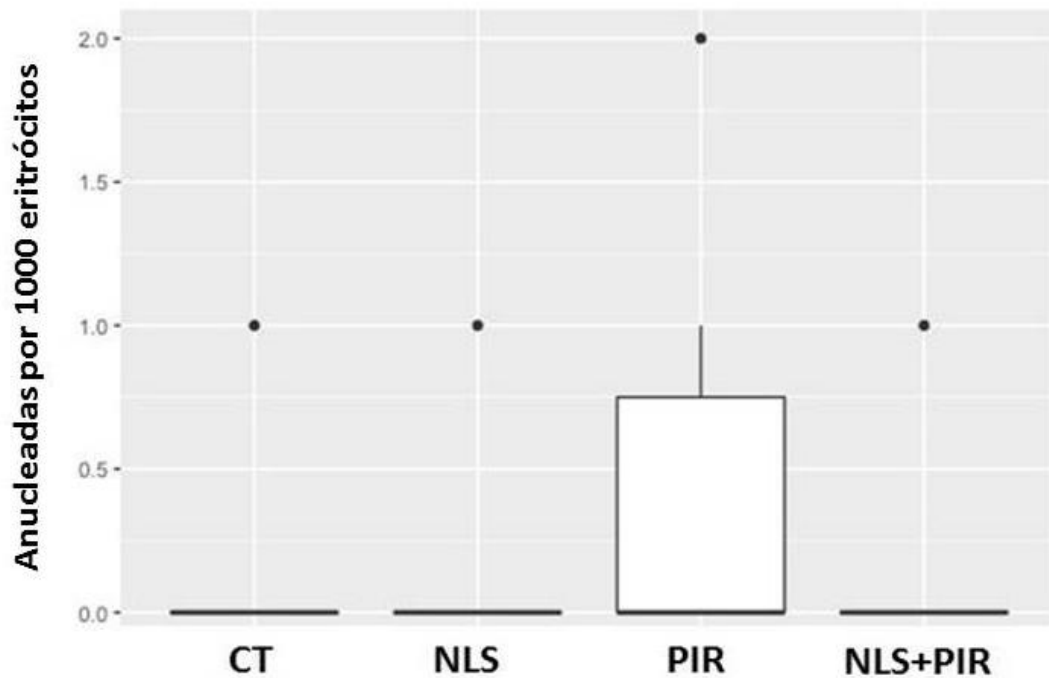
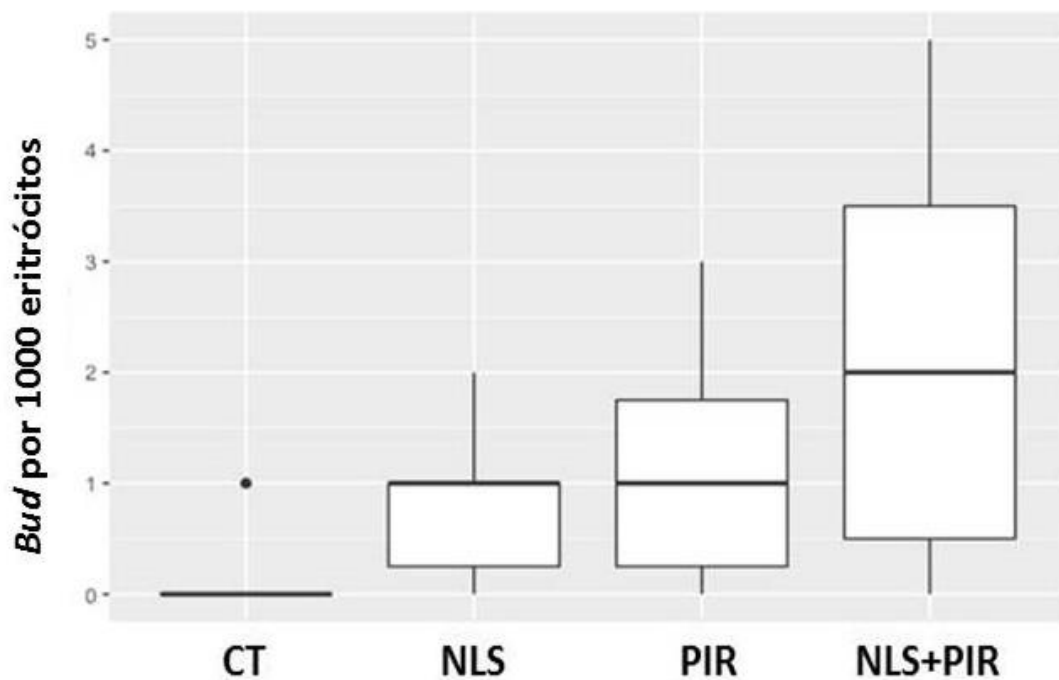


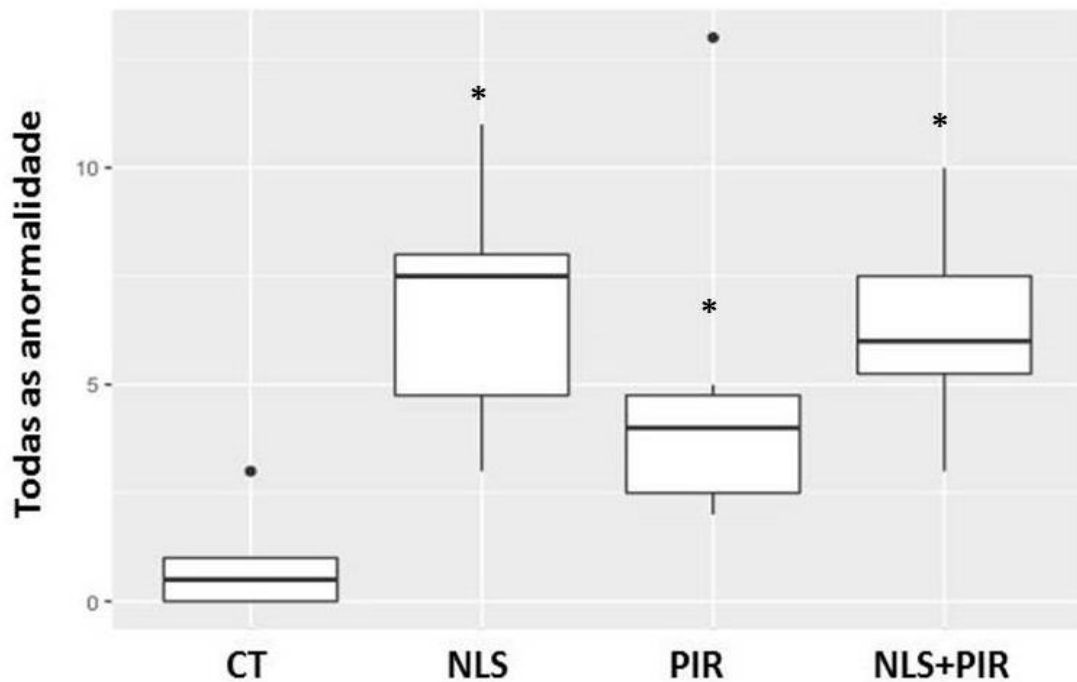
Figura 23: Boxplot indicando que não houve variação de eritrócitos com presença de *Bud* em girinos *L. catesbeianus* entre os grupos controle (CT) e expostos (PIR, NLS e NLS+PIR) ($P > 0,05$).



Todas as anormalidades também foram analisadas em conjunto (Figura 24), pois esta análise conjunta pode nos mostrar os efeitos genotóxicos de forma generalizada dos

tratamentos em relação ao CT. Houve aumento das anormalidades nucleares em todos os tratamentos em relação ao CT ($F = 13,180$; $P < 0,001$), apesar de não ter sido observada diferença entre os grupos expostos ($P > 0,05$). Isso pode ter ocorrido especialmente nos grupos das NLS devido ao provável efeito de internalização das nanopartículas nas células do que em comparação ao PIR.

Figura 24: Boxplot da somatória das alterações nucleares observadas para os eritrócitos de girinos *L. catesbeianus* expostos aos grupos PIR, NLS e NLS+PIR. O asterisco (*) indica que ocorreu aumento de todas as alterações nucleares em relação ao controle (CT) ($P < 0,001$).

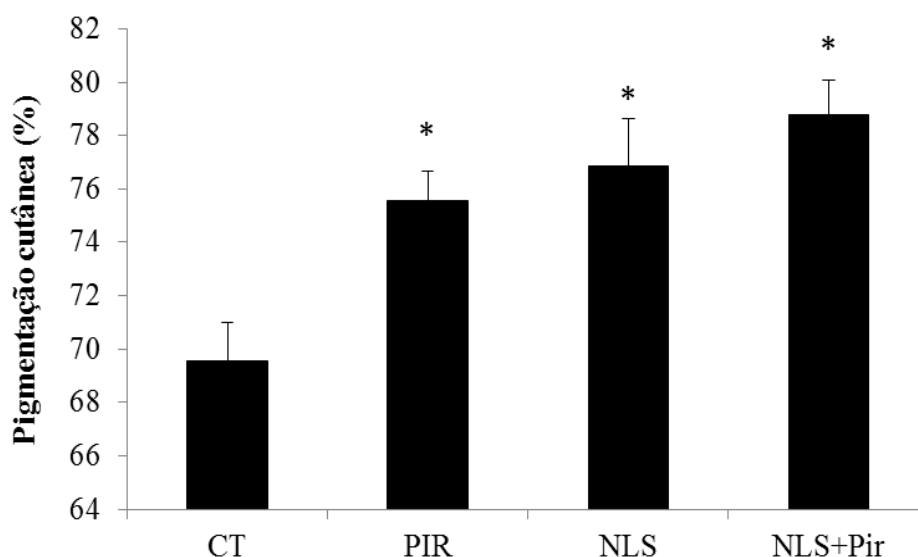


Por fim, de acordo com os resultados apresentados nesse estudo para a genotoxicidade, a exposição durante 48h indicou que os grupos da NLS e NLS+PIR exercem, de fato, um efeito sobre os organismos expostos, especialmente no grupo exposto às NLS isoladas. Essas alterações podem causar danos no material genético, assim como instabilidade genética, o que em longo-prazo pode vir a ocasionar um declínio populacional, assim como surgimento de doenças crônicas nestes indivíduos. Ademais, essas anormalidades nos eritrócitos podem dificultar o transporte de oxigênio, levando-se em conta que já foi relatado a diminuição da concentração de hemoglobina em sangue periférico de ratos albinos após exposição à piretróide cipermetrina pelos autores Pande et al. (2014), sendo assim, fácil correlacionar essas alterações com a diminuição do NA dos indivíduos do grupo PIR em relação ao CT.

5.4 Pigmentação cutânea (*Body darkness*)

Segundo Chaplen et al. (2002), os organismos aquáticos estão susceptíveis a variados contaminantes, os quais são responsáveis por alterar a coloração do tegumento dos indivíduos, sendo que esta mudança ocorre em decorrência de uma resposta de adaptação comportamental sob controle do sistema nervoso simpático ou endócrino (estimulação adrenérgica), mediada ainda, por receptores adrenérgicos presentes na superfície dos cromatóforos, que apresentam pigmentos capazes de alterar a pigmentação corporal. No presente estudo foi observado um aumento da pigmentação ($P < 0,001$) em todos os grupos expostos (PIR, NLS e NLS+PIR) em relação ao CT (Figura 25). Entretanto, não houve diferença da pigmentação entre os grupos expostos ($P > 0,05$). Esse biomarcador não apresentou correlação com os biomarcadores de genotoxicidade, para o teste de micronúcleo nos grupos PIR ($P = 0,782$; $r = 0,146$), NLS ($P = 0,829$; $r = -0,114$), NLS+PIR ($P = 0,632$; $r = -0,250$) e CT ($P = 0,328$; $r = 0,485$), para células binucleadas nos grupos PIR ($P = 0,808$; $r = -0,128$), NLS ($P = 0,245$; $r = -0,562$), NLS+PIR, CT ($P = 0,544$; $r = 0,314$), para células com presença de *Bud* nos grupos PIR ($P = 0,640$; $r = -0,244$), NLS ($P = 0,331$; $r = 0,483$), NLS+PIR ($P = 0,984$; $r = 0,010$), CT ($P = 0,348$; $r = 0,468$), tampouco para as células anucleadas nos grupos PIR ($P = 0,121$; $r = 0,700$), NLS ($P = 0,291$; $r = -0,518$); NLS+PIR ($P = 0,531$; $r = 0,323$) e CT ($P = 0,348$; $r = 0,468$).

Figura 25: Pigmentação cutânea dos grupos expostos ao piretro (PIR), a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e a nanopartículas associadas ao piretro (NLS+PIR) em relação ao controle (CT). Os asteriscos acima das barras denotam diferença significativa ($P < 0,001$) dos tratamentos em relação ao controle. Todos os grupos expostos apresentaram maior pigmentação cutânea que o controle.



Os cromatóforos são células presentes na epiderme e derme que contêm grânulos de pigmento. Essas células podem ser classificadas quanto ao seu conteúdo pigmentar. Entre os existentes estão os melanóforos, que são células que contêm pigmento melanina que fica armazenado em grânulos denominados melanossomos, onde a própria célula é responsável pela sua produção (DUKOVICIC et al., 2010). Esse pigmento presente nas organelas é o responsável por alterar a coloração dos organismos por meio da resposta de agregação ou dispersão (DUKOVICIC et al., 2010), tornando os organismos mais ou menos escuros (MASSAGAKI, FUJII, 1999; LOGAN et al., 2006), o qual é um processo denominado de mudança fisiológica da cor (FUJII, 2000; SUGIMOTO, 2002).

Segundo Kaur, Dua (2015), a mudança de pigmentação tegumentar dos indivíduos aquáticos em seu habitat natural é extremamente importante para sua sobrevivência, pois possibilita a proteção contra predadores, aumentando as chances de alimentação e a sobrevivência dos organismos, já que a alteração da coloração pode dificultar o reconhecimento dos indivíduos pelos predadores, além de protegê-los por meio da regulação do calor contra raios UV e de substâncias ou de seus metabólitos conferindo-lhes, por fim, maior proteção (SUGIMOTO, 2005). Entretanto, essas células sofrem alterações em resposta a estímulos internos e/ou externos, ocorrendo, desta forma, alteração de coloração nos indivíduos que podem vir a não ser benéficas (SUGIMOTO, 2005).

Dentre os estímulos externos, vale destacar a exposição às substâncias tóxicas (CÉSARINI, 1996; SUGIMOTO, 2005). Isso foi confirmado por Kapil et al. (2008) que constataram a ação dispersiva dos cromatóforos logo nas primeiras horas de exposição à cipermetrina no peixe *Channa punctatus*, o que também foi analisado no presente estudo, onde tanto o piretro quanto as NLS isoladas ou associadas agiram como estressores sobre os girinos de rãs-touro, promovendo um aumento da pigmentação em todos os animais expostos em relação ao grupo controle. Essa alteração da pigmentação nos grupos tratados, tanto isolados quanto associados, pode ter ocorrido especialmente pelo fato da pele de anfíbios ser altamente permeável facilitando, deste modo, a entrada de contaminantes. Lembrando que, em mamíferos, a absorção de piretróides pela pele é menor do que por outras vias, como a inalação e/ou pela via gastrointestinal (SANTOS, AREAS, REYES, 2007). Já em relação às NLS, elas apresentam capacidade de absorção pela pele ou muco (MULLER et al., 2002) e, assim como para o piretro, seu transporte pode também ter facilitado por membranas e tecidos, o que explicaria a alteração da pigmentação, especialmente quando associada ao piretro NLS+PIR, no qual se mostrou mais tóxica.

Outros autores como Montanha et al. (2014) e Sathya (2014) observaram uma diminuição total ou parcial da pigmentação cutânea em espécies de peixes *Rhamdia quelen* e *Danio rerio* expostos ao piretróide cipermetrina. A diferença entre os resultados obtidos em tais estudos com relação ao nosso pode ser atribuída a diferentes mecanismos fisiológicos entre as espécies estudadas, além da duração do experimento, classe de piretróide e/ou concentração do mesmo que podem ter influenciado nas diferentes respostas.

A regulação dos melanóforos em peixes, assim como a mudança da pigmentação dos organismos, ocorre por meio da estimulação adrenérgica (BURTON, 2002), especialmente pela estimulação dos β -adrenoreceptores pela noradrenalina, que provoca a dispersão dos melanossomos, que correspondem às organelas pigmentares (MYASHITA, FUJII, 1975; BURTON, 2002). Quando ativados, receptores β -adrenérgicos estimulam a produção de AMPc, responsável pela regulação das proteínas motoras do citoesqueleto que movem os melanossomos no interior dos melanóforos, fazendo com que ocorra a dispersão e conseqüente escurecimento cutâneo (SKOLD et al., 2016). Com isso, o estresse oriundo da exposição dos animais aos compostos utilizados no presente estudo pode ter gerado uma resposta adrenérgica com liberação nervosa ou humoral de catecolaminas, estimulando os β -adrenoreceptores. Instigante, portanto, foi o fato de não ter sido observada uma taquicardia nos animais expostos a todos os compostos em relação ao controle, uma vez que pela alteração da pigmentação ficou demonstrado que houve a liberação de catecolaminas. Mais estudos terão que ser realizados para procurar desvendar esse contrassenso. Não obstante, a menor responsividade ou até a irresponsividade de alguns biomarcadores em relação a outros já anteriormente citados deve ser considerada. Nesse sentido, uma hipótese plausível seria que a concentração limiar de catecolaminas necessária para ocasionar o aumento da pigmentação da pele seja muito menor que aquela necessária para provocar uma taquicardia. Entretanto, futuros estudos utilizando agonistas e antagonistas β -adrenérgicos são necessários para corroborar esta hipótese.

Essas mudanças na pigmentação cutânea dos indivíduos podem ainda ser denominadas morfológicas, quando estas alterações ocorrem de forma gradativa e permanecem por mais tempo, ou ainda pode ocorrer de forma fisiológica, quando este processo ocorre imediatamente em resposta ao estímulo devido à migração dos pigmentos presentes no interior dos cromatóforos (BAGNARA, HADLEY 1973; SUGIMOTO, 2002). O processo de alteração da pigmentação pode ainda necessitar de maior demanda energética, já que ocorre processo de migração das organelas, além de síntese ou recrutamento de pigmentos (POLO-CAVIA, GOMEZ-MESTRE, 2016). Dessa forma, mesmo que essa alteração seja vantajosa para os animais, a energia necessária para a desintoxicação, eliminação e reparo dos danos ocasionados

pela exposição aos compostos pode estar sendo desviada para o processo de pigmentação, podendo prejudicá-los na resposta de fuga do ambiente estressante, no crescimento e metamorfose dos indivíduos e ainda os tornando-os ainda mais susceptíveis à predação. Tal assertiva é especialmente válida para os animais expostos ao piretro, uma vez que os mesmos se mostraram também mais letárgicos. Portanto, a avaliação da alteração da pigmentação cutânea também se mostrou um biomarcador altamente sensível. Por se tratar de uma metodologia relativamente simples e pouco custosa, mostra-se uma excelente ferramenta para indicar alterações ambientais ocasionadas por contaminação de substâncias tóxicas.

5.5 Pigmentação Interna do Coração

Em animais ectotérmicos como peixes e anfíbios (Gallone et al., 2002), as células pigmentadas não estão presentes apenas na derme e epiderme, mas também em órgãos e tecidos internos, constituindo, desta forma, o sistema pigmentar extra cutâneo destes indivíduos. Esse sistema pigmentar pode estar presente em órgãos como o fígado, as gônadas, baço, porções do intestino, nos vasos sanguíneos, como também no coração (PRELOVSEK, BULOG, 2003; SANTOS, OLIVEIRA, 2007). Portanto, da mesma forma que a pigmentação cutânea, a pigmentação visceral também pode ser alterada em decorrência de mudanças fisiológicas e/ou ambientais (AGIUS, AGBEDE, 1984), como exposições a substâncias contaminantes (GALLONE et al., 2002), as quais podem causar alterações na fisiologia e/ou morfologia dos melanócitos (OLIVEIRA et al., 2017). Tais alterações foram observadas no presente estudo, já que a pigmentação do coração dos indivíduos do grupo PIR diminuiu ($P = 0,0338$) em relação ao CT (Figura 27). A pigmentação do coração dos grupos CT e expostos pode ser observada na Figura 26.

Para o teste de correlação entre os biomarcadores de pigmentação do coração e de genotoxicidade houve uma correlação inversa para as NLS+PIR em relação aos micronúcleos ($P = 0,012$; $r = -0,908$) e para células anucleadas ($P = 0,004$; $r = 0,943$), onde pode ser observada uma diminuição na pigmentação enquanto ocorreu aumento de presença de micronúcleo e de células anucleadas para esse grupo. Não houve correlação para os grupos PIR ($P = 0,770$; $r = 0,153$), NLS ($P = 0,140$; $r = 0,675$) e CT ($P = 0,521$; $r = -0,330$) em relação aos micronúcleos, assim como também, os grupos PIR ($P = 0,813$; $r = -0,124$), NLS ($P = 0,603$; $r = -0,271$) e CT ($P = 0,851$; $r = 0,099$) não apresentaram correlação com as células anucleadas. Para a presença de *Bud*, não houve correlação com a pigmentação para todos os grupos

expostos PIR ($P = 0,703$; $r = 0,200$), NLS ($P = 0,738$; $r = 0,769$), NLS+PIR ($P = 0,456$; $r = -0,380$) e para o CT ($P = 0,456$; $r = -0,380$), tampouco para as células binucleadas em todos os grupos PIR ($P = 0,528$; $r = 0,326$), NLS ($P = 0,353$; $r = -0,464$), NLS+PIR ($P = 0,740$; $r = -0,175$) e CT ($P = 0,334$; $r = -0,480$).

Figura 26: Análise da pigmentação do coração de *L. catesbeianus* coradas com H.E, indicando na seta (preta) a presença de pigmento melanina. A) grupo controle (CT); B) grupo piretro (PIR); C) grupo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e D) grupo das nanopartículas associadas ao piretro (NLS+PIR). Coloração: hematoxilina – eosina em aumento de 100X.

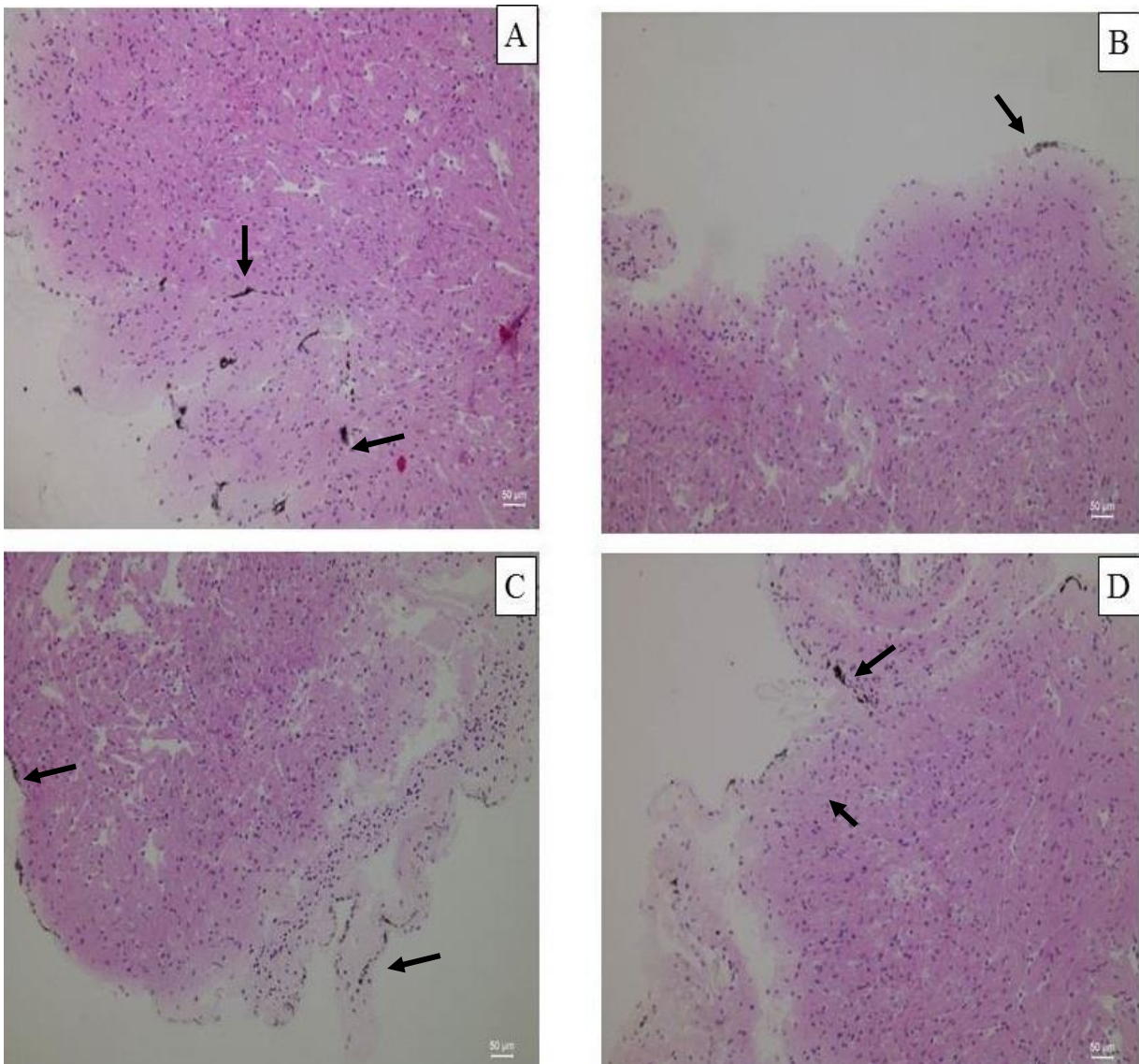
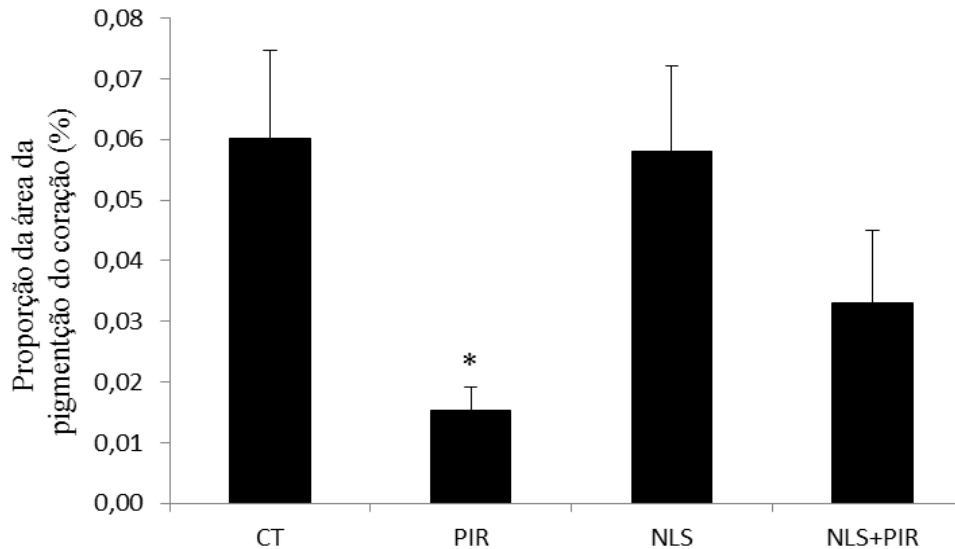


Figura 27: Proporção da pigmentação interna do coração nos diferentes grupos experimentais. O grupo PIR apresentou diminuição da pigmentação em relação ao grupo CT ($P = 0,0338$). O asterisco (*) denota uma diferença significativa do PIR com relação ao controle (CT).



Os melanócitos viscerais, células responsáveis pela pigmentação interna, são originados da crista neural ectotérmica (COLOMBO et al., 2011) e, segundo Gallone et al. (2002) sua função ainda não está definida. Entretanto, existem diversas hipóteses acerca da função desempenhada pela pigmentação (melanina) nos diferentes órgãos internos nos quais está presente, dentre elas a desintoxicação de substâncias contaminantes, as quais ocorrem em células melanomacrofágicas que apresentam ação fagocitária e que estão presentes no fígado e no baço (FENOGLIO et al., 2005), a participação no sistema imune (SKOLD et al., 2016) e a função protetora de células contra a formação de radicais livres e/ou sua neutralização (McGRAW, 2005), onde a melanina atua como antioxidante, protegendo contra danos nas moléculas de DNA (FRANCO-BELUSSI, SKOLD, OLIVEIRA, 2016). Diante disso, um aumento da pigmentação visceral poderia potencialmente reduzir os efeitos genotóxicos dos xenobióticos. Embora a função da pigmentação ainda não esteja definida, sabe-se que contaminantes ambientais podem alterá-la (GALLONE et al., 2002). Contudo, há outras variáveis ambientais que podem alterar a pigmentação interna em anfíbios anuros, como mudanças da temperatura e fotoperíodo, principalmente devido à capacidade do pigmento melanina em absorver radiação e transformá-la em calor (CESARINI, 1996; MORIYA et al., 1996), e é por meio da absorção da radiação e sua transformação em calor que a melanina também atua como protetora contra os danos causados no DNA em decorrência da exposição ao UV (ROULIN, 2014), a qual é também responsável por alterar a pigmentação da pele e de órgãos em anuros adultos (FRANCO-BELUSSI, SKOLD, OLIVEIRA, 2016). Em estudo de

Moresco (2009) avaliando a pigmentação visceral de espécies de anfíbios como *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus nanus* e *Rhinnele schneideri* submetidos à variação de temperatura e fotoperíodo, foi descrito um padrão de pigmentação nos diferentes órgãos das espécies utilizadas indicando, portanto, que a mesma pode variar de acordo com a taxonomia. Assim sendo, o sistema pigmentar pode variar em tipo de pigmento, quantidade e ocorrência, dependendo da espécie (PRELOVSEK, BULOG, 2003; SANTOS, OLIVEIRA, 2007).

Na literatura não há relatos sobre a ação do piretro e das NLS sobre a pigmentação interna do coração, mas há relatos da ação dos piretróides sobre o baço, onde foi observado um aumento e agregação de melanomacrófagos após exposição à deltametrina no peixe *Hypophthalmichthys molitrix* (KARIM, AHMAD, ALI, 2016). Contudo, isso não foi corroborado no presente estudo, já que houve uma diminuição da pigmentação do grupo PIR, o qual quando associado às NLS não apresentou alterações da pigmentação em relação ao grupo CT.

A regulação da produção de melanina ocorre por meio da ação do hormônio MSH (hormônio estimulante do melanócito), um peptídeo liberado pela adenohipófise (CASTRUCCI et al., 1984; HADLEY et al., 1985). Baseando-se nos efeitos centrais já descritos para o PIR, pode-se sugerir que este biocida provoque uma redução ou inibição da produção e/ou secreção de MSH, fazendo com que ocorra a diminuição da produção de melanina no órgão coração quando se encontra isolado. Em contrapartida, quando associado às NLS, essa redução ou inibição do hormônio pode não ter ocorrido, podendo indicar que as NLS minimizaram os efeitos do biocida. Será interessante testar esta hipótese em futuros estudos.

Para o teste de correlação entre os biomarcadores e pigmentação cutânea não houve correlação com a pigmentação cardíaca dos organismos para os grupos PIR ($P = 0,398$; $r = -0,426$), NLS ($P = 0,899$; $r = -0,066$), NLS+PIR ($P = 0,917$; $r = 0,055$) e CT ($P = 0,944$; $r = -0,0369$). Entretanto, a proposição de que a pigmentação cutânea protege os tecidos internos dos danos ocasionados pelo piretro foi corroborada pela redução da pigmentação visceral dos animais expostos ao piretro, que foram inversamente proporcionais. Da mesma forma, pode-se propor que, devido aos demais grupos (NLS e NLS+PIR) terem também apresentado um aumento da pigmentação cutânea, não foi necessário um aumento da pigmentação visceral cardíaca nestes grupos a fim fornecer uma proteção adicional contra os efeitos nocivos de tais compostos. Contudo, interessante é o fato de que nesse caso, as NLS quando associadas ao PIR, reverteram a redução da pigmentação cardíaca observada para o PIR isoladamente. Não se sabe em qual extensão o aumento aqui observado na pigmentação cutânea dos indivíduos expostos aos xenobióticos estudados pode tornar os girinos mais susceptíveis a predadores

naturais no seu ambiente natural, mas há que se supor que uma alteração na pigmentação corpórea deve ter algum impacto na capacidade de camuflagem destes animais. De qualquer forma, o presente estudo mostrou que tanto a análise da pigmentação cutânea quanto da visceral são excelentes ferramentas para análise dos efeitos de contaminantes ambientais em anfíbios anuros.

A Tabela 6 apresenta um resumo sistemático dos principais efeitos do PIR e das NLS, tanto isolados quanto associados, sobre os diferentes marcadores aqui utilizados. Pela análise da Tabela 6 fica evidente que, enquanto alguns biomarcadores foram irresponsivos ao xenobióticos e sua combinação (e.g., massa ventricular relativa, frequência cardíaca *in situ*, ocorrência de *Buds* ou de células anucleadas), outros (e.g. nível de atividade e pigmentação cardíaca) foram somente responsivos ao piretro ou somente às nanopartículas (diâmetro das miofibrilas e ocorrência de eritrócitos binucleados). Para os micronúcleos, o efeito genotóxico promovido pela nanopartículas isoladas ainda foi observado quando o mesmo foi associado ao piretro e, por fim, todos os grupos experimentais apresentaram um aumento da pigmentação corpórea, isolados ou associadamente. Tais resultados ressaltam a relevância de se utilizar uma ampla variedade de biomarcadores em diferentes níveis de organização. Ademais, fica claro que ambos os xenobióticos podem exercer efeitos deletérios em anfíbios por diferentes mecanismos mesmo após uma exposição rápida a uma concentração subletal dos mesmos.

Tabela 7: Resumo sistemático dos resultados observados para os diferentes biomarcadores para os grupos expostos, comparando-os com seus respectivos controles, MVR: massa ventricular relativa; f_H : frequência cardíaca; NA: nível de atividade; MF: miofibrila ventricular; PB: pigmentação cutânea; PH: pigmentação cardíaca.

Biomarcadores	PIR	NLS	NLS+PIR
<i>Morfofisiológicos</i>			
MVR	-	-	-
f_H	-	-	-
NA	↓	-	-
MF	-	↓	-
PB	↑	↑	↑
PH	↓	-	-
<i>Genotoxicidade</i>			
MN	-	↑	↑
BN	-	↑	-
AN	-	-	-
<i>Bud</i>	-	-	-

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos após exposição dos girinos *L. catesbeianus* por 48h a uma concentração subletal do composto piretro e de nanopartículas, isolados ou associados, demonstraram que a sensibilidade dos diferentes biomarcadores aos compostos foi variável, o que poderia levar a conclusões errôneas acerca da ocorrência ou não de um impacto negativo dos diferentes compostos ou de um efeito minimizador das NLS sobre a toxicidade do PIR. Os biomarcadores de MVR e f_H não foram responsivos nesse estudo, o que pode ter ocorrido em consequência da baixa concentração utilizada ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$) e/ou do curto período de exposição (48h). Já o biocida piretro apresentou diminuição do nível de atividade e da pigmentação do coração, tendo seus efeitos tóxicos diminuídos quando associados as NLS. Em contrapartida, as NLS se mostraram mais tóxicas quando isoladas para os biomarcadores de genotoxicidade, aumentando micronúcleos e células binucleadas, assim como também, para o biomarcador de diâmetro de miofibrila, no qual apresentou redução. Entretanto, quando as NLS estiveram associadas ao piretro (NLS+PIR), tiveram seus efeitos tóxicos diminuídos para esses biomarcadores. Já o biomarcador de pigmentação tegumentar foi o mais sensível nesse estudo, no qual todos os grupos expostos tiveram aumento da pigmentação, mostrando que os grupos expostos podem ter gerado uma resposta de estresse sobre os receptores β -adrenérgicos, além de que é o biomarcador com maior relevância ecológica, já que para essa análise não é necessário a eutanásia dos indivíduos. Por fim, as NLS utilizadas nesse estudo precisam ser melhor avaliadas para se saber o que de fato ocasiona os efeitos tóxicos nos organismos, para que assim, possam ser utilizadas como carreadores de substâncias, no qual o objetivo é diminuir os efeitos tóxicos de biocidas no ambiente e para os organismos não-alvos. Além de que, essas alterações ocasionadas pelos xenobióticos utilizados no presente estudo, podem a longo prazo ocasionar declínio da espécie, podendo prejudicá-los não somente no mecanismo de fuga dos indivíduos aos xenobióticos, o que os tornam mais susceptíveis aos predadores, como também alterar o processo de crescimento e metamorfose desses organismos.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, F.C et al. The impact of cadmium chloride on the gonadal morphology of the North American bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Fresenius Environmental Bulletin**. v.22, p.1962-1966. 2013.

ADAMS, M.J. Correlates factors in amphibian decline: exotic species and habitat change in western Washington. **Journal of Wildlife Management**. v.63, p.1162-1117. 1999.

AGIUS, C.; AGBED, S.A. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and hemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**. v.24. p.471-488. 1984.

AGOSTINI, G. M.; NATALE, G. S.; RONCO, A. E. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. **Ecotoxicology**. n. 19, p.1545-1550. 2010.

AKTAR, M.W; SENGUPTA, D; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Eletronic Database: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2984095/>>. Journal list, **Interdisciplinary toxicology**, 2009. Acesso em: 2 Mar 2016.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. In: **ANNUAL Book of Standarts**. [S.l.: s.n.], n.11, p. 220-240. 2000.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). Report of the AVMA Panel on Euthanasia. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 218, n.5, p. 669-696, Mar. 2001.

AMPHIBIA WEB. Science Zone of The Dasa. Disponível em:< <https://amphibiaweb.org/> > Acesso em: 20/02/2018.

ANDRADE WALDEMARIN, K. Cooper sulfate affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cardiomyocytes structure and contractile function. **Ecotoxicology**. v.21, p. 783-794. 2012.

ANELLI-JR, L.C. Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup sobre função cardiorespiratória de matrinxã *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). 2010. 91 f.

Tese (Doutorado Ciências Fisiológicas) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos- SP, 2010.

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* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.74, p.150-156. 2011.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro. v.12, n.1. 2007.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.T. ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**. v.30, n.5, p. 119-1127. 2007.

BAGNARA, J.T. e HADLEY, M.E. Chromatophores and color change, the comparative physiology of animal pigmentation. **The Quarterly Review of Biology**, v. 49, n. 2, p. 159-160. 1973.

BALINT, T. et al. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous metidation and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**. v. 33, p. 279-295, 1995.

BARBOSA, A.L; CARRER, H; RAMIRO, D.A. **Biotechnology in agriculture**. v. 24. n.70. São Paulo. 2010.

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.

BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida e micro extração em fase sólida de piretróides em água. **Química Nova**. v.24, p. 172-175. 2001.

BELLUTA, I; SILVA, M.A.M. Vulnerabilidade natural do córrego do Cintra frente aos pesticidas – um estudo de caso. **Revista energia na agricultura**. Botucatu, V, 23, n.2. 2008.

BERNARDI, M.M. et al. In: SPINOSA, H. de S.; GÓMIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, p. 942. 2008.

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

BILIA, A.R. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 14, p. 1-14. 2014.

BLAUSTEIN, A.R.; D.B. Wake. Declining amphibian populations: A global phenomenon? **Trends in Ecology & Evolution**. p.5203. 1990.

BLAUSTEIN, A.R. UV-B Radiation and Amphibians Decline. **Oregon State University**. 2004. Disponível em: <<http://www.amphibiaweb.org/declines/UV-B.html>> Acesso em 24 Mar 2016.

BLAUSTEIN, A.R. et al. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Science**. v.1223, p.108–119. 2011.

BLOOMQUIST, J.R. Ion Channels as target for insecticides. 1996. In: MOREIRA, M. D; PICANÇO, M. C; SILVA, E. M; MORENO, S. C; MARTINS, J. C.; Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. p. 1-27. 2013.

BLOOMQUIST, J.R. Insecticides: chemistries and characteristics. In: SANTOS, M.A.T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349.2007.

BOLOGNESI, C. et al. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**. v.78, n.1, p.93-98. 2006.

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

BRACK, P. Novos riscos resultantes dos transgênicos na agricultura. Notícias Ambientais. **Eco Agência**. 2013. Disponível em: <<http://www.ecoagencia.com.br/?open=artigo&id===AUUJkRZxGZHNIraNVTWJVU>>.

Acesso em: 27 Mar. 2016.

BRIDGES, M.; SEMLITSCH, R.D. Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. **Conservation Biology**. v.14, p.1490-1499. 2000.

BURGGREN, W.W., FEDER, M.E., PINDER, A., Temperature and the balance between aerial and aquatic respiration in larvae of *Rana berlandieri* and *Rana catesbiana*. **Physiological Zoology**. v. 56, p. 263-273. 1983.

BURY, R, B. WHELAN, J.A. Ecology and management of the bullfrog. U.S. **Fish and Wildlife Service Resource**. Publication, 155.

BURTON, D. The physiology of flatfish chromatophores. **Microscopy Research and Technique**. v. 58, n. 6, p. 481-487. 2002.

BUSS, F. D.; OLIVEIRA, B. R.; BAPTISTA, F. D. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 339-345, 2008.

CABAGNA, C.M et al. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibian Leptodactylidae) by the pirethroid inseticid cypermethrin. **Toxicological & Environmental Chemistry**. v. 88, n. 4. p.729-737. 2006.

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.

CASTRUCCI, A.M.L.; HADLEY, M.E.; HRUBY, V.J. Melanotropin Bioassays: In vitro and in vivo comparisons. **General and Comparative Endocrinology**. v.55, p.104-111. 1984.

CHAPLEN, F.W.R. et al. Fish chromatophores as cytosensors in a microscale device: detection of environmental toxins and bacterial pathogens. **Pigment Cell Research**. v.15, p.19-26. 2002.

CARISSON, G et al. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**. v.126, p.30-41. 2013.

CÉSARINI, J. P. Melanins and their possible roles through biological evolution. **Advances in Space Research**. v. 18, n. 12, p. 35-40. 1996.

CHAUHAN, L.K. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprotruron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.48, n.8, p.636-46. 2007

CHEN, Z.; WANG, Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography**. v.754, p.367-395. 1996.

CHEN, C.C, et al. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.74, p.474-482. 2010.

CHEN, H., YADA, R. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. **Trends in Food Science and Technology**. v, 22, p585-594. 2011.

CHENG, H. N.; KLASSON, K. T.; ASAKURA, T.; Wu, Q. Nanotechnology in Agriculture. In *Nanotechnology: Delivering on the Promise Vol. 2*; ACS Symposium Series; **American Chemical Society**. v. 1224, p. 233–242. 2016.

CHEM SERVICE. Safety Data Sheet – Pyrethrum. 2016. Disponível em: <http://cdn.chemservice.com/product/msdsnew/External/English/S13151T1%20English%20S DS%20US.pdf>. Acesso em: 4 Mai 2016.

COLA, D.F. Nanopartículas lipídicas como sistemas carreadores para ivermectina e metopreno visando aplicações em veterinária. Dissertação em Ciências Ambientais. Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho. Sorocaba. 2016.

COLA, D.F. et al. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**. v.39. n 9. p.1034-1043, 2016.

COLLINS, J.P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases of Aquatic Organisms**. v.92, p.93–99. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3354/dao02307>. Acesso em: 19 Fev. 2018.

COLLINS, J.P, CRUMP, M.L. Extinction in our times. Global amphibians decline. **Oxford University Press**. Oxford. 2009.

COLLINS, J.P., STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity & Distributions Journals** v.9, p.89–98. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x>. Acesso em: 18 Fev. 2018.

COLOMBO, S.; BERLIM, L.; DELMAS, V.; LARUE, L. Classical and non- classical melanocytes in vertebrates. In melanies and melanossomes: **Biosynthesis, Biogenesis, Physiological and Phatological functions**, Germany. Welhein. v.1. p.21-62. 2011.

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, M.J. et al. Effects of the organophosphorus pesticide folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). 2007.

COX, C. Pyrethrins/Pyrethrum Insecticides Factsheet. **Journal of Pesticide Reform**. v.2. n.1. p.14-20. 2002.

CUNHA, E.R., DELARIVA, R.L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw,1802): Uma revisão. **Revista de Saúde e Biologia**. v.4. n.2. p.34-46. Jul/dez. 2009.

ÇALISCAM, M.; ERKMEN, B.; YERLI, S.V. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulates*. In: Efeitos toxicológicos de piretróides (Cipermetrina e Deltametrina) em peixes – revisão. Ano XI, n. 18. 2012.

ÇOSKUN, B. et al. Evaluation of the toxic effects of cypermethrin inalathion 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.

DAS, S., CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS Pharmacology and Science Technology**. v. 12 n. 1. p 62-76. 2011.

DAS, B.K, MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic, and hematological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C. v.134. p.109-121. 2003.

DAVIDSON, C; SHAFER, H.B, JENNINGS, M.R. Spatial test of the pesticide drift, UV-B and climate-change hypotheses for California Amphibians declines. In: RELYEA, R.A. Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. **Ecological Applications**. v.13, n. 6. p. 1515-1521. 2003.

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.

DASGUPTA, A. et al. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. **Food Research International**. v. 69, p. 381-400. 2015.

DEJONCKHEERE, W. et al. Permetrin and deltamethrin residues on lettuce. Pestic. 1982. In: SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides: uma visão geral. **Alimentação e Nutrição**. Araraquara. v. 18. n. 3. 2007.

DEN BESTEN, P.J. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. **Marine Environmental Research Journal**. v. 46, p. 252-256. 1998.

Di GIULIO, R.T; NEWMAN, M.C. Ecotoxicologia. Capítulo 29. In: Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**. 2º ed. Porto Alegre: AMGH. 2012.

DOKTOROVOVA, S; SOUTO, E.B; SIVA, A.M. Nanotoxicology applied to solid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of *in vitro* data. **Elsevier**. 2014.

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.

DUKOVCIC, S.R; HUTCHSON, J.R; TREMPY, J.E. Conservation of the chromatophore pigment response. **Journal of Applied Toxicology**. v.30, p. 574-581. 2010.

EATON, D, L. GILBERT, S.G. Princípios de toxicologia. Capítulo 2. In: Klaassen, C.D.; Watkins III, J.B. **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**. 2º ed. Porto Alegre: AMGH. p.6. 2012.

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.

FEDER, M.E. Responses to acute aquatic hipóxia in larvae of the frog *Rana beriandieri*. **Journal of Experimental Biology**. v.104, p.79-95. 1983.

FEDERICI, G., SHAW, B.J., & HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**. v.84, p.415–430. 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>

FENECH M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. v. 455, p. 81-95. 2000.

FENOGLIO, C. et al. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cell and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.60, p. 259-268. 2005.

FIJAN, N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. 2002. In: LAJMANOVICH, R.C et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles

of common toad (*Rhinella anerarum*) treated with the herbicides Liberty[®] and glifosinate-ammonium. **Mutation Research: Genetic and Toxicology Environmental Mutagen**. 2014.

FORDHAM, C.L et al. Effects of Malathions on survival, growth, development, and equilibrium posture of bullfrog tadpoles (*Rana Catesbeiana*). **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.20, n.1, p.179-184. 2001.

FRACETO, L.F. Nanopartículas como sistemas carreadores de compostos bioativos visando aplicações em agricultura. Biblioteca virtual Fapesp. 2015. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/138483/desenvolvimento-de-nanopartículas-como-sistema-carreador-para-os-fungicidas-carbendazim-e-tebuconazo/>>. Acesso em: 28 Mar. 2016.

FRACETO, L.F. et al. Alginate nanoparticles as a controlled release system for clomazone herbicide. **Química Nova**. v.33. n.9. São Paulo. 2010.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? Front. **Environmental Science**. 2016.

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

FRANCO-BELUSSI, L; SKOLD, H.N; OLIVEIRA, C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**. v.219, p.1378-1283. 2016.

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.

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

FROST, D.R. et al. In: KOOP, K. et al. Publicação sobre efeitos de pesticidas em anfíbios no período de 1980 á 2007. Seções especiais. **Revista Multiciências**. Campinas. Edição 8. 2007.

FUJII, R. The regulation of motile activity in fish chromatophores. **Pigment Cell Research**. v. 13, n. 5, p. 300–319. 2000.

GALLONE, A. et al. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta*. L.A. new melanogenic system? **Pigment cell research**. v.15. p.32-40. 2002.

GARDNER, S.C.M. & OBERDÖSTER. **Toxicology of Reptiles**. CRC press. p.328. 2005.

GOKALP et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes on mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethrod lambda-cyhalothrin. **Mutation Research**. 726. P.104-108. 2011.

GOSNER, K.L. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. **Herpetologic**. v. 16, p.183–190. 1960. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2307/3890061>.

GOULART, M.D. CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano. 2, n. 1. 2003.

GUNASEKARA, A. S. Environmental Fate of Pyrethrins. 2005. Disponível em: http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/pyrethrin_efate2.pdf. Acesso em: 12 ago. 2014.

GRILLO, R. et al. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: Na environmentally safer alternative for weed control. **Journal Hazard Mater**. v. 278, p. 163-171. 2014.

GRILLO, R.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F. Nanotechnology Applied to Bio-Encapsulation of Pesticides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.16, p.1231–1234. 2016.

GRISOLIA, C.K. Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução. Brasília, DF. Universidade de Brasília. p. 392. 2005.

HECNAR, S.J. M'CLOSKEY, R.T. Changes in the composition of a ranid frog community following bullfrog extinction. **American Midland Naturalist**. n.137. p.145-150. 1997.

HEDDLE, J.A., HITE, M., IRKHART, B., MACGREGOR, J.T.E., SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**. v. 123, p. 61-118. 1983.

HADLEY, M.E.; MIEYR, J.H., MARTIN, B.E.; CASTRUCCI, A.M.L. (Nle4, D-Phe7)-alpha-MSH: a superpotent melanotropin with prolonged action on vertebrate chromatophores. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.81, n. 1, p.1-6. 1985.

HEUDORF, U.; ANGERER, J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. **Environmental Health Perspectives**. v.109, n.3, p.213-217. 2001.

HILLMAN, S.S. Cardiovascular correlates of maximal oxygen consumption rates in anuran amphibians. **Journal of Comparative Physiology**. v. 109, p. 199-207. 1976.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**. v. 659, p. 93-108. 2008.

HUSSIEN, H.M; ABDOU, H.M; YOUSEF, M.I. Cypermethrin induced damage in genomic DNA and histopathological changes in brain and hematotoxicity in rats: the protective effects of sesame oil. **Brain Research Bulletin**. v. 92, p.76-83. 2013.

ISMAN, M. B. Perspective Botanical insecticides: for richer, for poorer. **Pest Management Science**. v. 64, p. 8–11. 2008.

ITHO, S. de F. Intoxicação por inseticidas inibidores da colinesterase organofosforados e carbamatos: diagnóstico e tratamento. **Vitória: Da Ação à Reação**, 2002.

JAIN, A et al. Nanomaterials in Food and Agriculture: an overview on their safety concerns and regulatory issues. 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1160363>.

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.

KAH, M., BEULKE, S., TIEDE, K., HOFMANN, T. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v.43, p. 1823–1867. 2013.

KAH, M., HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, v.63, p. 224–235. 2014.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2/3, p. 105-19, Mar. 2010.

KAKADIA, G.P., CONWAY, R.B. Solid Lipid Nanoparticles: A potential Approach for Dermal Drug Delivery. **American Journal of Pharmacological Science**. v.2. p.1-7. 2014.

KAN, Y. et al. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p.34170-179, 2012.

KARERU, P. et al. Use of botanicals and safer insecticides designed in controlling insects: the African case. In: Trdan, S. Insecticides- Development of Safer and More Effective Technologies. **Intech. Croatia: Rijeka**, cap. 10, p. 297-310. 2013.

KARIM, A.; AHMAD, N.; WAJID, ALI. Histopathological changes in spleen and kidney of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) after acute exposure to deltamethrin. **Biologia (Pakistan)**. v. 62, n.1, p. 139-144. 2016.

KATS, L.B., FERRER, R.P. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. **Diversity and Distributions**. v.9. p.99-110. 2003.

KAPIL, S.R et al. Effects of cypermethrin on chromatophores of freshwater fish *Channa punctatus*. Sangupta, M and Dalwani, R. (Editors). p.571-578. 2008.

KARERU, P. et al. Use of botanicals and safer insecticides designed in controlling insects: the African case. In: Trdan, S. Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies. **Intech. Croatia: Rijeka**, cap. 10, p. 297-310. 2013.

KAUR, R; DUA, A. Colour changes in *Labeo rohita* (Ham.) due to pigment traslocation in melanophores, on exposure to municipal wastewater of Tung Dhab drain, Amristar, India. **Environmental toxicology and Pharmacology**. v.39, p.747-757. 2015.

KIM et al. Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities. 2017.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. **Biopesticides International**. v. 4, n. 1, p.63–84. 2008.

KUMAR, A. et al. Preliminary evaluation of the toxicity of cypermethrin and lambda-cyhalothrin to *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. n.79. p. 613-616. 2007.

KUMAR, A.; RAI, D. K.; SHARMA, B.; PANDEY, R. S. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in-vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 2008.

LAJMANOVICH, R.C et al. Inducion of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of cammon toad (*Rhinella anerarum*) treated with the herbicides Liberty[®] and glifosinate-ammonium. Mutation Research: **Genetic and Toxicology Environmental Mutagen**. 2014.

LARINI, L. Inseticidas Organossintéticos. In: Larine, L. **Toxicologia dos Praguicidas**, 1^a ed. São Paulo; Editora Manole Ltda, p.19-91. 1999.

LILLYWHITHE, H.B., ZIPPEL, K.C & FARREL, A.P. Restig and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. **Comparative. Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 369-382. 1999.

LIPPACHER, A., MULLER, R.H., MADER, K. 2001. In: TAVEIRA, S.F. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico de câncer de pele. 2009.(Tese Doutorado) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LOGAN, D.W; BURN, S.E; JACKSON, L.J. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. **Pigment Cell Research**. v.19, p.206-213. 2006.

LUDOMIRSKY, A. Q-T prolongation and polymorphous (“torsade de pointes”) ventricular arrhythmias associated with organophosphorus inseticide poisonig. In: SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretróides uma visão geral. **Alimentação e Nutrição**. Araraquara. v. 18, n. 3. 2007.

MACIEL, R.A. Efeitos da deltametrina ne excitação e condução cardíaca e na resposta ao estresse oxidativo em ratos wistar. Dissertação de Mestrado. Universidade de Campinas Unicamp. 2011.

MAGALHÃES, D.P., FILHO, A, S, F. Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v.12, p.355-381. 2008.

MASAGAKI, A; FUJII, R. Differential actions of melatonin on melanophores of the threeline pencilfish, *Nannostomus trifasciatus*. **Zoological Science**. v.16, p.35-42. 1999.

MANNA, S. et al. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. **Journal of Veterinary Science**. v. 7, n. 2. p.133-136. 2006.

MARIGOLDAR, S.R; AHMED, N; DAVID, M. Impact of cypermethrin on behavior responses in the freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **World Journal of Zoology**. v. 4, n. 1, p.19-23. 2009.

MARTINS, N.D., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Microsystin-LR: how it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia. *Oreochromis niloticus*. **Chemistry**. v. 84, p.154-159. 2013.

McGRAW, K.J. The antioxidant function of many animals pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? **Animal Behavior**. v. 69, p. 757-764. 2005.

MEHNERT, W., MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. 2001. In: TAVEIRA, S. F. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico de câncer de pele. 2009. (Tese Doutorado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MARUYAMA, C. R. et al. Nanoparticles based on chitosan as carriers for the combined herbicides Imazapic and Imazapyr. **Scientific Reports**. v. 6, p. 1–13. 2016.

MATTOS, B. D et al. Controlled release for crop and wood protection: Recent progress toward sustainable and safe nanostructured biocidal systems. **Journal of Controlled Release**. v. 262, p. 139–150. 2017.

MAYNARD, A. D., Warheit, D. & Philbert, M. A. **Toxicology Science**. v.120, p. 109–129, 2011.

MENDES, R. Patologia do trabalho. 2º ed. Rio de Janeiro. **Editora Ateneu**. Rio, 2005.

MIRSAL, I. A. Soil pollution: origin, monitoring and remediation. 2^a ed. **Berlin: Springer**, p.312. 2008.

MIYASHITA, Y.; FUJII, R. Receptor mechanisms in fish chromatophores – II. Evidence for beta adrenoceptors mediating melanosome dispersion in Guppy melanophores. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C Comparative Pharmacology, v. 51, n. 2, p. 179-187. 1975.

MONTANHA, F.P et al. Clinical, biochemical and hemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, n.3, p.697-704. 2014.

MORAGAS, M.W.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. Instituto de Geografia no Brasil. 2003. **Revista online**. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/caminhosdegeografia/article/viewFile/15315/8614>>. Acesso em: 25 Mar. 2016.

MORIYA, T, et al. Light- sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: I. Spectral characteristics of melanophore response in isolated tail fin of *Xenopus* tadpole. **Journal of Experimental Zoology**, v.276, p.11–18.1996.

MORESCO, R.M. Análise dos melanócitos viscerais em anuros (*Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* e *Physalaemus cuvieri*) submetidos a variação de fotoperíodo e temperatura. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal. Universidade Estadual Paulista campus São José do Rio Preto. 2009.

MOUSAVI, R. S., REZAEI, M. Nanotechnology in Agriculture and Food Production. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**. v. 10, p.414-419. 2011.

MÜLLER H. R., MADER K., GOHLA S. 2000. In: OLIVEIRA, J. L. Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema carreador conjunto para os herbicidas atrazina e simazina visando futuras aplicações na agricultura. 2015. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Sorocaba.

MULLER, R.H. et al. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v.242, p.121-128. 2002.

NAIR, R.; VARGHESE, S.H.; NAIR, B.J.; MAEKAWA, T.; YOSHIDA, Y.; KUMAR, D.S. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**. v.179, p.154-163, 2010.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER (NPIC). Pyrethrins & Pyrethroids. 1998. Disponível em: <<http://npic.ors.edu/factsheets/pyrethrins.pdf>>. Acesso em: 27 Mar. 2016.

NUNES, B. et al. Behavior and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.71, p. 341-354. 2008.

OLIVEIRA, J. et al. Solid Lipid Nanoparticles Co-loaded with Simazine and Atrazine: Preparation, Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.63, p.422-432. 2015.

OLIVEIRA, C.R. et al. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**. v. 149, p.304-313. 2016.

OLIVEIRA, C. et al. Use of melanin- pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian Anurans. **The Royal Society of Chemistry**. cap. 6, v.32, p. 125-142. 2017.

OLIVEIRA, L.F.; MARTINEZ, C.B.R. Uso da biota no monitoramento da qualidade de ecossistemas aquáticos contaminados por metais. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 2011, Londrina. **Anais eletrônicos**. Londrina: UNOPAR/IBEAS, 2011. Resumo estendido. Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2011/VI-011.pdf>>. Acesso em: 19 de Outubro 2016.

OLIVEIRA et al. Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.66, p. 1330-1340. 2018.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos. **Ministério da Saúde**, Brasília. 1997.

OSTI, S. et al. Comparative Studies of Delthametrin Acute Toxicity in Exotic and Brazilian Fish. **Sociedade de Ecotoxicologia**. v. 2, n.2, p 101-106. 2007.

PARISI C, et al. Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? **Nano Today**. v.10, p.124-127. 2015.

PANDE, S. et al. Peripheral blood and bone marrow responses under stress of cypermethrin in albino rats. **Interdisciplinary Toxicology**. v.7, n. 1, p. 33-40. 2014. doi: 10.2478/intox-2014-0006

PANDEY, A.K; TOMAR, V. Melanophores in *Bufo melanosticus* (Schneider) tadpoles followings exposure to the insecticide dimethoate. **Environmental Contamination and Toxicology**. v.35, p.796-801. 1985.

PANTALEÃO, S.M, ALCÂNTARA, A.V., ALVES, J.P.H., SPANÓ, M.A. The piscine in micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.47, n.3, p.219-224. 2006.

PEARL, C.A, et al. Asymmetrical effects of Introduced bullfrog (*Rana catesbeiana*) on native ranid frogs in Oregon. *Copeia*. v.1, p. 11-20. 2004.

PERLATTI, B., BERGO, S. L. P., DA SILVA, F. G. F. M., FERNANDES, B. J., FORIM, R. M. Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. In: STANISLAV, T. (Ed). *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies*. Intech, p. 523-550. 2013.

PESTICIDES DATABASE (PAN). Pyrethrins. 2014. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC34291>. Acesso em: 28 Mar. 2016.

PEREIRA, R.S. Identificação e caracterização das fontes de poluição dos recursos hídricos. **Revista eletrônica de Recursos Hídricos**. IPH- UFRGS. v.1, n.1, p.20-36. 2004. Disponível em: <http://www.abrh.org.br/informacoes/rerh.pdf>.

PIMPÃO, C. T. Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos de deltramina em uma espécie de peixe fluvial nativo: efeito bioquímico e imunotóxico. Curitiba, 2006 (Tese em processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná. 2006.

POLO-CAVIA, N; GOMEZ-MESTRE, I. Pigmentation plasticity enhances crypsis in larval newts: associated metabolic cost and background choice behaviour. **Scientific Reports**. v. 7, p.39739. 2017.

POUNDS, A. FOGDEN, M.P.L. CAMPBELL, J. H. Biological response to climate change on a tropical mountain. **Nature**. v. 398, p.611-615. 1999.

PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; Nguyen, Q. D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. **Frontiers in Microbiology**. 2017.

PRELOVSEK, P.M; BULOG, B. Biogenesis of melanosomes in Kupffer Cells of *Proteus anguinus* (Urodela Amphibia). **Pigment Cell Research**. v.16. p.345-350. 2003.

QUEIROZ, J. F., MOURA E SILVA, M.S.G., TRIVINHO-STRIXINO, S. Organismos Bentônicos: Biomonitoramento da qualidade da água. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**. 2008.

RAI, M., INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.94, p.287–293, 2012.

RAJABI, S., et al. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n. 1, p.1–6. 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. 1985. In: WINKALER, E.U., SILVA, A.D., GALINDO, H.C., MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para monitoramento da saúde dos peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**. Maringá. v.23. n.2, p. 507-514, 2001.

READING, M.; CRAIG, D. Q. M. Thermal Analysis of Pharmaceuticals. CRC Press, p. 1-21. 2006.

REBELO, F.M. Intoxicação por agrotóxicos e raticidas no Distrito Federal de 2004 a 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

REGNAULT-ROGER, C. Essential Oils in Insect Control. In: Ramawat, K. G.; Mérillon, J.M. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. **Ebook. London: Dordrecht**, cap. 138, p. 4087-4107. 2013.

RIBEIRO, D. A. et al. Fluoride does not induce DNA breakage in chinese hamster ovary cells in vitro. **Revista Brazilian Oral Research**. v. 18, p. 192-196. 2004.

RIBEIRO, L.R. Efeitos da exposição aguda ao Metil Paration sobre a função cardíaca de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus*. Iniciação Científica. Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba. 2011.

RISSOLI, R.Z. Comparação entre os efeitos da exposição em nível subletal de Glifosato e dos herbicidas a base de glifosato Roundup Original e Roundup Transorb R sobre girinos de rã-touro. 2012. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2012.

ROBERTS, J. R.; REIGART, J. R. Recognition and Management of Pesticide Poisonings. 6 ed. Washington: U.S. **Environmental Protection Agency**, p. 2013, 277. Disponível em: <http://www2.epa.gov/sites/production/files/documents/rmpp_6thed_final_lowresopt.pdf>. Acesso em: 21/02/2018.

RODRIGUES, A.C.F. Estudos de variações bioquímicas e de genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental. Tese Doutorado. Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2014.

ROULIN, A. Melanin- based colour polymorphism responding to climate change. **Global Change Biology**, v. 20, p. 3344–3350. 2014.

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.

SALLA, R.F, et al. Cardiac adaptations of Bullfrog tadpoles in Response to Chytrid Infection. **Journal Experimental Zoology**. p.1-10. 2015.

SANCHES – BAYO, F. Inseticides mode of action in relation to their toxicity to non- targeted organisms. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**. v.4, n.2. 2012.

SATHYA, K et al. The Effects of Cypermethrin on Zebrafish Embryo an Alternative Model for Assessing the Embryo Toxicity of Environmental Chemicals. **American Journal Pharm Research**. v.4, p.2316-2322. 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F. Insecticides Mode of Action in Relation to Their Toxicity to Non-Target Organisms. **Journal of Environmental Analytical Toxicology**. v.4, p. 2-9. 2011.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

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.

SANTOS, V.M.R et al. Compostos organofosforados pentavalente: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicação como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**. v.30, n.1, p.159-170. 2007.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology of Environmental Safety**, v.56, p. 295-301. 2003.

SHAW, G. General Zoology or Systematic Natural History. Volume 3. Part 1. **Amphibia**. London. Thomas Davison. 1802.

SCHLEIER, J. J.; PETERSON, R. K. D. Pyrethrins and Pyrethroid Inseticides. Capítulo 3. Department of Land Resources and Environmental Sciences. Montana States. USA. 2011

SENTHIL-NATHAN, S. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. **Frontiers Physiology**. v. 4, p. 1-17, 2013.

SHINDE, S. K. et al. Toxicity induced by nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v.2, p.331–334 2012.

SILVA, M.E.F. Implicações toxicológicas e bioquímicas de xenobiótico em curimbatá (*Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881) um peixe tropical brasileiro. Tese de Mestrado. Unicamp. Instituto de biologia. Campinas, 2002.

SILVA, J., HEUSER, V., ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P., (org). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p.166-180. 2003.

SILVA, A.C. Toxicidade da deltametrina (Formulação Butox CE25) nas respostas cárdio respiratórias da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2011.

SILVA, M. S. et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**. v. 190, n. 1-3, p. 366-374, June. 2011.

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

SKÖLD, H. N.; ASPENGREN, S.; CHENEY, K. L., & WALLIN, M. Chapter Four-Fish Chromatophores—From Molecular Motors to Animal Behavior. **International review of cell and molecular biology**. v. 321, p. 171-219, 2016.

SOUTO, B. E; SEVERINO, P; SANTANA, A. H. M; PINHO, C. S. Nanopartículas de lípidios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**. v. 34, n. 10, p.1762-1769, 2011.

SPARLING, D.W. et al. (Eds). Ecotoxicology of amphibians and reptiles. 2nd Ed, **Pensacola, FL**, p.916. 2010.

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.

SUGIMOTO, M. Morphological colour changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology. **Microscopy Research Technique**. v.58, p. 496-503. 2002.

SUGIMOTO, M.; YUKI, M.; MIYAKOSHI, T. e MARUKO, K. The influence of long-term chromatic adaptation on pigment cells and striped pigment patterns in the skin of the Zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 30, p.430–440. 2005.

SVENSSON, P.A. et al. Chromatic interaction between ecd pigmentation and skin chromatophores in the nuptial coloration of female two-spotted gobies. **Journal of Experimental Biology**. v.208, p. 4391-4397. 2005.

SVOBODOVÁ, Z., et al. Effect of Deltamethrin on Hematological Indices of Common Carp (*Cyprinus carpio*). **Acta Veterinaria Brunensis**. v.72, p. 79-85. 2003.

THOMAS, Molecular and biochemical responses of fish to stressor and their potential use in environmental monitoring. In: Biological indicators of stress in fish. Edited by Marshal Adams. **American fisheries society**. Bethesda, Maryland. p.8-28. Tese. 1990.

TIBBITS, G.F.; HOVE-MADSEN, L. & BERS, D.M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. **Canadian Journal of Zoology**. v. 69, p. 2014-2019, 1991.

TOLEDO, L. F. Anfíbios como Bioindicadores. In: Neumann-Leitão, S. & El-Dier, S. (Orgs.) Bioindicadores da Qualidade Ambiental. Recife: **Instituto Brasileiro Pró- Cidadania**. p.196-208. 2009.

TOMIZAWA, M; CASIDA, J.E. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. **Rev. Pharmacology and Toxicology**. v.45, p. 247-268. 2004.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2005. In: WERNER, I; MORAN, K. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organism. **American Chemical Society**. Cap. 14. 2008.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Registration Eligibility Decision for Pyrethrins. 2006. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/pyrethrins_red.pdf>. Acesso em: 29 Mar. 2016.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Pyrethroids and Pyrethrins. 2013. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html>>. Acesso em: 29 Mar. 2016.

VAN METER, R.J. Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. **Environmental Pollution**. v.193, p.262–268. 2014.

VIARENGO, A., LOWE, D., BOLOGNESI, C., FABBRI, E., KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinela organisms, **Comparative Biochemistry and Physiology, part C: Toxicology and Pharmacology**, v.146, n.3, p. 281-300, 2007.

VIEIRA, E.L, et al. Avaliação do Processo de Contaminação do Solo em uma Microbacia no Noroeste do Estado do Rio de Janeiro. 2003. http://pesca.iff.edu.br/pesquisa/gestao-dos-recursos-hidricos-2012/varre-sai/CBG093-internet.doc/@@preview_provider.

VITORINO, C. et al. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. **Colloids and Surfaces, B**. v.84, p.117–130. 2011.

VIZOTTO, L.D. Ranicultura. **Ciência e Cultura**. n.36, p.42-45. 1984.

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.

WASSERSUG, R.J., PAUL, R.D, FEDER, M.E. Cardiorespiratory synchrony in anuran larvae (*Xenopus laevis*, *Pachymedusa dacnicolor*, *Rana berlandieri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 70, p.329-334. 1981.

WANG, D., DU, X., & ZHENG, W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. **Toxicology Letters**. v.176, n. 1, p. 40–47. 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.003>.

WINKALER, E.U., SILVA, A.D., GALINDO, H.C., MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para monitoramento da saúde dos peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**. Maringá. v.23, n.2, p. 507-514, 2001.

WITHERS, P.C., HILLMAN, S.S. Allometric and ecological relationships of ventricle and liver mass in anuran amphibians. **Functional Ecology**. v.15, p. 60-69. 2012.

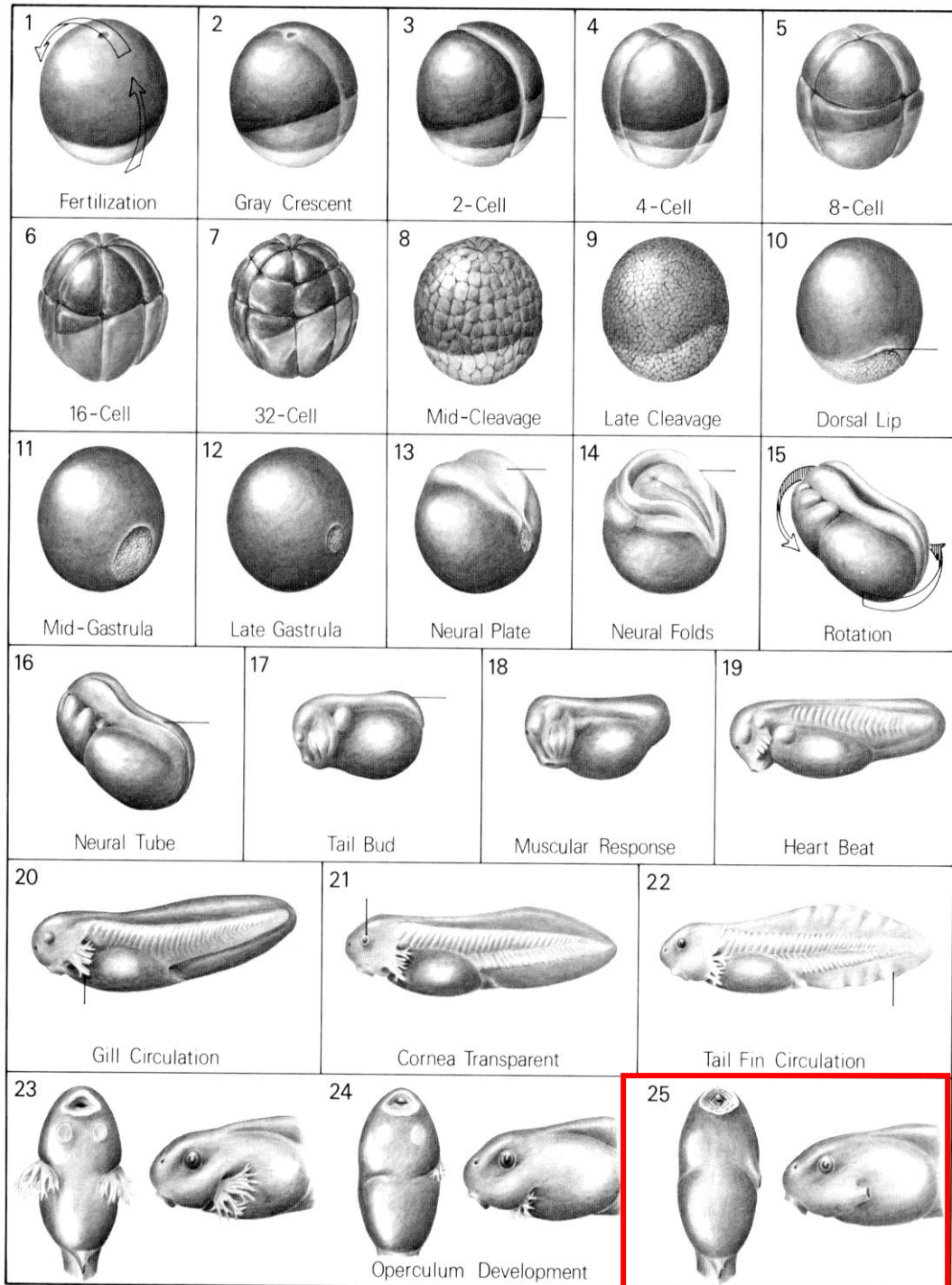
WERNER, I; MORAN, K. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organism. **American Chemical Society**. Cap. 14. 2008.

YOON, G; PARK, J. W.; YOON, I-S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**. v. 43, p. 353– 362. 2013.

ZORITA, I. et al. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environmental Pollution**. v. 153, p. 157-168. 2008.

ANEXO – A

Figura: Estágios de desenvolvimento de *Lithobates catesbeianus*. Em destaque vermelho o estágio 25 de Gosner (1960) utilizado no presente trabalho.



Fonte: Gosner 1960.