

CRISTIANE RONCHI DE OLIVEIRA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO SISTEMAS
CARREADORES DE EXTRATO DE PIRETRO E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA EM ORGANISMOS NÃO-ALVOS**

Sorocaba
2019

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências
ambientais*

CRISTIANE RONCHI DE OLIVEIRA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO SISTEMAS
CARREADORES DE EXTRATO DE PIRETRO E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA EM ORGANISMOS NÃO-ALVOS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Coorientador: Prof. Dra. Elaine Cristina M. da Silva Zacarin

Sorocaba

2019

O48n	Oliveira, Cristiane Ronchi de Nanopartículas lipídicas sólidas como sistemas carreadores de extrato de piretro e avaliação toxicológica em organismos não-alvos / Cristiane Ronchi de Oliveira. -- Sorocaba, 2019 166 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto Coorientadora: Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin 1. Nanopartículas. 2. Piretróides. 3. Toxicologia. 4. Abelhas. 5. Anfíbio. I. Título.
------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO SISTEMAS CARREADORES DE EXTRATO DE PIRETRO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA EM ORGANISMOS NÃO-ALVOS

AUTORA: CRISTIANE RONCHI DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

COORDINADORA: ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO
Engenharia Ambiental / Unesp - ICT Sorocaba

Profª. Drª. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / Universidade Federal de São Carlos - Câmpus Araras

Prof. Dr. FERNANDO RODRIGUES DA SILVA
Departamento de Ciências Ambientais / Universidade Federal de São Carlos - Câmpus Sorocaba

Profª. Drª. VANESSA BEZERRA DE MENEZES OLIVEIRA
Departamento de Biologia, Centro de Ciências Humanas e Biológicas - CCHB / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Câmpus Sorocaba

Prof. Dr. LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO
Engenharia Ambiental / Unesp - ICT Sorocaba

Sorocaba, 23 de agosto de 2019

Dedico essa tese...

Aos meus amados pais, Marisa e Romeu, por todo o apoio nessa jornada científica, por toda torcida, amor e alegria emanada em todos os momentos. Vocês são meus maiores exemplos e sem dúvidas eu não alcançaria meus sonhos sem vocês.

Ao meu marido, Lucas, por me apoiar nos meus sonhos mais loucos, por me dar suporte, por sempre me fazer acreditar e ver o lado positivo da vida. A vida é completa ao seu lado!

Ao meu irmão, Gustavo, que mesmo a quilômetros de distância ou a minutos sempre torceu por mim, sonhou comigo e me apoiou nas minhas viagens científicas.

Gratidão! Amo vocês!

*“Sem sonhos, a vida é uma manhã sem orvalhos, um céu sem estrelas, um oceano sem ondas,
uma vida sem aventura, uma existência sem sentido”.*

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, meu pais Romeu e Marisa, e ao meu irmão Gustavo, obrigada por todo o suporte que me deram ao longo desses 4 anos, por todo o apoio, auxílio, dedicação, compreensão, paciência, amor, carinho e afeto. Com certeza eu não chegaria aqui sem vocês, não existem palavras para agradecer tudo que vocês fizeram por mim, obrigada por serem os melhores e sempre acreditarem em mim. Amo muito vocês!

Ao meu marido Lucas, que esteve ao meu lado todos os dias, que ouvia minhas conquistas e desabafos, que me deu força nos momentos mais difíceis, que me alegrou, incentivou, me ouviu e comemorou comigo nossas conquistas. Obrigada por ser esse companheiro tão compreensível e amável, que possamos conquistar mais e mais sonhos juntos. Amo você!

A todos os meus professores que fizeram parte dessa jornada, por todos os novos ensinamentos, debates científicos e incentivos acadêmicos. Sou grata por tantos professores espetaculares que tive o prazer de conviver, especialmente meus orientadores, com certeza me tornei uma profissional melhor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto, que sempre esteve disposto a me ouvir, esclarecer minhas dúvidas e me ajudar. Muito obrigada por ser essa pessoa admirável e cheio de metas, que fazem os olhos dos alunos brilharem. Muito feliz em ter feito parte do time de Nanotecnologia Ambiental.

A minha coorientadora Prof. Dra. Elaine C.M. Silva-Zacarin, não existem palavras nesse mundo que possam agradecer tudo que você fez por mim todos esses anos que trabalhamos juntas, quantas conversas, quantos sonhos, quantas conquistas, quantos momentos que vivemos juntas e vamos continuar vivendo. Elaníssima agradeço a vida por tê-la colocado no meu caminho, obrigada por toda a amizade e carinho, obrigada por sempre acreditar em mim, por sempre falar com tanto amor da ciência, pelas risadas, pelos dias de “caos” e por todas as pesquisas “bombásticas”.

A maior colaboradora, Prof. Dra. Monica C. Jones muitíssimo obrigada por absolutamente tudo que você fez não só por mim, mas por todos os seus alunos. Obrigada por ajudar no desenvolvimento da ciência, mesmo em tempos difíceis. MÔ foi maravilhoso ficarmos no mesmo laboratório, aprendi muito com você nesse tempo, obrigada por me ouvir, me incentivar, por me alegrar, e por toda a torcida, enfim, obrigada por ser essa professora e amiga excepcional.

A Dra. Nathalie Ferreira Silva de Melo por todo o ensinamento proporcionado na área de nanotecnologia, obrigada pelos dias de laboratório, pelas conversas, por toda orientação e esclarecimentos. Sem dúvida aprendi muito ao seu lado, foi maravilhoso e gratificante trabalhar com você minha amiga.

A Dra. Lilian Franco Belussi, Dra. Raquel Fernanda Salla e a Dra. Hellen Maria Soares Lima por todos os novos ensinamentos compartilhados, obrigada pela convivência, pelo auxílio nas etapas dos bioensaios, nas análises dos materiais, por todas as sugestões e momentos acadêmicos deliciosos. Agradeço por tudo queridas amigas, contem comigo sempre.

Aos meus amigos de laboratório que fizeram os dias mais agradáveis, por toda a ajuda nas etapas de trabalho, por todos os dias que estiveram presentes, por todos os papos e almoços deliciosos, pela amizade que construímos ou fortalecemos, muitíssimo obrigada! Especialmente a Josimere, a Hellen, Rafaela, Raquel, Eliane, Nathalie, Lilian, Beatriz, Thais, Caio e Bruno. Sem a ajuda e amizade de vocês esse trabalho não seria possível. Espero que continuem para sempre na minha vida, torço muito por vocês e pelo sucesso de vocês, que vocês conquistem todos os seus sonhos. Amo vocês!

A minha amiga-comadre Gisele Rizzi, que mesmo a quilômetros de distância se fez presente em todos os momentos, torcendo por mim, me incentivando, ajudando e apoiando em todos os momentos, sejam de alegrias, nervosismo, conquistas e dificuldades. Amo você!

As minhas amigas-irmãs, Flávia Bragagnolo e Bruna França, que souberam compreender minha ausência, que me ouviam a qualquer momento, que estiveram ao meu lado e que torceram por mim todos os dias, gratidão! Vocês são as melhores, amo vocês!

As Universidades Públicas, principalmente a UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” *campus Sorocaba*) e a UFSCar (Universidade Federal de São Carlos *campus Sorocaba*), nas quais desenvolvi praticamente toda a minha pesquisa de Doutorado. Grata pelo ensino público gratuito e de qualidade!

A todos os integrantes do Laboratório de Ecotoxicologia e Biomarcadores Animais, do Laboratório de Fisiologia da Conservação e do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e auxiliaram na concretização desta etapa.

A Deus por estar sempre comigo, guiando meu caminho, me dando forças e abençoando minhas conquistas.

RESUMO

O extenso crescimento da agricultura combinado com o uso intensivo de agrotóxicos tem causado preocupação com a manutenção dos ecossistemas e a produção de alimentos realmente saudáveis. Atualmente, têm-se buscado alternativas sustentáveis para produção agrícola como os inseticidas botânicos e nanopesticidas. Os inseticidas botânicos são extraídos de plantas e utilizados no controle de pragas, sendo estes considerados biodegradáveis, seguros e menos tóxicos para a biodiversidade. Eles podem ser encapsulados em nanocarreadores que aumentam sua estabilidade e otimizem o seu uso agrícola. Os nanopesticidas trazem benefícios para o ambiente e a produtividade agrícola, dos quais destacam-se a liberação modificada dos ingredientes ativos nos campos agrícolas, maior estabilidade do sistema, menor toxicidade aos seres vivos e redução do impacto ambiental. No entanto, percebe-se a necessidade de estudos de toxicidade dos inseticidas botânicos e dos nanopesticidas em organismos não-alvos, como abelhas e anfíbios que estão declinando rapidamente no mundo inteiro. O objetivo desse estudo foi preparar e caracterizar os sistemas carreadores do extrato de piretro e avaliar o efeito destes compostos em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e abelhas (*Apis mellifera* Africanizada), utilizando biomarcadores de diferentes tipologias em nível subindividual e de indivíduo. O extrato de piretro encapsulado em nanopartículas (NLS+PIR) evidenciaram uma boa estabilidade físico-química em função do tempo e uma pequena distribuição no diâmetro das partículas, com um diâmetro hidrodinâmico médio de $257,6 \pm 2,0$ nm, polidispersão média de $0,11 \pm 0,01$ e eficiência de encapsulação maior que 99%. Nos bioensaios de toxicidade com abelhas observou-se menor índice total de lesão do intestino médio nos indivíduos do grupo NLS+PIR em relação aos grupos expostos a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; $7,4 \pm 0,5$) e ao extrato de piretro (PIR_{10ng}; $7,4 \pm 0,8$). O tempo de sobrevivência das abelhas expostas ao inseticida botânico (PIR_{10ng} = $141,18 \pm 21,3$ h) e ao piretróide (DLT_{10ng} = $25,33 \pm 0,93$ h) foram significativamente menores quando comparados ao controle ($257,83 \pm 21,79$ h). Entretanto, nos bioensaios com os girinos de rã-touro as NLS+PIR causaram alterações nos parâmetros hematológicos, com um aumento na quantidade de eosinófilos e eritrócitos, nas anormalidades nucleares eritrocíticas e danos no DNA, bem como desencadeado efeito hepatológicos como um aumento na congestão sinusoidal e na infiltração eosinofílica, e uma maior quantidade de células melanomacrofágicas. No índice total de lesão no fígado todos os grupos expostos (NLS, NLS+PIR, PIR e PVA) evidenciaram um aumento significativo em relação ao controle ($P < 0,0001$), contudo a exposição ao piretro encapsulado em nanopartículas (NLS+PIR) demonstrou o maior índice total da lesão no órgão ($43,6 \pm 2,7$). Portanto, os dados demonstram a importância de se compreender melhor a toxicidade dos inseticidas botânicos e nanopesticidas, o que é importante para avaliação toxicológica e de monitoramento ambiental. O desenvolvimento de formulações alternativas, como os nanopesticidas, para o controle de pragas na agricultura, contribuem para a sustentabilidade agrícola e, portanto, devem ser avaliados quanto a sua toxicidade nos organismos não-alvos a fim de auxiliar na compreensão nanotoxicológica e na proposição de legislações e regulamentações para o seu uso no campo.

Palavras-chaves: Nanopesticidas. Extrato de piretro. Abelha. Girinos. Sustentabilidade agrícola.

ABSTRACT

The extensive growth of agriculture combined with the intensive use of agricultural pesticides has caused concern for the maintenance of ecosystems and the production of truly healthy food. Sustainable alternatives for agricultural production such as botanical insecticides and nanopesticides have been sought nowadays. Botanic insecticides used in pest control are extracted from plants, hence they are considered biodegradable, safe and less toxic to biodiversity. They can be encapsulated in nanocarriers that increase their stability and optimize their agricultural use. Nanopesticides bring both benefits to the environment and agricultural productivity, such as the modified release of active ingredients in agricultural fields, greater system stability, less toxicity to living beings and environmental impact reduction. However, there is a need for toxicity studies of botanical insecticides and nanopesticides in non-target organisms such as bees and amphibians that are rapidly declining throughout the world. The objective of this study was to prepare and characterize the pyrethrum extract carrier systems and to evaluate the effect of these compounds on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) and bees (Africanized *Apis mellifera*) using biomarkers of different types at the subindividual and individual levels. The nanoparticle-encapsulated pyrethrum extract (SLN+PYR) showed good physico-chemical stability as a function of time and a small particle diameter distribution with a mean hydrodynamic diameter of 257.6 ± 2.0 nm, mean polydispersity of 0.11 ± 0.01 and encapsulation efficiency greater than 99%. In the toxicity bioassays with bees, the lowest intestinal lesion total index in the SLN+PYR group was observed in relation to the groups exposed to solid lipid nanoparticles (SLN, 7.4 ± 0.5) and pyrethrum extract (PYR_{10ng}, 7.4 ± 0.8). The survival time of bees exposed to the botanical insecticide (PYR_{10ng} = 141.18 ± 21.3 h) and to the pyrethroid (DLT_{10ng} = 25.33 ± 0.93 h) were significantly lower when compared with control group (257.83 ± 21.79 h). However, the SLN+PYR caused changes in hematological parameters in the bioassays with bullfrog tadpoles, an increase in the number of eosinophils and erythrocytes, erythrocytic nuclear abnormalities and DNA damage, as well as triggering hepatological effects such as increased sinusoidal congestion, eosinophilic infiltration and a greater amount of melanomorphagic cells. All exposed groups (SLN, SLN+PYR, PYR and PVA) demonstrated a significant increase in liver lesion total index in compared to control ($P < 0.0001$), however the exposure to the nanoparticle encapsulated pyrethrum showed the highest total injury in the organ (43.6 ± 2.7). Therefore, the data demonstrate the importance of better understanding the toxicity of botanical insecticides and nanopesticides, which is important for toxicological assessment and environmental monitoring. The development of alternative formulations for pest control in agriculture, such as nanopesticides, contributes to agricultural sustainability and should therefore be evaluated for their toxicity in non-target organisms in order to assist in nanotoxicological understanding and in proposing legislation and regulations for its use in the field.

Keywords: Nanopesticides. Pyrethrum extract. Bees. Tadpoles. Sustainable agriculture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. METODOLOGIA	23
2.1 PRODUTOS QUÍMICOS	23
2.1.1 Nanopartículas lipídicas sólidas	23
2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	24
2.2.1 Diâmetro médio e Polidispersão por Espectroscopia de Correlação de Fótons.....	24
2.2.2 Rastreamento de Partículas	25
2.2.3 Eficiência de Encapsulação	25
2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	26
2.2.5 Calorimetria diferencial exploratória.....	26
2.2.6 Microscopia de Força Atômica	27
2.3 BIOENSAIO TOXICOLÓGICO COM ABELHAS DE MEL POLI HÍBRIDA	27
2.3.1 Procedimentos histológicos.....	29
2.3.2 Análise semi-quantitativa do intestino médio.....	30
2.3.3 Análise por imunofluorescência de nanopartículas marcada com fluoróforo.....	31
2.4 BIOENSAIO TOXICOLÓGICO COM GIRINOS DE RÃ-TOURO	32
2.4.1 Determinação da CL50.....	33
2.4.2 Exposição aguda (48h)	34
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
2.5.1 Caracterização físico-química das nanopartículas	40
2.5.2 Bioensaio toxicológico com abelhas de mel poli-híbrida.....	40
2.5.3 Bioensaio toxicológico com girinos de rã-touro.....	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4. CAPÍTULO 1 – NANOPESTICIDA BASEADO NO INSETICIDA BOTÂNICO PIRETRO E SEU POTENCIAL EFEITO EM ABELHAS	43
ABSTRACT	45
4.1 INTRODUCTION.....	46
4.2 MATERIALS AND METHODS	48
4.2.1 CHEMICALS	48
4.2.2 Nanoparticles	49
4.2.3 Determination of encapsulation efficiency and quantification of pyrethrum by high-performance liquid chromatography (HPLC).....	50
4.2.4 Toxicological bioassay.....	50
4.2.5 Statistical analysis	52
4.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	53
4.3.1 Nanoparticle characterization.....	53
4.3.2 Differential scanning calorimetry (DSC).....	56
4.3.3 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).....	57
4.3.4 Toxicological bioassay.....	59

4.4 CONCLUSION	65
ACKNOWLEDGMENTS	66
SUPPLEMENTARY MATERIAL	67
5. CAPÍTULO 2 – EXTRATO DE PIRETRO ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS: ESTUDOS DE TOXICIDADE BASEADO NO EFEITO GENOTÓXICO E HEMATOLÓGICO EM GIRINOS DE RÃ-TOURO	72
ABSTRACT	74
5.1. INTRODUCTION	75
5.2 MATERIALS AND METHODS	77
5.2.1 Chemicals.....	77
5.2.2 Animal collection and acclimation in laboratory	78
5.2.3 Determination of LC50	79
5.2.4 Ecotoxicological experimental design.....	79
5.2.5 Experimental protocols.....	80
5.2.6 Statistical analysis	81
5.3. RESULTS AND DISCUSSION	82
5.3.1 Leukocyte and Erythrocyte measurements	82
5.3.2 Erythrocytes nuclear abnormalities.....	87
5.3.3 Comet assay.....	90
5.4. CONCLUSION	93
ACKNOWLEDGMENTS	94
SUPPLEMENTARY MATERIAL	95
6. CAPÍTULO 3 – ANÁLISES MORFOLÓGICAS, HISTOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICAS NO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO EXPOSTO AO EXTRATO DE PIRETRO E AO NANOPESTICIDA.....	96
ABSTRACT	98
6.1 INTRODUÇÃO	99
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	101
6.2.1 Produtos Químicos	101
6.2.2 Bioensaio toxicológico com girinos de rã-touro.....	101
6.2.3 Análises estatísticas	104
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
6.3.1 Análises biométricas e morfométricas do fígado	105
6.3.2 Análise semi-quantitativa do fígado.....	109
6.4 CONCLUSÕES	119
AGRADECIMENTOS	120
MATERIAL SUPLEMENTAR	121
7. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS	129
ANEXOS.....	157
APÊNDICES	162

1. INTRODUÇÃO GERAL

A urbanização, a industrialização, a agropecuária, dentre outras atividades utilizam grandes quantidades de recursos naturais, em contrapartida ocasionam a degradação do meio ambiente em grande escala. A partir da década de 60 iniciam-se as discussões ambientalistas sobre a proteção ambiental, a redução do uso indiscriminado de recursos naturais, a manutenção dos parâmetros de qualidade dos compartimentos ambientais, as mudanças de atitudes e hábitos da sociedade, e a perspectiva de uma sociedade que esteja embasada na sustentabilidade.

A agricultura é uma das atividades econômicas desenvolvidas por diversos países, na escala mundial a produção agrícola mais do que triplicou nos últimos 55 anos, em parte propiciados pelos avanços da Revolução Verde (FAO, 2017), como o uso de agrotóxicos (pesticidas) e fertilizantes nas lavouras, a fim de aumentar a produtividade mundial e garantir “alimento para todos” (ANDRADES; GANIMI, 2007). Por outro lado, esse aumento está correlacionado ao crescimento populacional exponencial, atualmente a população mundial corresponde a 7,7 bilhões de habitantes (WORLDMETERS, 2019), sendo necessário que a produtividade seja melhorada e ampliada, a fim de atender toda a população mundial (CARVALHO, 2017). Contudo, mesmo com o crescimento da produtividade agrícola e o avanço significativo no uso de terra nas últimas décadas, não será possível erradicar a fome e a desnutrição até 2050, pois segundo estimativas seria necessário um aumento de 50% na produção agrícola para atender toda a população mundial (FAO, 2017).

As práticas agrícolas requerem diferentes recursos naturais para manutenção do seu funcionamento, primeiramente necessita de uma área bioproductiva; de solo; de água; da ação dos serviços naturais, como os ciclos biogeoquímicos; da presença da biodiversidade e insetos polinizadores, além de sementes e mão-de-obra; etc. Se por um lado verifica-se a importância e dependência dos fatores ambientais para produtividade, por outro lado a agricultura convencional gera diversos impactos ambientais, principalmente em virtude do uso de agrotóxicos e fertilizantes, além da prática de monoculturas, o aumento da degradação do solo e erosão em terras cultiváveis, a perda da biodiversidade, entre outros fatores (DETHIER; EFFENBERGER, 2011; VELTEN et al., 2015). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura – FAO (2017), metade das florestas naturais já foram desmatadas para atividade agrícola, emitindo grandes quantidades de gases do efeito estufa (GEEs) e destruindo diversos habitats e ecossistemas, consequências que corroboram para inexistência da sustentabilidade agrícola.

Dados divulgados pela FAO (2019), estimam que a produção agrícola mundial utilize 2,57 kg/ha e o Brasil utilize 2,77 kg/ha por área de cultivo de agrotóxicos (dados médios – 1990 a 2016), sendo que em 2016 o Brasil utilizou 4,31 kg/ha por área de cultivo. O Brasil é considerado um dos maiores produtores agrícolas do Mundo, nas últimas quatro décadas a produção de grãos quintuplicou, atingindo 237 milhões de toneladas e aumentando a área bioprodutiva em 60% (EMBRAPA, 2018). Consequentemente, o Brasil é um grande consumidor de agrotóxicos em suas plantações, ocupando o 13º lugar no ranking de consumo de agrotóxicos por tonelada de cultivo (VASCONCELOS, 2018 *apud* VELINI; CARBONARI, 2018), algo preocupante em virtude dos impactos desencadeados ao meio ambiente, biodiversidade e saúde humana (ALBUQUERQUE et al., 2016; CARVALHO; NODARI, 2017).

Os resíduos dos agrotóxicos são encontrados nos alimentos, conforme descrito pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) realizado pela Anvisa. Os resultados do biênio de 2013-2015 evidenciaram que aproximadamente 20% das amostras analisadas estavam insatisfatórias, sendo que 3,00% apresentaram concentração de resíduos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) e 18,3% apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura (ANVISA, 2016). Esses resíduos podem ser encontrados no solo e nos recursos hídricos (KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008), desencadeando impactos no ambiente e efeitos à saúde dos seres vivos. Ademais, em virtude da ampla variedade dos agrotóxicos existentes, é difícil a total compreensão dos modos de ação, absorção, biotransformação e toxicidade nos seres vivos (AL-SALEH, 1994).

Os agrotóxicos podem ser divididos de acordo com o organismo alvo de ação, sendo divididos em inseticidas (insetos); fungicidas (fungos); herbicidas (plantas invasoras); acaricidas (ácaros); bactericidas (bactérias) e rodenticidas (ratos). Os inseticidas sintéticos são fabricados a partir de compostos orgânicos sintetizados pelas indústrias a partir de alterações químicas na molécula (KARERU; ROTICH; MAINA, 2013); contudo, tem-se buscado alternativas que visem diminuir a quantidade desses resíduos no ambiente, além de manter a produtividade das culturas (CORRÊA; SALGADO, 2011; KARERU; ROTICH; MAINA, 2013; KOUL; WALIA; DHALIWAL, 2008; SENTHIL-NATHAN, 2013).

A Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU) contempla ações e diretrizes que orientem os países em como atingir a sustentabilidade, nesta constam 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), destacando a importância e urgência da implementação desses em todo o Mundo. O objetivo 2 – Fome zero e Agricultura sustentável, destaca a importância de mudanças nos campos agrícolas, a fim de garantir a segurança alimentar,

promover a agricultura sustentável, aumentar a produtividade agrícola e manter a proteção dos ecossistemas, ampliar os investimentos em pesquisas e desenvolvimentos de novas tecnologias em países em desenvolvimento, bem como manter a variação dos preços de *commodities* agrícolas (ONU, 2015).

A proposição e seleção de novas alternativas deve estar correlacionada a um processo de tomada de decisão, o qual esteja embasada em uma política ambiental proativa e no planejamento ambiental, a fim de averiguar os potenciais impactos e problemas, e saná-los antes da implementação da atividade. É importante que a agricultura busque a segurança alimentar e as melhores práticas de cultivo (CARVALHO, 2017). Ademais, é importante que novas legislações e políticas de regularização dos agrotóxicos reduzam a aplicação destes (CARNEIRO et al., 2015; COSTA RIZZOTTO; LOBATO, 2018), ou que as orientações sobre o uso consciente e as fiscalizações contra a poluição ambiental sejam mais eficazes (CARNEIRO et al., 2015), a fim de alcançar a sustentabilidade agrícola, garantir a integridade dos ecossistemas e/ou otimizar a produção de alimentos orgânicos.

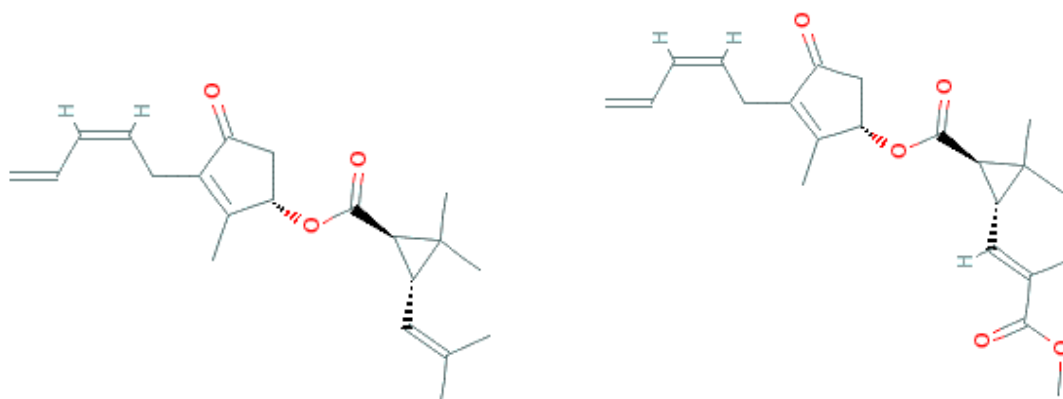
O uso de defensivos agrícolas naturais (KAPHLE; BASTAKOTI, 2018), novas tecnologias e formulações, como os nanocarreadores (CHEN; YADA, 2011; GRILLO et al., 2014a), a rotação de culturas (GONÇALVES et al., 2007) e o controle biológico de pragas (PAL; GARDENER, 2006), são alternativas que precisam ser aplicados no âmbito agrícola mundial, bem como se faz necessário a implementação de novas estratégias de gestão e a responsabilidade dos fabricantes com a comercialização, utilização e mecanismos de ação no ambiente (MAJEED, 2018).

Entre as alternativas propostas cita-se o uso de inseticidas botânicos ou biocidas. Estes têm sido pesquisados nos últimos anos, devido a crescente preocupação com os efeitos do uso abusivo dos inseticidas sintéticos (ISMAN; GRIENEISEN, 2014). Os inseticidas botânicos são extratos ou substâncias naturais derivadas de plantas, sendo, portanto, considerados renováveis, com biodegradação rápida, sem persistência no ambiente, eficazes e mais seguros ambientalmente quando comparados aos inseticidas sintéticos (McKENNA et al., 2013; SENTHIL-NATHAN, 2013). Estes são considerados pouco tóxico ou atóxicos para humanos (ISMAN, 2008; SENTHIL-NATHAN, 2013) e mamíferos, e podem agir sobre grande variedade de pragas agrícolas (REGNAULT-ROGER, 2013).

Um dos inseticidas botânicos extraídos de plantas é o piretro, que é derivado das flores do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum cinereum*) e utilizado no combate aos insetos praga. O extrato de piretro é composto principalmente por piretrinas, sua composição inclui piretrinas do tipo I e II (Figura 1), cinerina I e II e jasmolina I e II. Este

apresenta persistência moderada no ambiente com meia vida no solo de 8 dias e na água de 35 dias (PAN, 2014), são altamente lipofílicos, tem elevado ponto de ebulição, apresentam alta fotodegradação e não sofrem biomagnificação (SCHLEIER; PETERSON, 2011); tem baixa solubilidade na água (<10 ppm) e boa solubilidade em solventes orgânicos. As piretrinas I e II apresentam coeficiente de partição octanol-água (Kow) de 5,90 e de 4,30 a 25 °C, respectivamente (USEPA, 2006); e coeficiente de adsorção de matéria orgânica (Koc) de 5100 para piretrina I e de 2000 para piretrina II, sendo consideradas menos hidrofóbicas e com menor afinidade para solo e sedimentos quando comparados aos piretróides (SANDERS, 2006). Por outro lado, possuem baixa biodisponibilidade e instabilidade na presença de luz, calor e oxigênio (ROBERTS; REIGART, 2013), algo favorável para utilização em campo e redução dos efeitos em organismos não-alvos.

Figura 1 – Estrutura química em 2D de piretrinas I e piretrinas II, respectivamente. A piretrina I apresenta fórmula molecular de $C_{21}H_{28}O_3$, e a piretrina II de $C_{22}H_{28}O_5$



Fonte: NCBI-PubChem Database (2019).

O extrato de piretro natural é derivado de fontes naturais, no caso, o crisântemo, e não apresenta alteração química. Devido a sua fotoinstabilidade no ambiente a molécula do extrato de piretro foi alterada industrialmente para que fosse possível sua utilização contra insetos pragas nos campos agrícolas. Os piretróides são inseticidas sintéticos derivados do piretro, estes foram produzidos a partir de uma alteração estrutural da molécula, no qual adiciona-se um composto sinérgico, como butóxido de piperonila e/ou n-octilbicyclohepteno dicarboximida (ROBERTS; REIGART, 2013), que adicionam átomos de nitrogênio, enxofre e halogênios na estrutura das piretrinas (MONTANHA; PIMPÃO, 2012). Estes surgiram na década de 70, a partir da fabricação de diferentes gerações de piretróides, os quais foram produzidos com diferentes níveis de fotoestabilidade e eficiência no campo (SCHLEIER; PETERSON, 2011). Os piretróides são classificados em dois tipos, o tipo I e tipo II, devido a ausência ou presença

do grupo α -ciano (CN), respectivamente (ROBERTS; REIGART, 2013). Os do tipo I contemplam por exemplo: a aletrina, bifentrina e a permetrina, e os do tipo II são a: λ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e fenvaleratos (FIGUEIREDO, 2014).

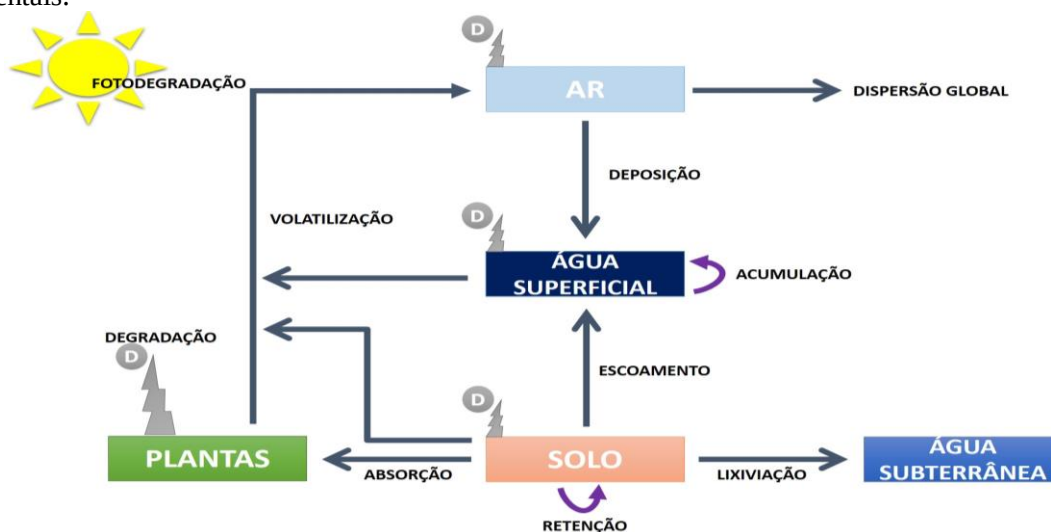
Os piretróides sintéticos foram amplamente utilizados por conta das suas propriedades, eficiência e baixa toxicidade em mamíferos (YOO et al., 2016), ademais apresentam amplo espectro de ação e são necessárias pequenas doses para sua atuação sobre as pragas (SANTOS et al., 2007) estando presente em mais de três mil formulações registradas (USEPA, 2013). Os piretróides são considerados mais seguros do que outros inseticidas, pois tem baixa persistência e menor potencial de contaminar o ambiente, entretanto devido a sua característica lipofílica, após ser absorvido, a sua eliminação é muito difícil (TANG et al., 2018), existindo uma tendência de bioacumulação nos organismos (VELISEK et al., 2007) e podendo causar efeitos à longo prazo (SANTOS et al., 2007). Na escala global o uso de piretróides em 2014 foi de 8.257 toneladas de ingrediente ativo (ZHANG, 2018), em 2002 representavam 25% do mercado mundial de inseticidas (SODERLUND et al., 2002), e é o grupo dos inseticidas mais utilizado na agricultura (SANTOS et al., 2007). Segundo Rossi (2013), os piretróides são utilizados em diversos cultivos agrícolas, sendo indicado em diversas monoculturas (p.ex. soja, milho, cana e algodão). Santos et al. (2007) acrescenta que, a permetrina, cipermetrina e deltametrina são comumente utilizados nos cultivos de arroz, batata, café, melancia e tomate.

O ingrediente ativo do extrato de piretro é classificado como medianamente tóxico (ANVISA, 2019; PAN, 2014), sendo altamente tóxico para insetos, sejam eles alvos ou não-alvo (COX, 2002), e para invertebrados aquáticos e peixes (USEPA 2006), sendo considerado menos tóxico para anfíbios, e com baixa toxicidade para os vertebrados terrestres (SCHLEIER; PETERSON, 2011). O piretro e os piretróides possuem efeitos neurotóxicos, devido a sua interação com os canais de sódio (Na^+) das células do sistema nervoso central. No funcionamento normal os canais de sódio se abrem com a transmissão do impulso nervoso para entrada de íons Na^+ e se fecham após a despolarização. Porém, os piretróides alteram o funcionamento normal, pois mantêm os canais de sódio abertos por um tempo maior, possibilitando um aumento do fluxo de íons Na^+ para o interior da célula nervosa (BURNS et al., 2013; SODERLUND, BLOOMQUIST, 1989; SODERLUND et al., 2002). Esse mecanismo de transmissão contínua e irregular de impulsos nervosos pode causar hiperexcitação do SNC, tremores, descoordenação motora, paralisia e até a morte em organismos expostos (NARAHASHI, 2000; RICHARDSON, 2019).

Geralmente a intoxicação ao extrato de piretro está associada a exposição oral. Nos insetos apresenta efeito de *knockdown*, causando descoordenação motora e prejudicando o voo (FIGUEIREDO, 2014), enquanto que nos mamíferos é rapidamente metabolizado, devido a ação de enzimas do fígado (SADEGHI-HASHJIN et al., 2011). Outras vias de exposição desse composto são a dérmica e a respiratória (AGUIAR-MENEZES, 2005). Destaca-se que a toxicidade desse composto é determinada pela estrutura química, forma de exposição e absorção, metabolização e sítio de ação (SCHLEIER; PETERSON, 2011).

Os piretróides têm sido usados em áreas urbanas e rurais, especificamente no controle de pragas agrícolas, sendo também utilizados no cotidiano como repelentes e *spray* de inseticidas em áreas residenciais, como produtos de uso veterinários (TANG et al., 2018) ou na área médica para controlar ectoparasitas (CASARETT; DOULL, 2008), bem como no uso sanitário no controle de vetores de doença, como do mosquito *Anopheles*, transmissor da malária (DUCHON et al., 2009). Entretanto, devido ao seu uso em áreas rurais e urbanas, surgiu à preocupação com o escoamento destes produtos para os corpos hídricos e que podem afetar a fauna aquática (USEPA, 2013). Neste sentido, percebe-se a necessidade de avaliar a toxicidade do extrato de piretro e dos piretróides em organismos não-alvos, como invertebrados terrestres e aquáticos (p. ex. abelhas e formigas), e vertebrados aquáticos (p. ex. peixes e anfíbios). Estes compostos por meio de processos físico-químicos naturais, como volatilização, escoamento e lixiviação, podem contaminar os compartimentos ambientais, causar toxicidade em organismos não-alvos ou serem degradados, na Figura 2 está evidenciado o comportamento dos agrotóxicos no ambiente.

Figura 2 – Comportamento dos agrotóxicos no ambiente e as interações entre os compartimentos ambientais.



Legenda: D – degradação

Fonte: Autoria própria (2019).

As abelhas são insetos benéficos que nidificam e forrageiam no entorno de diversas plantas, sendo fundamentais para o processo de polinização e produção de alimentos (POTTS et al.; 2010). Estas são essenciais para manutenção do equilíbrio ecológico e da biodiversidade, pois são responsáveis por aproximadamente 80% da polinização nas espécies de angiospermas (MOISSET; BUCHMANN, 2015). As abelhas apresentam excelentes respostas aos xenobióticos, evidenciando que estas podem ser usadas como espécies bioindicadores. As abelhas podem ser afetadas indiretamente pelo uso dos inseticidas e agrotóxicos em geral. Isto remete a preocupação mundial da desordem do colapso das colônias (CCD - *Colony Collapse Disorder*) diagnosticado em *Apis mellifera* (LINNAEUS, 1758), na qual as abelhas forrageiras não conseguem retornar às suas colônias, o que pode estar associada aos efeitos da exposição aos agrotóxicos neurotóxicos (ELLIS et al., 2010; vanENGELSDORP et al., 2011). Os efeitos destacados pela CCD são principalmente a morte das abelhas operárias, seu enfraquecimento ou desnorreamento (STOKSTAD, 2007; vanENGELSDORP et al., 2009); permanência da rainha na colmeia abandonada pelas operárias e falta de insetos ou outros organismos que se alimentam do mel e néctar (STOKSTAD, 2007).

Além da CCD em colônias de *Apis mellifera*, que não foi oficialmente diagnosticada no Brasil (PIRES et al., 2016), o declínio de populações de abelhas ocorre por uma combinação de fatores estressores, causando uma sobrecarga de estresse sobre a colônia (CORNMAN et al., 2012; GOULSON et al., 2015). A perda de hábitat e as mudanças climáticas (GOULSON et al., 2015), os agrotóxicos tais como inseticidas e fungicidas (SIMON-DELISO et al., 2014), as doenças causadas por vírus, ácaros ou parasitas, como o fungo *Nosema* (p. ex. *Nosema ceranae*) (TRAVER et al., 2018) e o ácaro *Varroa destructor* (CONTE et al., 2010), as restrições nutricionais, devido a expansão das monoculturas e redução da diversidade de recursos florais (CORNMAN et al., 2012; GOULSON et al., 2015), são evidenciadas como possíveis causadores do declínio das abelhas. O desaparecimento das abelhas em todo o mundo, pode afetar a produção agrícola, os apicultores e o equilíbrio dos ecossistemas (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014).

A abelha híbrida da espécie *Apis mellifera* Africanizada são frequentemente estudadas em virtude dos seus hábitos generalistas em relação a coleta de recursos florais (pólen, néctar e resina vegetal) (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2013) e tem distribuição geográfica na América. As abelhas estão declinando em todo mundo, desencadeando dessa forma uma preocupação global, não somente porque as abelhas melíferas desempenham importantes serviços de polinização agrícola, mas também porque a apicultura e o mercado dos produtos apícolas têm

grande importância na economia mundial (ARZOUMANIDIS; RAGGI; PET, 2019; GELDMANN; GONZÁLEZ-VARO; 2018; HUNG et al., 2018).

No Brasil e nos EUA, o uso indiscriminado de inseticidas sintéticos em monoculturas é um fator preponderante na mortalidade de abelhas no entorno dos campos de cultivo (MALASPINA et al., 2008; PETTIS et al., 2013). O enfraquecimento das colônias de *A. mellifera* Africanizada, no Brasil diferem dos sintomas clássicos da CCD (PIRES et al., 2016) e casos de intoxicação das colônias com inseticidas são frequentemente relatados e detectados quando se observa mortalidade em massa na colônia (MAGGI et al., 2016; PIREZ et al., 2016). Segundo Sanchez-Bayo e Goka (2014), os resíduos dos agrotóxicos foram encontrados no mel, no pólen e na cera das colmeias, fazendo com que as abelhas estejam constantemente em contato com essas substâncias tóxicas. Portanto, é importante uma avaliação toxicológica mais ampla dos efeitos das exposições a longo prazo nessas espécies.

Nos vertebrados, o grupo que está mais ameaçado de extinção é o dos anfíbios, espécies consideradas mais vulneráveis às mudanças climáticas por possuírem uma pele permeável e úmida (STEBBINS; COHEN, 1995). O declínio das populações anfíbias em todo o mundo é evidente e diversas causas têm sido evidenciadas, segundo Alford e Richards (1999), Beebee e Griffiths (2005), Hayes et al. (2010a) e McCallum (2007), a contaminação hídrica, a perda de habitats, radiação ultravioleta, aquecimento global, as infecções parasitárias, espécies invasoras, entre outros fatores, podem afetar os anfíbios e contribuir para o seu declínio.

A Classe Amphibia é composta por três ordens (Anura, Caudata Gymnophiona) e apresenta ampla diversidade de espécies, com um total de 8.090 espécies descritas ao redor do mundo. A ordem Anura é a mais abundante com um total de 7.135 espécies (FROST, 2019). O ciclo de vida em ambientes diferentes, aquático e terrestre nos anfíbios (BECKER et al., 2010) contribui para que eles estejam em contato com uma maior quantidade de xenobióticos. Em comparação com outros vertebrados, os anfíbios realizam a biotransformação e excreção dos xenobióticos mais lentamente (GARDNER; OBERDÖSTER, 2005), desencadeando efeitos nocivos ao organismo, como danos moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos, etc.

Os estudos toxicológicos são importantes para compreender as causas do declínio das populações anfíbias. Esses estudos precisam utilizar espécies bioindicadores, uma espécie muito utilizada na Ecotoxicologia com anfíbios é a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*; SHAW, 1802). A rã-touro da família Ranidae é encontrada naturalmente em várias localidades do leste da América do Norte, sendo uma espécie com hábitos generalista, facilmente adaptável e com grande faixa de tolerância (FROST, 2019). Posteriormente, a rã-touro foi amplamente distribuída em vários países devido sua produção comercial, principalmente para finalidades

alimentícias e de vestuário (CULLEY, 1981). O grande problema são fugas acidentais de espécimes e, conseqüente invasão de habitats naturais. A rã-touro é uma espécie generalista e predadora, no Brasil é considerada uma espécie invasora, podendo alimentar-se de espécies nativas, que são menores e facilmente capturáveis (CUNHA; DELARIVA, 2009; SILVA, 2016).

A poluição da água causada por xenobióticos (ALFORD; RICHARDS, 1999), entre eles os agrotóxicos, fármacos e metais-traços é um fator frequentemente relacionado a toxicidade nos anfíbios. A contaminação dos corpos hídricos pode ser causada pelos seus múltiplos usos e diferentes resíduos que são descartados pela sociedade, tais como efluentes industriais, urbanos e agrícolas. A contaminação da água altera os parâmetros de qualidade e ameaçam os humanos e a biodiversidade (RITTER et al., 2011; SHARMA; BHATTACHARYA, 2017), principalmente a biota aquática, como peixes e girinos de anfíbios. Vários estudos têm evidenciado os efeitos dos xenobióticos nos anfíbios a partir de diferentes níveis de biomarcadores, bioquímicos (CARVALHO et al., 2017; RICHARDS; KENDALL, 2002); morfológicos (FRANCO-BELUSSI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2016); fisiológicos (COSTA et al., 2015; SALLA et al., 2016); reprodutivos (HAYES et al., 2010b) e comportamentais (ROHR; CRUMRINE, 2005).

É importante evidenciar que resíduos de piretróides, cipermetrina (0,11 ppm e 0,003 ppm) e deltametrina (0,004 ppm), foram encontrados no Córrego do Cintra na cidade de Botucatu-SP, sendo que no entorno existe produção agrícola (BELLUTA et al., 2010). Feo et al. (2010), evidenciou que amostras de água do rio Ebro Delta na Espanha continham resíduos de deltametrina (0.000002 a 0.000058 ppm) e cipermetrina (7.3×10^{-7} a 0.000057 ppm), enquanto que nas amostras de sedimentos foi observado apenas concentrações de cipermetrina (0.0000083 a 0.000072 ppm). Nos estudos de Antonious et al. (1997), foi evidenciado que após 1h existia 0,9 ppm e depois 30 dias continha 0,002 ppm de piretrinas nas amostras de solo, enquanto que na água de escoamento superficial após 11 dias de aplicação e com a primeira chuva continha 0.000036 ppm de piretrinas nas amostras.

Por outro lado, em análises de pólen apícola nas cinco regiões brasileiras foi averiguado a presença de piretróides, sendo que na média das concentrações dos piretróides nas regiões a cipermetrina (0.0024 ppm) e a permetrina (0.0027 ppm) foram as mais frequentes (SANTOS, 2005). Ademais, a região Sudeste foi a que apresentou as maiores concentrações médias dos piretróides (deltametrina – 0,0017 ppm; ciflutrina - 0,003 ppm; cipermetrina - 0,0036 ppm e permetrina – 0,004 ppm) nas amostras de pólen. Nos estudos de Pettis et al. (2013), a análise de amostras de pólen (n = 19) em sete áreas agrícolas nos EUA apresentaram resíduos de

piretróides no pólen em torno de 0,1 à 4,4 ppm, sendo que na cipermetrina verificou-se a maior concentração (4,38 ppm) e a bifentrina a menor concentração (0,11 ppm). Além de ser encontrada piretrinas no pólen de plantas de oxicoco na concentração de 0,16 ppm. Por outro lado, nos estudos de Malhat et al. (2015), as amostras de mel coletadas no Egito evidenciaram resíduos de permetrina (0.0019 ppm), cialotrina (0.0035 ppm) e fenvaleratos (0.0099 ppm).

Nesse contexto, percebe-se a necessidade de estudar o extrato de piretro em espécies anfíbias e nas abelhas, visto que não existe concentração do valor máximo permitido na legislação brasileira para o extrato de piretro e nem para piretróides nas classes de água e nem no solo e águas subterrâneas nas Resoluções Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), respectivamente na Resolução nº 357/2005 (alterada pela Res. nº 410/2009 e nº 430/2011) que: “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências” (BRASIL, 2005, p.1); e na Resolução nº 420/2009 (alterada pela Resolução nº 460/2013) que: “Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas (BRASIL, 2009, p.1). Somente na Portaria de Consolidação nº 5/2017 que descreve a “consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde”, está evidenciado no padrão de potabilidade da água a concentração permitida da permetrina no valor máximo permitido de 0,02 ppm ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$) na água potável (BRASIL, 2017, p.1)

Além da busca por inseticidas botânicos, eficazes e “ecoverdes”, atualmente têm-se buscado novas tecnologias e formulações de biocidas que otimizem a sua utilização e diminuam tanto a sua capacidade de contaminação ambiental, como os seus possíveis efeitos adversos em organismos não-alvos. Para tanto, uma proposta é a utilização de sistemas carreadores, que possam modular a liberação dos ingredientes ativos em função de tempo e direcionar de maneira mais eficiente o composto no organismo alvo (KARERU et al., 2013).

Neste contexto, as nanopartículas são um exemplo de sistemas carreadores capazes de encapsular ingredientes ativos e liberá-los de forma modificada (KUMAR, 2000; RIEHEMANN et al., 2009; SILVA et al., 2012), com o intuito de aprimorar a sua ação em vários processos tecnológicos e industriais (ERIKSSON et al., 2009). Uma das utilizações são como sistemas carreadores de defensivos agrícolas que potencialmente garantem maior segurança para o meio ambiente, pois reduzem a quantidade desses compostos aplicados nos campos agrícolas (CHEN; YADA, 2011; GRILLO et al., 2014a). O encapsulamento de ingredientes ativos em nanopartículas pode aprimorar os mecanismos de absorção e,

consequentemente, aumentar sua eficácia e estabilidade devido a proteção contra interferências da temperatura, pH, umidade e luz solar (BILIA, 2014), bem como reduzindo sua toxicidade (GRILLO et al., 2014a).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), assim como as nanopartículas poliméricas, lipossomas e emulsões são exemplos de sistemas nanocarreadores que foram desenvolvidos como alternativa aos convencionais (YOON; PARK; YOON, 2013). As NLS são preparadas usando lipídios na sua composição, que são sólidos em temperatura ambiente (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; MULLER, 2000) e um sistema de carregamento de ingredientes ativos lipofílicos efetivos, visto que permite um melhor controle das propriedades físico-químicas do composto (BILIA, 2014) e não necessita de solventes orgânicos no preparo (MEHNERT, MADER, 2001). Estas são consideradas nanopartículas orgânicas que são constituídas de compostos orgânicos, principalmente lipídios e polímeros, sendo consideradas partículas sólidas, solúveis e com baixa persistência no ambiente (KUMAR; LAI, 2014). Outras vantagens das NLS são sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, melhor biodisponibilidade de ingredientes ativos, alta estabilidade e ampla aplicabilidade (DAS; CHAUDHURY, 2011; EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA, 2012). Destaca-se que as nanopartículas orgânicas são pouco estudadas em comparação com as inorgânicas, porém nos últimos anos a indústria farmacêutica tem ampliado suas pesquisas em virtude das suas vantagens em comparação com outros nanomateriais (KUMAR; LAI, 2014).

Os nanocarreadores de defensivos agrícolas podem ser denominados de nanopesticidas, estes possuem excelentes propriedades para serem aplicados nos campos agrícolas. Os nanopesticidas são considerados eficientes e seguros ao ambiente, diminuindo a quantidade de compostos químicos aplicados no campo, auxiliando na melhoria da produtividade agrícola, diminuindo os impactos no ambiente e ecossistemas, e dessa forma auxiliando para uma agricultura sustentável (CHEN; YADA, 2011; PEREZ-DE-LUQUE, RUBIALES; 2009; PRASAD et al., 2017; WALKER et al., 2017). Contudo, as pesquisas com nanomateriais precisam progredir cada vez mais, para que assim seja possível estabelecer legislações, sistemas regulatórios e avaliação de risco específica para esses sistemas carreadores (KOOKANA et al., 2014; WALKER et al., 2017).

Os estudos nanotoxicológicos com o efeito sobre abelhas somente foi realizado com a avaliação toxicológica de nanomateriais, existindo até o momento somente seis estudos na área, sendo que destes mais de 80% são realizados com nanopartículas metálicas. Os nanomateriais compostos por metais e óxidos de metais estão amplamente utilizados em diversos produtos industrializados, representando 37% dos nanomateriais descritos no mundo, de acordo com o

Inventário de Produtos de Consumo de Nanotecnologia (VANCE et al., 2015). Dentre os estudos em abelhas temos os seguintes nanomateriais: TiO_2 , Ag-TiO_2 e ZnO-TiO_2 (ÖZKAN et al., 2014), no qual avaliou-se a concentração letal; ZnO (MILIVOJEVIC et al., 2015) que ponderou o comprometimento metabólico, análises enzimáticas (GST e AChE), taxa de alimentação e sobrevivência; ZnO (GLAVAN et al., 2017) que aferiu análises enzimáticas (GST e AChE) e comportamentais (taxa de alimentação); CdO e PbO a partir da avaliação da toxicidade no intestino das abelhas (DABOUR et al., 2019), ou estimando a concentração letal, a taxa de alimentação, expressão de enzimas (GST, CYP450, SOD e CAT) e atividade da acetilcolinesterase (NAGGAR et al., 2018); e por fim, somente um estudo com nanopartículas de boro (DAĞLIOĞLU et al., 2015) avaliando a concentração letal.

Na revisão sobre a toxicidade de nanomateriais em anfíbios divulgada por Amaral et al. (2019), existem aproximadamente 30 estudos toxicológicos realizados no mundo com nanopartículas, sendo que destes mais de 70% foram realizados com nanomateriais inorgânicos e somente 23,4% foram realizados com nanopartículas orgânicas, sendo que dessas principalmente avaliou-se as NPs de carbono (21,28%). Estes estudos avaliaram diferentes níveis de biomarcadores, como celulares e teciduais (OLIVEIRA et al., 2016; SPENCE et al., 2016; THOMPSON et al., 2017); genotóxicas (BOUR et al., 2017), enzimáticas (BIRHANLI et al., 2014); desenvolvimento e comportamentais (IBARRA et al., 2015; ROBBENS et al., 2010; YSLAS et al., 2012).

As combinações de inseticidas botânicos, como o piretro, e as NLS podem ser um sistema interessante de estudo visando o controle de pragas, pois ambos são considerados seguros, menos danosos ao ambiente e eficazes, principalmente devido a sua composição natural e/ou com componentes orgânicos, além da baixa persistência no ambiente desses compostos. Adicionalmente, devido à liberação modificada das nanopartículas e a rápida biodegradação dos inseticidas botânicos evidencia-se uma potencial diminuição da quantidade de resíduos no ambiente, minimizando os danos que eles podem vir a causar à biodiversidade.

Neste contexto, acredita-se que este estudo visa complementar a pesquisa de estruturas nanométricas aplicadas ao setor agrícola e, também, abrir novas perspectivas e potencialidades sobre a aplicação desse sistema carreador para os inseticidas botânicos. Adicionalmente, o desenvolvimento de sistemas carreadores de bioativos, visando aplicações na agricultura brasileira e mundial, tem sido alvo de estudo do grupo de pesquisa ao qual o presente projeto está vinculado, que tem como foco o desenvolvimento de sistemas micro e nanoparticulados para defensivos agrícolas (CAMPOS et al., 2014, CLEMENTE et al., 2014a; CLEMENTE et al., 2014b; GRILLO et al., 2010; GRILLO et al., 2011; GRILLO et al., 2012; GRILLO et al.,

2014a; GRILLO et al., 2014b; PEREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012), para alguns fármacos (de MELO et al., 2010; de MELO et al., 2011; de MELO et al., 2012; de MELO et al., 2014) e, mais recentemente, para repelentes e inseticidas botânicos (CAMPOS et al., 2019a; OLIVEIRA et al., 2018).

Em contrapartida, verifica-se a necessidade de estudos nanotoxicológicos para avaliar os possíveis riscos, efeitos e toxicidade das nanopartículas nos organismos, visto que estas podem ser reconhecidas pelos animais como substâncias antigênicas e estranhas ao organismo (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010), como já relatado em alguns estudos (BRACCHETA et al., 2012; CLEMENTE et al., 2014a; DIENI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Dessa forma, estudos nanotoxicológicos que avaliem comparativamente o efeito do ingrediente ativo, do sistema carreador e dos polímeros e/ou surfactantes presentes nas formulações nanocarreadores são essenciais para comprovar ou refutar a hipótese da potencial toxicidade desses compostos em organismos não-alvos. Os estudos com espécies anfíbias e espécies de abelhas na área da Nanotoxicologia são extremamente importantes, visto que ambas as populações dessas espécies têm declinado rapidamente nos últimos anos em todo o mundo, principalmente devido a mudanças no hábitat e os potenciais efeitos letais e subletais gerados pelos xenobióticos (ALFORD; RICHARDS, 1999; CORNMAN et al., 2012; GOULSON et al., 2015; McCRINK-GOODE, 2014).

O objetivo desse trabalho foi o preparo e a caracterização físico-química de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) como um sistema carreador do extrato de piretro, com o intuito de aperfeiçoar a eficácia de liberação desse inseticida botânico na agricultura, como possível alternativa para o controle de pragas agrícolas e diminuição da quantidade de ingredientes ativos e seus adjuvantes no ambiente, que podem vir a apresentar toxicidade a organismos não-alvos. Objetivou-se também avaliar a toxicidade do inseticida botânico, do sistema carreador livre e encapsulado com o extrato de piretro em organismos não-alvos como as abelhas que forrageiam nos campos de cultivo onde entrariam em contato com esses xenobióticos, bem como os girinos de anfíbios (fase imatura que vive em meio aquático), que podem entrar em contato com esses compostos por meio da lixiviação e escoamento dos mesmos para corpos hídricos presentes nas áreas agrícolas.

A hipótese do presente estudo é que as nanopartículas lipídicas sólidas podem ser utilizadas como sistemas carreadores do extrato de piretro e induzir menos efeitos adversos nos organismos não-alvos (abelha e girinos) do que o ingrediente ativo e as nanopartículas isoladas.

2. METODOLOGIA

Esse trabalho foi desenvolvido entre grupos de pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP e do *Campus* da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) de Sorocaba. Na UNESP foi realizada todo o preparo, caracterização e análise das formulações das nanopartículas lipídicas sólidas, enquanto que na UFSCar foram realizados os bioensaios com abelhas e girinos e as análises de mortalidade, histológicas, morfométricas e hematológicas. Além disso, o trabalho contou ainda com a colaboração de outros grupos de pesquisa, dentre eles: FATEC (Faculdade de Tecnologia) de Sorocaba para realização das análises genotóxicas e com a UNESP de Rio Claro para análises histológicas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo nº 1472160516/2016 - CEUA / UFSCar – Anexo 1), onde os bioensaios foram desenvolvidos.

2.1 Produtos Químicos

O extrato de piretro Pestanal[®] (extrato do inseticida botânico, CAS 8003-34-7, padrão analítico, Anexo 2), o álcool polivinílico (PVA, 30-70 kDa, CAS 9002-89-5, hidrolizado > 99%, Anexo 3) e tripalmitato de glicerol (tripalmitina, CAS 555-44-2, pureza ≥ 99%) foram comprados da empresa Sigma-Aldrich[®] (Anexo 4). Clorofórmio (CHCl₃, CAS 67-66-3, pureza ≥ 99%) foi comprado da empresa Dinâmica Química Contemporânea LTDA, todos esses produtos foram usados no preparo das nanopartículas. A acetona (CAS 67-64-1, pureza = 100%) foi comprada de uma empresa local e usada como solvente no preparo da solução de piretro.

2.1.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

As Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) foram preparadas segundo o método de emulsificação/evaporação do solvente (VITORINO et al., 2011) no laboratório de Nanotecnologia Ambiental da UNESP - *Campus* Sorocaba. Inicialmente, foi preparada 30 mL de solução aquosa contendo 1,25% PVA (álcool polivinílico) e mantida sob agitação constante (100 rpm). Em seguida, foi preparada a solução orgânica com 250 mg de tripalmitato de glicerol e 5 mg de extrato de piretro (ingrediente ativo – i.a.), os quais foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. Após a solução orgânica foi vertida na solução aquosa e submetida à sonicação

(Unique DES500) por 5 minutos e uma potência de 40 W. A emulsão formada foi levada ao homogeneizador Ultraturrax (Tecnal TE-102) por 7 minutos e 14.000 rpm. Em seguida, o solvente orgânico foi removido com o auxílio do evaporador rotativo e a emulsão foi concentrada até o volume final de 10 mL. A concentração final do extrato de piretro na formulação encapsulada foi de 0,05 mg.mL⁻¹. Destaca-se que as nanopartículas lipídicas sólidas sem o extrato de piretro também foram preparadas.

2.2 Caracterização das nanopartículas

Foram realizados planejamentos experimentais para que as formulações preparadas tivessem boa estabilidade físico-química e melhor eficiência de encapsulação do piretro nas nanopartículas. Para avaliar a estabilidade físico-química em função do tempo foram avaliados os seguintes parâmetros para manutenção do sistema coloidal: polidispersão, distribuição de tamanho, potencial zeta, pH, concentração de nanopartículas e eficiência de encapsulação do extrato de piretro. Todos os parâmetros foram analisados no intervalo entre 0 e 120 dias para verificar a estabilidade da formulação em função do tempo e expressos pela média e erro padrão (média ± erro padrão).

2.2.1 Diâmetro médio e Polidispersão por Espectroscopia de Correlação de Fótons

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons foi realizada para determinar o tamanho médio e a polidispersão das nanopartículas (em nm). As suspensões de nanopartículas foram diluídas em água Milli-Q (2 µL de solução em 1998 µL de H₂O) e avaliadas no analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern[®] Instruments, UK) a um ângulo fixo de 90 °C e temperatura de 25 °C.

O potencial zeta (em mV) das nanopartículas foi determinado a partir da técnica de microeletroforese em um analisador de potencial zeta (Zetasizer Nano ZS 90 - Malvern[®] Instruments, UK). As análises foram realizadas da mesma forma que descrita acima para diâmetro hidrodinâmico e polidispersão. O pH das suspensões das nanopartículas foi medido com o auxílio do pHmetro (Tecnal[®], Brasil). O monitoramento do pH das suspensões coloidais auxilia na verificação da estabilidade química dos componentes da formulação. Todas as análises foram realizadas em triplicata e em função do tempo (GOVENDER et al., 1999; VENKATRAMAN et al., 2005).

2.2.2 Rastreamento de Partículas

Os dados de concentração e distribuição de tamanho de partículas foi analisado em um equipamento de rastreamento de partículas (NTA - Nanosight LM 10) utilizando uma célula volumétrica, laser com comprimento de onda de 532 nm e as imagens coletadas com uma câmera CMOS, sendo estas analisadas com o software NanoSight (versão 2.3 - Malvern® Instruments, UK). Destaca-se que medições da água deionizada foram realizadas entre as análises para não haver contaminação das amostras e divergências nos resultados. As suspensões de NLS foram diluídas 10.000 vezes e analisadas em triplicata, injetando a amostra (1 mL) dentro da célula volumétrica (Figura 3). Cada réplica foi analisada cinco vezes, havendo aproximadamente 2000 partículas em cada análise, a partir do movimento Browniano (ANDERSON et al., 2013).

Figura 3 – Nanopartículas lipídicas sólidas. A) Representação esquemática das nanopartículas lipídicas sólidas com o extrato de piretro. B) Visualização de nanopartículas lipídicas sólidas em solução a partir do equipamento de rastreamento de partículas (NTA).



Fonte: Autoria própria (2017).

2.2.3 Eficiência de Encapsulação

A quantidade total do extrato de piretro presente na suspensão de nanopartículas foi determinado diluindo as suspensões com solvente orgânico (metanol ou acetonitrila). Esta solução foi filtrada em membrana Millipore® de 0,22 µm e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - Varian ProStar®). O método de ultrafiltração/centrifugação foi utilizado para determinar a quantidade de inseticida encapsulado, no qual a suspensão de nanopartículas foi submetida à centrifugação em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 10 kDa (Microcon – Millipore®). A taxa de associação do extrato de piretro foi determinando pela diferença de quantificação da fração não associada do inseticida

botânico e a quantidade total inicialmente adicionada nas nanopartículas associadas (GAMISANS et al., 1999; SCHAFFAZICK et al., 2003; KILIC et al., 2005). As análises foram realizadas em triplicata e em função do tempo.

2.2.3.1 Metodologia Analítica de quantificação do ativo por CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada na quantificação do extrato de piretro encapsulados nas nanopartículas. A análise foi realizada em sistema controlador, bomba isocrática, detector UV-VIS e injetor automático. As suspensões de nanopartículas previamente filtradas foram injetadas (100 µL) em coluna cromatográfica Phenomenex, Gemini, C₁₈ fase reversa, 5µ 110A, 150 x 3,90mm, eluídas com um gradiente de acetonitrila (Solvente A) e água deionizada (Solvente B): 75% solvente A e 25% do solvente B (AMBROZIC-DOLINSEK et al., 2008). O fluxo de fase móvel foi de 0,8 mL.min⁻¹ e a absorbância foi monitorada em comprimento de onda de 225 nm. A curva analítica do extrato de piretro foi determinada com o intuito de averiguar a eficiência de encapsulação do inseticida botânico nas nanopartículas lipídicas sólidas.

2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para averiguar as prováveis interações entre o extrato de piretro e as nanopartículas. As análises foram realizadas em espectrofotômetro de FTIR (Agilent) em uma faixa de 400 a 4000 cm⁻¹, utilizando 128 varreduras por amostra com resolução de 2 cm⁻¹. As amostras do extrato de piretro, lipídio, surfactante (PVA), mistura física, as NLS encapsuladas ou não ao inseticida botânico foram ponderadas usando o acessório de reflectância total atenuada (ATR), que possibilita análises de compostos em pó, pastas ou que não podem ser verificados em forma de pastilhas ou filmes (POLLETO et al., 2007; WANG et al., 2010). Foram observadas alterações nas bandas de absorção dos espectros a fim de correlacioná-las com os sistemas carreadores.

2.2.5 Calorimetria diferencial exploratória

As análises termais do extrato de piretro, do lipídio, das nanopartículas associadas ou não ao piretro foram realizadas no DSC Q20 TA Instruments®. As amostras, tinham massas entre 2-10 mg, as quais foram pesadas em balança analítica e colocadas em cadinhos de alumínio e

selados com tampa. Utilizou-se um cadinho vazio com tampa como referência. O padrão térmico de análise considerou uma rampa de aquecimento dos 10 aos 300 °C, com uma taxa de 10 °C por minuto, em atmosfera de nitrogênio (50 mL.min⁻¹).

2.2.6 Microscopia de Força Atômica

O microscópio de força atômica (MFA - BTO2217, Nanosurf, Switzerland) foi utilizado para avaliar a morfologia da superfície das nanopartículas. As suspensões foram sobrepostas em placas de silício previamente preparadas com remoção do dióxido de silício, assim facilitando a interação/adesão da amostra nas placas. As análises foram realizadas em modo de contato intermitente, usando cantilever comercial ContAL-G-10 (Budgetsensors).

2.3 Bioensaio toxicológico com *Apis mellifera* Africanizada

Para os bioensaios com abelhas *Apis mellifera* Africanizada (Figura 4) foi utilizada uma caixa com favos operculados (Figura 5A) de três colônias saudáveis. As colônias estavam localizadas em apiários no Estado de São Paulo. A emergência das abelhas operárias foi monitorada no laboratório e os indivíduos recém-emergidos (Figura 5B) foram transferidas para potes plásticos e alimentadas *ad libitum* com solução aquosa açucarada (50% água: 50% açúcar) para aclimatar durante 24 h (Figura 5C).

Figura 4 – Exemplos de abelha operária recém-emergida de *Apis mellifera* Africanizada. A) Operárias recém-emergidas utilizadas nos bioensaios. Barra = 1 cm; B) Visão geral de uma abelha operária recém-emergida em laboratório



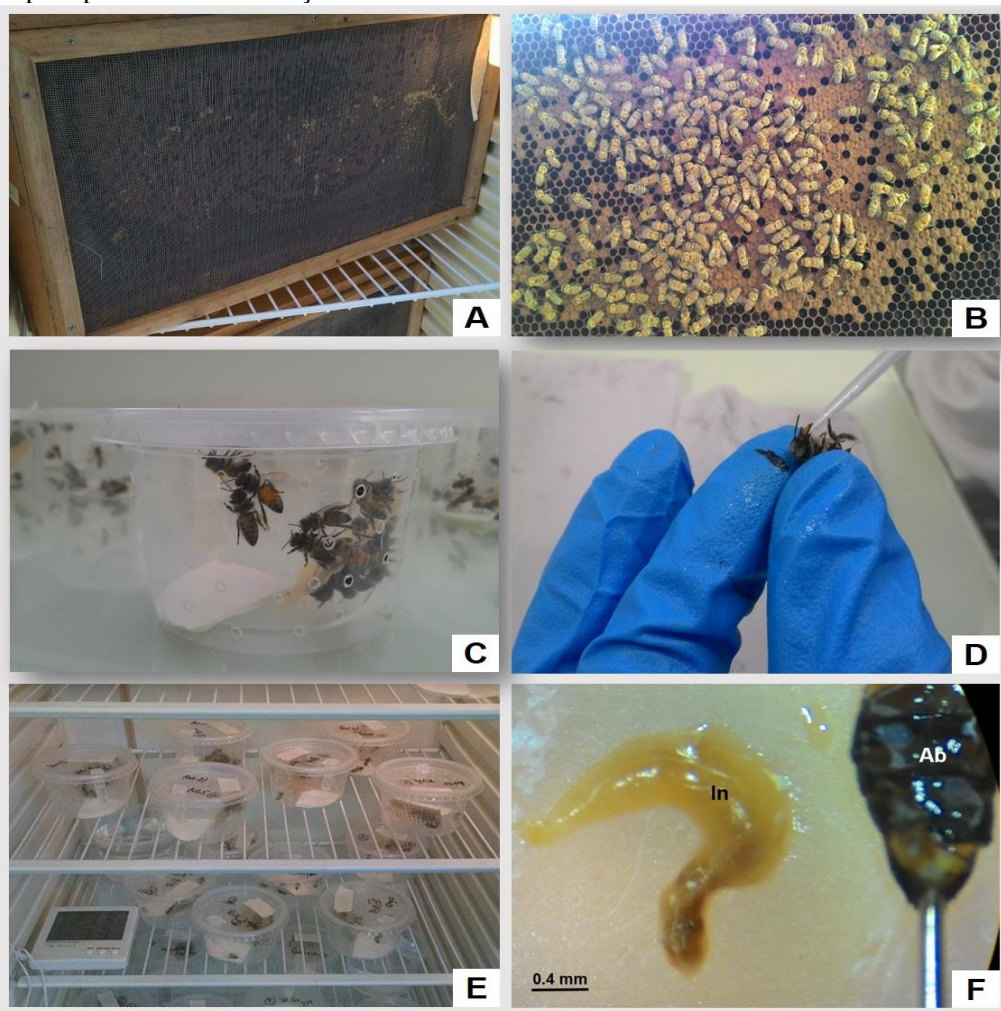
Fonte: A) Acervo pessoal (2017), B) Miotelo, L.

Posteriormente, as abelhas foram divididas em diferentes grupos experimentais ensaiados em triplicata: I) Controle (CTL) – solução açucarada; II) Extrato de piretro (PIR_{1ng}) – dose

subletal de $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; III) Extrato de piretro ($\text{PIR}_{10\text{ng}}$) – dose subletal de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; IV) Piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas ($\text{NLS} + \text{PIR}_{1\text{ng}}$) - dose subletal de $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; V) Piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas ($\text{NLS} + \text{PIR}_{10\text{ng}}$) – dose subletal de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; IV) Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS); V) Álcool polivinílico (PVA) – Controle do surfactante; VI) Acetona (ACN) – controle do veículo/solvente (Apêndice 2). A escolha da dose para o bioensaio foi baseada na DL50 do Piretro – 22 ng por abelha (48 h) (USEPA, 1991), e foram realizadas as respectivas diluições em série (cascata de diluição) da solução estoque (10 mL) das diferentes formulações utilizadas nos bioensaios toxicológicos, inclusive da formulação de NLS isoladas também foram diluídas para padronizar a quantidade de partículas na solução.

A exposição aguda foi realizada individualmente por via oral (Figura 5D), e cada solução dos diferentes grupos experimentais foram administrados na boca das abelhas ($1 \mu\text{L}$) com o auxílio da micropipeta. Após a exposição aguda, as abelhas foram mantidas em potes plásticos e alimentadas com solução açucarada 50% (v:v) e mantidas na estufa B.O.D. com umidade relativa de $70\% \pm 5$ e temperatura de $32 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Figura 5E). Foram realizados dois bioensaios, o primeiro sendo de análise de sobrevivência ($N = 12$ abelhas por grupo experimental e em triplicata), e o segundo para análises histológicas ($N = 15$ abelhas por grupo experimental e em triplicata). No primeiro bioensaio, a mortalidade foi registrada diariamente em cada pote de cada grupo experimental, até que a última abelha morresse. Nesse bioensaio foi adicionado o grupo deltametrina (DLT, $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) para controle positivo. No segundo bioensaio, após transcorridas 48 h do início do bioensaio, as abelhas ($N = 6$ por grupo) foram dissecadas e o intestino médio (ventrículo) removido (Figura 5F) e rotineiramente processados para análises histológicas e morfométricas.

Figura 5 – Imagens evidenciando o bioensaio toxicológico em abelhas recém-emergidas de *Apis mellifera* Africanizada. A) Quadros de cria com favos operculados; B) Abelhas recém-emergidas no favo da cria; C) Aclimação das abelhas recém-emergidas em potes de plásticos contendo alimentador; D) Exposição oral das abelhas realizada individualmente em todos grupos experimentais; E) Abelhas expostas e divididas por grupos experimentais e mantidas na estufa B.O.D; F) Intestino médio removido da abelha pelo processo de dissecação.



Fonte: Autoria própria (2017).

2.3.1 Procedimentos histológicos

O intestino médio (ventrículo) das abelhas foi coletado e fixado em solução de paraformaldeído tamponado 4% por 24 h e 4 °C, e então lavados em tampão do fixador (0.1 mol.L⁻¹ tampão fosfato em pH 7.4) durante 30 minutos e por duas vezes. Em seguida, o material foi rotineiramente desidratado em concentrações crescentes de álcool, de acordo com a metodologia descrita por Silva-Zacarin et al. (2012). Em seguida, o material foi embebido em historesina líquida e depois emblocado na historesina de inclusão. Posteriormente, o material foi submetido à microtomia para preparação de lâminas histológicas com secções de 3 µm de espessura, que posteriormente, foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina

(ANEXO 5), montadas, analisadas histopatologicamente de forma qualitativa e semiquantitativa, e por fim documentadas em fotomicroscópio de campo claro (Leica Microscope® - DM1000) e software (Leica Application Suite V3.8 software). Para cada abelha por grupo experimental ($n = 6$), foram analisadas duas lâminas por indivíduo e três cortes histológicos não sequenciais.

Outras lâminas histológicas com secções de 3 μm de espessura foram submetidas a diferentes colorações para análises histoquímicas. O Azul de Bromofenol e Xilidine Ponceau para detecção de proteínas totais; ácido periódico de Schiff (PAS) para detecção de glicoconjugados neutros; Sudan Black-B para detecção de lipídios (protocolos em SILVA-ZACARIN et al., 2012 e ANEXO 6-9).

2.3.2 Análise semiquantitativa do intestino médio

A avaliação das alterações histológicas a partir dos parâmetros para análise semiquantitativa foi realizada a partir do protocolo de Bernet et al. (1999) e alterações histológicas (lesões no órgão) para intestino de abelhas de acordo com protocolo de Soares-Lima et al. (2018) e Grella et al. (2019). Dois parâmetros foram estabelecidos para determinar o índice de alteração no intestino médio das abelhas de cada grupo experimental, usando fatores de importância e valores de escore (adaptado de BERNET et al., 1999), conforme Quadro 1:

Quadro 1 – Índice de lesão (I_{le}) para alteração histológica em abelhas (*Apis mellifera* Africanizada) e parâmetros utilizados na análise semi-quantitativa.

Escore (a) Fator de Importância (w)	0 - Sem ocorrência	1 - Pouca ocorrência	2 - Moderada ocorrência	3 - Severa ocorrência	Lesão no órgão
(1) importância patológica mínima (dano reversível)	$I_{le} = 1 \times 0$		$I_{le} = 1 \times 2$		Células eliminadas Secreção apócrina
(2) importância patológica moderada (dano geralmente reversível)		$I_{le} = 2 \times 1$		$I_{le} = 2 \times 3$	Vacuolização
(3) importância patológica severa (dano irreversível)	$I_{le} = 3 \times 0$		$I_{le} = 3 \times 2$		Núcleo picnótico Ninhos de células regenerativas

Fonte: Adaptado de Bernet et al. (1999) e Soares-Lima et al. (2018).

A análise histopatológica foi classificada em escores variando de 0 a 3, dependendo do grau e extensão da alteração: 0 - sem ocorrência, 1 – pouca ocorrência, 2 – moderada ocorrência, 3 – severa ocorrência. O fator de importância foi estabelecido para cada lesão observada (eliminação de células, secreção apócrina, vacuolização, alteração nos ninhos de células regenerativas, núcleos picnóticos) na análise qualitativa, de acordo com sua importância patológica da lesão, sendo classificada em: (1) importância patológica mínima (o dano pode ser facilmente reversível); (2) importância patológica moderada (o dano pode ser reversível na maioria dos casos) e (3) importância patológica severa (dano irreversível). Inicialmente, foi calculado o índice de lesão para cada alteração (ex. eliminação de células) por animal, usando a seguinte equação de Bernet et al. (1999):

$$I_{le} = a \times w \quad \text{Equação 1}$$

(Legenda: a = valor do escore; w = fator de importância)

O índice de lesões total no órgão foi calculado pela soma dos fatores de importância (Σ_{al}) multiplicado pelos valores de escore das alterações por indivíduo, usando a seguinte equação definida por Bernet et al. (1999):

$$I_{org} = \Sigma_{alt} (a \times w) \quad \text{Equação 2}$$

As médias e o erro padrão entre os indivíduos de cada grupo experimental foram calculados para os índices de lesão e índice do órgão.

2.3.3 Análise por imunofluorescência de nanopartículas marcada com fluoróforo

Nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas com fluoróforo (18:0 NDB / PE - NBD-DSPE) e depois administradas individualmente em abelhas operárias de *Apis mellifera* para comprovar a ingestão dos nanomateriais. O intestino médio foi coletado nos tempos 0, 2, 4 e 24 h após a ingestão e analisados no Microscópio de Varredura Confocal a Laser (Leica ®) por meio da varredura do intestino médio (montagem total) no eixo xyz.

2.4 Bioensaio toxicológico com girinos de rã-touro

Os girinos recém-eclodidos de rãs-touro - *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802 – Figura 6) foram adquiridos do ranário comercial (Figura 7A) localizado em Santa Bárbara d'Oeste, São Paulo, Brasil (22°78'S, 47°40'W) e transportados ao Laboratório de Ecotoxicologia e Biomarcadores em Animais da UFSCar – Campus Sorocaba, Brasil. No laboratório, os girinos foram mantidos em aquários de 60 L, equipados com aeração contínua ($1,2 \text{ Lh}^{-1}$), água declorinada ($> 6,0 \text{ mg O}_2.\text{h}^{-1}$), com temperatura constante ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e fotoperíodo natural ($\cong 12\text{h}$ claro: 12h escuro) durante o período de aclimação (7 dias - Figura 7B). Os animais foram alimentados com folhas orgânicas de espinafre e a alimentação foi cessada 48 horas antes do bioensaio.

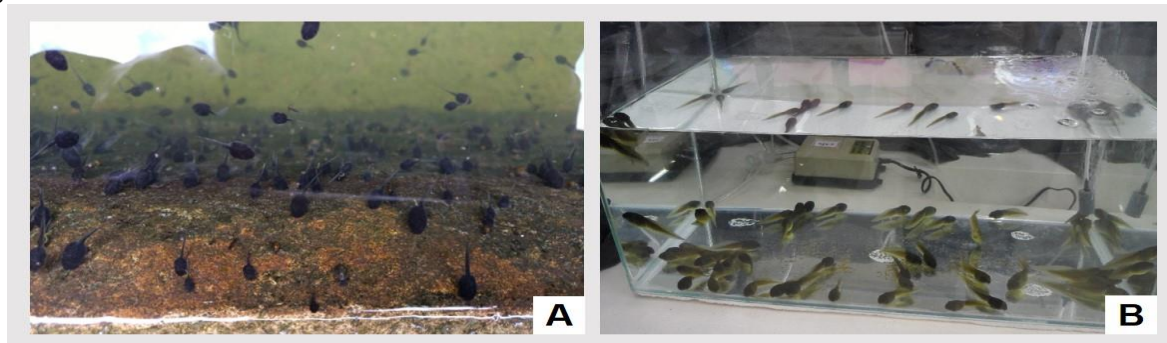
Figura 6 - Morfologia externa de um exemplar de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner: A) Girino de rã-touro medindo aproximadamente 9cm. Barra = 1 cm. B) Visualização da epiderme de girino de rã-touro em estereoscópio. Barra = 2 mm.



Fonte: Acervo pessoal (2017).

Durante os bioensaios os parâmetros nos aquários (20 L) foram mantidos de forma idêntica ao descrito no período de aclimação. Os parâmetros físico-químicos da água foram diariamente monitorados para garantir que fossem mantidos dentro dos níveis aceitáveis, semelhantes aos encontrados na maioria das águas continentais brasileiras (Resolução Conama 357/2005, CETESB, 2009). Durante os períodos de aclimação e exposição, as medições de amônia foram realizadas diariamente. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2002). Os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade (Protocolo nº 1472160516/2016 - CEUA / UFSCar), que segue as leis brasileiras reguladoras.

Figura 7 - Bioensaio toxicológico em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner conduzido laboratorialmente: A) Girino de rã-touro no ranário; B) Período de aclimação dos girinos no laboratório.



Fonte: Acervo pessoal (2017).

2.4.1 Determinação da CL50

A concentração do extrato de piretro utilizada nos bioensaios toxicológicos foi previamente definida pela determinação de CL50 (48 h), em virtude da inexistência de dados sobre a concentração e os efeitos deste inseticida botânico em girinos de rã-touro. Os girinos de rã-touro no estágio 25 de Gosner foram expostos em sistemas de frascos (potes – Figura 8), de acordo com a metodologia desenvolvida por Nunes et al. (2008).

Figura 8 – Delineamento experimental do bioensaio de mortalidade (CL50) em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Cada garrafa contém um indivíduo, que representa uma réplica dentro do grupo experimental.



Fonte: Acervo pessoal (2017).

Na literatura não existe a concentração do extrato de piretro nos compartimentos ambientais, e os relatos de concentrações de piretróides tem uma ampla variação. Nesse contexto, primeiramente foi realizada a CL50 com cinco concentrações - $0.07 \mu\text{g.L}^{-1}$; $0.7 \mu\text{g.L}^{-1}$; $7 \mu\text{g.L}^{-1}$; $70 \mu\text{g.L}^{-1}$; $700 \mu\text{g.L}^{-1}$. A concentração de $7,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi selecionada de outro estudo realizado em *L. catesbeianus* expostos a permetrina (piretróide comercial) (JOLLY et al., 1978).

Na sequência foi realizado um segundo bioensaio, onde selecionou-se concentrações na faixa de 70 e 700 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a partir dos resultados preliminares, bem como foi considerada a concentração de permetrina (piretróide tipo I) usada na mesma espécie (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) nos estudos realizados por França et al. (2015). Assim, o gradiente de concentração foi definido de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 600 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para permitir um menor espaçamento entre as concentrações próximas ao limite inferior e um maior espaçamento próximo ao limite superior desse gradiente, priorizando dessa forma os valores que foram descritos para CL50 de permetrina em girinos de rã-touro. Os animais foram alocados individualmente em potes contendo 1 L de água. Dessa forma, cada girino representa uma réplica no teste toxicológico ($N = 8$ girinos por concentração), no total tinham seis grupos experimentais com diferentes concentrações do piretro (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 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 580 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e dois grupos controle (água e acetona) (GARCIA, 2018). A concentração determinada pela CL50 foi de 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e no bioensaio de exposição aguda optou-se em utilizar 1/5 da CL50 (80 $\mu\text{g.L}^{-1}$) para o extrato de piretro.

2.4.2 Exposição aguda (48h)

Os girinos de rã-touro (144 indivíduos) no estágio 25 de Gosner (1960; Anexo 10) foram randomicamente divididos em seis grupos experimentais ensaiados em triplicata: I) Controle (CTL); II) Extrato de piretro (PIR); III) Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS); IV) Extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR); V) Álcool polivinílico (PVA); VI) Controle acetona (CTA) (Figura 9A-B; Apêndice 2).

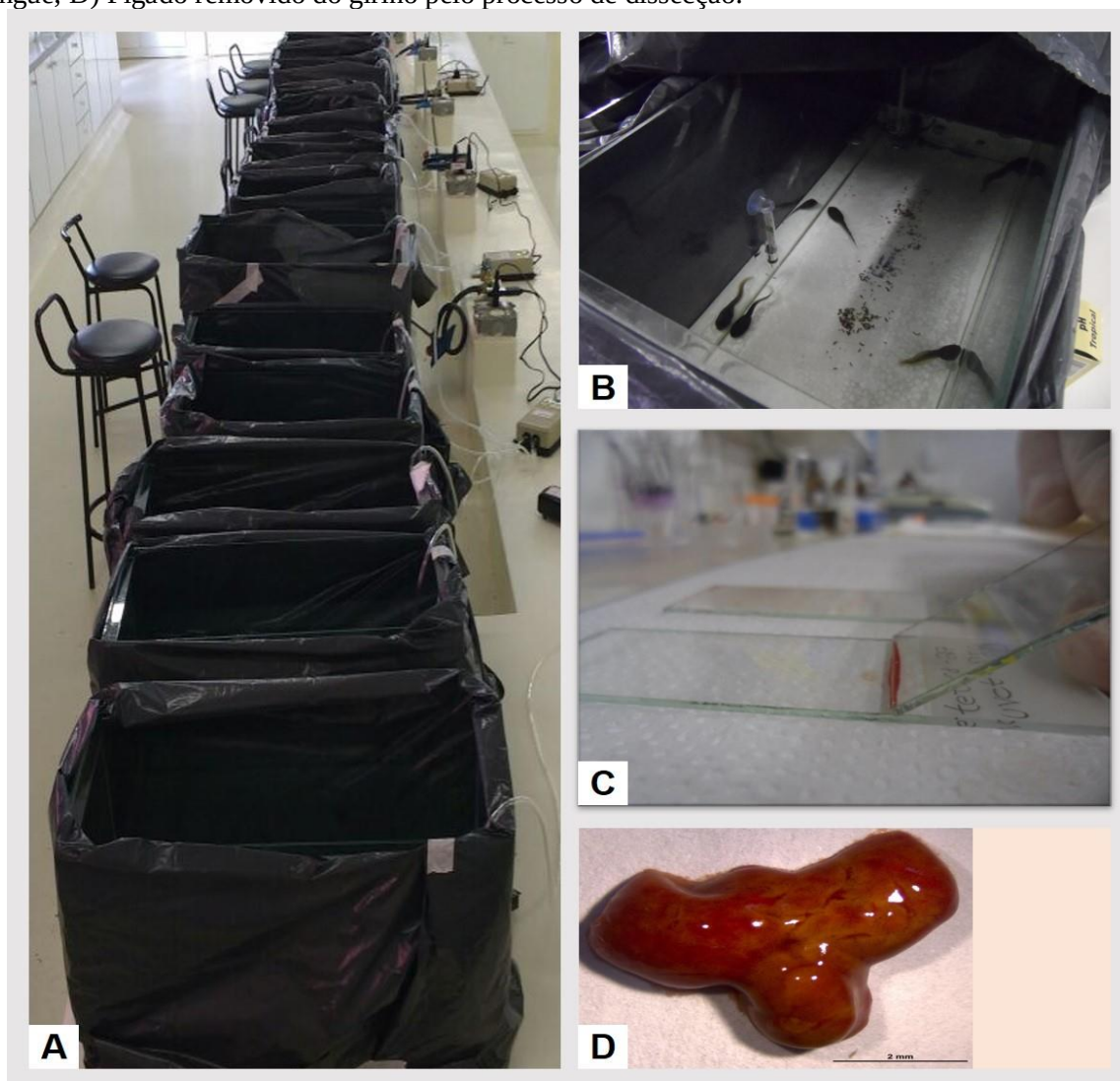
Cada grupo experimental continha 24 indivíduos divididos em três aquários ($N = 8$ girinos por aquário). Cada aquário foi preenchido com 8 L (1 L por girino) de água declorinada ($> 6,0 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$) e aerada ($1,2 \text{ L.h}^{-1}$). Durante os bioensaios, todos os aquários com os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e com fotoperíodo de 12:12 h. Os aquários foram cobertos com sacos pretos para evitar distúrbios externos. A exposição aguda ao piretro e nanopartículas (NPs) foi realizada em sistema estático por 48 h.

2.4.2.1 Leucócitos e Eritrócitos

Após o bioensaio, amostras de sangue de girinos ($N = 6$ indivíduos de cada grupo experimental) foram retiradas por punção cardíaca, após imersão em água gelada (15 minutos), seguida de anestesia local com lidocaína (50 mg.g^{-1}). Uma parte das amostras de sangue (2 μL de sangue) foi armazenada em microtubos heparinizados contendo solução salina (100 μL de

formaldeído citrato) para contagem de eritrócitos em duplicata em câmara de Neubauer (número de células $\times 2,5.10^3 \text{ mm}^{-3}$), sendo que foram contados 6 animais de cada grupo experimental. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando uma lâmina com esfregaço de sangue (Figura 9C), aproximadamente $10 \mu\text{L}$ de sangue de cada indivíduo ($N = 6$ por grupo), após a coleta o material foi fixado em metanol frio puro durante 20 min (4°C) e depois corados com Instant Prov Kit segundo o protocolo disponível no produto.

Figura 9 - Bioensaio toxicológico em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner: A e B) Exposição aguda realizada em triplicata; C) Processo de esfregaço com amostras de sangue; D) Fígado removido do girino pelo processo de dissecação.



Fonte: Autoria própria (2017).

2.4.2.2 *Micronúcleo e outras anormalidades nucleares*

Uma alíquota de 10 µL de sangue foi usada para realizar o esfregaço sanguíneo para o ensaio de micronúcleos e a análise de outras anormalidades nos eritrócitos, seguindo os procedimentos descritos por Lajmanovich et al. (2014) e Fenech (2000). A lâmina com a amostra de sangue foi fixada em metanol puro e frio (4 ° C) por 20 min, e depois corada pelo método de Rosenfeld (1947), segundo Ranzani-Paiva et al. (2013, protocolo em ANEXO 11). Posteriormente, foram analisadas 1.000 células por animal, em cada grupo experimental (N = 6 indivíduos de cada grupo experimental).

2.4.2.3 *Ensaio Cometa*

As lâminas foram previamente preparadas em agarose (1,5% em PBS, pH 7.4, Ca^{2+} e Mg^{2+}) e mantidas à temperatura ambiente. O sangue dos girinos foi coletado (10 µL por indivíduo, N = 3 girinos por grupo experimental) e transferido para um microtubo com 10 µL de PBS (tampão fosfato, pH 7.4, Ca^{2+} e Mg^{2+}). Após, 10 µL do sangue diluído foram misturados com 80 µL de agarose em baixo ponto de fusão (LMP; 0,5% em PBS, pH 7.4, Ca^{2+} e Mg^{2+}) e distribuídos em lâminas pré-preparadas. Estas lâminas foram imediatamente cobertas com uma lamínula e refrigeradas (4 ° C) por até 20 minutos.

Depois, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e imersas numa solução de lise previamente preparada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-lauroil-sarcosina 1%), sendo mantidas a 4 ° C durante 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes em solução tampão (PBS, pH 7.4, Ca^{2+} e Mg^{2+}) por 5 minutos cada e então submetidas à câmara de eletroforese (26 V e 300 mA) por 20 minutos com tampão alcalino (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13). Transcorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas em solução de neutralização (Tris 0,4 M) por 5 minutos e três vezes consecutivas. As lâminas foram colheradas por precipitação de prata e analisadas ao fotomicroscópio (Microscópio Leica - DM1000). As análises estatísticas representam o número de células com cauda de DNA nos grupos e classe de dano (classe 0, 1, 2, 3 e 4), essa metodologia foi adaptada de Lourenço et al. (2010) and Dalboni et al. (2012).

2.4.2.4 Análises morfológicas de alta resolução e morfométricas

Em um segundo momento, foram realizadas as coletas de material histológico após a exposição aguda de 48h. Os girinos de rã-touro foram eutanasiados por concussão cefálica conforme as normas de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMA, 2001), e em seguida os órgãos foram expostos por corte crânio-caudal e coletou-se o fígado (Figura 9D). O fígado foi pesado e fixado em solução de paraformaldeído tamponado 4% por 24 h e 4 °C, e então lavados duas vezes em tampão do fixador (0.1 mol.L^{-1} tampão fosfato em pH 7.4) durante 30 minutos. Posteriormente, o material foi rotineiramente desidratado em concentrações crescentes de álcool, de acordo com a metodologia descrita por Silva-Zacarin et al. (2012). Em seguida, o material foi embebido em historesina líquida e depois emblocado na historesina de inclusão.

O material histológico foi submetido à microtomia para a preparação de lâminas histológicas, e posteriormente as secções histológicas (3 μm de espessura) foram coradas com Azul de Bromofenol para análises morfométricas (item 3.4.2.4.1) com Hematoxilina-Eosina para análise histopatológica (item 3.4.2.4.2); e com outras colorações histoquímicas para detecções específicas: Xilidine Ponceau; PAS; Sudan-Black B para detecção de proteínas, gliconjugados neutros e lipídios, respectivamente (protocolos em SILVA-ZACARIN et al., 2012 e ANEXO 7-9 respectivamente); Azul de Toluidina para detecção de mastócitos, e Azul da Prússia para detecção de hemossiderina (ANEXO 12-13 respectivamente). Todas essas análises foram documentadas em fotomicroscópio de campo claro (Microscópio Leica® - DM1000) e software (Leica Application Suite V3.8 software).

2.4.2.4.1 Análises biométricas e morfométricas em girinos

As análises biométricas foram realizadas a partir da determinação da massa corpórea total dos girinos no estágio 25 de Gosner ($N = 10$ indivíduos por grupo experimental) e dos fígados coletados desses mesmos exemplares ($N = 10$ indivíduos por grupo experimental). A partir desses dados foi realizado o cálculo do índice hepatossomático (IHS) em todos os grupos experimentais, o qual relaciona a massa do fígado com massa corpórea do girino, segundo a fórmula abaixo:

$$[\text{IHS} = (\text{peso do fígado/peso do girino}) \times (100)] \quad \text{Equação 3}$$

As análises morfométricas foram realizadas a partir da contagem de células melanomacrofágicas nas secções histológicas do fígado dos animais dos grupos experimentais (N = 5 indivíduos por grupo experimental) mediante parâmetros previamente preestabelecidos (Tabela 1, OLIVEIRA et al., 2016). Deste modo, foi realizada a contagem das células melanomacrofágicas para confirmar ou refutar a hipótese de que essas aumentam sua frequência nos grupos expostos.

Tabela 1 – Parâmetros estabelecidos para as análises morfométricas de células melanomacrofágicas presentes no fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).

	CONTAGEM DAS CÉLULAS MELANOMACROFÁGICAS
Nº DE INDIVÍDUOS	5
Nº DE SECÇÕES POR LÂMINA	10
LENTE OBJETIVA	4x
CAMPO DE VISÃO	Maior área tecidual
ANÁLISE MORFOMÉTRICA	Contagem das células melanomacrofágicas

Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2016).

2.4.2.4.2 Análise semi-quantitativa do fígado

A avaliação das alterações histológicas a partir dos parâmetros para análise semi-quantitativa foi realizada a partir do protocolo de Bernet et al. (1999) e das alterações histológicas (lesões no órgão) para fígado de girinos de rã-touro a partir do estudo de Oliveira et al. (2016). Dois parâmetros foram estabelecidos para determinar o índice de alteração no fígado dos girinos de cada grupo experimental, no caso o fator de importância (w) e os valores de escore (a), conforme Quadro 2 abaixo:

Quadro 2 – Índice de lesão do órgão (I_e) para alteração histológica em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), evidenciando os parâmetros utilizados na análise semi-quantitativa, bem como o fator de importância de cada lesão e os escores.

Lesão do Órgão (I_e)	Fator de Importância (w)	Escore (a)
<i>Distúrbios circulatórios</i>		0 – Sem ocorrência 2 – Pouca ocorrência 4 – Moderada ocorrência 6 – Severa ocorrência
a) Hemorragia	1	
b) Hemácias turgidas	1	
c) Edema intercelular	1	
d) Infiltração de hemácias	1	
e) Congestão sinusoidal	2	
f) Dilatação sinusoidal	2	
<i>Mudanças regressivas</i>		
a) Citoarquitetura dos hepatócitos	1	
b) Corpos de Mallory	1	
c) Corpos acidófilos	1	
d) Lipidose	1	
e) Esteatose macrovesicular	2	
f) Picnose	2	
g) Apoptose	2	
h) Necrose	3	
<i>Mudanças progressivas</i>		
a) Hipertrofia	1	
b) Hiperplasia	2	
<i>Respostas inflamatórias</i>		
a) Células melanomacrofágicas	1	
b) Infiltração eosinofílica	1	
c) Infiltração leucocitária	1	
d) Granuloma (tumor benigno)	3	

Legenda: A lesão no órgão foi dividida em distúrbios circulatórios que indicam patológicas no sangue e no fluxo sanguíneo; mudanças regressivas significam que funções do órgão foram reduzidas ou tornaram-se inexistentes; mudanças progressivas indicam um aumento da atividade celular ou tecidual; por fim, as respostas inflamatórias que desencadeiam a ativação do sistema imune e células de defesa. O fator de importância foi classificado em: 1- mínima importância patológica (dano reversível); 2- moderada importância patológica (dano geralmente reversível); 3- severa importância patológica (dano irreversível). E o escore foi classificado a partir da frequência de visualização no tecido hepático em 0 – sem ocorrência; 2 - pouca ocorrência; 4 - moderada ocorrência e 6 - severa ocorrência

Fonte: Adaptado de Bernet et al. (1999) e Oliveira et al. (2016).

A análise histopatológica foi classificada a partir da determinação de escores variando de 0, 2, 4 e 6, dependendo do grau e extensão da alteração: 0 - sem ocorrência, 2 – pouca ocorrência, 4 – moderada ocorrência, 6 – severa ocorrência. E pelo fator de importância estabelecido para cada lesão observada na análise qualitativa, conforme descrito Quadro 2. De acordo com sua importância patológica da lesão, sendo classificada em: (1) importância patológica mínima (o dano pode ser facilmente reversível); (2) importância patológica moderada (o dano pode ser reversível na maioria dos casos) e (3) importância patológica severa (dano irreversível). Na análise semi-quantitativa, primeiramente foram analisados indivíduos

de todos os grupos experimentais ($N = 5$ indivíduos por grupo experimental), sendo analisadas um total de sete secções histológicas não sequenciais por lâmina/indivíduo em diferentes áreas teciduais (campos de visão), e em seguida calculou-se o índice de lesão e o índice de lesão total no órgão.

As equações utilizadas no cálculo do índice de lesão e do índice de lesão total no órgão seguiram as equações descritas por Bernet et al. (1999), conforme o item 3.3.2. As médias e o erro padrão entre os indivíduos de cada grupo experimental foram calculados para os índices de lesão e índice do órgão.

2.5 Análises estatísticas

OS dados de caracterização físico-química das nanopartículas, dos bioensaios toxicológicos com abelhas e girinos foram previamente submetidos a análises estatísticas, sendo realizada a análise de homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov).

2.5.1 Caracterização físico-química das nanopartículas

Os dados da caracterização físico-química das nanopartículas foram submetidos ao teste T, seguido do teste de Mann Whitney. O nível de significância foi de 0,05. O programa utilizado para análise estatística foi o GraphPad Prism versão 5.0.

2.5.2 Bioensaio toxicológico com abelhas de mel poli-híbrida

Os dados dos bioensaios de abelhas foram submetidos ao teste One-Way ANOVA foi aplicado para dados não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. O nível de significância foi de 0,05 e o programa utilizado para análise estatística foi o GraphPad Prism versão 5.0.

Para a análise de sobrevivência para cada grupo experimental foi realizado o teste de Log-Rank (Kaplan-Meier method) e o tempo de sobrevivência entre os grupos foi analisado pelo teste de Holm-Sidak. O nível de significância foi de 0,05 e o programa utilizado para análise estatística foi o software SigmaPlot 13.

2.5.3 Bioensaio toxicológico com girinos de rã-touro

Os dados dos bioensaios de girinos foram submetidos ao teste One-Way ANOVA aplicado para dados paramétricos e seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, para comparar os resultados obtidos para diferentes grupos experimentais. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para dados não paramétricos, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. O nível de significância foi de 0,05 e o programa utilizado para todas as análises estatísticas foi o GraphPad Prism versão 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sessão de resultados e discussão da tese está organizada em capítulos, os quais estão apresentados no formato de artigos científicos (publicados ou em fase de preparação) e conforme as normativas dos periódicos científicos. O capítulo I intitulado de “*Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees*” publicado na revista *Chemosphere* (v. 236, p.124282, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.013>) apresenta os dados da caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas, bem como avalia a toxicidade a partir da exposição oral em abelhas *Apis mellifera* Africanizada, organismos não-alvos que estão em declínio no mundo e são polinizadores extremamente importantes tanto em campos agrícolas como na vegetação nativa.

O capítulo II intitulado de “*Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles*” apresenta os dados hematológicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de sangue de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ao extrato de piretro e as nanopartículas lipídicas sólidas carregadas ou não com o inseticida botânico. Este artigo foi aceito para publicação na revista *Environmental Pollution* (v. 253, p.1009-1020, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.037>). Os anfíbios são os vertebrados que estão mais ameaçados no mundo, sendo necessário compreender em nível celular e molecular a possível toxicidade de nanopesticidas.

O capítulo III intitulado de “*Liver morphology, histochemistry and morphometric analysis in bullfrog tadpoles exposed pyrethrum extract and nanopesticide*” destaca as alterações histopatológicas no fígado de girinos rã-touro a partir de análise morfológicas, histoquímicas e morfométricas quando expostos ao inseticida botânico e ao nanopesticidas. Este capítulo está em fase de preparação para submissão. Os estudos nanotoxicológicos são importantes para compreender a potencial toxicidade de nanomateriais em organismos não-alvos, como vertebrados, que podem absorver esses compostos e desencadear respostas em diferentes níveis de organização biológica.

4. CAPÍTULO 1 – NANOPESTICIDA BASEADO NO INSETICIDA BOTÂNICO PIRETRO E SEU POTENCIAL EFEITO EM ABELHAS

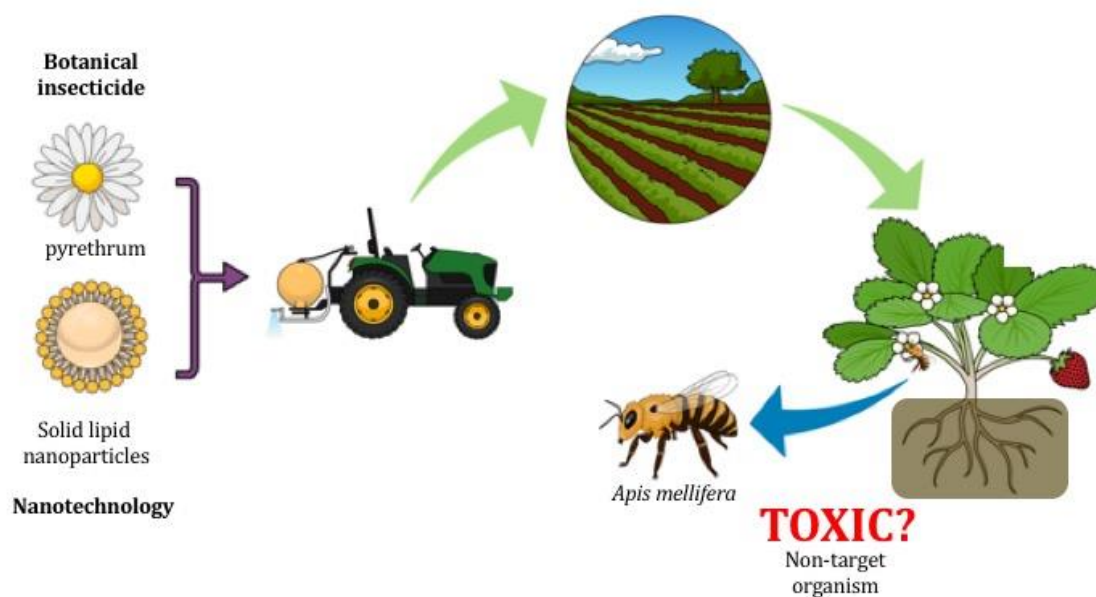
RESUMO

A nanotecnologia tem o potencial de superar os desafios da agricultura sustentável, e os nanopesticidas podem controlar as pragas agrícolas e aumentar a produtividade agrícola com menor impacto ambiental. No entanto, é importante avaliar sua toxicidade em organismos não-alvo, como as abelhas (*Apis mellifera*), que forrageiam nos campos. Os objetivos deste estudo foram desenvolver um nanopesticida baseado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) carregadas com extrato de piretro (PIR), avaliar suas propriedades físico-químicas e a toxicidade a curto prazo em um organismo não-alvo (abelha). NLS+ PIR foi estável físico-quimicamente durante 120 dias. NLS+PIR tinha um diâmetro final de $260,8 \pm 3,7$ nm e um índice de polidispersão de $0,15 \pm 0,02$ nm, em comparação com a NLSs que tinham um diâmetro de $406,7 \pm 6,7$ nm e um índice de polidispersão de $0,39 \pm 0,12$ nm. O extrato de piretro encapsulado as nanopartículas teve uma eficiência de encapsulação de 99%. A análise de sobrevivência das abelhas melíferas evidenciou que o $\text{PYR}_{10\text{ng}}$ reduziu a longevidade em comparação ao grupo controle ($P \leq 0,01$). Nanopartículas livres e $\text{PYR}_{10\text{ng}}$ causaram alterações morfológicas no intestino médio das abelhas, enquanto que as nanopartículas com piretro encapsulado não tiveram efeito significativo nas células digestivas, por isso são consideradas mais seguras, pelo menos a curto prazo, para as abelhas. Estes resultados são importantes para entender os efeitos dos nanopesticidas nos insetos benéficos e podem reduzir os impactos ambientais dos agrotóxicos a partir do uso de novas formulações.

PALAVRAS-CHAVES: Nanopesticida. Biocida. Agricultura sustentável. Nanopartículas lipídicas sólidas. Abelhas.

CHAPTER I

NANOPESTICIDE BASED ON BOTANICAL INSECTICIDE PYRETHRUM AND ITS POTENTIAL EFFECTS ON HONEYBEES



Published Article (online) - Oliveira, C. R. et al. Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. *Chemosphere*, v. 236, p.124282, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.013>

ABSTRACT

Nanotechnology has the potential to overcome the challenges of sustainable agriculture, and nanopesticides can control agricultural pests and increase farm productivity with little environmental impact. However, it is important to evaluate their toxicity on non-target organisms, such as honeybees (*Apis mellifera*) that forage on crops. The aims of this study were to develop a nanopesticide that was based on solid lipid nanoparticles (SLNs) loaded with pyrethrum extract (PYR) and evaluate its physicochemical properties and short-term toxicity on a non-target organism (honeybee). SLN + PYR was physicochemically stable after 120 days. SLN + PYR had a final diameter of 260.8 ± 3.7 nm and a polydispersion index of 0.15 ± 0.02 nm, in comparison with SLN alone that had a diameter of 406.7 ± 6.7 nm and a polydispersion index of 0.39 ± 0.12 nm. SLN + PYR had an encapsulation efficiency of 99%. The survival analysis of honeybees indicated that PYR_{10ng} presented shorter longevity than those in the control group ($P \leq 0.01$). Empty nanoparticles and PYR_{10ng} caused morphological alterations in the bees' midguts, whereas pyrethrum-loaded nanoparticles had no significant effect on digestive cells, so are considered safer, at least in the short term, for honeybees. These results are important in understanding the effects of nanopesticides on beneficial insects and may decrease the environmental impacts of pesticides.

KEYWORD: Nanopesticide. Biocide. Sustainable agriculture. Solid lipid nanoparticles. Bees.

4.1 Introduction

Agri-food production and population growth are amongst the greatest challenges facing humanity. Agriculture is one of the primary drivers of the economy by providing food to the population and benefiting producing countries, but increased population growth has significantly increased humanity's global ecological footprint, surpassing the biocapacity of the Earth (SEKHON, 2014). Human populations increase exponentially over time, whereas food production increases in a linear manner. Conventional agricultural practices generally have negative impacts on the environment and biodiversity, as they require many resources such as energy, water, and soil, and large amounts of agrochemicals and fertilizers are used to improve productivity.

The U.S. Department of Agriculture's (USDA) National Institute of Food and Agriculture (NIFA, 2018) aims to find innovative solutions to issues related to agriculture, food, the environment, and communities. NIFA's priorities include global food security and hunger, food safety, plant health and production, and animal health and production (NANO, 2018). Many of these issues may be resolved using nanotechnology, which has demonstrated great potential in providing novel solutions to agricultural problems (SCOTT; CHEN, 2012; MUKHOPADHYAY, 2014). In the last few decades, nanoscience and nanotechnology have been at the forefront of the development of several nanomaterials for different medical and industrial purposes. Nanoparticles have been developed for a wide variety of applications in the biomedical and electronic fields, while research on nanoparticles as carriers of pesticides has only been conducted in the last decade, and there are still many variables to be investigated before their use on crops (LIU et al., 2008; ANJALI et al., 2010; GOPAL et al., 2012; KAH et al., 2014; SARLAK et al., 2014; MISHRA et al., 2017; KIM et al., 2018).

Nanotechnology can deliver agricultural substances such as nanopesticides and nanofertilizers that increase farm productivity, decrease the environmental impact and the amount of resources used, improve pest control, and support sustainable agriculture, particularly in developing countries. Furthermore, nanocarriers of pesticides and fertilizers have economic advantages for agriculture, because their stability and controlled-release mechanism increase efficiency and reduce the amount of chemicals required on crops (PEREZ-DE-LUQUE; RUBIALES, 2009; CHEN; YADA, 2011; GRILLO et al., 2016; PRASAD et al., 2017; WALKER et al., 2017).

However, the effects of nanoparticles should be fully evaluated before they are incorporated into sustainable agriculture. The U.S. National Science Foundation (NSF) and

Environmental Protection Agency (EPA) encourage the investigation of various aspects of nanomaterials, such as their toxicity to non-target organisms, their destination, transportation, and safety in the environment, and their status in terms of food legislation, and support the creation of a nanomaterial database and the maintenance of food regulations (SCOTT; CHEN, 2012).

Pyrethrum extract is a natural botanical insecticide that is extracted from chrysanthemum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Chrysanthemum cinereum*) flowers, is composed of pyrethrin types I and II, cinerin and jasmolin, and can be used on crops to control pest insects (PEAY et al., 2006). Natural pyrethrum (a.i.) is highly lipophilic, photodegradable, has low water solubility ($<10 \text{ mg.L}^{-1}$), does not exhibit biomagnification (SCHLEIER; PETERSON, 2011), and leaves no toxic residues in plants. However, it is more expensive than synthetic pyrethroids (PEAY et al., 2006) and is highly toxic to insects, aquatic invertebrates, and fish (USEPA, 2006). Pyrethroids are insecticides that were developed to improve the photodegradation of natural pyrethrin, and thus be used as an insecticide in the field (SANTOS et al., 2007), and have great stability and target selectivity. Examples of pyrethroids include deltamethrin, permethrin, and cypermethrin (MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

However, for the use of pyrethrum extract in the field it is necessary, at first, to load it into solid lipid nanoparticles (SLNs) to prevent its fast degradation, improving its stability and efficiency to allow its application on crops. Many benefits can be obtained by using SLNs, such as lower large-scale production costs, greater physicochemical stability, the possibility of hydrophilic and hydrophobic drug encapsulation, and the use of natural products in the formulation preparation (MULLER et al., 2000; MULLER et al., 2011; NASERI et al., 2015; SARANGI; PADHI, 2016).

Interactions between biological systems and nanomaterials are complex, so it is important to evaluate their toxicity to non-target organisms (JACQUES et al., 2017), particularly to beneficial insects such as honeybees (*Apis mellifera*), which play an important role in pollinating agricultural crops (GIANNINI et al., 2015). Honeybee populations are declining worldwide, and although multiple factors contribute to this decline (GOULSON et al., 2015), it is mainly caused by agrochemicals sprayed on crops visited by bees (POTTS et al., 2010). In this context, the physicochemical characterization of nanopesticides can enable their future use in organic farming and contribute to sustainable agriculture, because these carriers may have little effect on the environment and biodiversity (GRILLO et al., 2016; PRASAD et al., 2017). However, this carrier system must have low toxicity to honeybees and other beneficial insects.

The objectives of this study were to develop a nanopesticide that was based on SLNs loaded with pyrethrum extract biocide (nanobiocide), characterize its physicochemical properties, and evaluate its toxicity to honeybees (Africanized *A. mellifera*). We evaluated sublethal effects on the histopathology of the bee midgut, an organ that plays a central role in food digestion and nutrient absorption. It is important to emphasize the fact that there are gaps of information in the literature regarding the toxicity of nanopesticides to non-target organisms, such as pollinator insects including honeybees. Our results can be applied in the field, can contribute to nanopesticide regulation, and can improve both environmental and food security.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Chemicals

The pyrethrum extract Pestanal® (biocide, CAS 8003-34-7, analytical standard), polyvinyl alcohol (PVA, 30–70 kDa, CAS 9002-89-5, hydrolyzed >99%), and glyceryl tripalmitate (tripalmitin, CAS 555-44-2, purity ≥99%) were purchased from Sigma-Aldrich. Chloroform (CHCl₃, CAS 67-66-3, purity ≥99%) was purchased from a local supplier. All these products were used for the preparation of the nanoparticles. Acetone (CAS 67-64-1, purity = 100%) was used as a solvent in the preparation of the pyrethrum solution.

4.2.1.1 Solid lipid nanoparticles

SLNs containing pyrethrum were prepared by the method of emulsification/solvent evaporation with some modifications (VITORINO et al., 2011; de MELO et al., 2018). Initially, 30 mL of an aqueous phase containing 1.25% PVA and distilled water was prepared and magnetically stirred (100 rpm). An organic phase with 250 mg of glyceryl tripalmitate and 5 mg of pyrethrum (active ingredient – a.i.) was then prepared, which was dissolved in 5 mL of chloroform. The organic phase was added to the aqueous phase, and this mixture was sonicated at 40 W for 5 min producing an emulsion. The emulsion was placed in an ULTRA-TURRAX™ homogenizer at 14,000 rpm for 7 min. The organic solvent was then removed using a rotating evaporator in order to create a concentrated emulsion with 10 mL of nanoparticles. The final concentration of biocide was 0.05 mg mL⁻¹. SLNs without pyrethrum extract (control) were also prepared.

4.2.2 Nanoparticles

The purpose of the formulations was to achieve greater physicochemical stability and better efficiency of pyrethrum encapsulation in the nanoparticles. In order to evaluate the physicochemical stability as a function of time were used the maintenance of colloidal parameters in formulation. The colloidal parameters were the mean diameter, polydispersity index, zeta potential, besides the nanoparticle concentration and encapsulation efficiency of the pyrethrum extract. All analyses were conducted for 120 days and the results were expressed (mean $\pm$ SEM).

4.2.2.1 Nanoparticle characterization

The mean diameter and polydispersion index were determined by dynamic light scattering (DLS). Nanoparticle samples were diluted (10 μ L:1 mL) in purified water and analyzed using a Zetasizer Nano ZS90 analyzer (Malvern Panalytical, UK). Zeta potential values (in mV) were also determined using the ZS90 analyzer, with the same dilution process. The pH of the nanoparticles was determined using a pH meter (Tecnal[®], Brazil). Further details could be obtained in literature (VENKATRAMAN, 2005; de MELO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

4.2.2.2 Nanoparticle concentration

SLN size distributions and concentrations were analyzed using a nanoparticle tracking analysis (NTA) instrument (NanoSight LM10). Nanoparticle samples were diluted 10,000 times and analyzed by injecting 1 mL of the sample into the cell.

4.2.2.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

A thermal analysis was performed to demonstrate that the pyrethrum was encapsulated in the nanocarriers using a DSC Q20 differential scanning calorimeter (TA Instruments). The samples of pyrethrum extract, lipid, SLNs, and SLNs loaded with pyrethrum were analyzed.

4.2.2.4 Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR was performed to investigate interactions between the biocide and the SLNs using an infrared spectrophotometer (Agilent). The pyrethrum extract, lipid, surfactant (PVA), physical mixture, SLNs, and SLNs loaded with pyrethrum were analyzed using an attenuated total reflectance accessory (POLLETO et al., 2007; WANG et al., 2010).

4.2.3 Determination of encapsulation efficiency and quantification of pyrethrum by high-performance liquid chromatography (HPLC)

The total amount of pyrethrum extract present in the nanoparticle suspension was determined by the ultrafiltration/centrifugation method. After the suspension had been diluted with acetonitrile, it was filtered through a 0.22 μm MilliporeTM membrane filter and quantified by HPLC (Varian ProStar). The pyrethrum extract association rate was calculated as the difference between the non-associated fraction of biocide and the total amount initially added to the nanoparticles (GAMISANS et al., 1999; SCHAFFAZICK et al., 2003; KILIC et al., 2005) (Table 1S- Supplementary Material).

4.2.4 Toxicological bioassay

Operculated brood combs were collected from three healthy colonies of Africanized *Apis mellifera* located in apiaries at Sao Paulo State, Brazil. The emergence of worker bees was monitored in laboratory. Following emergence, the bees were transferred to plastic pots lined with filter paper and fed *ad libitum* sugar-aqueous solution (50%:50% water:inverted sugar, v:v) to acclimatize for 24 h.

Subsequently, the 1-day-old bees were divided into the following experimental groups in triplicate (each colony representing a replicate): I) Control (CTL) - sugar-aqueous solution (syrup); II) Sublethal dose ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) of pyrethrum extract (PYR_{1ng}); III) Sublethal dose ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) pyrethrum extract (PYR_{10ng}); IV) $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of pyrethrum loaded in SLNs (SLNP_{1ng}); V) $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of pyrethrum loaded in SLNs (SLNP_{10ng}); IV) Empty SLNs; V) Polyvinyl alcohol - surfactant control (PVA); VI) Acetone control (ACN) - vehicle/solvent control. The dose used per bee was based on the LD50_{48h} of pyrethrum for honeybees, i.e., $22 \text{ ng} \cdot \text{bee}^{-1}$ (USEPA, 1991).

Acute exposure was performed individually by oral administration, i.e., the corresponding solution of the experimental group was administrated to the bees (1 μL) using a micropipette (*per os* administration). Two sublethal doses of 10 ng or 1 ng of biocide per bee were given of the pyrethrum extract (PYR) and pyrethrum loaded in nanoparticles (SLNs). The half the $\text{LD50}_{48\text{h}}$ value corresponded to a 1/2 dilution ($\text{LD50}/2 = 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} = 10 \text{ ppm}$), and the other dose corresponded to a 1:20 dilution of the $\text{LD50}_{48\text{h}}$ value ($\text{LD50}/20 = 1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} = 1 \text{ ppm}$), both being sublethal concentrations for honeybees. Concentrations of the solutions, which were used for getting the sublethal doses offered to bees, were obtained by serial dilution of stock solution.

After individually acute exposure, the bees were kept in plastic pots (cages), being fed with 50% (w/w) sucrose aqueous solution, in an incubator at a relative humidity of $70\% \pm 5$ and temperature of $32 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, under dark conditions. Two bioassays were performed, being the first one for survival analysis (N = 12 bees per pot in triplicate, per experimental group, totalizing 36 individuals) and another one for histology analyzes (N = 15 bees per pot in triplicate per experimental group, totalizing 45 individuals).

In the first bioassay (survival analysis), the bees were monitored daily until the last bee has died. Specifically for survival bioassay, the deltamethrin (DLT, $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) experimental group was added as positive control. In the second bioassay, the bees were collected 48 h after the acute exposure (N = 6 per group) and dissected for midguts' removal, which were processed for resin embedding and histological analysis (section 2.4.1).

4.2.4.1 Histology procedure

The bee midguts were fixed in 4% buffered paraformaldehyde solution for 24 h and immersed in phosphate-buffered saline ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer, pH 7.4). After, the material was dehydrated in an increasing ethanol series according to Silva-Zacarin et al. (2012). Subsequently, the material was embedded in historesin, and submitted to microtomy. Slides containing 3- μm thick histological sections were stained with hematoxylin-eosin. Posteriorly, the material was photodocumentated and both qualitative and semi-quantitative histopathological analyses were performed using Leica Application Suite V3.8 coupled to the light field photomicroscope (DM1000, Leica). For each bee from each experimental group (N = 6), two slides were analyzed per individual and three non-sequential histological sections were analyzed for each slide.

Other slides containing 3- μ m thick histological sections were submitted to histochemical analysis (Fig. 4S) for detection of proteins, lipids and neutral glycoconjugates (SILVA-ZACARIN et al., 2012).

4.2.4.2 *Semi-quantitative analysis of midguts*

Parameters for semi-quantitative analysis were defined according to the Bernet et al. (1999) protocol, and histological alterations (lesions) in midgut of bees were based on Soares-Lima et al. (2018) and Grella et al. (2019) protocol. To determine alterations in the bee midguts, the lesion index and the organ index, were calculated using two parameters: the importance factor and the score value (Bernet et al., 1999). Alterations were classified from 0 to 3, depending on their degree and extent: 0- no alteration, 1- slight alteration, 2- moderate alteration, and 3- severe alteration. The importance factor was established for each lesion observed (cells eliminated from the epithelium, increased apocrine secretions from the digestive cells, cellular vacuolization, changes in regenerative cells' nests, and the presence of pyknotic nuclei in cells of the epithelium) by a qualitative analysis based on pathological severity. This factor was categorized as (1) minimal pathological importance (repairable damage), (2) moderate pathological importance (damage was repairable in most cases), or (3) severe pathological importance (irreparable damage).

4.2.5 Statistical analysis

All data were previously subjected to homogeneity of variance (Bartlett's) and normality (Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov) tests. The physicochemical characterization data were subjected to a Student's t-test followed by a Mann Whitney test. A semi-quantitative analysis of the bee midguts was performed using a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. The significance level was set at $\alpha = 0.05$. GraphPad Prism v.5.0 was used for these statistical analyses.

The survival curve of honeybees per each experimental group was analyzed by the Log-Rank test (Kaplan-Meier method), and comparison between survival time of the groups was performed by the Holm-Sidak test. The significance level was set at $\alpha = 0.05$. SigmaPlot 13 software was used these analyze.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Nanoparticle characterization

The SLNs were prepared using approved components that are generally recognized as safe (GRAS). Tripalmitin (glyceryl tripalmitate) was used as a solid lipid and PVA was used as a surfactant. Physicochemical stability of the empty and encapsulated biocide in SLNs were evaluated from maintenance measurements of the colloidal parameters (mean diameter, polydispersity and zeta potential), besides the concentration of nanoparticles and pyrethrum encapsulation efficiency, over time (0–120 days). Colloidal parameter values and other parameters are shown in Table 1.

Table 1: Characterization of empty SLN and SLN loaded with pyrethrum extract over a period from 0 to 120 days.

PARAMETERS	SLN ₀	SLN ₁₂₀	SLN+PYR ₀	SLN+PYR ₁₂₀
MD _{DLS} (NM)	290.0 ± 5.0	406.7 ± 6.7 ^{a,c}	264.9 ± 2.8	260.8 ± 3.7
MD _{NTA} (NM)	185.9 ± 4.6 ^c	263.8 ± 18.5 ^{a,c}	161.5 ± 2.7	227.0 ± 12.3 ^b
PDI	0.12 ± 0.01	0.39 ± 0.12 ^{a,c}	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.02
ZP (-mV)	13 ± 0.4 ^c	14 ± 0.3 ^c	9.7 ± 0.2	18.2 ± 0.3 ^b
CT (10 ¹³ particles/mL)	2.7 ± 0.5	3.8 ± 0.2	5.9 ± 0.5	2.0 ± 0.1
pH	4.9 ± 0.04	5.7 ± 0.04 ^{a,c}	5.0 ± 0.02	7.1 ± 0.02 ^b
EE (%)	-	-	> 99%	> 99%

Legend - Mean diameter (MD) using dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA) techniques; polydispersion index (PDI); zeta potential (ZP), concentration of nanoparticles (CT); hydrogenionic potential (pH) and encapsulation efficiency (EE). The values are expressed as the mean ± standard error of six measurements. ^a Significant difference between SLN group and times; ^b Significant difference between SLN+PYR group and times; ^c Significant difference between SLN and SLN+PYR group. Paired T Test for parametric test, and Mann Whitney U test for nonparametric test. Source: Own authorship (2018).

The initial and final hydrodynamic diameters (mean ± SEM) of the empty solid lipid nanoparticles (SLN) were 290.0 ± 5.0 and 406.7 ± 6.7 nm, respectively. For the SLNs loaded with pyrethrum (SLN + PYR) the initial and final hydrodynamic diameters were 264.9 ± 2.8 and 260.8 ± 3.7 nm, respectively. There was a significant difference between the empty nanoparticles and those loaded with pyrethrum in the initial ($P \leq 0.0001$ and $T = 18.18$) and final ($P \leq 0.0001$ and $T = 48.51$) analyses. The hydrodynamic diameter values of empty SLNs increased after 60 days of storage with significant differences between the timepoints ($P \leq 0.0001$ and $T = 54.60$), while these values remained stable for SLN + PYR over the

experimental period (120 days) (Fig. 1SA- Supplementary Material). The empty SLNs had a larger mean diameter and less physicochemical stability than SLN + PYR, indicating that active ingredient of pyrethrum can stabilize nanoparticle formulation and decrease aggregate formation.

The polydispersion index at 0 and 120 days was 0.12 ± 0.01 and 0.39 ± 0.12 nm, respectively, in empty SLNs, and 0.12 ± 0.01 and 0.15 ± 0.02 nm, respectively, in SLN + PYR (Table 1), and values below 0.2 nm in the initial analysis were considered indicative of good stability and a small distribution of particle diameters. The low values indicate that the nanoparticles were of similar size and without aggregates (MASARUDIN et al., 2015). Similar results were obtained by de Melo et al. (2016) in a 120-day experiment with 15d-PGJ2-loaded SLNs, and by González et al. (2015) at the beginning of their experiment with poly (ethylene glycol)-nanoparticles containing geranium (an essential oil). However, the time-based analysis revealed that the SLN polydispersion index had increased after 60 days of storage (0.3 and 0.39 nm; Fig. 1SB - Supplementary Material), with significant differences between the timepoints ($P \leq 0.005$ and $T = 0.0$) and significant differences between SLN₁₂₀ and SLN + PYR₁₂₀ ($P \leq 0.005$ and $T = 0.0$). These data indicate that there was a heterogeneous distribution of particle diameters, i.e., there was a greater aggregation of particles in the empty system (SLN). Particle aggregation and degradation occur in SLN formulations that increase and decrease particle size, respectively, due to the loss of a surfactant coating that protects the material (MULLER et al., 1996).

Both nanosystems had a negative zeta potential, with initial and final values of -13 ± 0.4 and -14 ± 0.3 mV, respectively, for empty SLNs and -9.7 ± 0.2 and -18.2 ± 0.3 mV, respectively, for SLN + PYR. There was a significant difference between the empty nanoparticles and those loaded with pyrethrum ($P \leq 0.0001$, $T_{0d} = 8.989$, and $T_{120d} = 24.50$; Table 1). After decreasing on the 30th day (-5.48 ± 0.13 mV), the zeta potential of SLN + PYR increased to -12.2 ± 0.18 and -18.2 ± 0.35 mV after 90 and 120 days, respectively (Fig. 1SD- Supplementary Material). Similarly, the empty SLN zeta potential decreased after 15 (-4.85 ± 0.19 mV) and 30 (-6.27 ± 0.18 mV) days, but increased on the 60th day (-15.43 ± 0.23 mV), indicating good stability until the end of the analysis time (Fig. 1SD- Supplementary Material). Zeta potential values greater than 30 mV indicate excellent electrostatic stabilization (60 mV is the ideal value), while values lower 15 mV may result in partial flocculation (SCHWARZ et al., 1994). Low zeta potentials were observed, but the nanoparticle formulations were stable over time due to steric stabilization provided by the PVA (LOURENÇO et al., 1996). Stabilizers can be used in nanoparticle formulations to

prevent particle aggregation (ABDELWAHED et al., 2006). In the present study, the nonionic surfactant PVA was used to prepare the SLNs, which is absorbed onto surface nanoparticles and promotes steric stabilization (ADITYA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Therefore, unlike in previous studies, it was not superficial electrostatic repulsion that provided stability to the system (PASQUOTO-STIGLIANI et al., 2017). Particles in suspension are more stable if the zeta potential is greater than 20 mV, and 40 mV indicates excellent stability (ADITYA et al., 2013). Similar results were obtained by Oliveira et al. (2018) in zein nanoparticles loaded with the essential oil citronella (geraniol and R-citronellal), and by Kah et al. (2014) in a polymer-based nanoformulation of atrazine.

SLNs showed good stability for the encapsulated a.i, evidencing that physicochemical properties did not change over time. According to Naseri et al. (2015), SLNs are good nanocarriers and can be used to deliver drugs and agrochemicals. Their properties include great physicochemical stability during production and storage, a good release profile, the ability to solubilize lipophilic actives, and low toxicity (NASERI et al., 2015).

There was a significant difference in the pH of the empty SLN suspension between 0 and 120 days (4.9 ± 0.04 and 5.7 ± 0.04 , respectively; $P \leq 0.0001$ and $T = 16.08$), and of SLN + PYR (5.0 ± 0.02 and 7.1 ± 0.02 , respectively; $P \leq 0.0001$ and $T = 10.04$; Table 1). Only at 120 days there was a significant difference in pH between the treatment groups ($P \leq 0.0001$ and $T = 107.9$) with SLN + PYR having a pH of 7.16 ± 0.02 (Fig. 1SC - Supplementary Material), indicating that hydrolytic processes occurred during this period. Similar results were obtained by Oliveira et al. (2015).

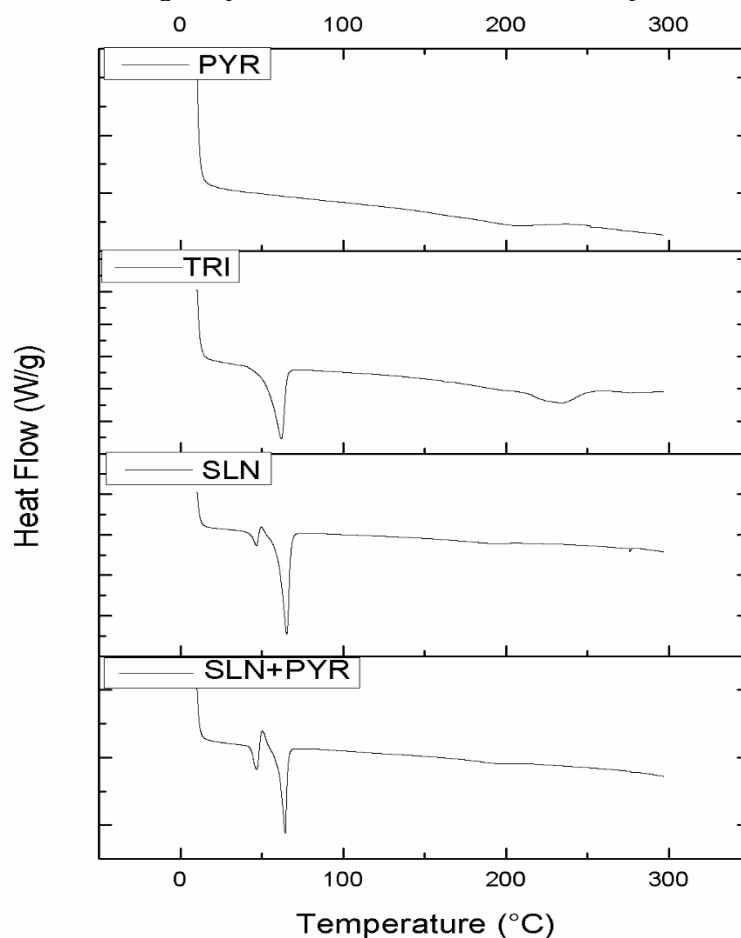
The NTA revealed that the empty SLNs contained $2.7 \pm 0.5 \times 10^{13}$ particles per mL with an initial size of 185.9 ± 4.6 nm, and SLN + PYR contained $5.9 \pm 0.5 \times 10^{13}$ particles per mL with an initial size of 161.5 ± 2.7 nm. Table 1 shows that there was a significant difference among timepoints for empty SLNs ($P \leq 0.02$ and $T = 3.65$) and SLN + PYR ($P \leq 0.007$ and $T = 4.92$), as well as between empty SLNs and SLN + PYR at 0 ($P \leq 0.0004$ and $T = 10.68$) and 120 ($P \leq 0.007$ and $T = 5.23$) days. NTA counts the number of particles per mL and is a complementary technique in the analysis of hydrodynamic diameters, and DLS and NTA did not provide similar diameter values and particle concentrations. This difference may have been caused by sample dilution during the NTA, which could have caused some aggregates to rupture in suspension and result in smaller particles than the DLS (MARUYAMA et al., 2016). The morphology of the particles was analysed by AFM and demonstrated that particle sizes were compatible to the values obtained by DLS and NTA (Appendix 4).

The encapsulation efficiency of pyrethrum into the SLNs was evaluated using an analytical curve of pyrethrum determined by HPLC (Peak area (a.u.) = $4.69 + 1952.15 \times [\text{pyrethrum concentration}]$, $r = 0.9934$). The encapsulation efficiency was as high as 99%, suggesting that the pyrethrum extract was efficiently encapsulated in this carrier system. Nevertheless, it is important to verify the release profile of pyrethrum in field conditions and it is expected that due to the high encapsulation efficiency, the particles will protect the a.i. in order to increase its shelf life in field conditions. A high encapsulation efficiency has also been reported in polymeric nanocapsules and SLNs loaded with carbendazim and tebuconazole (CAMPOS et al., 2015), in chitosan nanoparticles carrying the herbicides imazapic and imazapyr (MARUYAMA et al., 2016), and in microcapsules containing dementholized peppermint oil (ZHAO et al., 2016). The high encapsulation value indicates the affinity of the biocide to the lipid matrix (de MELO et al., 2016) due to its low solubility in water ($<10 \text{ mg.L}^{-1}$) and high solubility in organic solvents (USEPA, 2006).

4.3.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC thermograms for SLN + PYR, empty SLNs, tripalmitin, and pyrethrum extract are presented in Fig. 1. The DSC analyzes in this study were carried out with the objective of demonstrating that the pyrethrum interacts with nanocarriers components. There were no endothermic peaks for the pyrethrum extract. Tripalmitin's lowest peak was observed at 61°C , which agrees with the melting point described in the literature (CHEN et al., 2006). Analysis of the empty SLNs and SLN + PYR revealed that the melting points for tripalmitin were 65°C and 64°C , respectively, indicating that tripalmitin in the SLNs was solid, and that the pyrethrum did not change the lipid core organization of the SLNs. Similar results were obtained by Oliveira et al. (2015), who found that the herbicides simazine and atrazine were dispersed on a nanoparticle matrix; as well as, Nasser et al. (2016), which verified that SLNs containing *Zataria multiflora* essential oil (ZEO) did not show DSC peak of *Zanataria multiflora*. The authors suggested that essential oil was incorporated and dissolved in the lipid matrix. Analysis of the empty and encapsulated SLNs revealed two peaks, one indicating a tripalmitin peak and the other possibly indicating PVA. Thermal studies of PVA have reported an 88.1°C peak, probably due to moisture evaporation (GUIRGUIS; MOSELHEY, 2012).

Figure 1 - Differential scanning calorimetry evaluation of interaction between pyrethrum extract and components of the SLN formulation: Thermograms for (PYR) Pyrethrum extract, (TRI) Tripalmitin, (SLN) Solid lipid nanoparticles, (SLN+PYR) Pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles. Conditions: N₂ flow - 50 mL/minute, heating ramp of 10 to 300°C at a rate of 10°C per minute.

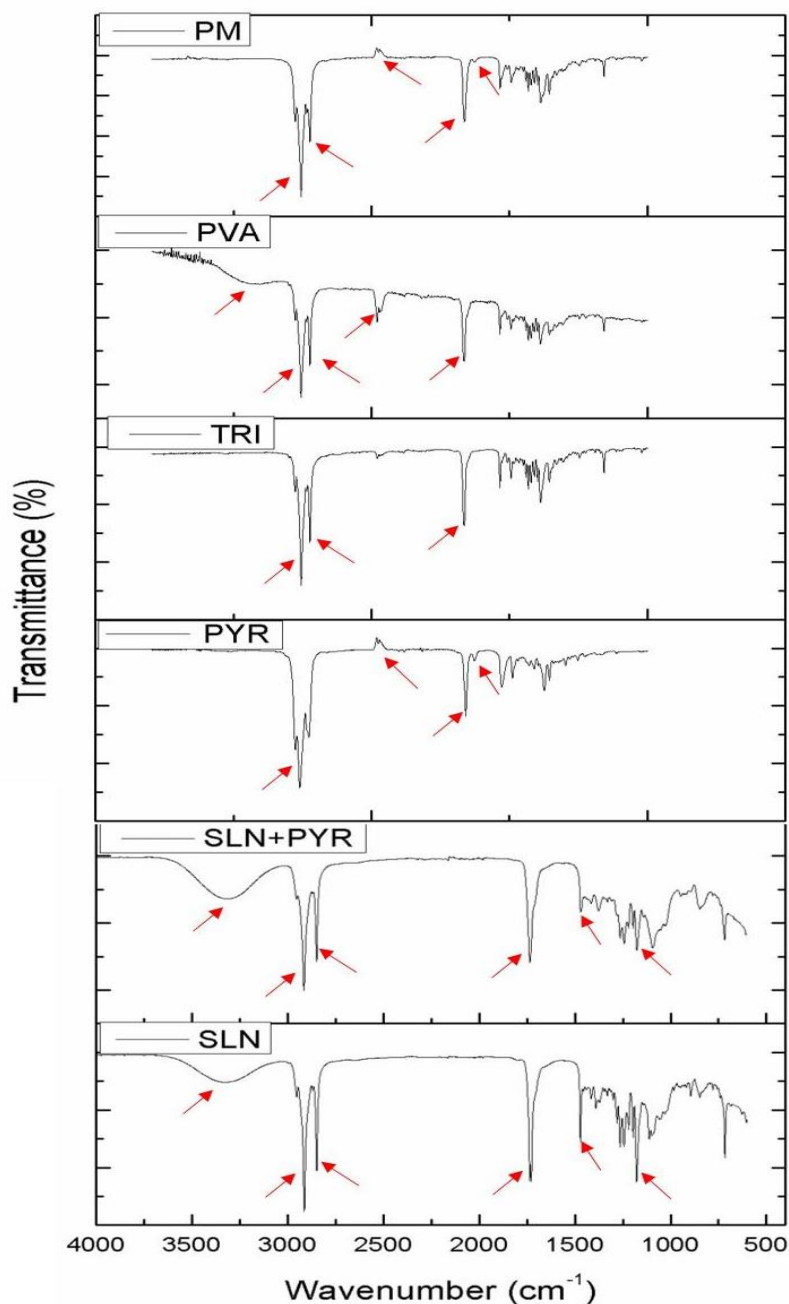


4.3.3 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The physical mixture had three specific bands at 2914, 2368, and 1654 cm^{-1} (Fig. 2), which corresponded with tripalmitin (2914 cm^{-1}); and pyrethrum extract bands at 2368 and 1654 cm^{-1} , corresponding with peak CO_2 (OLIVEIRA; PASSOS, 2013) and a stretching of the $-\text{C}=\text{C}$ group, respectively. The infrared spectra of PVA, empty SLNs, and SLN + PYR exhibited similar specific bands at 3335 cm^{-1} (Fig. 2), which suggests the presence of an $-\text{O}-\text{H}$ group in the formulations. These groups were probably derived from the water and PVA used in the preparation of the nanoparticles (ZAIN et al., 2011). The specific bands at 2914 and 2848 cm^{-1} that were observed in the nanoparticles indicates a stretching of the $-\text{C}-\text{H}$ group (Fig. 2), corresponding to tripalmitin (CAMPOS et al., 2015). It was also possible to observe bands at 1735 cm^{-1} , corresponding to a stretching of the $-\text{C}=\text{O}$ group, at 1470 cm^{-1} ,

corresponding to a bending of the -C-H_2 group, and at 1178 cm^{-1} , corresponding to a stretching of the -C-O group.

Figure 2 - Infrared spectroscopic evaluation of interaction between pyrethrum extract and components of the SLN formulation: FTIR spectra for (PM) Physical mixture (PVA) Surfactant - polyvinyl alcohol; (TRI) Tripalmitin; (PYR) Pyrethrum extract; (SLN+PYR) Pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles; (SLN) Solid lipid nanoparticles. Arrows indicate the main characteristic absorption bands in each spectrum. Conditions: infrared spectrophotometer with a range of 400 to 4000 cm^{-1} , 128 scans per sample and 2 cm^{-1} resolutions.



4.3.4 Toxicological bioassay

Exposure to deltamethrin or pyrethrum extract ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) affected the longevity of bees, reducing their life span. Bees exposed to pyrethrum extract ($P < 0.01$; $141.18 \pm 21.3 \text{ h}$) and pyrethroid ($P < 0.001$; $25.33 \pm 0.93 \text{ h}$) presented shorter longevity than those in the control group ($257.83 \pm 21.79 \text{ h}$). There is not significant difference between control and other experimental groups (ACN; PVA; SLN; SLNP_{1ng}; SLNP_{10ng} and PYR_{1ng}; $P > 0.05$). The ACN ($252.7 \pm 25.03 \text{ h}$) data was similar to control group, as well as SLNP_{1ng} ($256.24 \pm 21.00 \text{ h}$) and SLNP_{10ng} ($241.33 \pm 18.81 \text{ h}$). The mean survival time of PVA ($171.16 \pm 18.09 \text{ h}$), SLN ($196.54 \pm 11.38 \text{ h}$) and PYR_{1ng} ($175.33 \pm 28.12 \text{ h}$) groups was lower than the control group, but not significant ($P > 0.05$). The data of survival analysis were showed in Supplementary Material (Fig. 2S).

Pyrethroids can be dangerous to honeybees (Johnson et al., 2010), for example, they interfere in the behavior (PALMQUIST et al., 2012), learning and memory performance (LIAO et al., 2018). In addition, exposure to Lambda-Cyhalothrin negatively affects the life span (LIAO et al., 2018; DOLEZAL et al., 2016). In line with these data, the pyrethrum extract and deltamethrin also reduced survival of Africanized *Apis mellifera*.

The sublethal doses of $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (1 ppm) and $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (10 ppm) of biocide free or encapsulated that were administered to the bees, induced short-term responses, at morphological level, in the midguts of newly emerged workers.

The bee midgut is mainly responsible for food digestion and nutrient absorption, and is composed of three cell types: digestive, endocrine, and regenerative cells. Digestive cells are responsible for the production of digestive enzymes and nutrient absorption, endocrine cells produce hormones, and regenerative cells, which are within nests, are responsible for cell renewal of the epithelium (MARTINS et al., 2006). We showed that NLS is absorbed in honeybee midgut because fluorophore-labelled nanoparticles were found inside digestive cells (Appendix 5).

Histological analysis of the bee midguts revealed morphological alterations in the epithelium (Fig. 3), specifically in the digestive cells, whereas the regenerative cell nests maintained their normal morphological pattern. An increase in the elimination of digestive cells to the intestinal lumen was observed in some treatment groups (empty SLNs, SLNP_{1ng}, and PYR_{10ng}; Fig. 3D, E, and 3H) in comparison to the control groups (CTL, ACN, and PVA), which was significant in the empty SLN group ($P < 0.05$; Fig. 4A and Table 2S - Supplementary Material).

Therefore, sublethal concentrations of pyrethrum extract in both non-encapsulated and encapsulated form in nanoparticles, as well as in empty nanoparticles (SLN), caused changes in digestive cells. Digestive cells have many microvilli close to the peritrophic matrix in the lumen, and among these cells, nests of small regenerative cells are in the intestinal epithelium (NEVES et al., 2002). These undifferentiated cells that remain in the nest are a source for cell renewal in epithelium of bee midgut (CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 2004). Thus, regenerative cells replace dead digestive cells, which were released into the lumen, for new epithelial digestive cells by differentiation process (CRUZ et al., 2011). In this study, regenerative nests were observed in midgut epithelium, but histological alterations indicative of cytotoxicity were not found in these cells, such as pyknotic nuclei. If the regenerative cells from nests had presented nuclear pyknosis, which is an indicative of cell death in undifferentiated cells, this alteration would have a “severe pathological importance” because regenerative cells in adults does not suffer mitosis (CRUZ et al., 2011), and consequently epithelial renewal of midgut would be compromised, resulting to partial or total loss of the organ function.

Digestive cells are eliminated by cell degeneration under natural conditions, meanwhile this process can be accelerated and/or intensified in response to xenobiotic exposure (e.g., SLNs; Table 2S - Supplementary Material). Therefore, cell renewal is an important process in maintaining the organ function, because the differentiation process from regenerative cells can replace dead digestive cells and to renew the midgut epithelium.

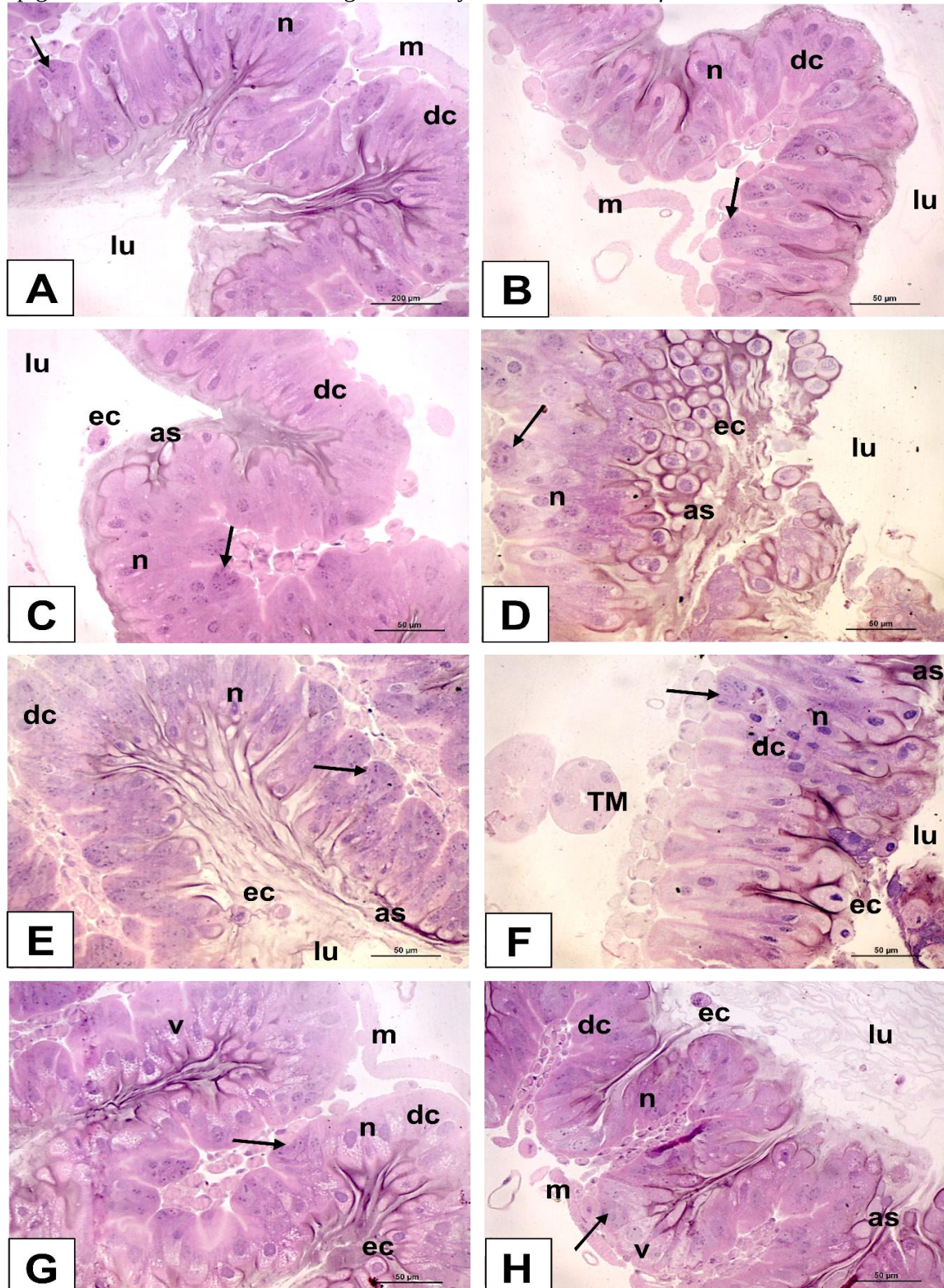
There was less elimination of digestive cells to the intestinal lumen in bees exposed to pyrethrum-loaded nanoparticles than in those exposed to empty nanoparticles (SLN). Probably, the reduced cell-to-lumen liberation has been due to the interaction of the pyrethrum with the active sites in the nanoparticle, providing greater stability of the colloidal system over the time (0-120d) and high encapsulation efficiency (>99% along 120d), as evidenced in the physicochemical characterization data. On the contrary, empty SLNs are more reactive and form aggregates more easily over time. Therefore, reactive empty SLNs could interact with the epithelial cells of the midgut (oral exposure) and induce cytotoxicity in digestive cells, which would trigger their elimination to the organ's lumen. The compounds used in nanoparticle formulations, and the colloidal instability of the system, can affect interactions with cell membranes and trigger cytotoxicity (NAFEE et al., 2009). Whereas the worker honeybee has lifetime of 45 days, and considering the acute exposure to the nanopesticide during its application, probably the whole SLNP will remain stable during its life span. Associating this information with the survival analysis, it can be noted that encapsulated pyrethrum kept the

survival time (256.24 ± 21.00 h and 241.33 ± 18.81 h, SLNP_{1ng} and SLNP_{10ng}, respectively) of the bees similar to the control group (257.83 ± 21.79 h). Given that 10 ng of pyrethrum extract and pyrethroid (deltamethrin) reduced life span of the bees, it may be noted that pyrethrum-loaded in nanoparticle is more safe for honeybees, probably because of the stability of the encapsulated pyrethrum and its release as a function of time.

Another important process that we observed was the increase apocrine secretions from the midgut epithelium onto the apical surfaces of midgut digestive cells (Fig. 3SD and 3SE - Supplementary Material). These epithelial cells secrete digestive enzymes and peritrophic matrix substances normally by means of apocrine secretion. Therefore, an increase in secretion may be a protective compensatory response to xenobiotic exposure. Increased apocrine secretion occurred in both the empty nanoparticle-exposed and 1 ng. μL^{-1} of pyrethrum-loaded nanoparticle-exposed groups in compared to control group ($P < 0.05$; SLN and SLNP_{1ng}; Table 2S and Fig. 4B). A previous study reported an increase in apocrine secretion of midgut digestive cells in bees exposed to sublethal doses of thiamethoxam insecticide (0.428 ng. μL^{-1} and 0.0428 ng. μL^{-1} per day for 18 days), as well as the increase in both cell vacuolization and cell elimination from the epithelium to the midgut lumen over the exposure period (OLIVEIRA et al., 2014).

Higher frequency of eliminated digestive cells and release of apocrine secretion (Fig. 4) were considered reversible alterations in the bee midgut and that did not affect survival of bees in empty SLNs or encapsulated pyrethrum (SLNPs) groups. In normal physiological situations, there is low frequency of senescent or dead cells eliminated to the lumen (CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999), and releasing of digestive enzymes from cells to the peritrophic matrix in the lumen, usually by apocrine secretion (TERRA; FERREIRA, 2012). Therefore, these alterations were classified as importance factor 1 in the semi-quantitative analysis, because normally they are reversible, i.e., damage recovery in epithelium occurs through the differentiation of regenerative cells from their nests in order to have new digestive cells. Thus, there is a compensatory response to the potential physiological stress triggered by agrochemicals or nanocarriers that can lead to the elimination of cells and/or intensification of apocrine secretion. Soares (2012) reported an elimination of cells into the lumen, increased apocrine secretion, and pyknotic nuclei in the epithelial cells of the *Scaptotrigona postica* midgut after applying sublethal doses of the insecticide imidacloprid. Similarly, Rossi et al. (2011) exposed Africanized *A. mellifera* to sublethal doses of imidacloprid and observed an increase in both cell elimination and apocrine secretion in the midgut.

Figure 3 – Honeybees (Africanized *A. mellifera*) midguts after 48 h of acute exposure. A) CTL - syrup control; B) ACN –acetone control; C) PVA - surfactant control; D) SLN – Solid lipid nanoparticles; E) SLNP_{1ng}– 1 ng.μL⁻¹ of pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles; F) SLNP_{10ng} – 10 ng.μL⁻¹ of pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles G) PYR_{1ng}– 1 ng.μL⁻¹ of pyrethrum extract; H) PYR_{10ng} – 10 ng.μL⁻¹ of pyrethrum extract. Legend: dc = digestive cell; ec = eliminated cell in the lumen; lu = lumen; n = nucleus, v = vacuolization; as = apocrine secretion; Black arrow = Regenerative cell; TM = Malpighi's tubes; m = muscle. Staining: Hematoxylin-Eosin. Bars: 50 μm.



Source: Own authorship (2018).

Although vacuolization can be present in bee midgut cells as a physiological process of autophagy for intracellular turnover, their increased level frequently has been associated to side-effects of xenobiotics, especially in bees exposed to pesticides. For example, Cruz et al. (2010) reported cytoplasmic vacuolization and cell elimination in *A. mellifera* larvae midguts exposed to fipronil (0.1 and 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$) and boric acid (1.0, 2.5, and 7.5 mg.g^{-1}). Kakamand et al. (2008) observed an increase in the vacuolization of midgut cells in honeybees exposed to deltamethrin (1, 2.5, 5, and 10 mg.L^{-1}) and the degeneration of the midgut epithelium of bees exposed to the highest concentration of this compound.

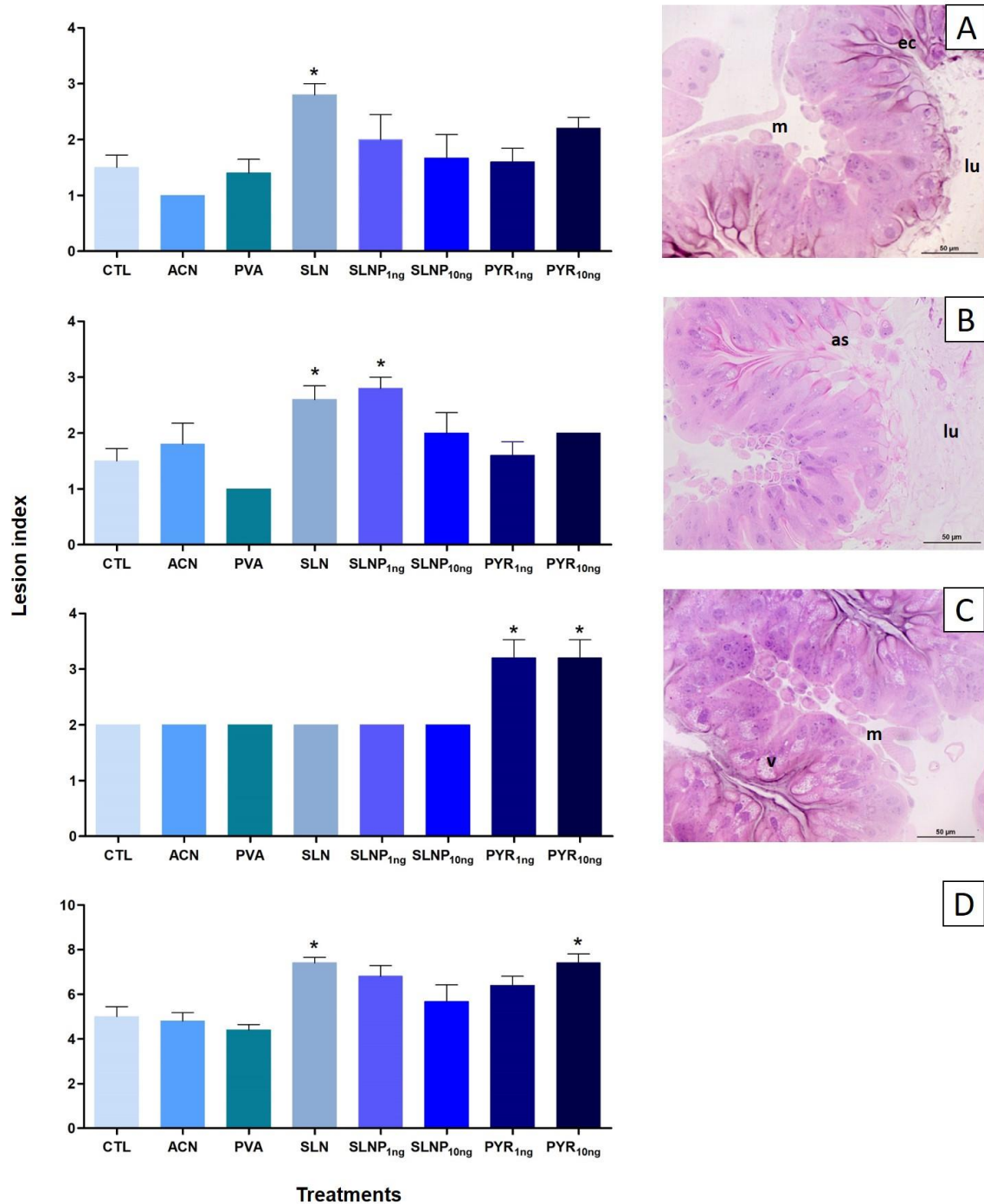
Histochemical analysis of vacuolization areas in digestive cells (Fig. 4S - Supplementary Material) showed that they are negative for proteins or neutral glycoconjugates, but had positive labelling for lipids that could indicate multivesicular bodies, because newly emerged honeybees have no spherocrystals yet. Multivesicular bodies are frequently found in midgut cells of insects (SERRAO; CRUZ-LANDIM, 1996), and are formed from early endosomes due to an inward budding of its membrane resulting in intraluminal vesicles whose main function is “collecting” plasma membrane receptors to be degraded into the lysosomes. Multivesicular bodies and autophagy are closely related (FADER; COLOMBO, 2009).

At the present study, intensification of cytoplasm vacuolization was considered a morphological alteration indicative of cytoplasmic loss, which is of greater pathological importance than the other alterations analyzed because, especially in insects, autophagy may act as a pro-death process at the cellular/organ level (MALAGOLI et al., 2010), although its effects at the organismal level can still be considered as fundamental for survival.

Cell vacuolization increased in both groups exposed to pyrethrum extract (Fig. 3G and H, Fig. 3SG and 3SH, and Table 2S), and showed significant difference ($P < 0.05$) with control group (Fig. 4C). In the organ index, the vacuolization in group of 10 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ of pyrethrum extract (Fig. 4D and Table 2S) showed statistic difference in total index, because this alteration was classified as importance factor 2 in the semi-quantitative analysis since of the loss of cytoplasmic material and the severity level.

In the total organ index analysis, the empty nanoparticles and 10 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ of pyrethrum extract caused more significant changes than the other experimental groups (Table 2S). In contrast, nanoparticles loaded with 1 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ pyrethrum extract did not increase cell alterations more than the other groups (nanoparticles and pyrethrum extract). The SLNP groups exhibited a decrease in short-term cell alterations, so in this respect was considered safer for bees over short exposure times.

Figure 4 – Alterations and organ index in honeybee (*Africanized A. mellifera*) midguts. a) Eliminated cell index; b) Apocrine secretion index; c) Vacuolization index; d) Total organ index. Legend: CTL – syrup control; ACN – acetone control; PVA - surfactant control; SLN – Solid lipid nanoparticles; SLNP_{1ng} – 1 ng.μL⁻¹ of pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles; SLNP_{10ng} – 10 ng.μL⁻¹ of pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles; PYR_{1ng} – 1 ng.μL⁻¹ of pyrethrum extract; PYR_{10ng} – 10 ng.μL⁻¹ of pyrethrum extract. Kruskal Wallis One-way ANOVA, followed by Dunn's multiple comparison test. Legend: ec = eliminated cell in the lumen; lu = lumen; v = vacuolization; as = apocrine secretion; m = muscle. Staining: Hematoxylin-Eosin. Bars: 50 μm. *represent significant differences between groups.



Source: Own authorship (2018).

At the lowest sublethal doses ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), the biocide did not evidence significant histopathological changes in the total lesion index, indicating that could be applied on crops. A carrier system could be developed to improve pyrethrum extract stability, thus allowing its use as nanopesticides. Besides, when the pyrethrum extract was encapsulated in nanocarriers and demonstrated lower toxicity when compared with pyrethrum only. Therefore, nanocarriers are an alternative to conventional pesticide applications. Nanotechnology applied in the agricultural sector could increase agricultural production and crop protection, contribute to sustainable agriculture and eco-friendly carrier systems, and reduce environmental effects and toxicity to organisms (GRILLO et al., 2016). Oliveira et al. (2018) found that zein nanoparticles loaded with citronella effectively controlled the pest species *Tetranychus urticae* with low toxicity.

The empty SLNs showed effects onto honeybee, for example, in the total lesion index, with the increase the eliminated cells and apocrine secretion. Therefore, nanocarrier system itself may have reactive sites capable of changing their biological system because it has no active ingredient encapsulated. These reactive sites could interact with organic molecules of the organism, inducing negative effects that indirectly decreased the mean survival time of the bees ($196.54 \pm 11.38 \text{ h}$; $P > 0.05$). By the way, further studies need to be performed in order to evaluate these hypotheses.

Nanopesticides can be able to increase the efficiency of agrochemicals and biocides, because it is possible that in the field low doses of the active ingredients can be used. However, in the case of pyrethrum and SLNs this fact will be confirmed with biological assays in target organisms that will be run in the future. In addition, they increase production and reduce damage to the environment (PRASAD et al., 2017). However, there are still many gaps in information to be filled, normative instructions to be written, and legislation to be made before they can be extensively and safely employed in agriculture (KAH; HOFMANN, 2014; KOOKANA et al., 2014). According to Kah et al. (2018), further studies that investigate the efficacy of nanopesticides in crop farming are needed, in order to elucidate their effects on biodiversity and human health, and their benefits and costs compared with conventional formulations.

4.4 Conclusion

It is important to develop and analyze carrier systems as they have many potential benefits in comparison to synthetic and natural agrochemicals, such as reducing the amount of biocide in the environment and greater stability. However, nanotoxicological studies should be

undertaken to evaluate the effects of nanoparticles on non-target organisms. In conclusion, this study demonstrates that nanoparticles loaded with pyrethrum extract at sublethal dose (1 or 10 ng. μL^{-1}) are relatively safe for honeybees, because they do not cause morphological changes in digestive cells. In contrast, empty nanoparticles and 10 ng. μL^{-1} of pyrethrum extract caused changes in digestive cells during acute exposure. The concentration of 1 ng. μL^{-1} of pyrethrum extract could be used for pest control. These data reflect the effects of a sublethal and acute exposure, and more studies are needed to check if a chronic exposure to these compounds would have different effects on bees. Our results added information for subsidizing future decision making, regulatory framework creation, risk assessments, and legislation development, and improve food security. In addition, based on the results we are planning to run biological assays in order to investigate the efficacy of the nanopesticide against target organisms.

Acknowledgments

Authors would like to thank the grant of São Paulo Research Foundation (FAPESP 2017/21004-5). The colleagues who assisted this work Caio Eduardo da Costa Domingues; Nathalie Ferreira Silva de Melo; Thaisa Cristina Roat; Osmar Malaspina; Monica Jones-Costa; Elaine Cristina Mathias Silva-Zacarin; Leonardo Fernandes Fraceto. Hellen Maria Soares-Lima and Rafaela Tadei for assisting in the toxicity bioassays, and Edson Sampaio keeping the colonies of honeybees for experiments. Authors thanks Profa. Dra. Leticia S. Souto from LADIVE by the availability of the microtome (FAPESP 2015/01424–4).

Supplementary Material

Table 1S: Chromatographic conditions used for quantifying the pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles by HPLC.

Samples	Pyrethrum
Mobile phase	Acetonitrile/water (75/25, v/v)
Injection volume	100 μ L
Flow rate	0.8 mL.min ⁻¹
Temperature	40°C
Detector	Ultraviolet (UV), λ = 225 nm
Chromatographic column	C18 – 15cm (Phenomenex, Gemini, C ₁₈ reverse phase, 5 μ m 110A, 150 x 3.90 mm)

Source: Own authorship (2018).

Table 2S – Mean and standard deviation (mean $\pm$ SEM) of the occurrence rate of midgut alterations (index) in honey bees (Africanized *A. mellifera*) of the control and exposed groups (N = 6 bees per experimental group). Kruskal Wallis One-way ANOVA, followed by Dunn's multiple comparison test. *represent significant differences between groups.

Groups	Elimination cell	Apocrine secretion	Vacuolization	Organ Index
CTL	1.5 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 1.0
ACN	1.0 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.0	4.8 $\pm$ 0.75
PVA	1.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0	4.4 $\pm$ 0.5
SLN	2.8 $\pm$ 0.4*	2.6 $\pm$ 0.5*	2.0 $\pm$ 0.0	7.4 $\pm$ 0.5*
SLNP _{1ng}	2.0 $\pm$ 0.9	2.8 $\pm$ 0.4*	2.0 $\pm$ 0.0	6.8 $\pm$ 1.0
SLNP _{10ng}	1.7 $\pm$ 0.95	2.0 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 0.0	5.6 $\pm$ 1.7
PYR _{1ng}	1.6 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 1.0*	6.4 $\pm$ 0.8
PYR _{10ng}	2.2 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 1.0*	7.4 $\pm$ 0.8*

Source: Own authorship (2018).

Figure 1S – Physicochemical characterization of SLN (solid lipid nanoparticles) and SLN+PYR (pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles) over a period of 120 days. A) Hydrodynamic diameter of nanoparticles, B) Polydispersion index (PDI), C) Potential of hydrogen (pH) using a pH meter, and D) Zeta potential using a dynamic light scattering (DLS) equipment. All values are expressed as the mean $\pm$ standard error of three determinations.

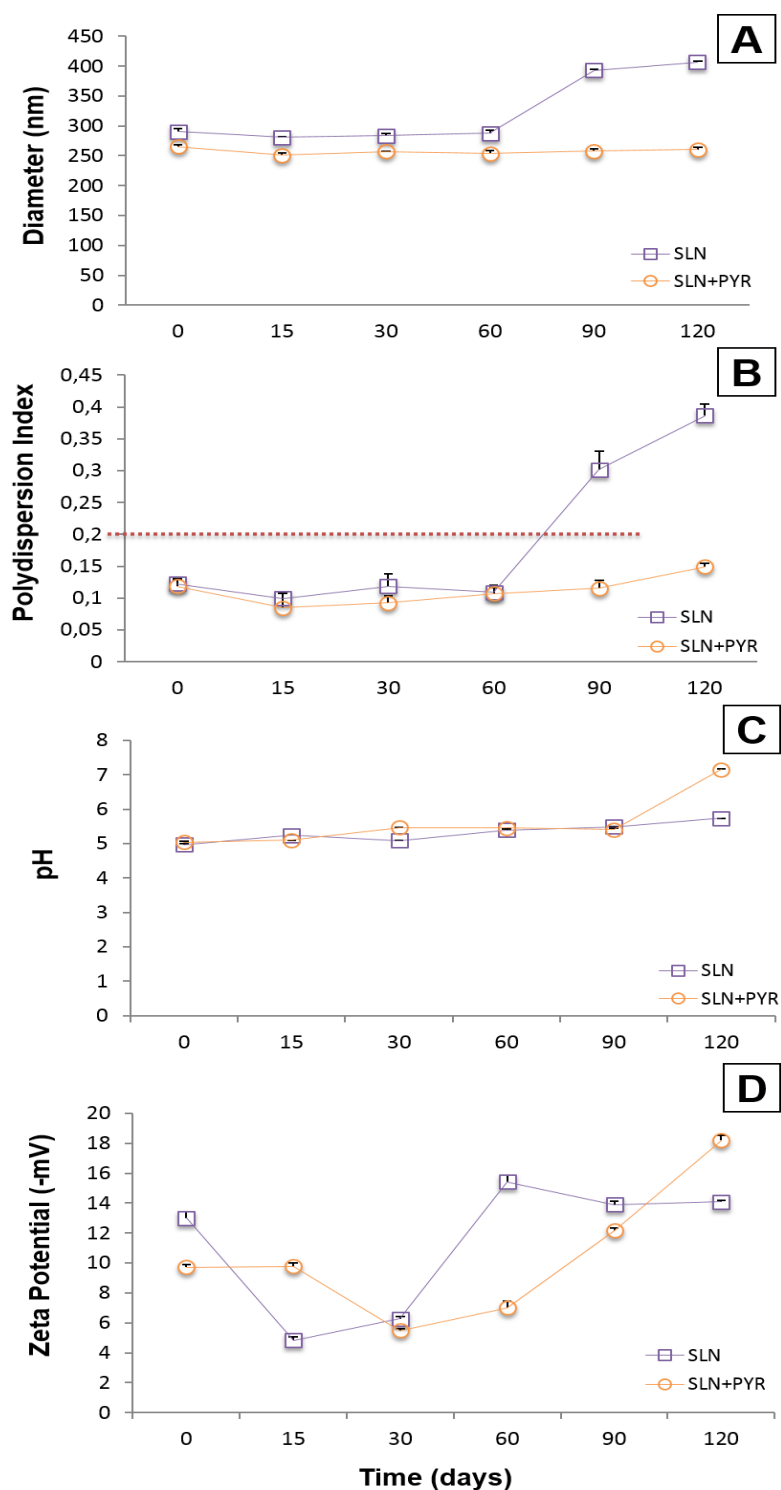
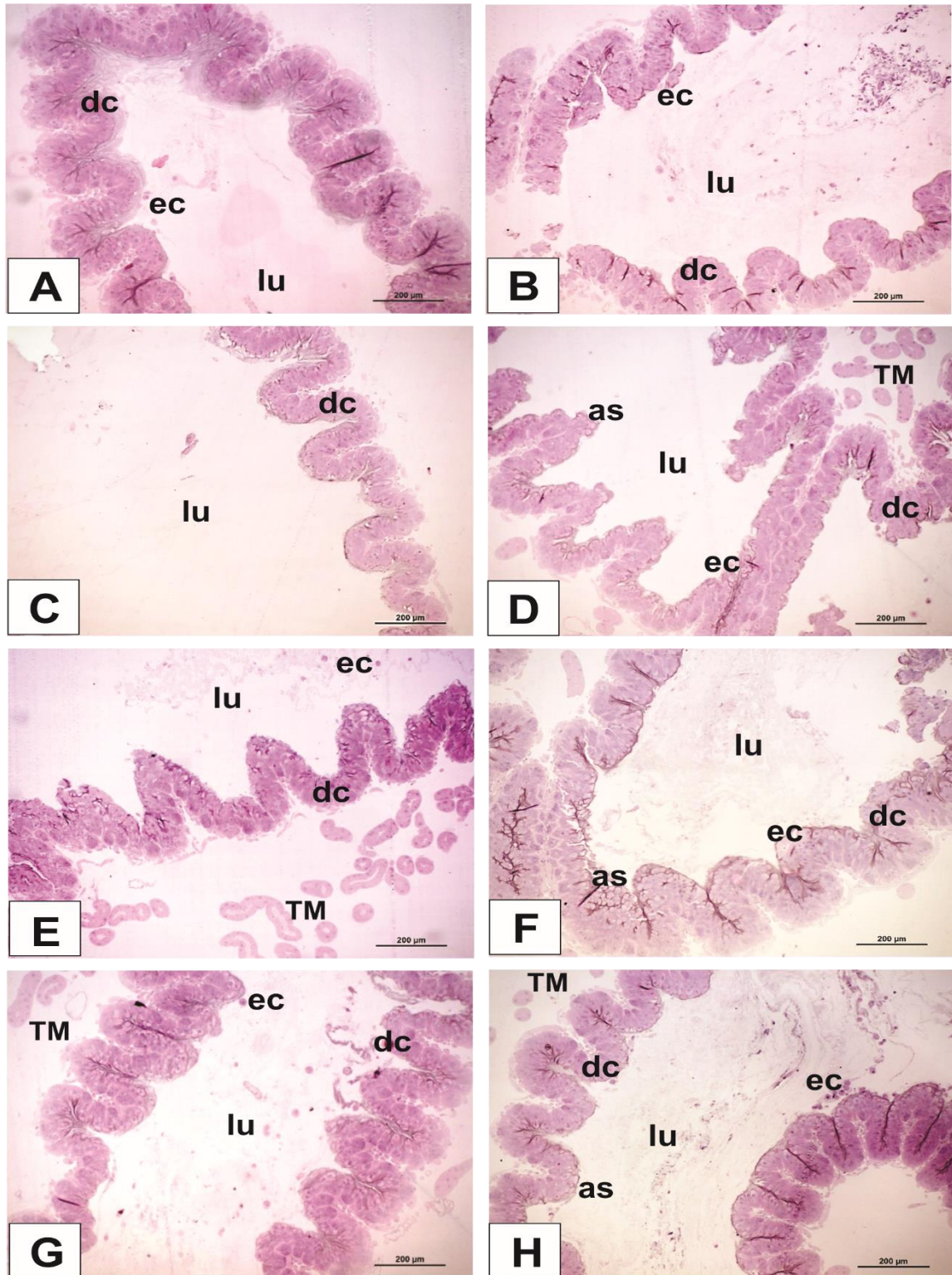
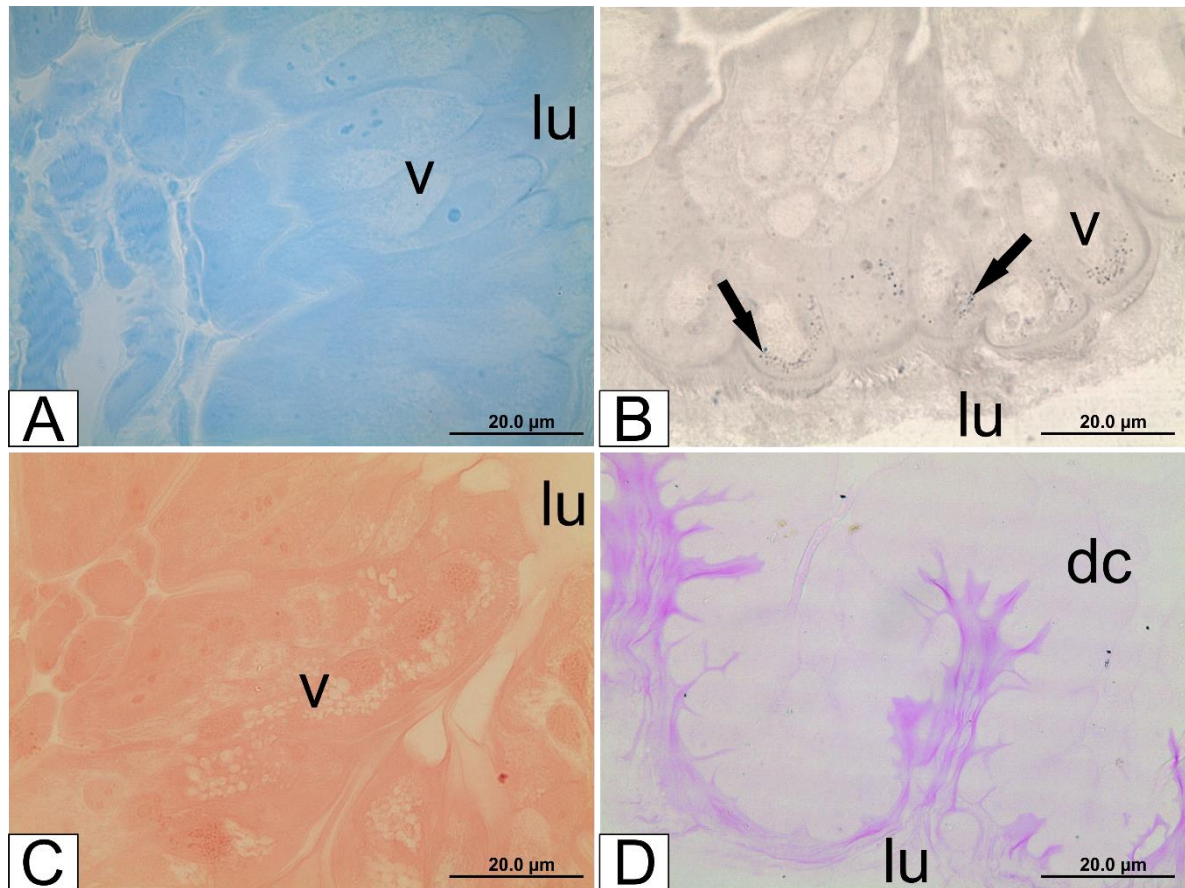


Figure 3S – Honeybees (Africanized *A. mellifera*) midguts after 48 h of acute exposure. A) CTL - syrup control; B) ACN –acetone control; C) PVA - surfactant control; D) SLN – Solid lipid nanoparticles; E) SLNP_{1ng}– 1 ng.μL⁻¹ of pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles; F) SLNP_{10ng} – 10 ng.μL⁻¹ of pyrethrum loaded in solid lipid nanoparticles G) PYR_{1ng}– 1 ng.μL⁻¹ of pyrethrum extract; H) PYR_{10ng} – 10 ng.μL⁻¹ of pyrethrum extract. Legend: dc = digestive cell; ec = eliminated cell in the lumen; lu = lumen; as = apocrine secretion; TM = Malpighi's tubes. Staining: Hematoxylin-Eosin. Bars: 50 μm.



Source: Own authorship (2018).

Figure 4S – Honeybees (Africanized *A. mellifera*) midguts after 48 h of acute exposure. Histochemical analysis of midgut epithelium for detection of different macromolecules in vacuolation region of cells. A) Bromophenol Blue for protein detection; B) Sudan Black-B for lipid detection; C) Ponceau Xylidine for protein detection; D) Periodic Acid–Schiff (PAS) for glycoconjugate detection. Legend: dc = digestive cell, lu = lumen, v = vacuolization. Bars: 20 μ m.



Source: Own authorship (2018).

5. CAPÍTULO 2 – EXTRATO DE PIRETRO ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS: ESTUDOS DE TOXICIDADE BASEADO NO EFEITO GENOTÓXICO E HEMATOLÓGICO EM GIRINOS DE RÃ-TOURO

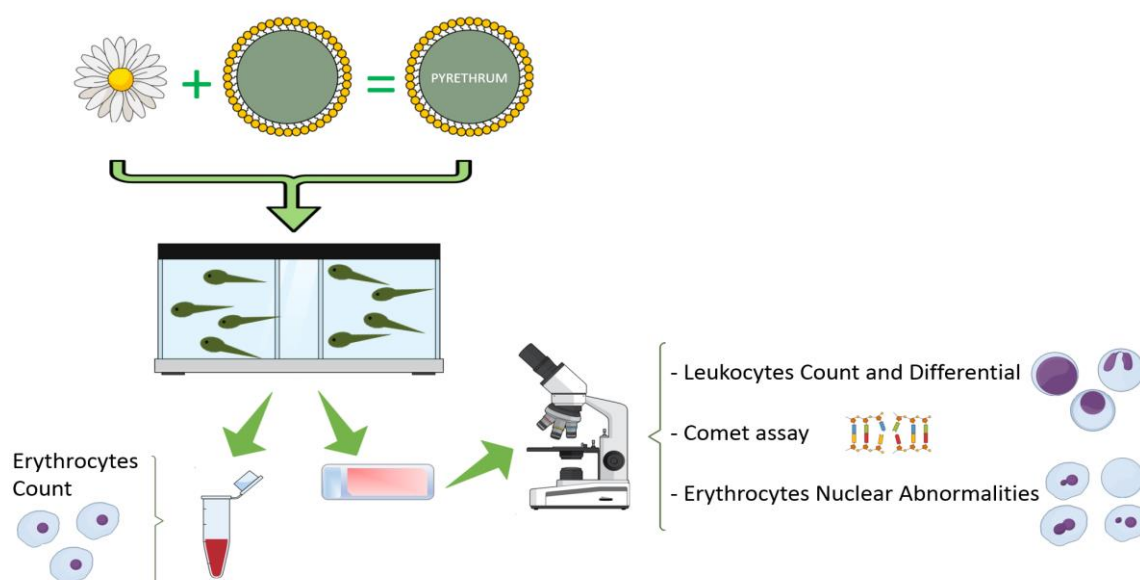
RESUMO

O ambiente recebe cerca de 2,7 kg.ha⁻¹ por ano de agrotóxicos que são utilizados na produção agrícola. Estes podem ter um impacto negativo na biodiversidade ambiental e potencialmente desencadear efeitos fisiológicos em espécies não-alvo. Os avanços na tecnologia e nos sistemas nanocarreadores para agrotóxicos levaram a novas alternativas para minimizar esses impactos, como os nanopesticidas, considerados mais eficientes, seguros e sustentáveis. No entanto, é importante avaliar o risco, ação e toxicidade dos nanopesticidas em organismos aquáticos e terrestres. Este estudo tem como objetivo avaliar biomarcadores genotóxicos e hematológicos em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) submetidos à exposição aguda (48 h) ao extrato de piretro (PIR) e ao piretro encapsulado a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR). Os resultados mostraram um aumento no número de leucócitos durante a exposição aguda, como eosinófilos nos grupos expostos as nanopartículas, e basófilos no grupo exposto ao PIR. A análise hematológica mostrou que o PIR encapsulado em nanopartículas aumentou significativamente o número de eritrócitos em comparação com os outros grupos expostos. Os dados do ensaio cometa indicaram um aumento na frequência das classes que correspondem a danos mais severos no DNA em grupos expostos, sendo que o grupo exposto ao PIR mostrou uma alta frequência de danos no DNA da classe 4. Além disso, anormalidades nucleares eritrocíticas foram desencadeadas pela exposição aguda em todos os tratamentos, evidenciando diferença significativa com o grupo controle. Esses resultados mostraram respostas genotóxicas em girinos de rã-touro, o que poderia desencadear a morte celular. Conclui-se que essas análises são importantes para aplicações na avaliação de ambientes aquáticos contaminados e seu biomonitoramento, a fim de avaliar a toxicidade de xenobióticos, como o extrato de piretro e as nanopartículas em espécies anfíbias. No entanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão dos efeitos dos nanopesticidas e inseticidas botânicos em organismos não-alvo, a fim de contribuir para aspectos regulatórios futuramente.

Keyword: Nanotoxicologia. Nanopartículas lipídicas sólidas. Inseticida botânico. Piretro. Girinos de rã-touro.

CHAPTER II

PYRETHRUM EXTRACT ENCAPSULATED IN NANOPARTICLES: TOXICITY STUDIES BASED ON GENOTOXIC AND HEMATOLOGICAL EFFECTS IN BULLFROG TADPOLES



Published Article (online) – Oliveira, C. R. et al. Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles. *Environmental Pollution*, v. 253, p. 1009-1020, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.037>

ABSTRACT

The environment receives about 2.7 kg.ha⁻¹ annually of pesticides, used in crop production. Pesticides may have a negative impact on environmental biodiversity and potentially induce physiological effects on non-target species. Advances in technology and nanocarrier systems for agrochemicals led to new alternatives to minimize these impacts, such as nanopesticides, considered more efficient, safe and sustainable. However, it is important to evaluate the risk potential, action and toxicity of nanopesticides in aquatic and terrestrial organisms. This study aims to evaluate genotoxic and hematological biomarkers in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) submitted to acute exposure (48h) to pyrethrum extract (PYR) and solid lipid nanoparticles loaded with PYR. Results showed increased number of leukocytes during acute exposure, specifically eosinophils in nanoparticle-exposed groups, and basophil in PYR-exposed group. Hematological analysis showed that PYR encapsulated in nanoparticles significantly increased the erythrocyte number compared to the other exposed groups. Data from the comet assay indicated an increase in frequency of the classes that correspond to more severe DNA damages in exposed groups, being that the PYR-exposed group showed a high frequency of class-4 DNA damage. Moreover, erythrocyte nuclear abnormalities were triggered by short-time exposure in all treatments, which showed effects significantly higher than the control group. These results showed genotoxic responses in tadpoles, which could trigger cell death pathways. Concluding, these analyses are important for applications in assessment of contaminated aquatic environments and their biomonitoring, which will evaluate the potential toxicity of xenobiotics, for example, the nanoparticles and pyrethrum extract in frog species. However, further studies are needed to better understand the effects of nanopesticides and botanical insecticides on non-target organisms, in order to contribute to regulatory aspects of future uses for these systems.

Keyword: Nanotoxicology. Solid lipid nanoparticles. Botanical insecticides. Pyrethrum. Bullfrog tadpoles.

5.1. Introduction

Agrochemicals can be found in water bodies in rural areas and have a direct impact on the niches occupied by amphibians. These species may have cardiac and physiological effects (COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2015), histological and cellular (OLIVEIRA et al., 2016; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2016; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2019; RISOLLI et al., 2016), biochemical (RICHARDS; KENDALL, 2002; VAN METER et al., 2019), and others. Despite the fact that large-scale use of agrochemicals in crops increases food production, about 2.7 kg.ha⁻¹ per year are used in crop production (ZHANG, 2018). Their residues can be carried to the water bodies from physical-chemical processes, such as leaching and surface runoff (BOTELHO et al., 2012), reaching surrounding landscapes of crops in concentrations that can be toxic for aquatic and terrestrial organisms.

An alternative to minimizing the negative impact of these agrochemicals on non-target organisms is by using botanical insecticides, which are natural substances from plants with insecticidal properties, and considered effective and environmentally safer than their synthetic molecules, therefore reducing environmental contamination (ISMAN, 2008; McKENNA et al., 2013; SENTHIL-NATHAN, 2013; HIKAL et al., 2017). However, most botanical insecticides are less stable in environmental conditions than synthetic pesticides, because they are photosensitive and suffer rapid biodegradation (ISMAN, 2006). An example is a pyrethrum extract produced from flowers of chrysanthemum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Chrysanthemum cinereum*; SCHLEIER; PETERSON, 2011) which is composed of pirethrin I and II, cinerin and jasmolin, it is lipophilic and photosensitive, and are toxic to insects and aquatic organisms (COX, 2002; SCHLEIER; PETERSON, 2011; USEPA 2006).

Nanotechnology promotes the development of new compounds to be applied in crop protection, this can encapsulate active ingredient and contribute to stabilizing botanical insecticides by providing modified release systems (KUMAR, 2000; RIEHEMANN et al., 2009; SILVA et al., 2012). Agricultural nanocarrier systems, which are developed for acting in pest control, release active ingredients over time-and, therefore, can reduce the amount of active ingredients and their residues in the crops and environment (CHEN; YADA, 2011), as well as improve the stability of the active ingredients and protect them from degradation by light and temperature (BILIA, 2014). The use of nontoxic solvent, natural and biodegradable compounds in their formulation, help in the lowest toxicity (LU; OZCAN, 2015). Therefore, these systems are potentially more efficient, providing greater security for the environment and are safer for

non-target organisms (CHEN; YADA, 2011; GRILLO et al., 2014; KARERU et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015, SILVA et al., 2012).

Nanotoxicology is a recent area (MOORE, 2006), in the last years there has been an increase in studies with nanomaterials, their effects and action mode (BUNDSCHUH et al., 2018). The nanoparticles (NP) emissions can be indirect (e.g. wastewater treatment plants) or direct to the environment and trigger multiple pathways of cellular response in the organisms, such as oxidative stress (BUNDSCHUH et al., 2018). Nanomaterials may interact with many pollutants or constituents of environment and thus change their bioavailability and toxicity (DU et al., 2018).

The behavior of NP in aquatic system has been studied, nevertheless studies with amphibian populations associated with nanomaterials are still scarce (OLIVEIRA et al., 2016). However, further studies are required to discuss the potential toxicity of these compounds for amphibians. Nanotoxicology in the aquatic environment has been more studied in microorganisms (ZHU et al., 2019), aquatic invertebrates (MAGESKY; PELLETIER, 2018) and fish species (FEDERICI et al., 2007; MANSANO et al., 2018), but most of them evaluate the toxicity of metallic or inorganic nanoparticles (GRIFFITT et al., 2008).

The studies with nanomaterials in aquatic species show cytotoxic and physiological effects (MAGESKY; PELLETIER, 2018; MANSANO et al., 2018); genotoxic and hematological effects (SHALUEI et al., 2013; VIGNARDI et al., 2015); behavioral and bioaccumulation (CAMPOS et al., 2019b); biochemical and histological evaluations (FERNANDES et al., 2018); hepatotoxicity (OLIVEIRA et al., 2016); etc. However, more species need to be investigated, and many gaps need to be answered for a better understanding of nanomaterials, in order to avoid the environmental contamination and side-effects on species.

However, the legislation should be renewed and/or adapted to provide a more accurate risk assessment of nanomaterials (WALKER et al., 2017), as well as ensuring the development of a regulatory framework for nanopesticides (KOOKANA et al., 2014). This context, in Brazil there is no legislation and normative that regulates the production and use of nanomaterials (WACKER et al., 2016), nor of the possible benefits of these as carrier systems in agriculture and medicine. The law project nº 6741/2013 to create the National Nanotechnology Policy was on analysis by the Brazilian government, but this was filed in January 2019. Regulatory agencies worldwide have started to discuss and establish a policy for nanotechnology and nanosafety, defining criteria for development, evaluation and classification of nanomaterials (WACKER et al., 2016).

The nanocarriers are being used in several different applications by society, for example, in medical, cosmetic, industrial (e.g. textile and ink) and agricultural areas. However, due to the variety of products on the market, the emission sources and action modes in the environment will be diversified (NOWACK; BUCHELI, 2007), which increases the risk the environmental contamination and effects on biodiversity (BUNDSCHUH et al., 2018). Additionally, pyrethrins and their residues can be found in sediments, and in soil and water bodies (TANG et al., 2018). In this scenario, it is important to assess the potential risks, effects and toxicity of nanopesticides carrying pyrethrum. The nanotoxicological studies with pyrethrum extract encapsulated in solid lipid nanoparticles (SLN) on non-target animals (i.e. amphibian tadpoles) are important, because they may can be exposed to the botanical insecticide and its carrier systems via runoff water.

Amphibians were chosen as the experimental models because their populations have been decreasing in recent years, mainly due to changes in their habitats and pollution generated by xenobiotics (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002; BEEBEE; GRIFFITHS, 2005; HAYES et al., 2010a; WAKE; VREDENBURG, 2008). In the agricultural fields, chemical compounds should minimize their effects on non-target organisms, such as amphibians, and act selectively only on the target pest. The aims of this study were to analyze genotoxic and hematological biomarkers in order to provide a better understanding of the potential toxicological effects of nanopesticides in anuran tadpoles, providing new approaches for risk assessment in the environment for nanotechnological products.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Chemicals

The pyrethrum extract, Pestanal® (extract botanical insecticide, CAS 8003-34-7 - analytical standard), poly-vinyl alcohol (PVA, 30-70 kDa, CAS 9002-89-5 – hydrolyzed > 99%) and glyceryl tripalmitate (tripalmitin, CAS 555-44-2, purity ≥ 99%) was purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co, and chloroform (CHCl₃, CAS 67-66-3 - purity ≥ 99%) was used for nanoparticles preparation. Acetone (CAS 67-64-1 - purity = 100%) was used as a solvent to prepare the pyrethrum solution.

5.2.1.1 Solid Lipid Nanoparticles

Solid lipid nanoparticles (SLN) containing pyrethrum extract were prepared according to the emulsification/solvent evaporation method with some modifications (VITORINO et al., 2011). Initially, 30 mL of aqueous phase was prepared containing 1.25% PVA and distilled water kept under magnetic stirring (100 rpm). In addition, the organic phase was prepared with 250 mg of glyceryl tripalmitate and 5 mg of pyrethrum extract (active ingredient – a.i.), which was dissolved in 5 mL of chloroform. The organic phase was added to the aqueous phase and this mixture was sonicated for 5 min at 40 W producing an emulsion. The emulsion was placed in an ULTRA-TURRAX™ homogenizer at 14.000 rpm for 7 min. Next, the organic solvent was removed using a rotating evaporator and the emulsion was concentrated up to 10 mL of the nanoparticles. The final concentration of botanical insecticide was 0.05 mg.mL⁻¹. The solid lipid nanoparticles (control) were also prepared without pyrethrum extract. The summary of the nanoparticle characterization data is described in the supplementary material (Table 1S). Although pyrethrum is photosensitive, once inside the nanoparticle it does not suffer degradation, as proven by HPLC.

5.2.2 Animal collection and acclimation in laboratory

Newly hatched *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) tadpoles were acquired from a frog farm in Santa Barbara d' Oeste, São Paulo State, Southeast Brazil (22°78'S, 47°40'W). According to the external anatomic features the tadpoles were classified in the 20 and 22 Gosner stages (GOSNER, 1960). In the laboratory, tadpoles were kept in 60 L aquariums equipped with continuous aeration supply (1.2 L.h⁻¹) and dechlorinated water (> 6.0 mg O₂.h⁻¹), with a constant temperature (25 ± 1 °C) and natural photoperiod (~12 h light: 12 h dark cycle) during the acclimation period (~7 days), until they reached 25 Gosner (1960) stage, that is the beginning of independent feeding. Animals were fed on organic spinach leaves, which were withheld 48 h before the bioassay. The water was monitored daily to ensure that the physical and chemical parameters (supplementary material – Table 2S) were kept at acceptable levels similar to those found in most Brazilian inland waters (CONAMA Resolution 357/2005, CETESB, 2009). During the acclimation and exposure periods, ammonia measurements were performed daily. All procedures followed ASTM (2002) guidelines. The experiments were previously approved by the University Ethics Committee (Protocol nº 1472160516/2016 - CEUA/UFSCar), which follows Brazilian regulatory laws.

5.2.3 Determination of LC50

The pyrethrum extract concentration used for ecotoxicological bioassays was previously defined by determining LC50 (48 h) as there was no data providing information about the effects of this pesticide for bullfrog tadpoles. The range of concentrations to determine the LC50 was based on the concentration of permethrin, which is a synthetic pyrethroid, used in a previous study with the same species ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) performed by França et al. (2015).

Bullfrog tadpoles at Gosner (1960) developmental stage 25 (premetamorphic stage) were tested in bottle systems according to the methodology developed by Nunes et al. (2008). Each individual was placed into one bottle containing 1 liter of dechlorinated water, in the absence of light. Thus, each tadpole represents a replica in the test ($N = 8$ tadpoles per concentration) assayed in six pyrethrum-exposed groups: $130 \mu\text{g.L}^{-1}$, $170 \mu\text{g.L}^{-1}$, $190 \mu\text{g.L}^{-1}$, $220 \mu\text{g.L}^{-1}$, $400 \mu\text{g.L}^{-1}$, $580 \mu\text{g.L}^{-1}$, and two control groups: pyrethrum-free water and solvent control with acetone ($580 \mu\text{g.L}^{-1}$) diluted in water. The LC50 of PYR was $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Supplementary material – Figure 3S). Ecotoxicological bioassay was performed testing 1/5 of LC50 ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$ concentration) for pyrethrum extract, which was immediately prepared.

5.2.4 Ecotoxicological experimental design

One-hundred and forty-four tadpoles at Gosner (1960) developmental stage 25 were randomly divided into six experimental groups assayed in triplicate: I) Control (CTL); II) pyrethrum extract (PYR); III) Solid lipid nanoparticles (SLN); IV) pyrethrum extract associated with solid lipid nanoparticles (SLN+PYR); V) Poly-vinyl alcohol (PVA); VI) Acetone control (CTA).

Each experimental group had 24 individuals in the total, divided into three glass test aquariums ($N = 8$ tadpoles per aquarium), according guidelines proposed by ASTM (2002) for conducting ecotoxicological experiments with amphibians and other animals. Each test aquarium was filled with 8 L of well-aerated, dechlorinated water ($> 6.0 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$). During the bioassays, all glass test aquariums with the animals were kept under controlled temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), on a 12:12 h light: dark cycle in the laboratory. To prevent external disturbances and photodegradation of tested compounds all the aquariums were covered with black bags. Acute exposure to pyrethrum extract and nanoparticles (NPs) was performed in a static system for 48 h.

5.2.5 Experimental protocols

At the end of bioassay, the tadpoles were immersed in cold water (15 min) followed by anesthesia with lidocaine (50 mg.g⁻¹). Approximately 40 µL of blood were taken from each tadpole of the different experimental groups. Therefore, 2 individuals from each aquarium were used for hematological and genotoxic analyzes, totalizing 6 individuals per experimental group, except for comet assay (see item 5.2.5.3).

5.2.5.1 *Leukocyte and Erythrocyte measurements*

In the red blood cell count were used 2 µL of blood from each tadpole (N = 6 per group), which were stored in heparinized microtubes containing saline solution (100 µL of formaldehyde citrate) for erythrocyte counting in a Neubauer chamber (number of cells x 2.5 x 10³ mm⁻³). The differential leukocyte count was performed using blood smear, approximately 10 µL were taken from each tadpole (N = 6 per group) by cardiac puncture, after was made fixation in pure cold methanol for 20 min (4°C) and then stained using the Instant Prov Kit. In addition, red blood cells (RBC) from 6 animals for each experimental group were counted by means of double-blind count.

5.2.5.2 *Erythrocytes nuclear abnormalities*

An aliquot of 10 µL blood were taken from each tadpole (N = 6 per group) by cardiac puncture, and it was used to perform blood smear with a drop of blood for the micronuclei assay and the analysis of other erythrocytes nuclear abnormalities, following the procedures described by Lajmanovich et al. (2014) and Fenech (2000). Slides containing blood smear were immersed in a fixative solution, cold pure methanol (4 °C), for 20 min. Then, they were stained using the Rosenfeld method (1947), according to Ranzani-Paiva et al. (2013). Afterwards, 1000 cells were analyzed per animal in each experimental group (N = 6 individuals per experimental group).

5.2.5.3 *Comet assay (Single cell gel electrophoresis assay)*

Glass slides were previously prepared in agarose (1.5% in PBS pH 7.4, Ca²⁺ and Mg²⁺ free) and kept at room temperature. Tadpoles' blood was collected per experimental group (10

μL per individual, $N = 3$ tadpoles per experimental group, i.e., one individual from each different aquarium) and transferred to a microtube with $10 \mu\text{L}$ of PBS (phosphate buffer saline pH 7.4, Ca^{2+} and Mg^{2+} free). Thus, $10 \mu\text{L}$ of the diluted blood was mixed with $80 \mu\text{L}$ of the agarose low melting point (LMP; 0.5% in PBS pH 7.4, Ca^{2+} and Mg^{2+} free) and distributed on pre-prepared slides. These slides were immediately covered with a coverslip and refrigerated (4°C) for up to 20 minutes. Afterwards, the coverslip was carefully removed so as not to disturb the material. Slides were immersed in a previously prepared lysis solution (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-lauroyl- sarcosine 1%) kept at 4°C for 1 hour. The lysis was neutralized washing the slides 3 times in a buffer solution (PBS pH 7.4, Ca^{2+} and Mg^{2+} free) for 5 minutes each time, and then were submitted to the electrophoresis in a chamber with an alkaline buffer (NaOH 300 mM, 1 mM EDTA, pH > 13). Single cell gel electrophoresis was carried out for 20 minutes, at 26 V and 300 mA. After this time, the slides were washed 3 times in a neutralization solution (Tris 0.4 M) for 5 minutes each one, and 3 times in a buffer solution (PBS pH 7.4, Ca^{2+} and Mg^{2+} free) for 5 minutes each one, thereafter fixated for 5 minutes in ethanol (OLIVE; BANÁTH, 2006). The slides were kept overnight at room temperature. Staining was carried out by silver nitrate staining. To analyze the DNA damage, a photomicroscope (Leica Microscope- DM1000) was used, at 100x magnification, and categorized the migration of DNA fragments from the nucleoid, visually resembling a comet tail. The nucleoid and tail length were used to categorize the damage into classes 0 (nucleoid with no tail), 1 (tail length up to nucleoid diameter), 2 (tail length larger than the nucleoid diameter with rounded well-defined nucleoid), 3 (large tail with faded definition of nucleoid), and 4 (large tail with poorly presence of nucleoid), representing undamaged ($\cong 0,0$ % of fragmented DNA), low damaged ($\cong 12,5$ %), medium damaged ($\cong 35,0$ %), highly damaged ($\cong 57,5$ %) and extreme damaged ($\cong 85,0$ %) cells, respectively, adapted from Lourenço et al. (2010) and Dalboni et al. (2012). For statistical analyses, each cell nucleoid and its DNA tail were counted per experimental group. The obtained data were normalized for 50 cells in order to get a percentage of cells for the DNA damage classes per experimental group.

5.2.6 Statistical analysis

For statistical analysis, all data of the different analyses were previously submitted to homogeneity of variances (Bartlett's test) and normality tests (Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests). A one-way ANOVA test was applied followed by the parametric Tukey-Kramer

multiple comparison test to compare the results obtained for different experimental groups in the red blood cells count. The Kruskal-Wallis test was performed for non-parametric data, followed by the Dunn's multiple comparison test in the white blood cells differential count; erythrocytes nuclear abnormalities and comet assay. The significance level was 0.05. The program used for statistical analysis was the GraphPad Prism, version 5.0.

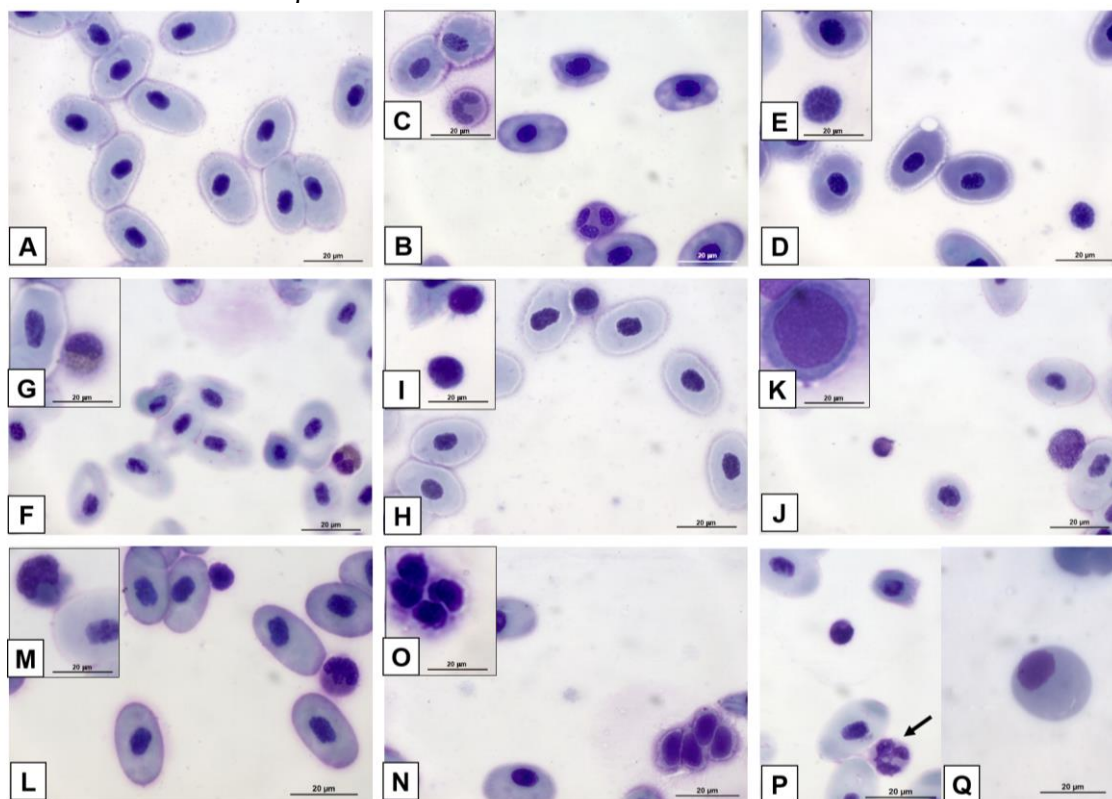
5.3. Results and Discussion

5.3.1 Leukocyte and Erythrocyte measurements

Bullfrog tadpoles blood contains erythrocytes (RBC), leukocytes (WBC) and thrombocytes (platelets). The erythrocytes are nucleated in amphibian species and have an elliptic, flat and biconvex format (Figure 1A); the leukocytes are divided into lymphocytes, monocytes, neutrophils, basophils and eosinophils (Figure 1B-1L).

Neutrophils, eosinophils and basophils are considered granulocytes. Neutrophils have lobed nucleus and few visible granules in cytoplasm (Figure 1B-C); basophils have small nuclei visible due to the large number of cytoplasmic granules (Figure 1D-E); eosinophils have both larger and more visible nucleus and cytoplasmic granules (Figure 1F-G). Lymphocytes and monocytes are considered agranulocytes. Lymphocytes can be either small (Figure 1H-I) or large and their nucleus occupies the largest portion of the cytoplasm (Figure 1J-K). On the contrary, the nucleus of monocytes occupies the smallest area of the cytoplasm and can have different forms (Figure 1L-M); the rineform is the most frequent. Thrombocytes are oval-shaped and aggregated cells, this were rarely found (Figure 1N-O) and, for this reason, they were not counted nor included in the discussion. Non-terminally differentiated cells, heterophils (immature neutrophils, Figure 1P) and immature erythrocytes were also found in smears (Figure 1Q), but not included in the count.

Figure 1 – Blood cells of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). A) Normal erythrocytes; B-C) Neutrophils; D-E) Basophils; F-G) Eosinophils; H-I) Small lymphocytes; -J-K) Large lymphocytes; L-M) Monocytes; N-O) Thrombocytes; P) Heterophil (arrow) and Q) Immature erythrocytes. Staining: Instant-Prov Kit. Bars: 20 μ m.



Source: Own authorship (2018).

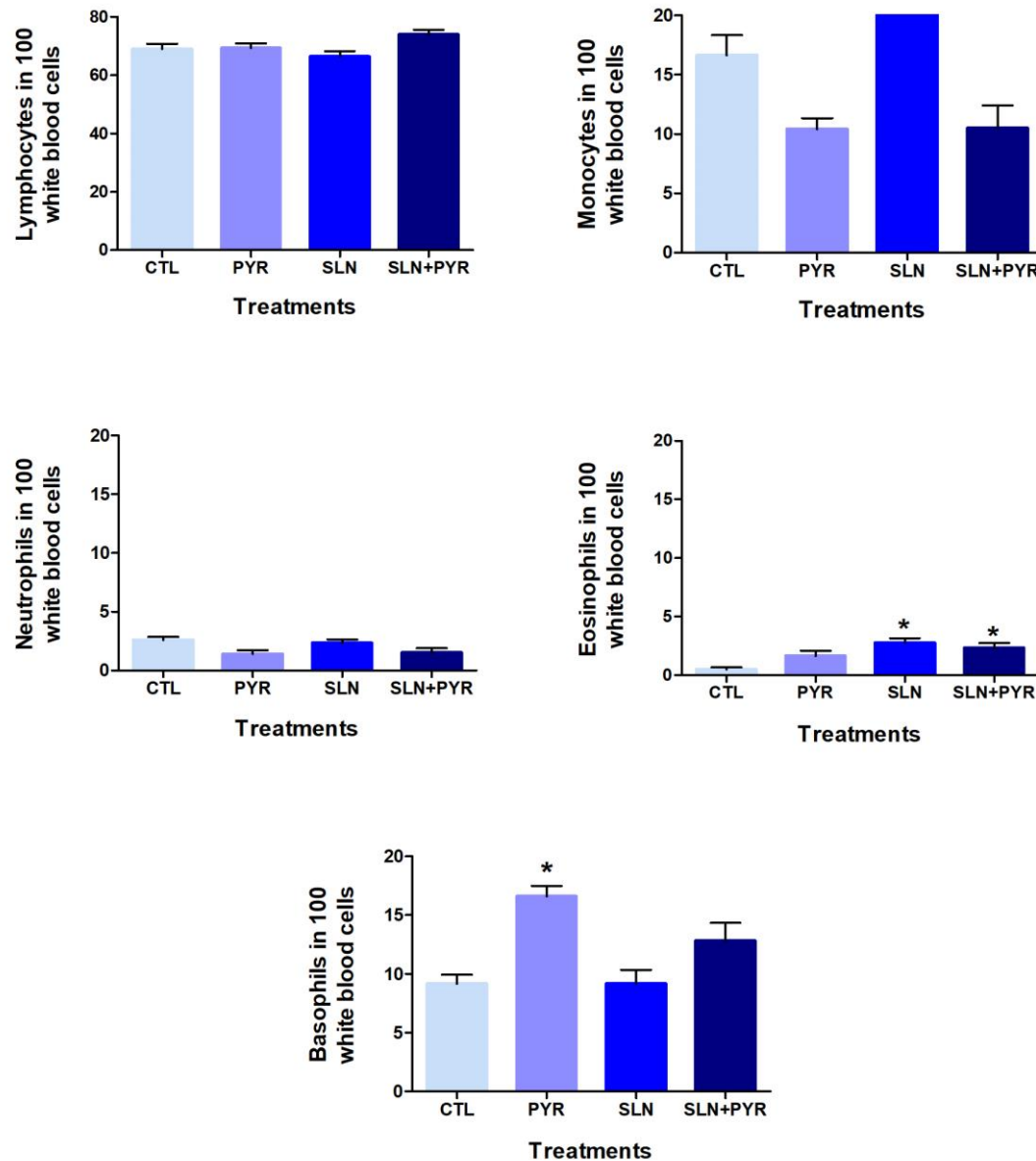
These cell types were already reported for amphibians in other studies (CLAYER; QUAGLIA, 2009; ARIKAN; ÇIÇEK, 2014). Concerning the hematological biomarkers evaluated in the present study, similar characteristics of blood cells were observed by Heatley and Johnson (2009) in the Malaysian frog (*Megophrys nasuta*) and in the various species of Turkish Herpetofauna (ARIKAN; ÇIÇEK, 2010). Variations in the shape of RBC indicate that bullfrog tadpoles are undergoing a critical condition, for example, anemia (DAS; MAHAPATRA, 2012). For all hematological and genotoxic parameters, there was no significant difference ($P > 0.05$) between the controls (CTL) with solvent control (CTA, acetone) and polyvinyl alcohol (PVA, surfactant control), except in the comet assay, which had a significant difference between the PVA group ($P = 0.0001$) and the CTL group.

5.3.1.1 Leukocytes

The number of lymphocytes ($P = 0.0339$), monocytes ($P \geq 0.05$) and neutrophils ($P = 0.0405$) of the exposed groups was similar and had no significant difference among these

groups. Eosinophils had a significant difference between nanoparticles groups and CTL (0.5 ± 0.1508 , Mean $\pm$ SE; $P = 0.0004$) showing almost five-fold increase in the SLN group (2.75 ± 0.4106 , Mean $\pm$ SE) and SLN+PYR (2.35 ± 0.4144 , Mean $\pm$ SE) compared to control group. Basophils had a significant difference between PYR (16.58 ± 0.9 , Mean $\pm$ SE) and CTL (9.17 ± 0.7671 , Mean $\pm$ SE, $P = 0.0001$) showing almost two-fold increase in the exposed group (Figure 2) in relation to control group.

Figure 2 – Number of white blood cells of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) from each experimental group. CTL: control, PYR: pyrethrum extract, SLN: solid lipid nanoparticles, SLN+PYR: nanoparticles associated to pyrethrum. The asterisks above horizontal bars denote a significant difference in relation to the CTL. Kruskal Wallis One-way ANOVA, followed by the Dunn's multiple comparison test. Note the differences in the scales of the graphics.



Source: Own authorship (2018).

Lymphocytes were the most frequent type of leukocytes observed at the present study that and it is considered standard for amphibians (ROUF, 1969). In addition, eosinophils were more frequent in the SLN and SLN-PYR exposed groups than the other ones, and basophils were more frequent in the PYR-exposed group than the other experimental groups.

Solid lipid nanoparticles are produced with natural products such as solid lipids and surfactants. It should also be mentioned that the lipid external layer of nanoparticles keeps in its solid phase at room temperature (BATTAGLIA et al., 2014), probably it keeps this property even inside organisms when absorbed for them. These nanoparticles are considered to have an excellent physical stability, spherical format, good release profile of active ingredient, and to be a non-toxic carrier system (NASERI et al., 2015). In fact, studies indicate that the exposure to xenobiotics or environmental stressors (CHEN, ROBERT, 2011) and solid lipid nanoparticles (WINTER et al., 2016) can activate animals' immune systems. Additionally, the physicochemical proprieties of nanoparticles can stimulate and/or suppress the immune responses (DOBROVOLSKAIA; McNEIL, 2007; ZOLNIK et al., 2010), and the SLN enter de body can induce inflammatory processes (KONONENKO et al., 2015) and cell death in organisms (WINTER et al, 2016).

Eosinophils are effector multifunctional cells that migrate toward several mediators released at parasitic infections, inflammatory sites and allergy (LUNA-GOMES et al., 2013, DAVOINE; LACY, 2014). These immunomodulatory cells participate both in innate and adaptive immune response via expression of various receptors and secretion of a variety of mediators (HOGAN et al., 2008, BREEDVELD et al., 2017). SLN induced hematological effects in Swiss *albino* mice, which probably leads to inflammatory response (WINTER et al., 2016). In the present study, SLNs-exposed groups probably triggered an inflammatory response, activating the eosinophil recruitment and activation in the test-organism. Based on study performed by Kayser et al. (2000) demonstrating that solid lipid nanoparticles interact with macrophage-like cells, we suggest that this here-obtained response occurred because the SLP interacted with macrophage present in circulating blood, after their absorption by the tadpoles. Macrophages produce cytokines as Interleukin-8 (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014), which in turn is a mediator of eosinophil chemotaxis (ERGER; CASALE, 1995). Similarly, another type of organic nanoparticle associated to the herbicide clomazone also resulted in eosinophil activation in exposed bullfrog tadpoles (OLIVEIRA et al., 2016).

Basophils were more frequent in the PYR-exposed group. Basophils play a role in allergic processes and inflammatory disorders (BREEDVELD et al., 2017). The pyrethrum extracted from a botanical source, which has high lipophilia, could be interact with amphipathic

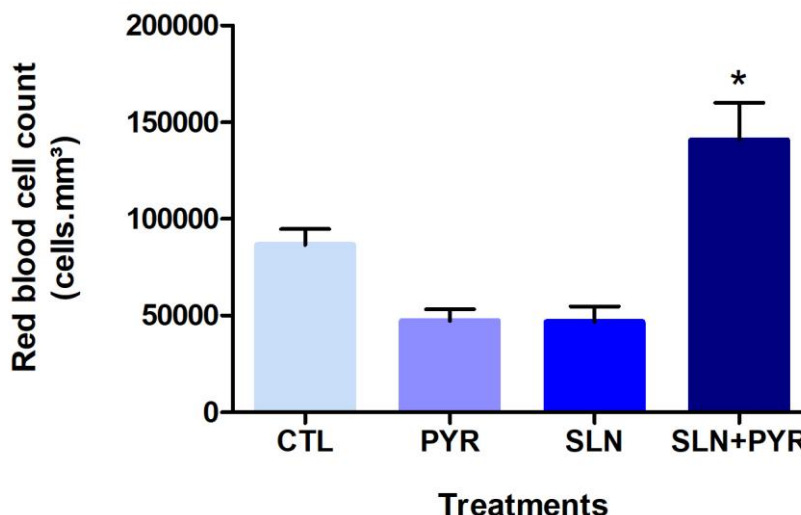
molecules present in tadpole's blood. Thus, this interaction is recognized by the organism as a foreign substance triggering an immune response that induced the increase of basophils number in the blood of tadpoles. A higher number of granulocytes was already correlated with increased environmental stress in vertebrates (AGIUS; ROBERTS, 2003). Basophilia has been described in different species green frogs of the genus *Rana* (*R. ridibunda* Pallas, *R. lessonae* Camerano, and *R. esculenta* Linnaeus) living in the urban environment near to the industrial and it could be regarded as specific forms of antitoxic responses, according the study performed by Romanova and Egorikhina (2006).

Another possibility for increase basophils in the PYR-exposed group is the interaction of pyrethrins, which compose the pyrethrum extract, with some serum blood protein of tadpole, so that this conjugate (pesticide plus protein) could plays a role of antigen and, consequently, antigenic molecules can be recognized and has the potential to active the immune system (CHIPINDA et al., 2011). This hypothesis was based on capacity of pyrethroids bind to a protein (hapten) and, consequently, to raise antibodies against the conjugate (protein plus pesticide), triggering an immune response. This mechanism is the basic principle of the immunoassays for measuring the residues of pyrethroids in environmental samples (AHN et al., 2011). Antigens can interact with IgE antibodies present in the surface membrane of basophils and triggers IgE-dependent allergic inflammation (MIYAKE; KARASUYAMA, 2017).

5.3.1.2 Erythrocytes

Figure 3 shows an increase in the erythrocytes in SLN+PYR (140833 ± 19284 , Mean $\pm$ SE; $P = 0.0001$) in comparison the other experimental groups CTL (86667 ± 8115 , Mean $\pm$ SE), PYR (47273 ± 5997 , Mean $\pm$ SE) and SLN (46818 ± 7863 , Mean $\pm$ SE). There were no significant differences between the other exposed groups and control group.

Figure 3 – Number of red blood cells of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). CTL: control, PYR: pyrethrum extract, SLN: solid lipid nanoparticles, SLN+PYR: nanoparticles associated to pyrethrum. The asterisk above horizontal bars denotes a significant difference between SLN+PYR and the CTL. One-way ANOVA, followed by the Tukey's multiple comparison test.



The increase in the number of erythrocytes or other parameters in RBC can also be altered in organisms exposed to xenobiotics. Erythropoiesis is directly stimulated in tadpoles and adults when exposed to xenobiotics (BARNI et al., 2007). Although there are no studies with amphibians so far, Raheem (2018) described that rabbit immunized with AgNPs trigger in erythrocytose and Winter et al. (2016) observed hemolysis lower than 5% in mice submitted to intravenous application of several solid lipid nanoparticles. Thus, here is not discarded the possibility of hemolysis that could be verified at future studies, which potentially could induce erythropoiesis in tadpoles in order to compensate this adverse effect. This explains the mitosis in erythroid cells observed in this study (Figure 4J-K). In *Lithobates catesbeianus* all life stages naturally present mitotic cell in circulating blood (MANIATIS; INGRAM, 1971).

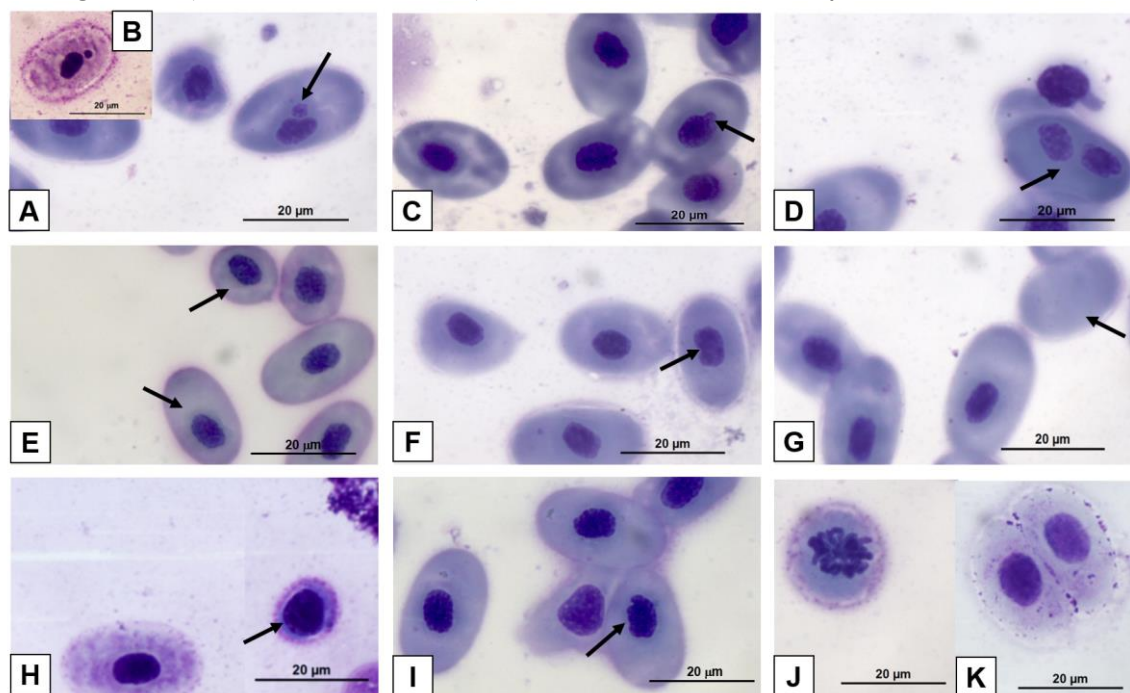
Physiologically, the increase in RBC frequency in SLN+PYR group could intensify the oxygen supply of the organisms that were exposed to this xenobiotic, consequently enhancing the oxygen transport capacity (GATTEN; BROOKS, 1969). The increase in red blood cells and oxygen supply may be the indirect mechanism of increased ATP (adenosine triphosphate) production for xenobiotics' detoxification (BARNI et al.; 2007).

5.3.2 Erythrocytes nuclear abnormalities

Erythrocytes are commonly nucleated and their nuclei have an elliptic or circular shape, but a decentralized nucleus with a circular shape can also be found (Figure 4E). Erythrocytes

with nuclear abnormalities (ENA) in bullfrog tadpoles are shown in Figure 4. Rineform and lobed shape nucleus were also found in erythrocytes (Figure 4E, 4F and 4I). Pycnotic cells (Figure 4H) were rarely found, but mitosis cell division was frequently observed (Figure 4J-K).

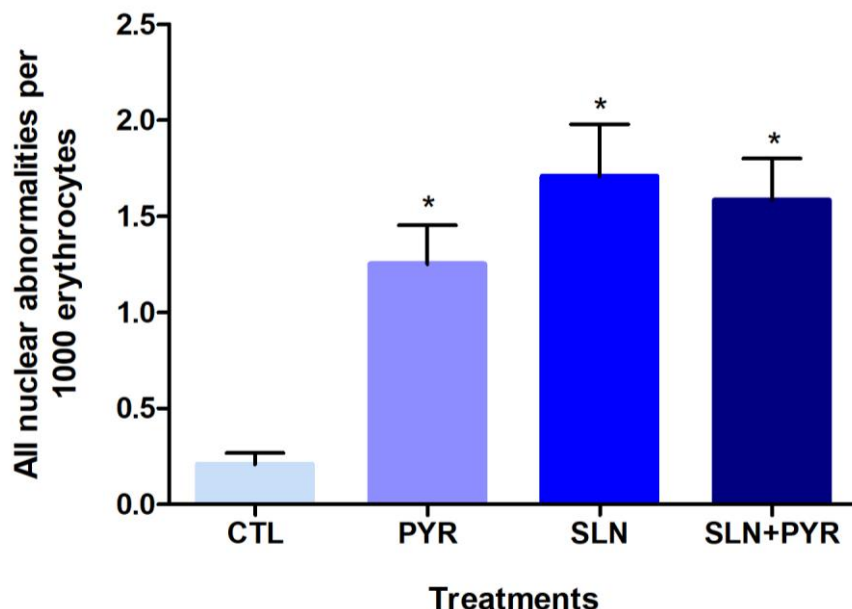
Figure 4 – Red blood cells characterization of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) A and B) Micronuclei; C) Bud nucleus; D) Binucleate cell; E) Espherical Cell and decentralized nuclei; F) Rineform nucleus; G) Anucleated cell; H) Pycnotic cell; I) Lobed nucleus; J-K) Mitotic cell division. Staining: A, C-K) Instant-Prov Kit and B) Rosenfeld method. Bars: 20 μ m.



Source: Own authorship (2018).

The number of erythrocyte nuclear abnormalities (ENA) increased in all the exposed groups (PYR, SLN and SLN+PYR) in relation to the control (0.21 ± 0.0592 , Mean $\pm$ SE, $P = 0.0001$; Figure 5). ENA were more frequent in SLN (1.708 ± 0.2712 , Mean $\pm$ SE), SNL+PYR (1.58 ± 0.2185 , Mean $\pm$ SE) and PYR (1.25 ± 0.2030 , Mean $\pm$ SE) groups than in the control group. These abnormalities are considered genotoxic damage in most studies due to problems in cell division process resulting of chromosome damages (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001). The increase in micronuclei frequency observed in bullfrog can be related to premetamorphic (i.e. Gosner stage 25) or adults' phases, due the cell division in erythrocytes and/or the xenobiotic exposure level in environment (BARNI et al., 2007). Thus, ENA are indicative of the cellular response from the organism, which results in the removal of cells damaged by the xenobiotics.

Figure 5 – Erythrocytes nuclear abnormalities found in the red blood cells of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) from the experimental groups. CTL: control, PYR: pyrethrum extract, SLN: solid lipid nanoparticles, SLN+PYR: nanoparticles associated to pyrethrum. The asterisks above horizontal bars denote a significant difference in relation to the control. Kruskal Wallis One-way ANOVA, followed by the Dunn's multiple comparison test.



To the best of our knowledge, there are no studies evaluating the effect of solid lipid nanoparticles in amphibians, however the increase of ENA in the exposed-groups was also observed by Vignardi et al. (2015) in the marine fish, *Trachinotus carolinus*, when exposed to titanium dioxide nanoparticles. The genotoxicity of nanoparticles was observed by Chen and Von Mikecz (2005) using fluorochrome-labeled SiO₂ nanoparticles in epithelial cell culture and showed that these nanoparticles enter inside the cell nucleus. The genotoxicity of pyrethroids demonstrated by the increased occurrence of micronuclei was observed in the freshwater fish, *Channa punctatus*, exposed to cypermethrin (ANSARI et al., 2011) and by Campana et al. (1999) for other species of fish (*Cheirodon interruptus interruptus*) exposed to lambda-cyhalothrin.

Hematological parameters are responsive biomarkers that measure stress and physiological disturbances in aquatic organisms exposed to nanoparticles (SHALUEI et al., 2013). SLNs prepared with tripalmitin (lipid) and polysorbate or lecithin (surfactants) did not result in hemolytic effects nor in the disturbance of the erythrocyte membranes (PIZZOL et al., 2014). In the present study with tadpoles, SLNs did not result in hemolytic alterations in the RBCs, thus, it is important to mention that SLSs were prepared with organic compounds, which decreases the toxicity and has better bioavailability and stability compared to other NPs (SURENDER; DEEPIKA, 2016). However, the pyrethrum and nanoparticles triggered ENA in

tadpoles, showing genotoxic damage. Toxicity and biological interaction of nanoparticles are influenced by several factors, such as size, shape, composition, aggregation, surface area and organism species (ALBANESE et al., 2012; GATOO et al., 2014; SHARIFIA et al., 2012), being important to evaluate these properties for better determination of toxicity.

The types of erythrocyte nuclear abnormalities (Figure 5) that we found were also described by Das and Mahapatra (2014) for adults of tree frog (*Polypedates teraiensis*) and by Lajmanovich et al. (2014) for *Rhinella arenarum* (common toad) tadpoles. Cytogenetic and genotoxic effects can be analyzed by the micronucleus test, which is widely used for detecting clastogenic (chromosome breakage) or aneugenic (chromosome loss) damages induced by the chemical or physical agents and, therefore, can be used for environmental monitoring (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; POLLO et al., 2015; UDROIU, 2006).

5.3.3 Comet assay

Comet assay or single cell gel electrophoresis assay (SCGE) showed an increase in the damage of class 3 ($P = 0.0001$) and 4 ($P = 0.0001$) for exposed groups (PYR, SLN and SLN+PYR) in comparison with the control group. However, no differences between the exposed groups were observed (Figure 6).

The most frequent damage classes in the control group were class 1 ($P = 0.0001$) and class 2 ($P = 0.0001$), cases with no damage were also frequent ($P = 0.0001$); but for class 2, no significant difference was observed between CTL and SLN+PYR. On the other hand, the most frequent damage classes in the exposed groups were classes 3 and 4, and the PYR group had the most class 4 damage, and the SLN group had the most class 3 damage (Figure 7).

Figure 6 - Comet assay and DNA damage in the bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) of the experimental groups showed significant differences in the group of the pyrethrum extract, nanoparticles and pyrethrum nanoparticles (*) with the control group. CTL: control, PYR: pyrethrum extract, SLN: solid lipid nanoparticles, SLN+PYR: nanoparticles associated to pyrethrum. Statistical analysis represents the number of cells with DNA tail length. Kruskal Wallis One-way ANOVA, followed by the Dunn's multiple comparison test (Mean $\pm$ SE).

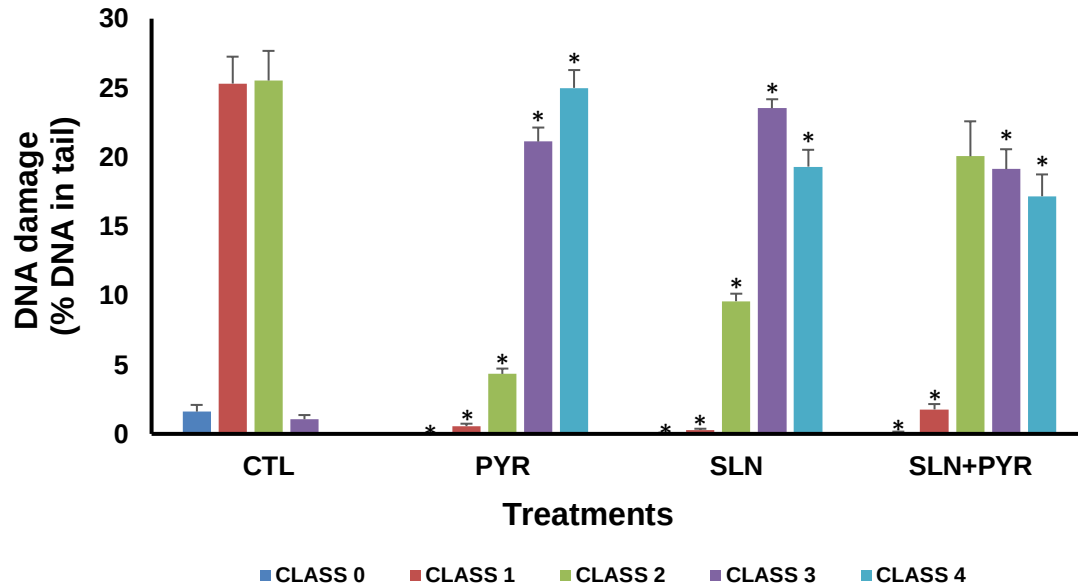
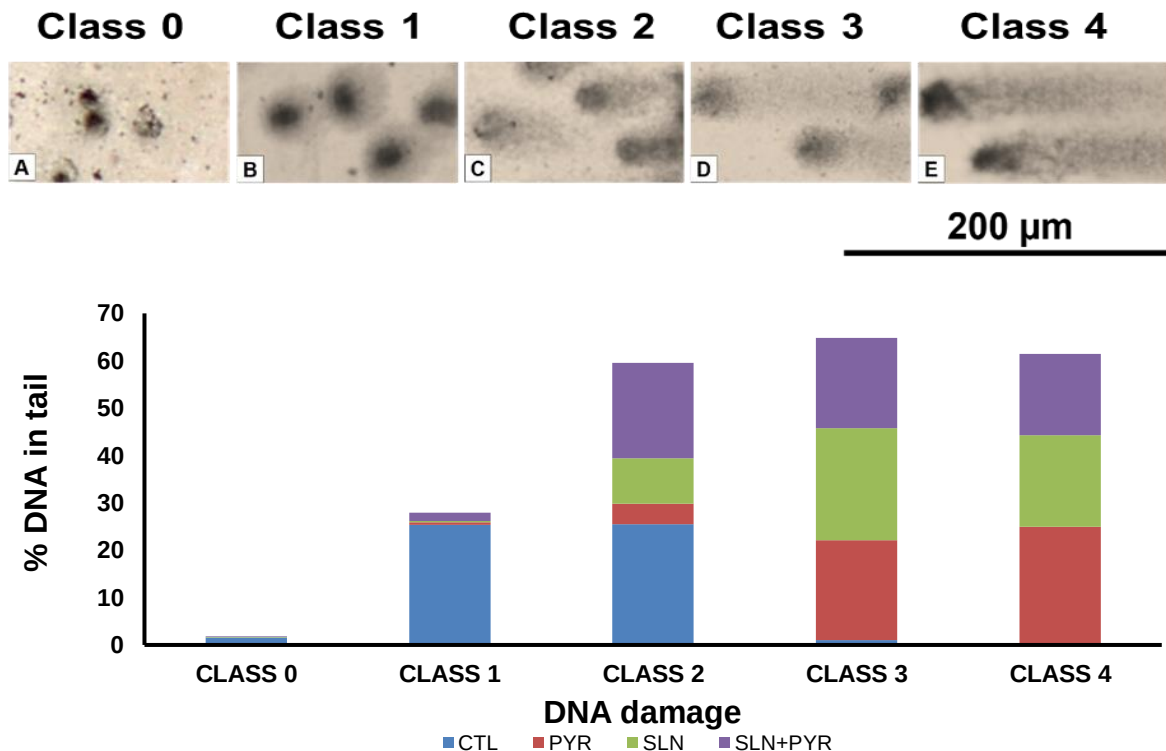


Figure 7 - Comet assay and DNA damage in the bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) of the experimental groups. Graphical analysis represents the number of cells with DNA tail and the classification of the DNA damage. CTL: control, PYR: pyrethrum extract, SLN: solid lipid nanoparticles, SLN+PYR: nanoparticles associated to pyrethrum. A) Class 0; B) Class 1; C) Class 2; D) Class 3 and E) Class 4.



Comet assay has been used in various species, different tissues and isolated cells to evaluate xenobiotic exposures and to understand some diseases (SINGH, 2016). Moreover, single strand-breaks in DNA were expected as an effect of nanoparticles (KARLSSON, 2010; KAIN et al., 2012; RAHMAN et al., 2017), as well as for pyrethrum extract (CABAGNA et al., 2006) and for nanoencapsulated pyrethrum (SLN+PYR) treatments. Nanoparticles associated to pyrethrum had a lower genotoxic and mutagenic effect in the comet assay when compared to the other groups – SLN and PYR, these results show that the botanical insecticide, once encapsulated, becomes less toxic to the organism than in its free form.

An effect that was not expected was the damage observed in the PVA treatment group, i.e., the surfactant used in SLN preparation, therefore there is no report about its toxicity (DEMERLIS; SCHONEKER, 2003; KELLY et al., 2003; MENON et al., 2012). However, the values observed for PVA and SLN treatments were not different, thus, the toxic effect of SLN may also be induced by an additional effect of PVA, as the PVA is a component in its synthesis, as a dispersive agent (MAHMOUDI et al., 2009). According to Scholer et al. (2002), the lipid matrix with your constituents or the concentration of active ingredient in nanoparticle, can determine the cytotoxicity in organisms

Nanoparticles and botanical insecticide cause mutagenicity in the erythrocytes of bullfrog tadpoles (*L. castesbeianus*), causing damage during cell division that result in the formation of micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities and DNA damage. Moreover, it has been shown that TiO₂-NP have effects on the erythrocyte DNA of the marine fish (*T. carolinus*), causing a significant increase at the tail lengths and at % of Tail DNA of the comets of all groups exposed to nanoparticles (VIGNARDI et al., 2015). Mutagenic and genotoxic damage induced in exposed groups can potentially lead to necrosis (MAHAYE et al., 2017), which leads to an inflammatory response potentially mediated by eosinophils (BREEDVELD et al., 2017), which were recruited by proinflammatory cytokines from macrophages (CHANG, 2010) after the probable nanoparticle endocytosis (KAYSER et al., 2000).

In this context, Doktorovova et al. (2014) highlighted the relevance of further studies to understand the possible genotoxic action of SLN, mainly with *in vivo* assays and ecotoxicology analysis in order to verify the safety of nanoparticles in the environment. The micronucleus test and evaluation of other nuclear abnormalities, as well as the comet assay, showed to be sensitive and biomarkers of early effects induced by the SLN and botanical insecticide on bullfrog tadpoles.

The analysis of biomarkers at the cellular and molecular level contribute to evaluate the possible sublethal effects of nanomaterials on non-target organisms. Altogether, the alterations on the biomarkers analyzed in this study provided evidence that the biomarkers employed are sensitives and indicate early response (48 h) to the tested xenobiotics. Considering that the tadpoles presented both genotoxicity and activation of their immune system in all exposed groups, these alterations can impact their fitness and survival in the natural environmental, and they might cause long-term effects on populations. Indeed, the elevation in RBC count was observed only when PYR were encapsulated in nanoparticles, suggesting an increase in oxygen transport capacity becomes necessary for this exposed-group.

Indeed, it has been demonstrated that bullfrogs are particularly sensitive to environmental pollution, being therefore, used as bioindicators (PARMAR et al., 2016; SIMON et al., 2011; VENTURINO et al., 2003), as well as, hematological analysis and changes in blood parameters are used in some species and are representatives in the study of contamination in aquatic environments (CABAGNA et al., 2006; SHALUEI et al., 2013; ZHELEV et al., 2016). Therefore, our results indicate that these biomarkers can be used in the biomonitoring and assessment of contaminated areas in the vicinity of the amphibian habitat. These data added to another nanotoxicological studies will bring great contribution in the establishment of a worldwide policy for nanotechnology and nanosafety.

5.4. Conclusion

Bullfrog tadpoles are suitable model organisms in the toxicity study of both nanopesticides and botanical insecticide. Hematological parameters, genotoxic and mutagenic analyses were appropriated biomarkers of acute toxicological effects to evaluate the tadpole's exposure to nanopesticides and pyrethrum extract, either isolated or encapsulated.

This work is pioneer in the analysis of the effects of solid lipid nanoparticles on anuran amphibians, and it brings novel findings regarding botanical insecticide and solid lipid nanoparticles toxicity, which will contribute to regulatory frameworks and future legislation. Finally, it is important to study both the safety and efficiency of nanocarriers in non-target aquatic organisms.

Acknowledgments

Authors would like to thank the São Paulo Research Foundation (#2017/21004-5). The colleagues who assisted this work Thaís Deluno Garcia; Lilian Franco-Bellusi; Raquel Fernanda Salla; Bruno Fernando Santos de Souza; Nathalie Ferreira Silva de Melo; Silvia Pierre Irazusta; Monica Jones-Costa; Elaine Cristina Mathias Silva-Zacarin; Leonardo Fernades Fraceto. The authors are also very grateful to Dr. Gisele Miglioranza Rizzi-Possignolo (University of California, Santa Cruz) for the for the valuable suggestions and for having conducted a second and careful revision of the English.

Supplementary Material

Table 1S – Characterization of SLN and SLN+PYR in function of time (mean of 0 – 120 days).

PARAMETERS	SLN	SLN+PYR
z-average Diameter (nm)	324	258
Polidispersity index (PdI)	0.19	0.11
Zeta Potential (mV)	-11	-10
pH	5.3	5.6
Encapsulate efficiency (%)	-	≥ 99

Source: Own authorship (2018).

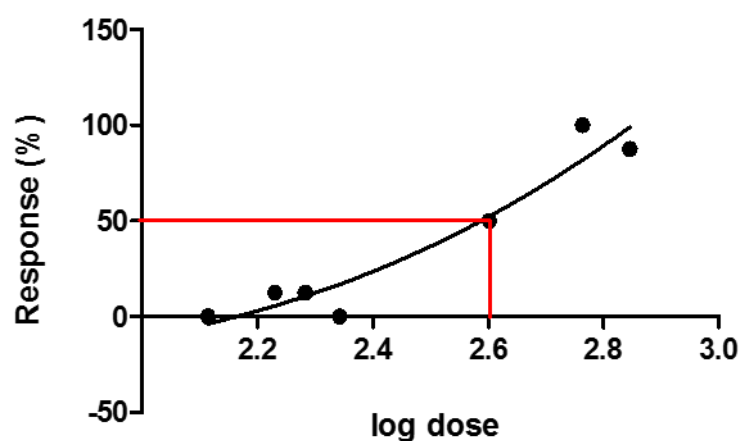
Table 2S - Physical-chemical parameters of the water (Mean $\pm$ SE) of the bioassay with bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) in the different experimental groups.

Groups	Temperature °C	Ph	Total Hardness (mg/L ⁻¹ CaCO ₃)	CO ₂	Ammonia
CONTROL	19.9 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0	50 - 150 ¹	4.7 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.2
PYRETHRUM	19.9 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0.1	50 - 150	3.4 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.2
SLN²	19.8 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0	50 - 150	2.8 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.1
SLN+PYR³	19.7 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0	50 - 150	3.4 $\pm$ 1.5	0.5 $\pm$ 0.2
ACETONE	19.9 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0	50 - 150	2.9 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.1
PVA⁴	19.8 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0	50 - 150	3.5 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.1

Legend: ¹Evidencing the 50-150 soft water; ²SLN - Solid Lipid Nanoparticle; ³SLN+PIR - Solid Lipid Nanoparticle associated to pyrethrum; ⁴PVA - Poly-vinyl alcohol.

Source: Own authorship (2018).

Figure 3S – Determination of concentration to pyrethrum botanical insecticide after 48h exposure.



6. CAPÍTULO 3 – ANÁLISES MORFOLÓGICAS, HISTOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICAS NO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO EXPOSTO AO EXTRATO DE PIRETRO E AO NANOPESTICIDA

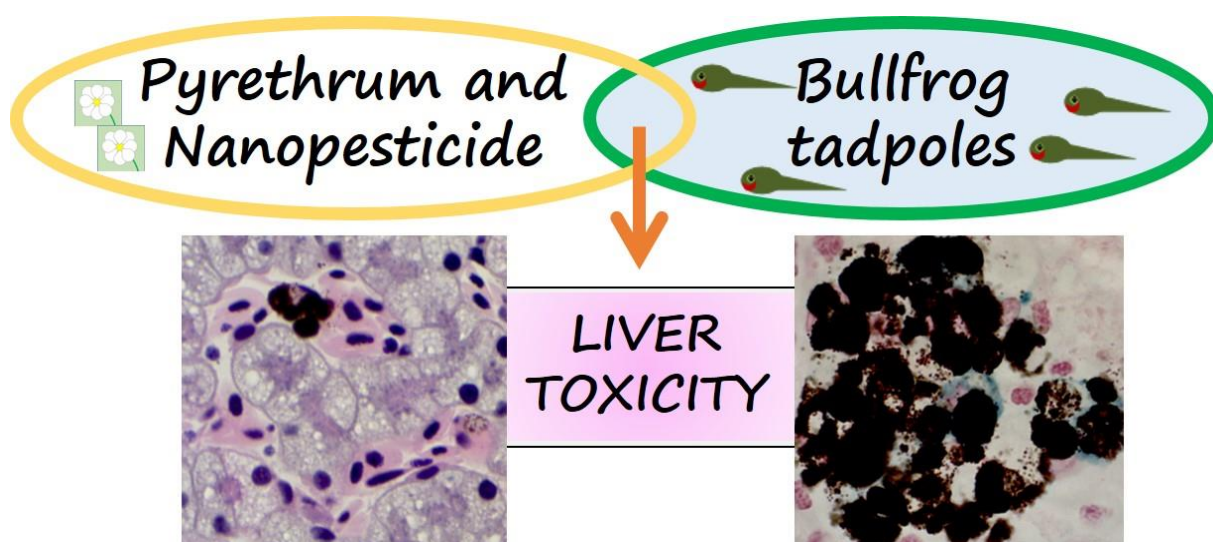
RESUMO

A área nanotecnologia cresceu muito nas últimas décadas, tendo fabricado produtos com diversos enfoques, como farmacêuticos, industriais, dermocosméticos, ambiental e agrícolas. Porém apesar de tantos produtos sendo comercializados ainda pouco se sabe sobre o comportamento no ambiente, mecanismo de ação nos seres vivos e a potencial toxicidade desencadeada por esses nanomateriais. Nesse contexto, os estudos nanotoxicológicos são extremamente importantes para compreender e responder essas lacunas, e até mesmo auxiliar na proposição de marcos regulatórios, para assim proteger a integridade dos ecossistemas e manter a saúde pública. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos histopatológicos no fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao extrato de piretro e a nanopesticidas do mesmo a partir de diferentes biomarcadores celulares. Os resultados evidenciaram um aumento no número de células melanomacrofágicas nos grupos expostos ao surfactante (PVA; $187 \pm 6,4$) e ao extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR; $169 \pm 5,3$) em comparação ao grupo controle. Enquanto que na análise histopatológica foi verificado um aumento da congestão e dilatação sinusoidal, bem como de infiltração leucocitária nos grupos expostos ao PVA e as nanopartículas (NLS e NLS+PIR) em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$), evidenciando uma toxicidade correlacionada a composição química da formulação nos três grupos. Por sua vez, as análises de biomarcadores celulares no grupo do extrato de piretro não apresentaram toxicidade, quando os parâmetros foram analisados individualmente, porém no índice total de lesão do órgão, esse composto ($34 \pm 0,84$) juntamente com os grupos do PVA ($37,2 \pm 1,77$), das nanopartículas livres (NLS - $42,4 \pm 1,76$) e associadas ao piretro (NLS+PIR - $43,6 \pm 2,7$) apresentaram efeitos hepatotóxicos. Conclui-se, dessa forma, que as espécies anfíbias são responsivas à exposição a inseticidas botânicos e a nanopesticidas, evidenciando que a exposição aguda desses organismos no ambiente acarretaria em efeitos sub-letais. Contudo estudos de exposição crônicos precisam ser realizados para averiguar se estes compostos podem interferir na sobrevivência, fitness e performance dessas populações. Tal estudo é de extrema importância devido a tendência de desenvolvimento de nanopesticidas visando aplicações em agricultura sustentável, contribuindo assim para um melhor entendimento da importância dos componentes das partículas em ensaios de toxicidade em organismos não-alvo.

Palavras-chave: Nanotoxicologia. Análise histopatológica. Piretro. Rã-touro. Fígado.

CHAPTER III

LIVER MORPHOLOGY, HISTOCHEMISTRY AND MORPHOMETRIC ANALYSIS IN BULLFROG TADPOLES EXPOSED PYRETHRUM EXTRACT AND NANOPESTICIDE



Em Preparo.

ABSTRACT

The great development of nanotechnology in the last decades has resulted in the creation of products with diverse approaches, such as pharmaceuticals, industrial, dermocosmetics, environmental and agricultural. Although many products are commercialized, little is known about the behavior in the environment, the mechanism of action in living beings and the potential toxicity triggered by these nanomaterials. In this context, nanotoxicological studies are extremely important to understand and answer these problems, in addition to assist in proposing regulatory frameworks in order to protect the integrity of ecosystems and maintain public health. The objective of this study was to evaluate the histopathological effects in the liver of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the extract and pyrethroids nanopesticides from different cellular biomarkers. The results showed an increase in the number of melanomorphagic cells in the surfactant exposed groups (PVA; 187 ± 6.4) and the pyrethrum extract encapsulated in solid lipid nanoparticles (SLN+PYR; 169 ± 5.3) compared to the control. While in the histopathological analysis there was an increase in congestion and sinusoidal dilatation as well as leukocyte infiltration in the groups exposed to PVA and nanoparticles (SLN and SLN+PYR) compared to the control group ($P < 0.05$), which indicates a toxicity correlated to the chemical composition of the formulation in the three groups. On the other hand, the biomarker analysis in the pyrethrum extract group did not show any toxicity, when the parameters were analyzed individually, but in the total organ injury index this compound (34 ± 0.84) together with the PVA groups (37.2 ± 1.77), free nanoparticles (SLN; 42.4 ± 1.76) and pyrethrum-encapsulated nanoparticles (SLN+PYR; 43.6 ± 2.7) showed hepatotoxic effects. Therefore, amphibian species are responsive to exposure to botanical insecticides and nanopesticides, showing that the acute exposure of these organisms to the environment would lead to sub-lethal effects. However, chronic exposure studies need to be performed to see if these compounds can interfere with the survival, fitness, and performance of these populations. Such a study is of extreme importance due to a development trend of nanopesticides towards developing communities, thus contributing to a better understanding of the particulate components in toxicity assays in non-target organisms

Keyword: Nanotoxicology. Histopathological analysis. Pyrethrum. Bullfrogs. Liver.

6.1 Introdução

A nanotecnologia é uma área que envolve o processamento de diferentes materiais em escalas nanométricas, que ampliou muito suas aplicações na área científica e econômica nas últimas décadas (MAURER-JONES et al., 2013), alcançando os impressionantes 1,7 bilhões de dólares em 2010 no mercado econômico, representando uma taxa de 10,4% de crescimento anual (KOO, 2016). São produzidos diversos nanomateriais (NMs), em diferentes áreas como médica, farmacêutica, cosmética, industrial, saneamento e agrícola (HOWARD, 2010; NOWACK; BUCHELI, 2007).

De acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO, 2012, p. 1), o nanomaterial é definido como “material com qualquer dimensão externa em nanoescala ou com estrutura interna ou estrutura de superfície em nanoescala”, enquanto que nanopartícula (NPs) é definida como um “nano-objeto com todas as três dimensões externas em nanoescala”. Os NMs são considerados materiais com dimensão de 1–1000 nm, porém muitos trabalhos consideram de 1–100 nm. O grande problema encontra-se na falta de regulação internacional para esses materiais, para que assim exista uma padronização para sua definição e caracterização (JEEVANANDAM et al., 2018). A agência reguladora da Europa - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), institui o Regulamento (UE) 2015/2283 para novos alimentos recentemente, no qual os nanomateriais utilizados na agricultura podem ter partículas maiores que 100 nm, desde que possuam propriedades típicas de nanopartículas (HARDY, 2018).

Com toda a inovação tecnológica também temos o lado negativo, pois com tantos materiais sendo produzidos e descartados não se sabe os impactos e riscos associados destes, como por exemplo de uma potencial exposição aos seres vivos e sobre a preservação da integridade dos ecossistemas (OLIVEIRA, 2019). Desde o processo produtivo, seu manuseio, sua utilização e seu descarte pode haver formas de intoxicação e/ou descarte de nanopartículas para o meio ambiente (JEEVANANDAM et al., 2018). O problema está na falta de regras estabelecidas para medições dessas nanopartículas no ambiente de trabalho, bem como uma avaliação de risco no âmbito ocupacional (BERGES, 2013), ou mesmo nos compartimentos ambientais interferindo na sobrevivência, desenvolvimento e comportamento dos seres vivos (MAURER-JONES et al., 2013), sendo necessário que regularizações na área da saúde e segurança (Del CASTILLO, 2013), bem como na área ambiental sejam desenvolvidas e aplicadas em todo o Mundo (HOWARD, 2010).

A nanotoxicologia é uma área da toxicologia que tem estudado a toxicidade nos seres vivos das nanopartículas presentes nos ecossistemas, a fim de determinar o potencial nível de ameaça ambiental e social (WALTERS; POOL; SOMERSET, 2016). A toxicidade das nanopartículas está principalmente associada a composição e a morfologia da partícula, mas também é preciso considerar o tamanho, a agregação das partículas, a área superficial, o tempo da amostra, a dose e o tempo de exposição (JEEVANANDAM et al., 2018). Ademais, o comportamento das NPs dentro do organismo pode ser alterado em virtude da interação com o sistema biológico, bem como em função da sua degradabilidade e bioacumulação (ENIS et al., 2017).

Os estudos nanotoxicológicos nos ecossistemas aquáticos tem aumentado gradativamente, evidenciando os diferentes níveis tróficos e a toxicidade nas espécies (ROCHA et al., 2017). Muitos estudos evidenciam a toxicidade em peixes e salientam que as NPs geralmente são absorvidas pelos epitélios e brânquias, e causam toxicidade em diferentes níveis, como subcelular, celular, tecidual, molecular, entre outros (WALTERS POOL; SOMERSET, 2016). O mecanismo de ação em organismos aquáticos segue duas vias principais de resposta toxicológica, um seria a toxicocinética e outra a bioacumulação em locais alvos (CHEN, 2016).

Contudo, é importante que estudos com espécies anfíbias também sejam realizados, visto que as populações anfíbias têm um ciclo de vida dual e estão declinando em todo o Mundo, em virtude das mudanças climáticas, perda de hábitat, exposições ao xenobióticos e infecções parasitárias (COLLINS et al., 2010). Os estudos nanotoxicológicos com anfíbios são limitados, sendo que principalmente são avaliados os efeitos das nanopartículas inorgânicas, representando 72% dos estudos em comparação das NPs orgânicas (AMARAL et al., 2019).

O estágio de desenvolvimento dos anfíbios e o tempo de exposição, além de todas os parâmetros das nanopartículas supracitados precisam ser considerados nos estudos toxicológicos dessas espécies (AMARAL et al., 2019). Dentre os efeitos já relatados nessas populações estão efeitos hematológicos e genotóxicos (OLIVEIRA et al., 2019; BOUR et al., 2017), celulares em diferentes órgãos como fígado, gônada, rim e brânquias (OLIVEIRA et al., 2016; THOMPSON et al., 2017); efeito enzimáticos e bioquímicos (BIRHANLI et al., 2014; SALVATERRA et al., 2013), efeitos hormonais (HAMMOND; CAREW; HELBING, 2013); embrionários (BACCHETTA et al., 2012). Portanto, percebe-se que os anfíbios são responsivos aos nanomateriais e podem ser utilizados nos estudos toxicológicos e de biomonitoramento.

As nanopartículas apresentam alta reatividade e, portanto, são facilmente transformadas no ambiente, a partir de diferentes processos como reações redox ou reações de biomacromoléculas. Essas transformações alteram o mecanismo de ação e comportamento das

NPs no ambiente e a toxicidade nos seres vivos (MAURER-JONES et al., 2013). Portanto, é importante que todos esses detalhes sejam estudados para que se tenha uma utilização consciente e não prejudicial dos NMs aos ecossistemas, dessa forma os estudos nanotoxicológicos poderão contribuir para ampliar os conhecimentos sobre as nanopartículas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito histopatológico no fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), a fim de compreender as potenciais alterações morfológicas, histoquímicas, biométricas e morfométricas nesse órgão a partir da exposição aguda a nanopesticidas e inseticidas botânicos a base de extrato de piretro. O fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos e análises a partir de biomarcadores nesse tecido são importantes para compreender o nível de resposta celular, tecidual e no órgão. A partir deste estudo se espera obter informações sobre os potenciais efeitos tóxicos de nanopesticidas em organismos não-alvo a fim de que possam ser desenvolvidas alternativas menos impactantes ao ambiente.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Produtos Químicos

O extrato de piretro Pestanal[®] (extrato do biocida, CAS 8003-34-7, padrão analítico) e o álcool polivinílico (PVA, 30-70 kDa, CAS 9002-89-5, hidrolizado > 99%) foram comprados da empresa Sigma-Aldrich[®]. A acetona (CAS 67-64-1, pureza = 100%) foi comprada de uma empresa local e usada como solvente no preparo da solução de piretro. As nanopartículas foram caracterizadas e produzidas previamente na UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Campus de Sorocaba, Brasil.

6.2.2 Bioensaio toxicológico com girinos de rã-touro

Os girinos recém-eclodidos de rãs-touro - *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) foram adquiridos em ranário comercial no estado de São Paulo/Brasil e armazenados no Laboratório de Ecotoxicologia e Biomarcadores Animais - da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos), Campus de Sorocaba, São Paulo/Brasil. Os girinos foram aclimatados durante 7 dias em aquários de 60 L, equipados com aeração contínua ($1,2 \text{ Lh}^{-1}$), água declorinada ($> 6,0 \text{ mg O}_2\text{.h}^{-1}$), temperatura constante ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e fotoperíodo natural ($\square 12\text{h}$ claro: 12h escuro). Os animais foram alimentados com folhas orgânicas de espinafre, a alimentação foi

cessada 48 horas antes do bioensaio. Durante o bioensaio toxicológico os girinos no estágio 25 de Gosner (1960) foram realocados em aquários menores (20 L), os parâmetros do sistema foram mantidos igualmente ao período de aclimação e os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados para estarem de acordo com os níveis aceitáveis da legislação brasileira (Resolução Conama 357/2005, CETESB, 2009).

Os girinos de rã-touro no estágio 25 de Gosner (1960) foram randomicamente divididos em seis grupos experimentais ensaiados em triplicata: I) Controle (CTL); II) Extrato de piretro (PIR); III) Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS); IV) Extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS+PIR); V) Álcool polivinílico (PVA); VI) Controle acetona (ACN). O grupo PVA foi avaliado como o controle das nanopartículas, visto que esse é o surfactante utilizado no preparo das nanopartículas lipídicas sólidas com e sem o princípio ativo. Enquanto que o grupo acetona foi avaliado toxicologicamente por ser o solvente utilizado na solução de extrato de piretro, sendo, portanto, o controle do grupo piretro. Cada grupo experimental continha 24 indivíduos divididos em três aquários ($N = 8$ girinos por aquário) com 8 L (1 L por girino) de água decolorada. Os aquários foram cobertos com sacos pretos para evitar distúrbios externos. A exposição aguda ao piretro e nanopartículas (NPs) foi realizada em sistema estático por 48 h e utilizou-se a concentração de $80 \mu\text{g.L}^{-1}$ (1/5 da CL50 previamente determinada) de extrato de piretro livre e encapsulado nos bioensaios toxicológicos (OLIVEIRA, 2019). Todos os procedimentos seguiram as diretrizes da ASTM (2002). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade (Protocolo nº 1472160516/2016 - CEUA / UFSCar), que segue as leis brasileiras reguladoras.

Transcorrida as 48h de exposição aguda foram realizadas as coletas do material histológico ($N = 6$ indivíduos por grupo experimental de aquários diferentes) para a realização de análises morfológicas, histoquímicas e morfométricas. Os girinos de rã-touro foram eutanasiados por concussão cefálica conforme as normas de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMA, 2001). Nesse momento, primeiramente pesou-se o material e depois os fígados foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado 4% por 24 h e 4 °C, e então lavados em tampão fosfato (pH 7.4) durante 30 minutos. Em seguida, o material foi rotineiramente desidratado em concentrações crescentes de álcool (SILVA-ZACARIN et al., 2012), embebido em historesina líquida e depois emblocado na historesina de inclusão. As lâminas histológicas com as secções histológicas foram confeccionadas e coradas com 1) Azul de Bromofenol para análises morfométricas e histopatológicas; 2) Hematoxilina-Eosina para análises morfológicas e semi-quantitativa do fígado; 3) Xilidine Ponceau para detecção de proteínas; 4) PAS para detecção de glicoconjugados; 5) Sudan-Black B para detecção de

lipídios; 6) Azul de Toluidina para detecção de mastócitos; 7) Azul da Prússia para detecção de hemossiderina. Os itens 3 ao 7 foram realizados para análises histoquímicas e analisou-se 2 indivíduos por grupo experimental. As lâminas histológicas foram todas documentadas ao fotomicroscópio de campo claro (Microscópio Leica® - DM1000) e software (Leica Application Suite V3.8 software).

6.2.2.1 Análises biométricas e morfométricas do fígado

As análises biométricas foram realizadas a partir da determinação da massa corpórea total dos girinos e dos fígados coletados desses espécimes (N = 10 indivíduos por grupo experimental). A partir desses dados calculou-se o índice hepatossomático (IHS) em todos os grupos experimentais, segundo a fórmula abaixo:

$$[\text{IHS} = (\text{peso do fígado/peso do girino}) \times (100)] \quad \text{Equação 1}$$

As análises morfométricas foram realizadas a partir da contagem de células melanomacrofágicas (individuais e agregadas) nas secções histológicas do fígado dos animais dos grupos experimentais (N = 5 indivíduos por grupo experimental) mediante parâmetros previamente preestabelecidos (OLIVEIRA et al., 2016). Deste modo, foi realizada a contagem das células melanomacrofágicas para confirmar ou refutar a hipótese de que essas aumentam sua quantidade nos grupos expostos. Foram analisadas 10 secções histológicas diferentes por lâmina, considerando-se a maior área tecidual observada na objetiva de 4x.

6.2.2.2 Análise semi-quantitativa do fígado

Todos os grupos experimentais foram avaliados morfológicamente para averiguar as alterações histopatológicas no fígado dos espécimes (N = 5 indivíduos por grupo experimental), no qual analisou-se uma lâmina por indivíduo em diferentes áreas teciduais (campos de visão), com secções histológicas não sequenciais. A avaliação dessas alterações para análise semi-quantitativa foi realizada a partir do protocolo de Bernet et al. (1999) e das alterações histológicas (lesões no órgão) para fígado de girinos de rã-touro de acordo com o estudo de Oliveira et al. (2016), e em seguida calculou-se o índice de lesão e o índice de lesão total no órgão (BERNET et al. 1999), ponderando-se as médias e o erro padrão entre os indivíduos de cada grupo experimental.

A análise histopatológica no fígado foi classificada por escores (a) variando de 0, 2, 4 e 6, dependendo do grau e extensão da alteração, e pela importância patológica (w) da lesão: 0 - sem ocorrência, 2 - pouca ocorrência, 4 - moderada ocorrência, 6 - severa ocorrência (OLIVEIRA et al., 2016). O fator de importância foi estabelecido para cada lesão observada na análise qualitativa, dessa forma a importância patológica da lesão foi classificada em: (1) importância patológica mínima (o dano pode ser facilmente reversível) - como hemorragia, hemácias turgidas, edema intercelular, infiltração de hemácias, citoarquitetura dos hepatócitos, corpos de Mallory, corpos acidófilos, lipidose, hipertrofia, células melanomacrofágicas, infiltração eosinofílica e infiltração leucocitária; (2) importância patológica moderada (o dano pode ser reversível na maioria dos casos) - como congestão sinusoidal, dilatação sinusoidal, esteatose macrovesicular, picnose, apoptose, hiperplasia; e (3) importância patológica severa (dano irreversível) - como necrose e granuloma.

6.2.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram previamente submetidas à homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov). E depois submetidos ao teste One-Way ANOVA para dados paramétricos e seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, ou ao teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. O nível de significância foi de 0,05 e o programa utilizado para todas as análises estatísticas foi o GraphPad Prism versão 5.0.

6.3 Resultados e Discussão

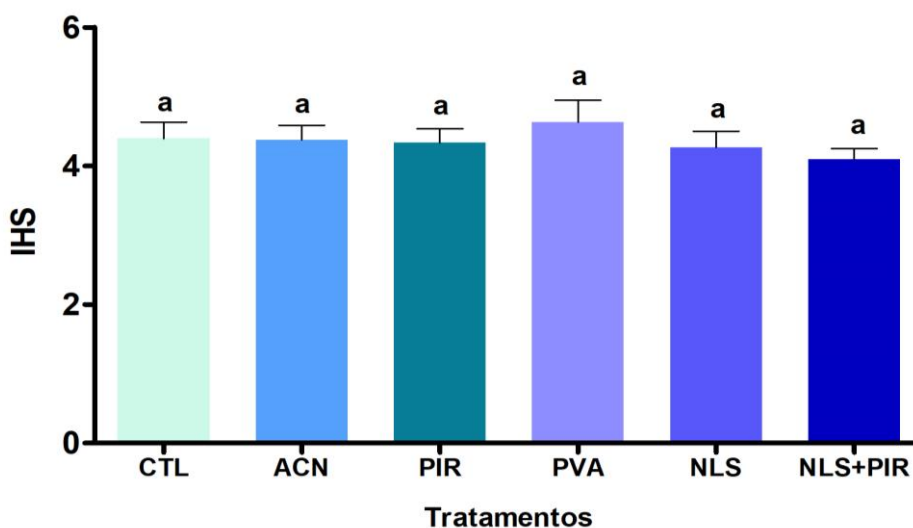
Os girinos apresentaram massa corporal entre 1,98 e 4,56 g ($2,98 \pm 0,06$ g, média $\pm$ DP) e tamanho corpóreo entre 5,5 cm e 8,4 cm ($7,25 \pm 0,07$ cm, média $\pm$ EP). Durante o período de exposição os espécimes foram monitorados duas vezes ao dia, no qual anotou-se a mortalidade e o comportamento dos animais. Durante as 48 h de exposição aguda não foi observada mortalidade em nenhum grupo experimental, contudo o padrão comportamental dos animais (nível de atividade) mostrou-se alterado em um grupo experimental. O grupo exposto ao extrato de piretro ($P = 0.035$; $12,5 \pm 4.1$ %) apresentou um menor nível de atividade em comparação ao grupo controle ($38,5 \pm 8.8$ %), evidenciando uma letargia nesses animais em virtude da exposição a esse composto (GARCIA, 2018). O extrato de piretro apresenta efeitos

neurotóxicos e isso pode ter acarretado em uma redução da atividade natatória na coluna d'água dos girinos de rã-touro, o que no ecossistema poderia torná-los mais susceptíveis à predação (WERNER; MORAN, 2008).

6.3.1 Análises biométricas e morfométricas do fígado

Os resultados do índice hepatossomático dos espécimes dos grupos expostos (ACN = $4,4 \pm 0,2$; PIR = $4,34 \pm 0,20$; PVA = $4,63 \pm 0,32$; NLS = $4,27 \pm 0,23$; NLS+PIR = $4,09 \pm 0,16$) em comparação ao grupo controle ($4,4 \pm 0,24$; média $\pm$ erro padrão) não evidenciaram diferenças estatísticas significativas, bem como não foram averiguadas diferenças entre os grupos experimentais (Kruskal-Wallis: $H = 1,197$; $P = 0,9451$) (Figura 1). Destaca-se que o grupo acetona foi incluído no delineamento experimental por ser o solvente do extrato de piretro, sendo abordado como um grupo controle do inseticida botânico ($P > 0,05$).

Figura 1 - Índice hepatossomático dos girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) entre o grupo controle e o grupo expostos. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn ($P > 0,05$). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos. Legenda: Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais ($P > 0,05$).



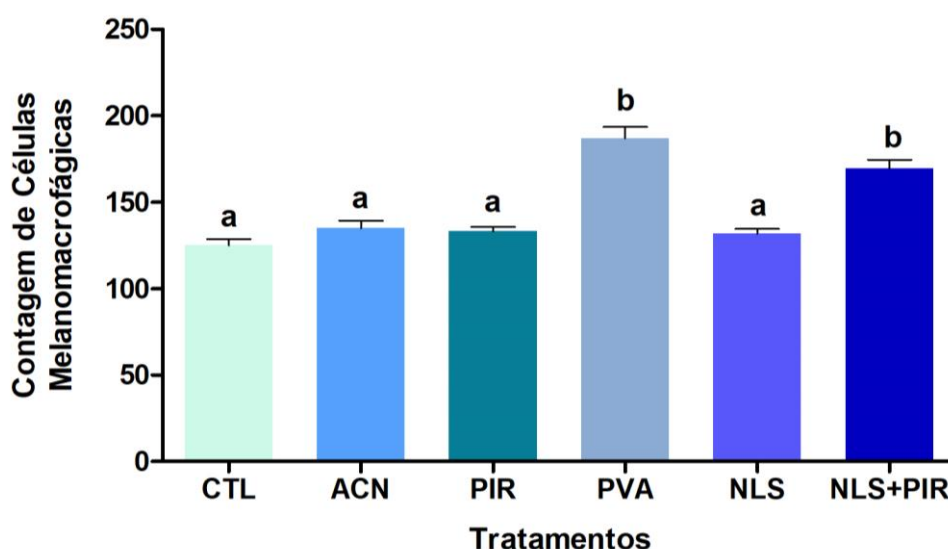
Fonte: Autoria própria (2019).

O IHS poderia fornecer informações de alterações no tecido hepático que poderiam ser correlacionadas com as análises histopatológicas. A partir desses resultados e posterior análise em nível tecidual, verificou-se que os indivíduos não apresentaram hiperplasia e/ou hipertrofia, hepática. Portanto, não foi detectada divisão celular no tecido hepático que configurasse hiperplasia, o que está em consonância com a ausência do aumento da massa do fígado (IHS).

Adicionalmente, não foi observado aumento no tamanho ou volume dos hepatócitos na análise histopatológica por meio de biomarcadores morfológicos utilizados, confirmando ausência de hipertrofia do órgão. O estudo de Oliveira et al. (2016) com girinos de rã-touro e nanopartículas de alginato-quitosana também não evidenciou alteração no índice hepatossomático.

O resultado da contagem das células melanomacrofágicas com campo total de visão (Figura 1S – Material Suplementar) evidenciou um aumento significativo em dois grupos experimentais em comparação com o grupo controle (Kruskal-Wallis: $H = 92,28$; $P \leq 0,0001$; Figura 2). Tanto o grupo exposto ao PVA ($187 \pm 6,43$; média $\pm$ erro padrão) que é o surfactante utilizado na produção das nanopartículas, como o grupo exposto ao extrato de piretro encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas ($169 \pm 5,31$) apresentaram um aumento de aproximadamente 50% e 35% na quantidade total de células melanomacrofágicas no fígado em comparação com o grupo controle ($125 \pm 3,46$), respectivamente. Enquanto que os outros grupos experimentais ACN ($135 \pm 4,26$); PIR ($133 \pm 2,70$) e NLS ($132 \pm 2,72$) não evidenciaram diferenças com o grupo controle ($P > 0,05$).

Figura 2 – Contagem de células melanomacrofágicas no fígado dos girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) em diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Legenda: Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais ($P \leq 0,05$).



Fonte: Autoria própria (2019).

Entretanto, os resultados entre os grupos experimentais evidenciaram que a nanopartícula em associação com o inseticida botânico também apresenta diferença entre o extrato de piretro e as nanopartículas isoladas ($P \leq 0,001$), demonstrando que quando associados – PIR e NLS – desencadeiam um aumento de aproximadamente 25% das células

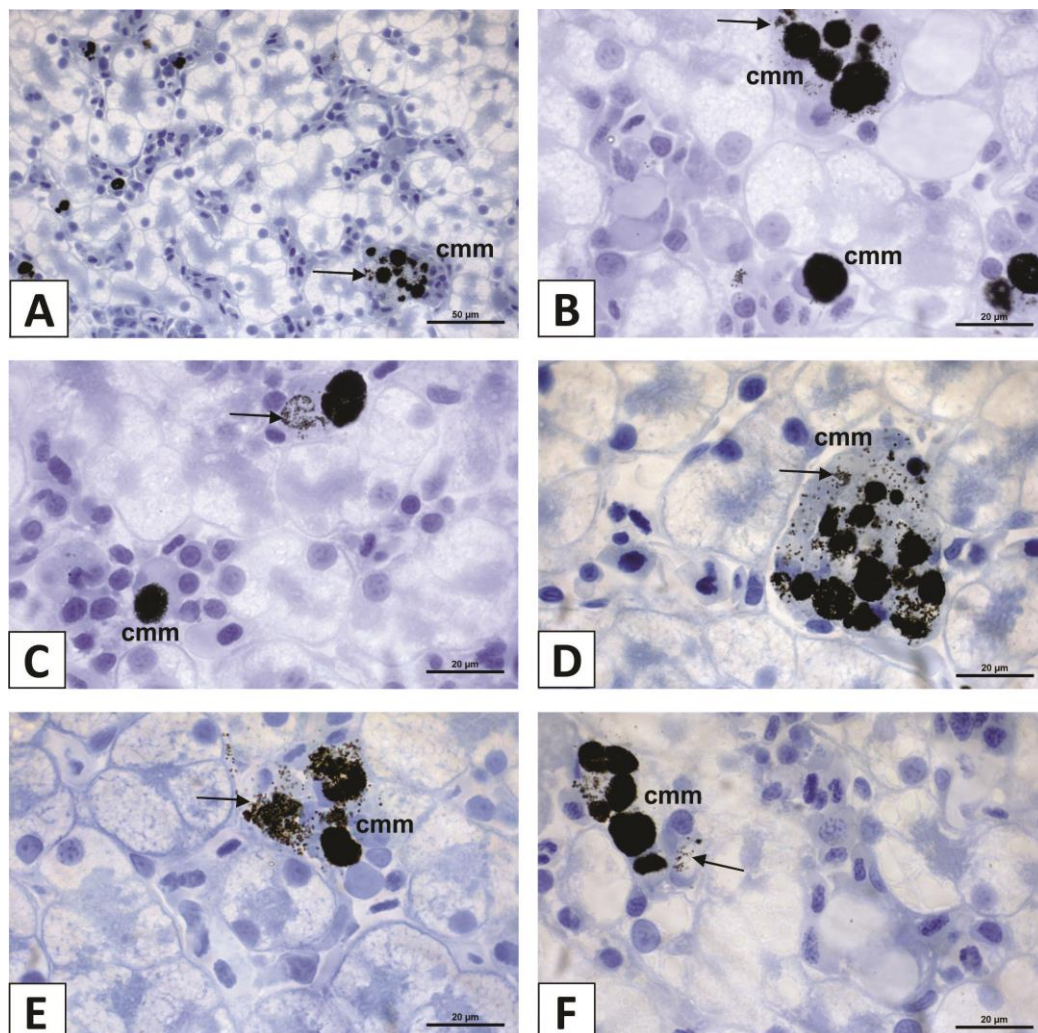
melanomacrofágicas. Por outro lado, o PVA em comparação as NLS também evidenciou um aumento de células melanomacrofágicas ($P \leq 0,001$) quando isolado, algo que não ocorre quando utilizado na formulação de nanopartículas.

Em todos os grupos experimentais (Figura 3) se observa que as células melanomacrofágicas estão dispersas por todo o tecido hepático, de forma isolada (melanomacrófagos – MMs) ou formando agregados (centro melanomacrofágicos - CMMs), apresentando formatos diferenciados, e sendo bem visíveis nas secções histológicas em virtude da sua pigmentação preta-amarronzada. Dentre os principais pigmentos descritos nas células melanomacrofágicas estão a melanina, a hemossiderina e a lipofucsina que podem ser detectados a partir de técnicas histoquímicas específicas (Figura 2S – Material Suplementar).

Os pigmentos são observados em forma de grânulos nas CMM (Figura 3), onde os grânulos de melanina são frequentemente visíveis em todos os tipos de colorações (Figura 2S – Material Suplementar) por apresentarem uma tonalidade mais escura (preto-amarronzado), sendo caracterizados como grânulos elétron-lúcidos na microscopia eletrônica de transmissão (MET). Segundo Agius & Agbede (1984), a) o pigmento melanina parece ser derivado de grânulos de melanina fagocitados pela célula melanomacrofágica, e possui propriedades contra radicais livres e danos oxidativos, possuindo grande afinidade com cátions livres; b) O pigmento hemossiderina apresenta grânulos mais finos e são observados no citoplasma das CMMs, que está ligado a fagocitose de hemácias senis ou que sofreram hemólise pelas CMM, as quais irão degradar a hemoglobina e armazenar íons de ferro; c) O pigmento lipofucsina apresenta variados tamanhos, sendo provavelmente derivado da degeneração de mitocôndrias ou outros restos celulares de membranas a partir da peroxidação lipídica.

Os radicais livres e cátions podem ser gerados pela peroxidação lipídica e fagocitose de hemácias, e assim a melanina das CMMs podem neutralizar seus potenciais efeitos e representar um efeito protetivo (AGIUS; AGBEDE 1984; ÇAKICI, 2018).

Figura 3 – Células melanomacrofágicas em diferentes formatos e tamanhos, frequentemente observadas no fígado dos girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner. A) Grupo controle; B) Grupo controle acetona; C) Grupo exposto ao extrato de piretro; D) Grupo exposto ao surfactante; E) Grupo exposto a nanopartículas lipídicas sólidas; e F) Grupo exposto ao extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. Legenda: Células melanomacrofágicas (cmm). Coloração: Azul de Bromofenol. A) Barra = 50µm; B-F) Barra = 20µm.



Fonte: Autoria própria (2019).

As células melanomacrofágicas foram descritas como células de defesa que são encontradas em diferentes espécies de vertebrados, como peixes e anfíbios. Estas apresentam formatos variados, são completamente visíveis em três dimensões e frequentemente são utilizadas como biomarcadores de resposta imune (DANG et al., 2019; RIBEIRO et al., 2011). São considerados agregados de fagócitos observados em diferentes órgãos como fígado, rim, baço e gônada (STEINEL; BOLNICK, 2017), e seu citoplasma contém lisossomos, mitocôndrias e detritos celulares (AGIUS; AGBEDE, 1984). Geralmente aumentam sua frequência frente a exposição aos xenobióticos (AGIUS; ROBERTS, 2003; RIBEIRO et al., 2011) em decorrência da sua resposta imunológica (DANG et al., 2019) e papel na detoxificação (GRILLITSCH; SCHISEARI, 2010). Ademais, alguns estudos relatam que os

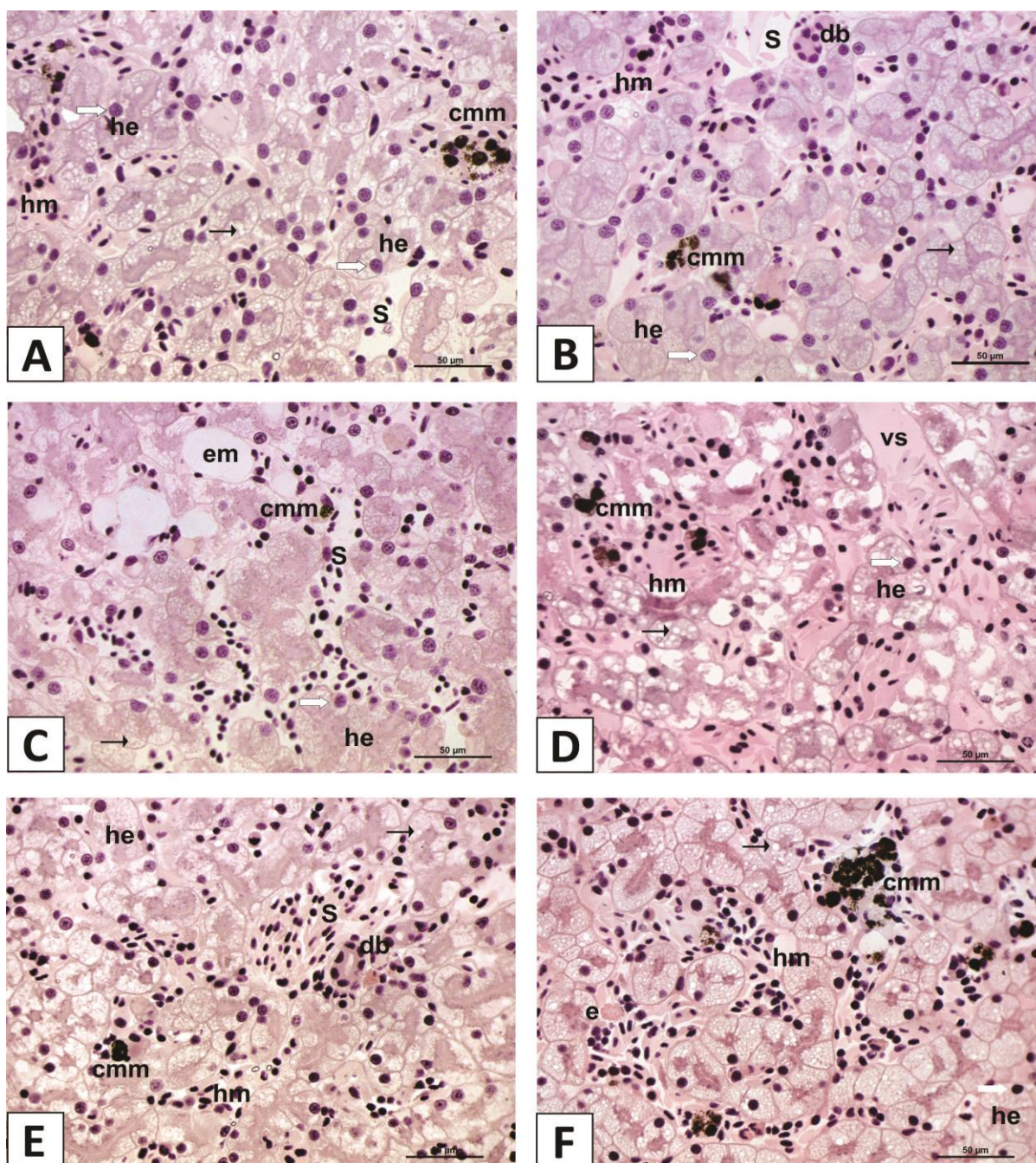
CMMs apresentam uma ligação com resposta imune humoral (STEINEL; BOLNICK, 2017), e outras funções são frequentemente relatadas como a fagocitose de hemácias, reciclagem de ferro, fagocitose de parasitas e restos celulares (AGIUS; AGBEDE, 1984; AGIUS; ROBERTS, 2003).

Os estudos com *Pelophylax bedriagae* (Família Ranidae) avaliaram um aumento da quantidade de CMMs no baço desses anfíbios expostos ao carbaril (grupo dos carbamatos) (ÇAKICI, 2018). Nos estudos de Qualhato (2018) em peixes de *Poecilia reticulata* (Família Poeciliidae), expostas a nanopartículas de óxido de ferro evidenciou-se um aumento no número, área e perímetro da CMMs presentes no fígado. Portanto, o aumento do número das CMMs nos grupos do PVA e da NLS+PIR evidenciam que os organismos desses grupos ativaram a resposta imune em virtude da exposição. Ademais, percebe-se que somente com a nanopartícula associada ao extrato de piretro obteve-se essa resposta, sugerindo um maior efeito do piretro encapsulado do que ele livre. Por outro lado, o PVA sem estar quimicamente ligado as nanopartículas evidencia sua reatividade com o organismo.

6.3.2 Análise semi-quantitativa do fígado

Os resultados morfológicos do fígado dos girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) evidenciaram que tanto os animais do grupo controle (CTL e ACN) como os animais expostos ao extrato de piretro, na sua forma livre (PIR) ou associado as nanopartículas (NLS+PIR), bem como das nanopartículas (NLS) e do surfactante (PVA) apresentaram a citoarquitetura típica da disposição tecidual dos hepatócitos de anfíbios, formando os ácinos dos hepatócitos, com presença de ductos biliares, vasos sanguíneos, capilares sinusóides, hemácias e leucócitos, bem como as células melanomacrofágicas (Figura 4). É possível verificar que o citoplasma dos hepatócitos apresenta proteínas, glicoproteínas e glicoconjugados (Figura 2S – Material Suplementar).

Figura 4 - Visão geral do fígado de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner com secções histológicas dos diferentes grupos experimentais. A) Grupo controle; B) Grupo controle acetona; C) Grupo exposto ao extrato de piretro; D) Grupo exposto ao surfactante; E) Grupo exposto a nanopartículas lipídicas sólidas; e F) Grupo exposto ao extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. Legenda: hepatócitos (he) e seus núcleos (evidenciado pelas setas brancas), os ductos biliares (db), vasos sanguíneos (vs), capilares sinusóides (S) contendo hemácias (hm) em seu interior, eósinofilos (e), células melanomacrofágicas isoladas ou formando centro (cmm), esteatose macrovesicular (em), e a lipidose foi frequente em todos os grupos experimentais (evidenciado pela seta preta). Barra = 50 μ m.



Fonte: Autoria própria (2019).

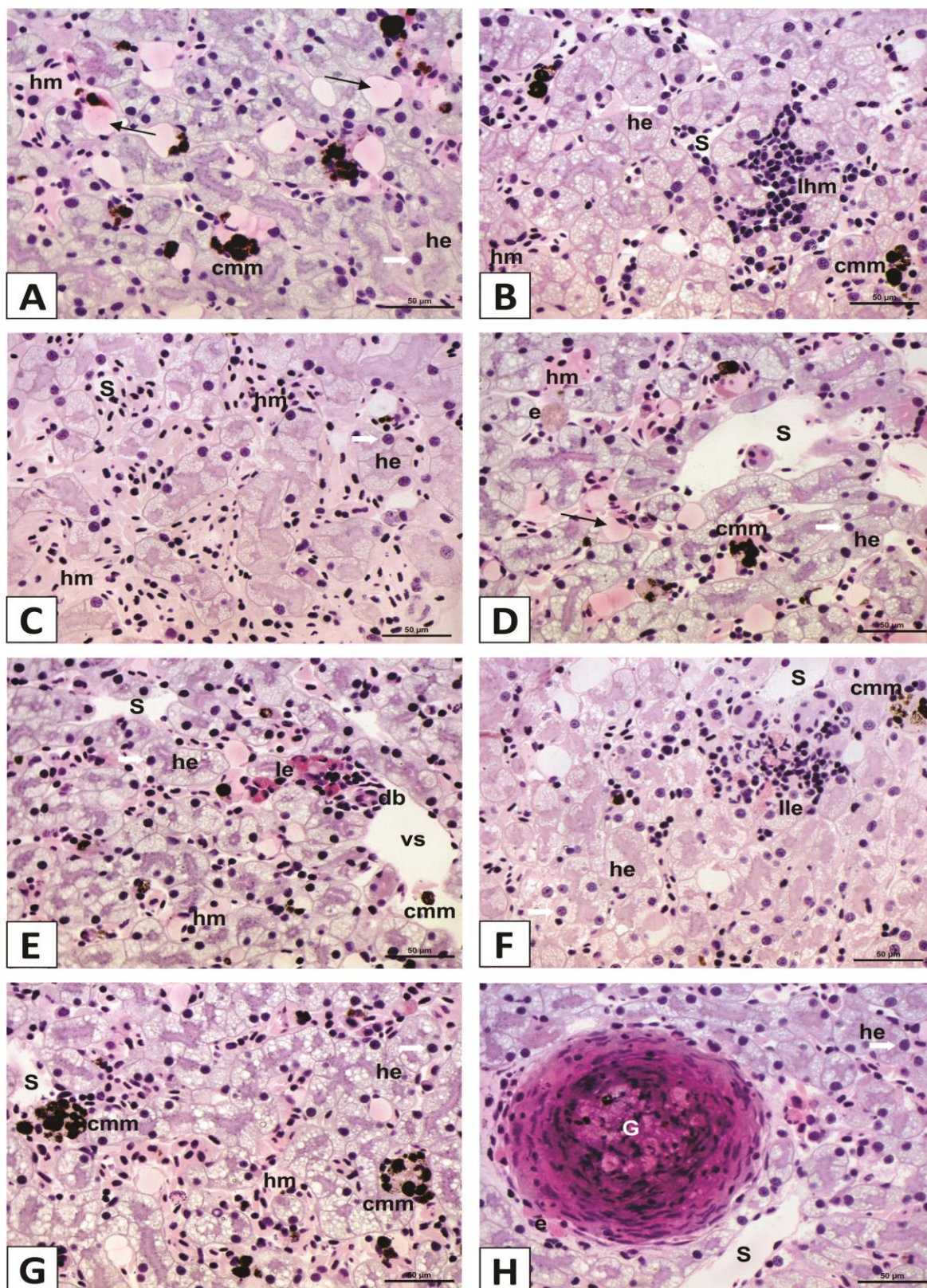
Nos cordões dos hepatócitos não foram observadas algumas alterações histopatológicas no tecido como lesão vascular ou degeneração hepatocelular; contudo foi observada a lipidose (microlipidose) frequente em todos os grupos experimentais (Figura 4) e, portanto, não foi avaliada como uma alteração histopatológica.

A lipidose é representada pelos grânulos ou pequenos vacúolos não corados pela hematoxilina-eosina no citoplasma dos hepatócitos, porém comprovada a partir de coloração específica para lipídios (Figura 2S – Material Suplementar), Sudan Black-B tem marcação positiva no citoplasma dos hepatócitos em todos grupos experimentais. Essa característica tecidual observada provavelmente está correlacionada ao aumento do conteúdo lipídico no órgão em virtude do tipo de alimentação com excesso desse composto, o qual acumula-se no tecido hepático em virtude do metabolismo desses indivíduos (HANDY et al., 1999). Provavelmente, esses espécimes estavam sendo submetidos a uma dieta nutricional rica em lipídios e, após coletados do ranário, passaram a ser alimentados com espinafre orgânico nas condições laboratoriais, porém não houve tempo suficiente para a retomada do metabolismo de forma a eliminar a lipidose.

Na análise histopatológica comparativa do fígado dos grupos controles com os grupos expostos, foram definidos os biomarcadores morfológicos que compõem conjuntamente o padrão de lesão no órgão. Esses biomarcadores foram classificados de acordo com sua importância patológica e o grau e extensão da alteração no órgão de análise. Algumas lesões como: hemorragia, edema intercelular, citoarquitetura dos hepatócitos, corpos de Mallory, corpos acidófilos, hipertrofia, hiperplasia, picnose, apoptose, necrose, não foram observadas na análise qualitativa nos grupos experimentais do presente trabalho, e, portanto, não foram utilizadas no cálculo do índice total da lesão do órgão.

Em contrapartida, outras alterações foram observadas nos grupos experimentais como: hemácias túrgidas, infiltração de hemácias, congestão sinusoidal, dilatação sinusoidal, infiltração eosinofílica, infiltração leucocitária, células melanomacrofágicas, granuloma e esteatose macrovesicular. Na Figura 5 é possível observar essas alterações que foram verificadas no fígado dos girinos de rã-touro, exceto a esteatose macrovesicular que está evidenciada posteriormente na Figura 8.

Figura 5 – Fotomicrografias evidenciando as lesões no órgão que foram observadas no fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao extrato de piretro livre e encapsulado, a nanopartículas lipídicas sólidas e ao surfactante das nanopartículas. A) Hemácias turgidas; B) Infiltração de hemácias; C) Congestão sinusoidal; D) Dilatação sinusoidal; E) Infiltração eosinofílica; F) Infiltração leucocitária, G) Células melanomacrofágicas; H) Granuloma.



Fonte: Autoria própria (2019).

Na Figura 5A observa-se que algumas hemácias se encontram turgidas, e que provavelmente sofrerão futura hemólise (YAMAMOTO et al., 2014). Após a análise semi-quantitativa esse parâmetro não evidenciou alterações significativas (Figura 6A) entre os grupos experimentais e o grupo controle (Kruskal-Wallis: $H = 32,18$; $P > 0,05$). A diferença estatística entre a acetona com os grupos das nanopartículas não é uma diferença comparável ($P \leq 0,05$), visto que a acetona é utilizada como solvente do extrato de piretro e na formulação nanocarreadoras o inseticida botânico e dissolvido em outro solvente (clorofórmio), o qual é evaporado durante sua produção. Por outro lado, a diferença significativa do extrato de piretro livre ($0,8 \pm 0,33$; média $\pm$ erro padrão) com ele associado as nanopartículas ($4,4 \pm 0,65$; $P \leq 0,001$) deve ser considerada ao final das análises.

Na figura 5B visualiza-se ao lado direito uma infiltração de hemácias imaturas e em processo de diferenciação, este parâmetro quintuplicou nos grupos expostos ao PVA ($4,0 \pm 0,42$) e quadriplicou nas NLS+PIR ($3,2 \pm 0,68$) em comparação com o grupo controle ($0,8 \pm 0,33$; Kruskal-Wallis: $H = 18,85$; $P = 0,002$; Figura 6B). Em girinos de rã-touro a eritropoiese ocorre principalmente no fígado (MANIATIS; INGRAM, 1971), sendo estimulada pela exposição à xenobióticos (BARNI et al., 2007). Geralmente, as células eritróides são observadas próximo aos vasos sanguíneos (MANSO de ABREU et al., 2009).

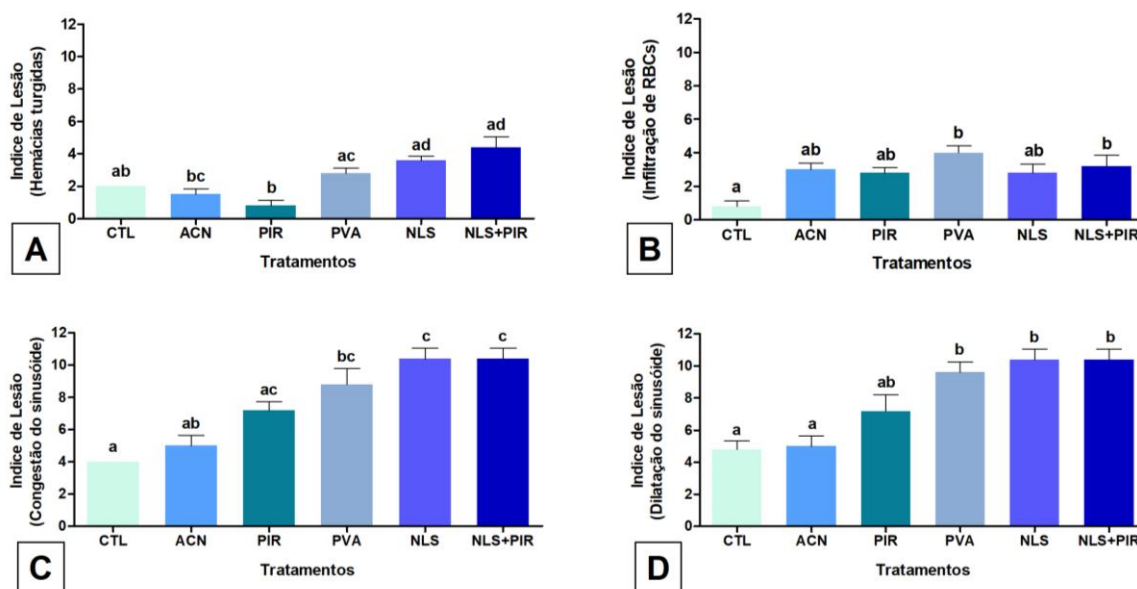
Na figura 5C percebe-se que o lúmen do sinusóide está completamente ou muito ocupado por hemácias, evidenciando uma congestão sinusoidal no parênquima hepático. Na figura 5D é possível visualizar que algumas regiões do sinusóides estão dilatadas, essa dilatação sinusoidal pode estar preenchida por diferentes células (ex. hemácias) ou somente estarem dilatadas em virtude de uma congestão sinusoidal. A congestão e dilatação sinusoidal foram frequentes nos grupos expostos surfactante e as nanopartículas livres e associadas ao inseticida botânico. Na congestão sinusoidal o PVA ($8,8 \pm 1,0$); NLS ($10,4 \pm 0,65$) e NLS+PIR ($10,4 \pm 0,65$) foram aproximadamente duas vezes maiores que os grupo controle ($4,0 \pm 0,0$; Kruskal-Wallis: $H = 35,93$; $P < 0,0001$; Figura 6C), enquanto que na dilatação sinusoidal o PVA ($9,6 \pm 0,65$); NLS ($10,4 \pm 0,65$) e NLS+PIR ($10,4 \pm 0,65$) também apresentaram diferença significativa com o grupo controle ($4,8 \pm 0,53$; Kruskal-Wallis: $H = 31,83$; $P < 0,0001$; Figura 6D) com aproximadamente o dobro dessa lesão.

A congestão e a dilatação sinusoidal no tecido hepático foram previamente relatadas em outros estudos com espécies anfíbias, como o estudo de Çakici (2015) em *Bufotes variabilis* (Família - Bufonidae) expostos ao carbaril (grupo carbamato) e nos estudos de Păunescu et al. (2012) com *Pelophylax ridibundus* (Família - Ranidae) expostos ao talstar 10EC (bifentrina – grupo piretróide). Dentro dos sinusóides é possível evidenciar o acúmulo de hemácias e até

mesmo sua aglutinação, bem como infiltrados de leucócitos e outras células ou detritos (PĂUNESCU et al., 2012). A aglutinação de hemácias, congestão venosa, o infiltrado leucocitário ou outros tipos celulares também foram visualizados no presente trabalho (Figura 4), sendo que a infiltração de leucócitos também foi analisada semiquantitativamente. A congestão e dilatação sinusoidal geralmente estão associadas a uma alteração no fluxo venoso normal no fígado, podendo até mesmo desencadear uma atrofia do órgão (KAKAR; KAMATH; BURGART, 2004), o que não foi observada no presente estudo.

A frequência de hemácias turgidas (Figura 6A), o aumento de infiltração de hemácias precursoras (Figura 6B), a congestão sinusoidal com hemácias (Figura 6C), bem como o aumento na quantidade de hemácias (Capítulo II), são todas alterações observadas no grupo das nanopartículas lipídicas sólidas associadas ao piretro, as quais provavelmente estão relacionadas ao efeito da exposição as NPs e evidenciam uma resposta do indivíduo frente a esse xenobiótico, com o intuito de compensar as alterações fisiológicas no órgão. Primeiramente, um aumento na frequência de hemácias nesse grupo pode ser em decorrência da intensificação do suprimento de oxigênio (GATTEN; BROOKS, 1969), ademais devido ao indicativo de pré-hemólise a partir das hemácias turgidas e a indicação positiva de hemossiderina nas células melanomacrofágicas (Figure 2S – Material Suplementar), bem como a verificação de infiltrado de hemácias imaturas nos capilares sinusóides e divisão celular de eritrócitos nas análises sanguíneas (Capítulo II), indicam assim a indução de eritropoiese para compensar a perda de hemácias circulantes ou até mesmo de hemácias senis que não estão sendo fagocitadas pelas CMM, pois estas podem estar participando de outras vias de desintoxicação.

Figura 6 – Índice de lesão para alteração histológica no fígado de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) submetidos a exposição aguda de 48 h. A) Hemácias turgidas; B) Infiltração de hemácias; C) Congestão sinusoidal; D) Dilatação sinusoidal. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Legenda: Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais ($P \leq 0,05$).



Fonte: Autoria própria (2019).

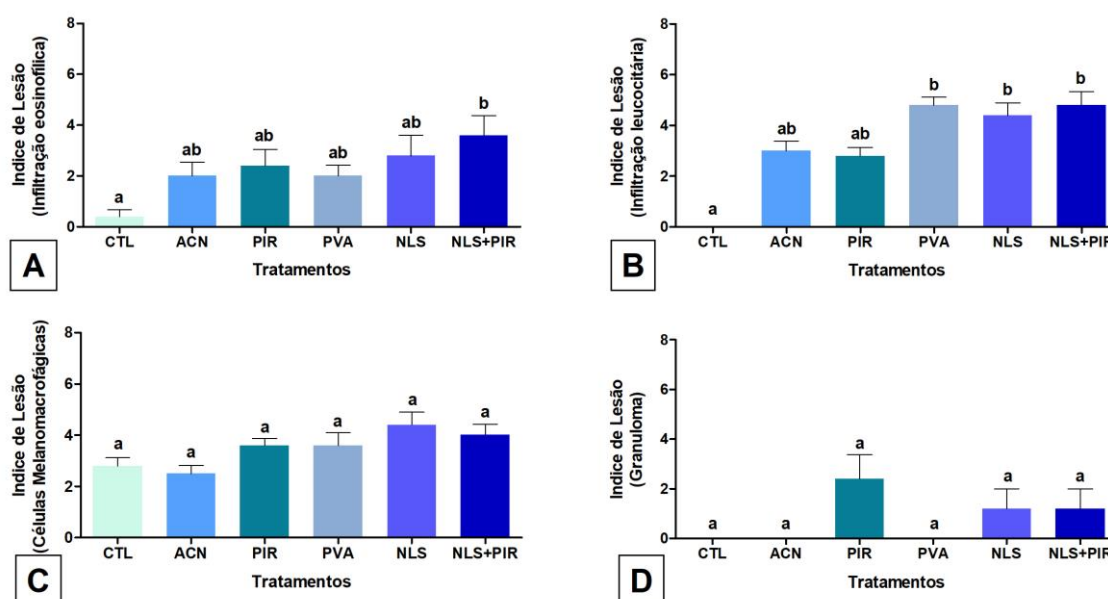
A figura 5E evidencia a infiltração eosinofílica, onde vários eosinófilos são encontrados próximos uns aos outros. Na Figura 7A é possível verificar que infiltração eosinofílica foi nove vezes maior no grupo das NLS+PIR ($3,6 \pm 0,78$) em comparação com o grupo controle ($0,4 \pm 0,27$; Kruskal-Wallis: $H = 12,47$; $P \leq 0,03$). Nas análises sanguíneas (Capítulo II) os eosinófilos também foram frequentes nesse grupo, esses resultados indicam que as nanopartículas com o ingrediente ativo desencadearam uma resposta imune a partir do recrutamento de eosinófilos.

Contudo, na análise de infiltração leucocitária no parênquima hepático (Figura 5F) é possível verificar a presença de leucócitos, principalmente eosinófilos, linfócitos e monócitos nos grupos experimentais, exceto no controle. Na Figura 7B observa-se que os grupos expostos ao PVA ($4,8 \pm 0,33$); NLS ($4,4 \pm 0,5$) e NLS+PIR ($4,8 \pm 0,53$) tiveram aproximadamente cinco vezes mais infiltrados leucocitários que o grupo controle (0 ± 0 ; Kruskal-Wallis: $H = 36,43$; $P < 0,0001$), evidenciando a ativação do sistema imune desses animais. O estudo com *Clarias gariepinus* (Família Clariidae) com nanopartículas de prata em diferentes concentrações (25, 50 e 75 mg.L^{-1}) evidenciou infiltração leucocitária no fígado de todos os grupos expostos (SAYED; YOUNES, 2017). Na literatura não se encontram relatos de infiltração leucocitária no fígado de anfíbios expostos a nanopartículas, sendo importante que mais pesquisas nanotoxicológicas em populações anfíbias sejam realizadas.

As células melanomacrofágicas podem ser frequentemente observadas nas análises, exibindo diferentes formatos, tamanhos e grânulos (Figura 5G). Na análise histopatológica não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (Kruskal-Wallis: $H = 12,45$; $P > 0,05$), porém na análise morfométrica (Item 6.3.1) verifica-se que os grupos expostos ao PVA e as NLS+PIR apresentam um aumento de CMM no tecido hepático. Fenoglio et al. (2005) relatou que águas contaminadas com diferentes xenobióticos ativou o aumento de células melanomacrofágicas no fígado de *Rana esculenta* (Família Ranidae), bem como evidenciou alterações nos grânulos dos pigmentos dessas células. Bach et al. (2018) relataram um aumento de CMMs, de congestão e dilatação sinusoidal no fígado de girinos de *Leptodactylus latrans* (Família Leptodactylidae) expostos a concentrações de glifosato. Esses resultados demonstram que as células melanomacrofágicas agem de forma protetiva ativando a resposta inflamatória frente a exposição aos xenobióticos.

O granuloma foi uma alteração praticamente inexistente nos grupos experimentais (Kruskal-Wallis: $H = 10,72$; $P > 0,05$, Figura 7D), sendo sua morfologia evidenciada na Figura 5G, este pode-se apresentar em diferentes graus de diferenciação, mas geralmente observa-se grande quantidade de células inflamatórias e do sistema imune ao seu redor, principalmente leucócitos eosinofílicos (RUBEN; STEVENS, 1970).

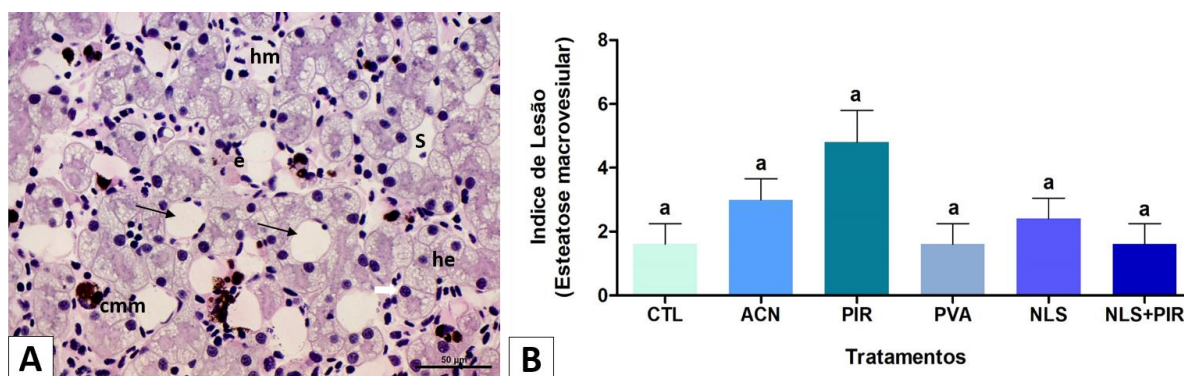
Figura 7 – Índice de lesão para alteração histológica no fígado de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) submetidos a exposição aguda de 48 h. A) Infiltração eosinofílica; B) Infiltração leucocitária; C) Células melanomacrofágicas; D) Granuloma. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Legenda: Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais ($P \leq 0,05$).



Fonte: Autoria própria (2019).

A esteatose macrovesicular (Figura 8) foi frequente no fígado do grupo exposto ao extrato de piretro ($4,8 \pm 1,0$), porém não foi observada diferença estatística significativa com o grupo controle ($1,6 \pm 0,65$; Kruskal-Wallis: $H = 10,54$; $P > 0,05$). Nota-se na Figura 5H que a esteatose macrovesicular não é corada com Hematoxilina-Eosina, diferente das hemácias turgidas que são coradas com HE. Qualhato et al. (2018), observou em peixes (*Poecilia reticulata*) expostos a nanopartículas de óxido de ferro tem um aumento da esteatose micro e macrovesicular nos indivíduos, sendo a macrovesicular a mais frequente. Essa alteração representa que o metabolismo lipídico do indivíduo está totalmente desregulado (QUALHATO et al., 2018), o que pode conduzir a problemas na performance e sobrevivência dos indivíduos.

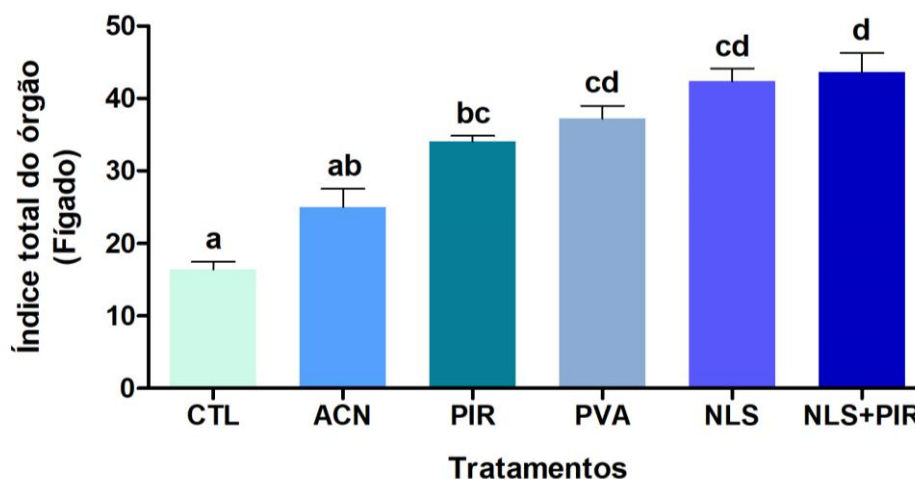
Figura 8 - Secção histológica do fígado de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner evidenciando a esteatose macrovesicular que foi frequente no grupo exposto ao extrato de piretro, porém sem diferença significativa. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Legenda: hepatócitos (he) e seus núcleos (evidenciado pelas setas brancas), capilar sinusóide (S) contendo hemácias (hm) em seu interior, células melanomacrofágicas (cmm), esteatose macrovesicular (evidenciado pela seta preta). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra = 50 μ m. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais ($P > 0,05$).



Fonte: Autoria própria (2019).

A análise do índice total de lesão do órgão dos anfíbios (Figura 9) evidenciou que todos os grupos expostos (PIR - $34 \pm 0,84$; PVA - $37,2 \pm 1,77$; NLS - $42,4 \pm 1,76$; NLS+PIR - $43,6 \pm 2,68$) apresentaram alterações histopatológicas no fígado em comparação com o controle ($16,4 \pm 1,0$; Tukey: $F = 32,73$; $r^2 = 0,76$; $P < 0,0001$; $df = 5$), indicando que mesmo o piretro não tendo evidenciando diferenças significativas nos biomarcadores quando estes são analisados de forma isolada, no somatório do índice total, esse grupo também apresentou efeitos hepatotóxicos. Uma explicação plausível é que esse composto é altamente lipofílico, e dessa forma consegue atravessar as membranas celulares e serem rapidamente absorvidos, mesmo em baixas concentrações (PĂUNESCU et al., 2012).

Figura 9 – Índice total de lesão para alteração histológica no fígado de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) submetidos a exposição aguda de 48 h. Anova um fator seguido pelo pós-teste de Tukey de comparação múltipla. Legenda: Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos experimentais ($P \leq 0,01$).



Fonte: Autoria própria (2019).

Ademais, verifica-se que o índice total do órgão no grupo experimental do extrato de piretro ($34 \pm 0,84$) foi estatisticamente diferente do grupo das nanopartículas associadas ao piretro - NLS+PIR ($43,6 \pm 2,68$), no nanocarreador observa-se um aumento de 35% do índice de lesão no fígado quando comparado ao extrato de piretro na sua forma isolada ($P \leq 0,01$). A concentração do extrato de piretro ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$) utilizada nesse bioensaio toxicológico com girinos de rã-touro e próxima da concentração ($110 \mu\text{g.L}^{-1}$) encontrada no Córrego do Cintra (Botucatu-SP) de cipermetrina (piretróide tipo II) na água desse córrego que possui atividades agrícolas nas redondezas (BELLUTA et al., 2010). O extrato de piretro na sua forma livre e encapsulado em nanopartículas, pode desencadear toxicidade no fígado desses animais, porém quando encapsulado verifica-se uma maior citotoxicidade no órgão de análise nessa espécie.

Os resultados histopatológicos evidenciaram que o fígado é um importante órgão de estudo, em virtude do seu papel na desintoxicação, biotransformação e excreção de xenobióticos. As alterações histológicas representam os efeitos tóxicos desses compostos nos hepatócitos (SOUFY et al., 2007), evidenciando a sensibilidade do fígado em ser utilizado como biomarcador na análise de lesão do órgão (PĂUNESCU et al., 2012). Os piretróides e seu potencial efeito tóxico precisam ser estudados em anfíbios para compreender melhor sua toxicidade e mecanismos de ação nos organismos, visto que em anfíbios estes parecem ser menos tóxicos do que para peixes (SCHLEIER; PETERSON, 2011).

O surfactante provavelmente está correlacionado com as respostas hepatológicas, segundo Nafee et al. (2009), os componentes utilizados na formulação dos nanocarreadores

podem influenciar na toxicidade e nas suas interações químicas com o organismo. O PVA é um polímero não iônico que atua como surfactante e adsorve em uma superfície hidrofóbica ou hidrofílica (FEKY et al, 2010). No presente estudo, o PVA hidrolisado provavelmente foi absorvido pelo girino, atingiu o sistema porta hepático e desencadeou diversas alterações histológicas nos hepatócitos, bem como foi transportado pelo sistema circulatório, onde potencialmente adsorveu compostos circulantes e desencadeou hepatotoxicidade nos indivíduos desse grupo. Ademais, o PVA que é utilizado no preparo das nanopartículas não evidenciou alterações estatísticas entre ele e as NPs, evidenciando que a citotoxicidade das nanopartículas pode não estar correlacionada ao surfactante. Destaca-se que o PVA foi o único grupo que evidenciou mastócitos na análise histoquímica (Figura 2S – Material Suplementar), essas células estão correlacionadas ao processo de modulação da resposta inflamatória (SILVA et al., 2011).

O sistema nanocarreador isolado possui sítios reativos capazes de mudar seu sistema de interação por não possuir nenhum ingrediente ativo encapsulado. Esses sítios reativos poderiam interagir com moléculas orgânicas do organismo, induzindo toxicidade nos seres vivos. Contudo a escala nanométrica pode estar amplificando esses efeitos nas nanopartículas em virtude da facilidade em atravessar membranas biológicas. Os nanomateriais possuem características como alta reatividade celular, capacidade de penetração celular e maior biodisponibilidade no organismo (JEEVANANDAM et al., 2018), o que representa benefícios na área médica, porém na área ambiental torna-se um problema a ser resolvido, pois pode desencadear toxicidade em organismos não-alvos.

Portanto, esse estudo nanotoxicológico contribui para melhor compreensão das alterações que as nanopartículas e seus componentes podem desencadear no fígado de anfíbios juvenis, evidenciando a possibilidade de novos estudos serem realizados em anfíbios, visto que os dados na literatura são escassos. A partir desse estudo e de outros estudos nanotoxicológicos as informações poderão ser utilizadas na proposição de leis e regulamentações, a fim de reduzir os riscos e impactos ambientais.

6.4 Conclusões

Conclui-se que a exposição ao inseticida botânico e as nanopartículas ativaram a resposta imune nos girinos de rã-touro, evidenciando o potencial citotóxico desses compostos, bem como destacando a responsividade do fígado como órgão de análise. Ademais, constata-se que as nanopartículas associadas ao piretro apresentaram um maior efeito do inseticida

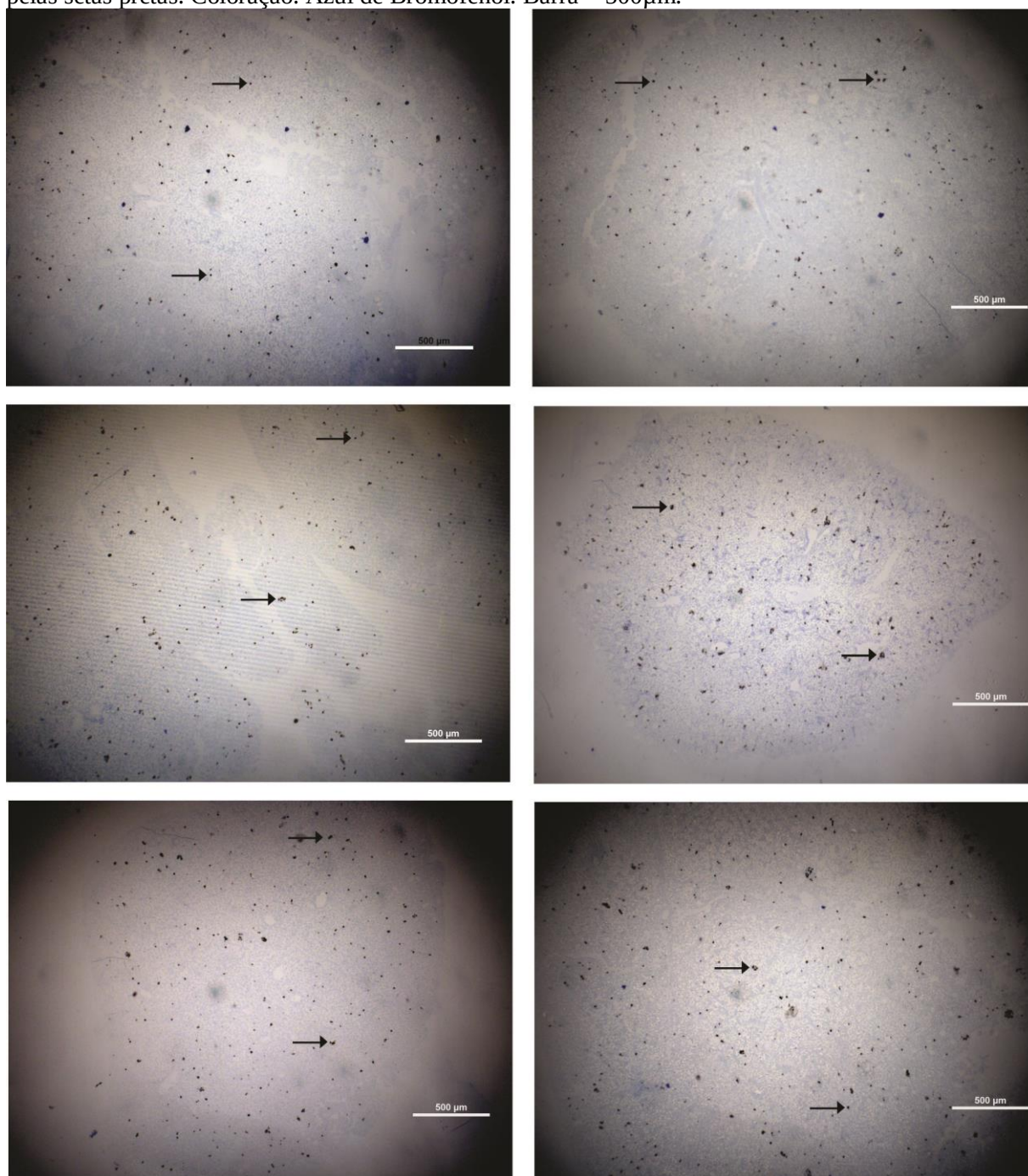
botânico na sua fórmula encapsulada do que na sua forma livre, pois na maioria dos parâmetros de análise as alterações foram significativas estatisticamente. Portanto, dessa forma, que as espécies anfíbias são responsivas à exposição a inseticidas botânicos e a nanopesticidas, evidenciando que a exposição aguda desses organismos no ambiente acarretaria em efeitos subletais. Contudo é importante que estudos crônicos sejam realizados para melhor averiguar a toxicidade desses nanomateriais e a potencial interferência na sobrevivência, desenvolvimento e performance (*fitness*) dessas populações.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#2017/21004-5). Aos colegas que ajudaram na coleta e bioensaios do Laboratório de Biomarcadores em Animais e do Laboratório de Fisiologia Animal – UFSCar- Sorocaba.

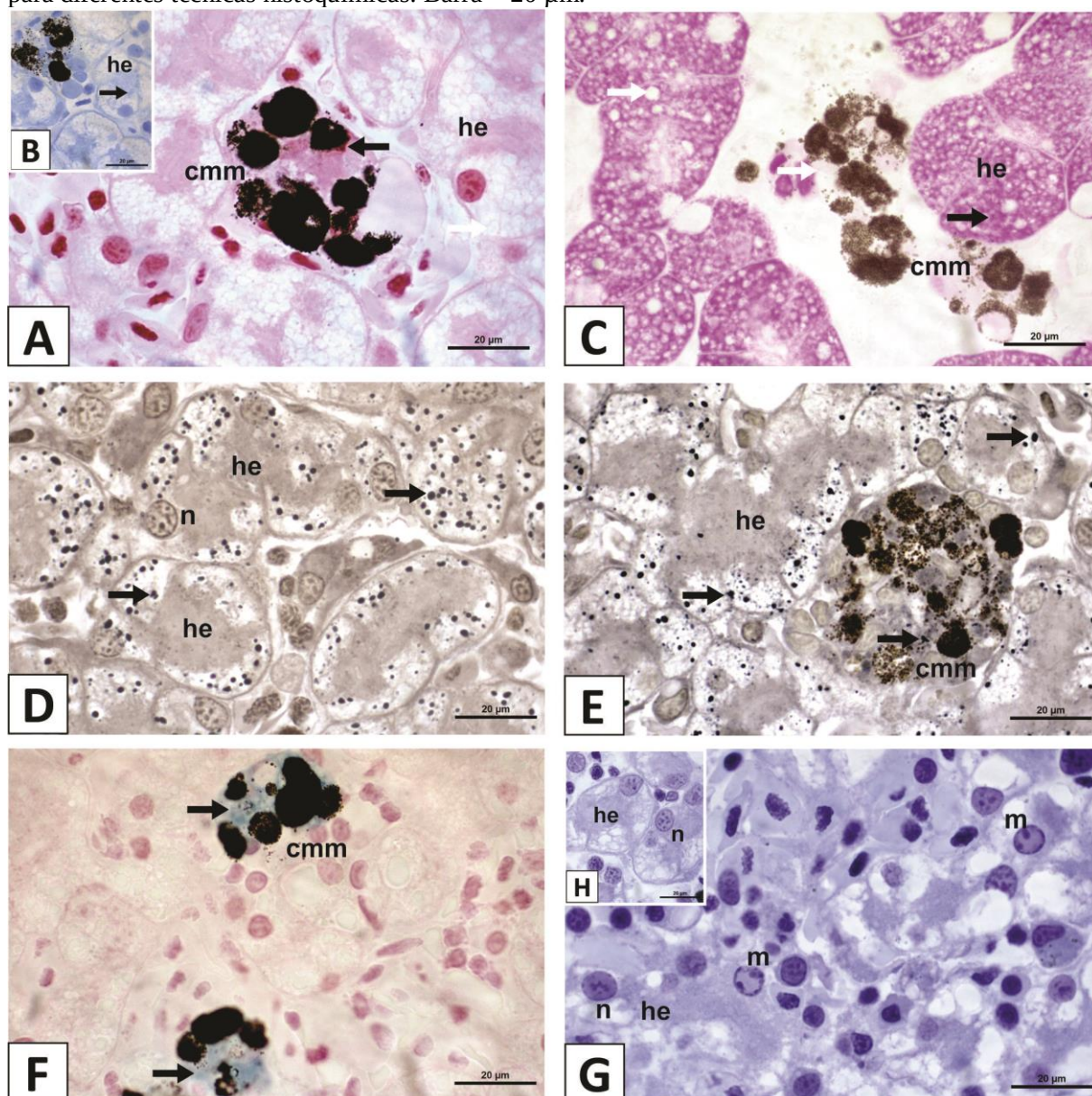
Material Suplementar

Figura 1S – Visão geral do fígado dos girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner em diferentes grupos experimentais utilizado para contagem de células melanomacrofágicas. A) Grupo controle; B) Grupo controle acetona; C) Grupo exposto ao extrato de piretro; D) Grupo exposto ao surfactante; E) Grupo exposto a nanopartículas lipídicas sólidas; e F) Grupo exposto ao extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. Legenda: Células melanomacrofágicas evidenciados pelas setas pretas. Coloração: Azul de Bromofenol. Barra = 500µm.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 2S – Secções histológicas do fígado de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner evidenciando um padrão histoquímico em todos os grupos experimentais. A) Xilidine Ponceau: mostrando a presença proteínas nas células melanomacrofágicas e a ausência nos grânulos de lipídose; B) Azul de Bromofenol: mostrando a presença proteínas no citoplasma dos hepatócitos; C) PAS (Ácido Periódico de Schiff): evidenciando a presença de glicoproteínas e glicoconjugados no citoplasma dos hepatócitos, ausência nos grânulos de lipídose e coloração característica dos grânulos de melanina; D-E) Sudan Black-B: evidenciando a presença de lipídios nos grânulos de lipídose nos hepatócitos e marcação positiva para lipídios nas células melanomacrofágicas (indicativo de lipofucsina); F) Azul da Prússia: evidenciando a presença de hemossiderina nas células melanomacrofágicas; G e H) Azul de Toluidina: evidenciando núcleos visíveis pela ligação com ácidos nucleicos e a presença de mastócitos no grupo do surfactante (PVA). Legenda: he – hepatócitos; n – núcleo; cmm - células melanomacrofágicas; m – mastócitos, seta preta – marcação positiva e seta branca – marcação negativa para diferentes técnicas histoquímicas. Barra = 20 μ m.



Fonte: Autoria própria (2019).

7. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES

Os estudos nanotoxicológicos com organismos não-alvos precisam ser considerados no momento da proposição de novas formulações em escalas nanométricas. A área da nanotecnologia cresceu muito nas últimas décadas e diferentes produtos são comercializados e utilizados no dia-a-dia, porém pouco se sabe sobre a toxicidade e mecanismo de ação desses compostos no meio ambiente e sobre a biodiversidade, sendo essencial que mais estudos sejam realizados para que todas as dúvidas sejam sanadas.

Os nanomateriais podem atingir os diferentes compartimentos ambientais a partir da sua utilização e descarte, e assim podem ser absorvidos por diferentes espécies de vertebrados e invertebrados. Mundialmente as espécies de invertebrados mais ameaçada são as abelhas, enquanto que do lado dos vertebrados são os anfíbios. Alguns fatores do declínio dessas espécies podem ser iguais, como as infecções parasitárias, a fragmentação de habitats ou a exposição aos agrotóxicos. Ademais, ambas as espécies são encontradas próximas aos campos agrícolas, podendo facilmente entrarem em contato com nanopesticidas ou inseticidas botânicos. Nesse contexto, percebe-se a necessidade de averiguar a toxicidade desses compostos nessas populações a fim de garantir a integridade dos ecossistemas.

Os resultados evidenciaram a potencialidade do sistema carreador para o inseticida botânico, mostrando que a formulação apresentou alta eficiência de encapsulação (> 99%), formato esférico das nanopartículas e estabilidade físico-química durante 120 dias. Abaixo estão representados os valores médios dos parâmetros físico-químicos monitorados em função do tempo (Tabela 1), no qual verifica-se que as nanopartículas com o piretro encapsulado apresentaram menor diâmetro médio do que as nanopartículas isoladas, e que estas (NLS) promoveram a estabilidade da formulação em condições naturais, possibilitando a utilização no campo desse inseticida botânico (PIR) que é instável no meio ambiente.

Tabela 1 – Caracterização de NLS and NLS+PIR and média dos parâmetros físico-químicos em função do tempo (0 – 120 dias).

PARÂMETROS	NLS	NLS+PIR
Diâmetro (nm)	324	258
Índice de Polidispersão (PDI)	0,19	0,11
Potencial Zeta (mV)	-11	-10
pH	5,3	5,6
Concentração de partículas (x10¹²)	1,72	1,82
Morfologia	Esférica	Esférica
Eficiência de encapsulação (%)	-	≥ 99

Fonte: Autoria própria (2018).

Os resultados das formulações nanocarreadoras mostraram-se ótimas quanto a potencialidade da utilização de nanopartículas lipídicas sólidas como carreadores do extrato de piretro, promovendo a estabilidade do piretro em condições naturais e garantindo a utilização de nanopesticidas nos campos agrícolas.

O teste de sobrevivência em abelhas evidenciou que o extrato de piretro e a deltametrina na maior concentração ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) apresentaram uma redução na longevidade, sendo que o piretróide foi muito mais citotóxico que todos os outros grupos experimentais. Enquanto que na exposição aguda (48 h) as nanopartículas isoladas e o inseticida botânico ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) causaram alterações morfológicas no intestino médio das abelhas. Esses grupos apresentam um índice total de lesão no órgão, o qual foi maior que todos os outros grupos experimentais. As nanopartículas associadas ao piretro não mostraram alterações morfológicas significativas e foram consideradas seguras para abelhas na exposição aguda. Nas abelhas o surfactante (PVA) e o solvente (Acetona) também foram testados e os resultados das análises morfológicas foram similares ao controle, indicando ausência de toxicidade.

Nos bioensaios de exposição aguda em girinos de rã-touro se observou um aumento de eosinófilos nos grupos de NPs e de basófilos no extrato de piretro nas análises hematológicas; por outro lado, todos os grupos expostos apresentaram anormalidades nucleares eritrocíticas, como presença de micronúcleo e danos no DNA a partir das análises genotóxicas. Na avaliação histopatológica do fígado, os indivíduos dos grupos expostos as nanopartículas isoladas e com piretro encapsulado, bem como ao surfactante (PVA), apresentaram lesões no órgão, dentre elas destaca-se a congestão sinusoidal e a infiltração leucocitária. Contudo, no índice total de lesão no órgão o extrato de piretro, juntamente com os outros grupos expostos (PVA, NLS e NLS+PIR), evidenciaram um aumento significativo do índice de lesão no fígado quando comparados com o controle ($P < 0,0001$). O grupo acetona também não evidenciou diferença estatística com o grupo controle nos anfíbios, sendo assim considerado um segundo controle dentro do delineamento experimental e discussão dos dados.

No Quadro 1 está evidenciado um resumo sintético dos resultados observados para os diferentes biomarcadores utilizados para avaliar a toxicidade em abelhas e girinos de anfíbios, a partir de diferentes grupos experimentais. As abelhas e o girinos são considerados organismos bioindicadores, ou seja, estes respondem a alterações que ocorrem no meio. Estas alterações podem ser avaliadas por meio de diferentes níveis de biomarcadores, como moleculares, celulares, teciduais, fisiológicos ou em órgãos de um organismo (LAM; GRAY, 2003). Na tabela encontram-se os biomarcadores que tiveram alterações estaticamente significativas ($P <$

0,05) nos grupos expostos comparando-os com seus respectivos controles e que foram discutidos nos três capítulos anteriores que compõem os resultados da presente tese.

Quadro 1 – Resumo dos resultados observados nos grupos expostos a partir de diferentes níveis de biomarcadores, quando comparados com seus respectivos controles em abelhas (*Apis mellifera* Africanizada) e girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), e apresentaram resultado significativo.

Biomarcadores	PIR	PVA	NLS	NLS+PIR
<u>Molecular</u>				
Eritrócitos com anormalidades nucleares ²	↑	-	↑	↑
Dano no DNA ²	↑	↑	↑	↑
<u>Celular</u>				
Liberação de células ¹	-	-	↑	-
Secreção apócrina ¹	-	-	↑	↑
Vacuolização ¹	↑	-	-	-
Hemácias ²	-	-	-	↑
Leucócitos ²	↑	-	↑	↑
Hiperplasia e Hipertrofia ²	-	-	-	-
Células melanomacrofágicas ¹	-	↑	-	↑
Infiltração eosinofílica ²	-	-	-	↑
Infiltração leucocitária ²	-	↑	↑	↑
Granuloma ²	-	-	-	-
Esteatose macrovesicular ²	-	-	-	-
Hemácias turgidas ²	-	-	-	-
Infiltração eritrócítica ²	-	↑	-	↑
Congestão e Dilatação sinusoidal ²	-	↑	↑	↑
<u>Tecidual</u>				
Tecido epitelial do intestino ¹	↑	-	↑	-
Tecido hematopoiético ²	↑	-	↑	↑
Parênquima hepático e vasos sanguíneos ²	↑	↑	↑	↑

Legenda: 1 – representa os biomarcadores utilizados em abelhas, e 2 – representa os biomarcadores utilizados em anfíbios.

Fonte: Autoria própria (2019)

A nível molecular foi analisado os efeitos genotóxicos nos anfíbios, que evidenciaram que as nanopartículas e o extrato de piretro desencadearam respostas nos anfíbios. Os efeitos genotóxicos podem indicar uma futura morte celular, o que será prejudicial aos animais e sua sobrevivência dependendo do seu grau de intensidade.

A nível celular verifica-se que nas abelhas a toxicidade das nanopartículas isoladas e do extrato de piretro; enquanto que nos anfíbios todos os grupos evidenciaram toxicidade, porém o grupo de indivíduos expostos as NLS+PIR evidenciou mais alterações no parênquima hepático, como aumento de infiltração eritrocítica e eosinofílica no fígado, e aumento da frequência de células melanomacrofágicas do que os outros grupos experimentais. Em seguida, as NLS foram as que mais desencadearam alterações hepatológicas, porém nem todos os efeitos foram observados no grupo exposto ao PVA.

A nível tecidual, o inseticida botânico foi menos tóxico do que as nanopartículas nos anfíbios, evidenciando que para vertebrados aquáticos os nanopesticidas podem ser mais perigosos, do que para espécies terrestres, como as abelhas. Nos anfíbios, também foi avaliado biomarcadores em nível de órgão, no qual o fígado desses animais foi analisado externamente e morfológicamente, no qual verificou-se que o mesmo é uma importante via de resposta em espécies expostas a esses compostos devido a sua função na biotransformação dos xenobióticos. Existem várias vias de contato das espécies com os nanomateriais, os quais podem ser absorvidos com maior ou menor facilidade e desencadear diferentes vias de resposta.

A maior parte de internalização das NPs pela célula ocorre por vias endocíticas, através de endossomos, lisossomos, caveolinas ou clatrin (MOORE, 2006). Após absorvidas podem desencadear diferentes respostas, como a ativação do sistema imune que podem remover as NPs rapidamente ou podem desencadear um processo inflamatório (KONONENKO et al., 2015). Dentre as respostas de imunotoxicidade destacam-se hemólise, leucocitose, coagulação e estresse oxidativo (DOBROVOLSKAIA et al., 2015). Outras vias são a ativação de respostas citotóxicas e genotóxicas, isso ocorre principalmente em virtude da propriedade das nanopartículas (SAJID et al., 2014), as quais irão interagir com proteínas das matrizes biológicas ou com o sistema imune (DOBROVOLSKAIA et al., 2015). Nesse estudo, verificou-se que as nanopartículas desencadearam citotoxicidade em ambos os organismos de estudos, bem como a ativação do sistema imune e genotoxicidade nos anfíbios.

Nas abelhas os bioensaios de toxicidade aguda evidenciaram que o nanopesticida foi mais seguro do que o inseticida botânico e as nanopartículas isoladas. As nanopartículas isoladas mostraram-se mais tóxicas nos insetos, sendo necessário mais biomarcadores e concentrações realísticas de campo para avaliar a toxicidade do composto na natureza.

O PVA é um surfactante que provavelmente foi absorvido pelo organismo dos animais e depois em virtude das suas propriedades adsorventes pode ter se ligado a uma proteína celular, o que causou reatividade e alterações histopatológicas. As nanopartículas isoladas são mais reativas e, portanto, mudam seu comportamento no sistema biológico, o que desencadeou a citotoxicidade nas espécies. Outro detalhe, que em função do tempo as NLS agregam com mais facilidade do que as nanopartículas associada, o que não foi o caso no presente estudo, pois as formulações eram recém-preparadas, mas é algo que deve ser considerado no campo. É importante salientar ainda que como as NLS+PIR apresentam maior toxicidade no fígado dos girinos, isso pode evidenciar que o extrato de piretro quando encapsulado tem um efeito hepatotóxico maior, o que pode ser devido a formulação, seus componentes e escala nanométrica. Essa hipótese precisa de estudos adicionais para ser comprovada, como por exemplo outros biomarcadores e estudos crônicos.

Como previsto na hipótese desse estudo as nanopartículas lipídicas sólidas foram efetivas como sistemas carreadores do extrato de piretro, além do mais induziu menos efeitos nas abelhas do que o extrato de piretro livre e as nanopartículas isoladas. Contudo nos girinos de rã-touro, todos os compostos (extrato de piretro, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas associadas ao piretro e o surfactante) apresentaram citotoxicidade nos espécimes; evidenciando a necessidade de mais estudos toxicológicos.

Portanto, conclui-se que é necessário não só estudar os nanopartículas com compostos encapsulados, mas também é preciso avaliar de forma isolada o sistema carreador, o ingrediente ativo e os componentes das NPs, tais como os surfactantes. Adicionalmente, é importante que estudos de toxicidade em diferentes tempos de exposição (agudo e/ou crônico) sejam conduzidos conjuntamente, a fim de verificar se é uma resposta inicial que persiste ou se existe recuperação após cessar a exposição, ou quais são as respostas tardias em exposições a longo prazo. Destaca-se que é importante considerar a expectativa de vida das espécies nos estudos crônicos, no caso dos anfíbios, em particular a rã-touro pode viver em média 20 anos, porém as abelhas operárias sociais vivem ao redor de 45 dias.

Por conseguinte, as concentrações testadas do extrato de piretro nas abelhas ($1 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ e $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) e nos girinos ($80 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$) embasadas na DL50 e CL50, respectivamente, são similares as concentrações de piretróides que já foram encontradas no ambiente em áreas próximas aos cultivos agrícolas. Especificamente no pólen apícola ($0,1$ à $4,4 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ de diferentes piretróides), na qual a maior concentração de cipermetrina descrita foi $4,4 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, em diferentes regiões agrícolas nos EUA (PETTIS et al., 2013). Na água, $110 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ de cipermetrina foi detectada no Córrego do Cintra – Botucatu, no Brasil (BELLUTA et al., 2010).

Portanto, verifica-se a necessidade de avaliar essas formulações em estudos de toxicidade crônica, para assim compreender a relevância ecológica, em nível de população, desses efeitos tóxicos observados nos organismos não-alvos durante a exposição aguda.

O desenvolvimento de sistemas carreadores para serem utilizados na agricultura são importantes para alcançar uma melhor produtividade agrícola, reduzir os impactos desencadeados pelos agrotóxicos, melhorar a estabilidade de inseticidas botânicos naturais e garantir a agricultura sustentável. Contudo, um fator importante é como proporcionar que os nanopesticidas sejam produzidos em larga escala, visto que muitos componentes necessitam de grau de pureza e são caros. Outro detalhe, é a necessidade de mais estudos nanotoxicológicos, a fim de compreender melhor a toxicidade em organismos não-alvos, além do modo de ação no ambiente e em organismos alvos, no caso dos nanopesticidas, para que assim se tenha uma melhor análise risco e de segurança desses produtos. Portanto, o desenvolvimento de pesquisas nanotoxicológicas irão contribuir para a construção de um banco de dados que poderão futuramente auxiliar no desenvolvimento de legislações e regulamentações dos nanomateriais agroalimentares no mundo.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>. 2006.
- ADITYA, N.P. *et al.* Curcumin and gnishtein coloaded nanostructured lipid carriers: in vitro digestion and antiprostata cancer activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, n. 8, p. 1878-1883, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf305143k>.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – (ANVISA). 2016. **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acesso em: 12 mar 2018.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. 2019. **Piretrinas**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/p22.pdf/6b04c6d3-7125-4af0-98a8-579663098359>. Acesso em: 12 maio 2019.
- AGIUS, C.; ROBERTS R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **J. Fish Dis.**, v. 26, p. 499–509, 2003.
- AGIUS, C.; AGBEDE, S.A. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **J. Fish Biol.**, v. 24, pp. 471-488, 1984. [10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x)
- AGUIAR-MENEZES, E. de L. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p.
- AHN, K.C., *et al.* Immunoassays and biosensors for monitoring environmental and human exposure to pyrethroid insecticides. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 2792–2802, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf1033569>.
- ALBANESE, A. *et al.* The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 14, p. 1–16, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>.
- ALBUQUERQUE, A. F. *et al.* Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci. Process Impacts**, v.18. n. 7, p. 779–787, 2016. doi: 10.1039/c6em00268d
- ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 30, p. 133-165, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.133>
- AL-SALEH, I.A. Pesticides: a review article. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 13, n. 3, p. 151-61, 1994.
- AMARAL, D.F. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: A critical review. **Sci. Total Environ.**, v. 686, p. 332-344, 2019.

AMBROŽIČ-DOLINŠEK, J. *et al.* Phytoplasma infection may affect morphology, regeneration and pyrethrin content in pyrethrum shoot culture. **Sci. Horticulturae**, v. 116, n. 2, p. 213- 218, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard Guide for Conducting Water Quality and Acute Toxicity Tests on Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians** ASTM International, West Conshohocken, PA (2002). Disponível em: <http://www.astm.org/Standards/E1192.htm>, Accessed 8th Dec 2015

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION - AVMA. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 218, n.5, p. 669 -696, Mar. 2001.

ANDERSON, W. *et al.* A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 405, p. 322–330, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.11.013>

ANDRADES, T.O.; GANIMI, R.N. Revolução verde e a apropriação capitalista. **CES Revista**, Juiz de Fora, v.21, p.43-56, 2007.

ANJALI, C.H. *et al.* Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal applications. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 73, n. 8, p. 1932-1936, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.039>.

ANSARI, R.A. *et al.* *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 74, 2011, p; 150–156 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.036>.

ANTONIOUS, G. F. *et al.* Residue levels of pyrethrins and piperonyl butoxide in soil and runoff water. **J Environ Sci Health B.**, v. 32, n. 5, p. 621–644, 1997. doi:10.1080/03601239709373106

ARIKAN, H.; ÇIÇEK, K. Haematology of amphibians and reptiles: a review. **North West. J. Zool.**, v. 10, p. 190–209, 2014.

ARIKAN, H.; ÇIÇEK, K. Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna. **Acta Herpetol.**, v. 5, p. 179–198, 2010. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-9032.

ARZOUMANIDIS, I; RAGGI, A.; PET, L. Life Cycle Assessment of Honey: Considering the Pollination Service. **Adm. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019. doi:10.3390/admsci90100

BACCHETTA, R. *et al.*, 2012 Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 4, p. 381-98, Jun. 2012

BACH, N.C. *et al.* Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). **Chemosphere**, v. 202, p. 289-297, 2018.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A. *et al.* Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. **Environ. Int.**, v. 60, p. 31-41, Oct. 2013. doi: 10.1016/j.envint.2013.07.002.

BARNI, S. *et al.* Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquat. Toxicol.**, v. 81, p. 45–54, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>.

BATTAGLIA, L. *et al.* Techniques for the preparation of solid lipid nano and microparticles, In: Sezer A.D., (Ed), **Application of Nanotechnology in Drug Delivery** v. 2, 2014, IntechOpen; London: United Kingdom, 51–75 <https://doi.org/10.5772/58405>.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 9, n. 5, p. 497-508. May 2012. doi:10.1517/17425247.2012.673278.

BECKER, C. G. *et al.* Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae. **Conserv. Bio.**, v. 24, n. 1, p. 287-294, 2010. doi: 10.1111/j.1523-1739.2009.01324.x.

BEEBEE, T.J.C.; GRIFFITHS R.A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? **Biol. Conserv.**, v. 125, n. 3, p. 271–285, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>.

BELLUTA, I. *et al.* Avaliação temporal e espacial no córrego do cintra (Botucatu-SP) frente aos defensivos agrícolas e parâmetros físico-químicos de qualidade da água - Um estudo de caso. **Energia na Agricultura**, v. 25, n. 2, 2010.

BERGES, M.GM. Exposure during production and handling of manufactured nanomaterials. **Nanomaterials**, p. 25-31, 2013.

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>.

BILIA, A.R. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 14, p. 1–14, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>.

BIRHANLI, A. *et al.* Effect of nanosized TiO₂ particles on the development of *Xenopus laevis* embryos. **Turkish J. Biol.**, v. 38, p. 283–288, 2014. <https://doi.org/10.3906/biy-1307-37>.

BLAUSTEIN, A.R.; KIESECKER, J.M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecol. Lett.**, v. 5, n. 4, p. 597–608, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x>.

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

BOUR, A. *et al.* CeO₂ nanoparticle fate in environmental conditions and toxicity on a freshwater predator species: a microcosm study. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 24, p. 17081-17089, 2017. 10.1007/s11356-017-9346-1

BRACCHETA, R. *et al.* Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. **Nanotoxicol.**, v. 6, n. 4, p. 381-398. 2012. doi: 10.3109/17435390.2011.579634.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento**. Diário Oficial [da] União, n. 53, 2005.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA - CONAMA. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. **Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas**. Diário Oficial [da] União, n. 249, 2009.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, Suplemento, n. 190, p. 360, 2017. Disponível em:

BREEDVELD, A. *et al.* Granulocytes as modulators of dendritic cell function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 4, p. 1003–1016, 2017. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0217-048RR>.

BUNDSCHUH, M. *et al.* Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? **Environ. Sci. Eur.**, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>.

BURNS, C. J. *et al.* Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: Review of the Epidemiologic and Animal Studies. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 16, n. 3-4, p. 127–283, 2013. doi:10.1080/10937404.2013.783383

CABAGNA, C.M. *et al.* Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibian *Leptodactylidae*) by the pirethroid insecticide cypermethrin. **Toxicol. Environ. Chem.** v. 88, n. 4, p. 729–737, 2006. <https://doi.org/10.1080/02772240600903805>.

ÇAKICI, Ö. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 67, n. 3, p. 237-243, 2015.

ÇAKICI, Ö. Histopathological analysis of carbaryl-induced toxicity in the spleen of Levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). **Env. Sci. Poll. Res.**, v. 25, n. 25, p. 24917-24922, 2018.

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*. **Mutat. Res.**, v. 438, n. 2, p. 155–161, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00167-3).

CAMPOS, E.V.R.; OLIVEIRA, J. L.; FRACETO, L. F. Applications of Controlled Release Systems for Fungicides, Herbicides, Acaricides, Nutrients, and Plant Growth Hormones: A

Review. **Adv. Sci., Eng. and Med.**, v. 6, p. 373-387, 2014. <https://doi.org/10.1166/ase.2014.1538>

CAMPOS, E.V.R. *et al.* Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 13809, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep13809>.

CAMPOS, R.P. de *et al.* Analysis of ZnO nanoparticle-induced changes in *Oreochromis niloticus* behavior as toxicity endpoint. **Sci. Total Environ.**, v. 17, n. 682, p. 561–571, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.183>.

CAMPOS, E. V. *et al.* Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecol. Indic.**, v. 105, p. 483-495, 2019.

CARNEIRO, F.F. (Org.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Búrigo. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARVALHO, F.P. Pesticides, environment, and food safety. **Food Energy Secur.**, v. 6, n. 2, p. 48-60, 2017.

CARVALHO, C.S. *et al.* Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. **Environ. Poll.**, v. 221, p. 445-452, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012>

CARVALHO, M. M. X.; NODARI, E. S.; NODARI, R. O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde – Marguinhos**, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hcsm/v24n1/0104-5970-hcsm-24-1-0075.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2017.

CASARETT, L.J.; DOULL, J. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7th ed. New York: McGraw-Hill. Chicago, 2008

CAVALCANTE, V.M.; CRUZ-LANDIM, C. Padrão eletroforético de proteínas e atividade de fosfatase ácida em extratos do intestino médio de *Apis mellifera L.* durante a metamorfose. **Neotrop. Entomol.**, v. 33, n. 2, p. 169-172, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1519566X2004000200007>.

CAVALCANTE, V.M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, Rio Claro, v. 24, p. 19-40, 1999.

CHANG, C. The immune effects of naturally occurring and synthetic nanoparticles. *J. Autoimmun.*, v. 34, p. 234–246, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.009>.

CHEN, G.; ROBERT, J. Antiviral immunity in amphibians. **Viruses**, v. 3, n. 11, p. 2065–2086, 2011.

CHEN, M.; VON MIKECZ, A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. **Exp. Cell Res.**, v. 305, p. 51–62, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.12.021>.

CHEN, H. *et al.* Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **J. Control. Release**, v. 110, n. 2, p. 296-306, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.052>.

CHEN, H.; YADA, R. Nanotechnologies in agriculture: new tools for sustainable development. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 22, p. 585-594, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.004>.

CHEN, W-Y. Toxicokinetic modeling challenges for aquatic nanotoxicology. **Front. Mar. Sci**, v. 2, p. 114, 2016.

CHIPINDA, I. *et al.* Haptenation: chemical reactivity and protein binding. **J. Allergy**, v. 2011, p. 1–11, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/839682>.

CLAVER, J.A.; QUAGLIA, A.I.E. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. **J. Exot. Pet Med.**, v. 18, p. 87–97, 2009. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006>.

CLEMENTE, Z. *et al.* Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. **Aquat. Toxicol.**, v. 147, p. 129-139, 2014a. Doi: 10.1016/j.aquatox.2013.12.024.

CLEMENTE, Z. *et al.* Ecotoxicological evaluation of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 14, p. 4911-4917, 2014b.

COLLINS, J.P. Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. **Dis. Aquat. Org.**, v. 92, p. 93-99, 2010. <https://doi.org/10.3354/dao02307>

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB (São Paulo State Environmental Company), 2009. **Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo: Série relatórios.** <http://cetesb.sp.gov.br/aguasinteriores/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/variaveis.pdf>. Accessed: 04 jan 18.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA (National Environmental Council), 2005. **Água: Classificação e qualidade.** Embrapa Art. 70. Resolução 20, 1-14, 2005. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705>. Accessed: 04 jan. 18.

CONTE, Y.L. *et al.* Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? **Apidologie**, v. 41, p. 353–363, 2010. Doi: 10.1051/apido/2010017

CORNMAN, R.S. *et al.* Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e43562, 2012.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N., Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Rev. Bras. de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000400016>

COSTA, A.M.; RIZZOTTO, M.L.F.; LOBATO, L.V.C. The issue of agrochemicals breaks the limits of the ethics of preservation of health and life. **Saúde debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 346-353, June 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/sdeb/v42n117/en_0103-

1104-sdeb-42-117-0346.pdf. Acesso em: 14 Jul 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811700>.

COSTA, M.J. *et al.* Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153–163, 2008. Doi: 10.1007/s10646-007-0178-5.

COSTA, M.J. *et al.* Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methylparathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Braz. J. Biol.**, v. 72, n. 4, p. 100–106, 2015. <https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.08314>

COX, C., Pyrethrins/pyrethrum insecticide factsheet, **J. Pestic. Reform.**, v. 2, n. 1, p. 14–20, 2002.

CRESPO, S.; LA ROVERE, A.L.N. **Projeto Geo Cidades**: relatório ambiental urbano integrado - Informe GEO. PNUMA. Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. Rio de Janeiro: Consórcio Parceria, 21, 2002. 193p.

CRUZ, A.S. *et al.* Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 26, n. 2, p. 165-176, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10565009-9126-x>.

CRUZ, L.C. *et al.* Morphometry of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier) (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis. **Neotrop. Entomol.**, v. 40, n. 6, p. 677-681, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000600007>.

CULLEY, D.D.J. Have we turned the corner in bullfrog culture? **Aquacult. Mag.**, Asheville, n. 7, p.20-24, 1981.

CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): Uma revisão. **SaBios**, v. 4, n. 2, 2009.

DA SILVA, E. T. A rã-touro norte-americana (*Lithobates catesbeianus*), uma espécie invasora no Brasil. **Revista de Ciências**, v. 7, n. 1, 2016.

DABOUR, K. *et al.* Cellular alterations in midgut cells of honey bee workers (*Apis mellifera* L.) exposed to sublethal concentrations of CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture. **Sci. Total Environ.**, v. 651, p. 1356-1367, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.311>

DAGLIOGLU, Y.; KABAKÇI, D.; AKDENİZ, G. Toxicity of nano and non-nano boron particles on *Apis mellifera* (honey bee). **Res. J. Chem. Environ. Sci.**, v. 3, n. 3, 2015.

DALBONI S.P. *et al.* The concurrence of hypercholesterolemia and aging promotes DNA damage in apolipoprotein E-deficient mice. **Open J. Blood Dis.**, v. 02, p. 51–55, 2012. <https://doi.org/10.3390/ijms14023325>.

DANG, M. *et al.* Characterisation and 3D structure of melanomacrophage centers in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*). **Tissue Cell**, v. 57, p. 34-41, 2019.

DAS, M.; MAHAPATRA, P.K. Blood cell profiles of the tadpoles of the dubois's tree frog, *Polypedates teraiensis* dubois, 1986 (Anura: rhacophoridae). **Sci. World J.**, v. 2012, p. 11, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/701746>.

DAS, M.; MAHAPATRA, P.K. Hematology of wild caught dubois's tree frog *Polypedates teraiensis*, dubois, 1986 (Anura: rhacophoridae). **Sci. World J.**, v. 2014, p. 7, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/491415>.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 12, n. 1, p. 62-76, 2011.

DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 570, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00570>.

de MELO, N.F.S. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Quím. nova**, v. 33, p. 65-69, 2010.

de MELO, N.F.S. *et al.* Poly (Lactide-co-Glycolide) Nanocapsules containing benzocaine: influence of the composition of the oily nucleus on physico-chemical properties and anesthetics activity. **Pharmaceut. Res.**, v. 28, p 1984-1994, 2011. Doi: 10.1007/s11095-011-0425-6.

de MELO, N.F.S. *et al.* Benzocaine-loaded polymeric nanocapsules: study of the anesthetic activities. **J. Pharm. Sci.**, v. 101, p. 1157-1165, 2012.

de MELO, N. F. S. *et al.*, Development of hydrophilic nanocarriers for the charged form of the local anesthetic articaine. **Colloids and Surf. B: Biointerfaces**, v. 121, p. 66-73, 2014. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.05.035.

de MELO, N.F. *et al.* 15d PGJ2-Loaded solid lipid nanoparticles: physicochemical characterization and evaluation of pharmacological effects on inflammation. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161796, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161796>.

de MELO, N.F.S. *et al.* Characterization of articaine-loaded Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and solid lipid nanoparticles in hydrogels for topical formulations. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 18, p. 4428-4438, 2018. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15235>.

DEL CASTILLO, A.M. Nanomaterials and workplace health e safety - What are the issues for workers? European Trade Union Institute, Brussels, 2013. 44p. ISBN 978-2-87452-288-8

DEMERLIS, C.C.; SCHONEKER, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 319–326, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00258-2).

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

DIENI, C. A. *et al.* Physiological hepatic response to zinc oxide nanoparticle exposure in the white sucker, *Catostomus commersonii*. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 162, p. 51-61. 2014. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.03.009.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; McNEIL S.E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nat. Nanotechnol.**, v. 2, n. 8, p. 469–478, 2007. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.223>.

DOKTOROVOVA, S., *et al.* Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – a systematic review of in vitro data. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 87, p. 1–18, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.02.005>.

DOLEZAL, A.G. *et al.* Pollen contaminated with field-relevant levels of cyhalothrin affects honey bee survival, nutritional physiology, and pollen consumption behavior. **J. Econ. Entomol.**, v. 109, n. 1, p. 41-48, 2016. <https://doi.org/10.1093/jee/tov301>.

DU, J. *et al.* A review on silver nanoparticles-induced ecotoxicity and the underlying toxicity mechanisms. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, 98, 2018, 231–239, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.003>.

DUCHON, S. *et al.* Pyrethrum: a mixture of natural pyrethrins has potential for malaria vector control. **J Med Entomol.**, v. 46, n. 3, p. 516-22, 2009. doi: 10.1208/s12249-010-9563-0.

DUQUE, G.A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 1–12, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.

HARDY, A. *et al.* Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. **EFSA Journal**, v. 16, n. 7, 2018.

EKAMBARAM, P.; SATHALI, A. H.; PRIYANKA, K. 2012. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. **Sci. Revs. Chem. Commun**, 2(1), 80-102.

EL FEKY, A. A. *et al.* Adsorption of some surfactants onto polyvinyl alcohol as hydrophobic polymer surface. **J Disper Sci Technol.**, v. 31, n. 8, p. 1091-1099, 2010.

ELLIS, J.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **J. Apic. Res.**, v. 49, n. 1, p. 134-136, 2010. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.30>

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Visão 2030**: o futuro da agricultura brasileira. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 212 p.

ENIS, I.Y. *et al.* An overview of nanotoxicology. **Engineering Sci.**, (NWSAENS), v. 12, n. 1, p. 57-65, 2017. DOI: 10.12739/NWSA.2017.12.1.1A0373.

ERGER, R.A; CASALE, T.B. Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. **Am. J. Physiol.**, v. 268, pt. 1, p. L117–L122, 1995.

ERIKSSON, J. *et al.* ZnO nanoparticles or ZnO films: a comparison of the gas sensing capabilities. **Sensors Actuat. B. Chem.**, v. 137, p. 94-102, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.10.072>

FADER, C.M.; COLOMBO, M.I. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. **Cell Death Differ.**, v. 16, n. 1, p. 70-78, 2009. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.168>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. **The future of food and agriculture** – Trends and challenges. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>. Acesso em: 01 jul 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. **Pesticides Use**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>. Acesso em: 01 set 2019.

FEDERICI G., *et al.* Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquat. Toxicol.**, v. 84, p. 415–430, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 455, p. 81–95, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).

FENOGLIO, C. *et al.* Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 60, p. 259–68, 2005.

FEO, M. L. *et al.* Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. **J. Hydrol.**, v. 393, n. 3-4, p. 156–162, 2010. Doi:10.1016/j.jhydrol.2010.08.012

FERNANDES, A.L. *et al.* Assessment of the effects of graphene exposure in *Danio rerio*: a molecular, biochemical and histological approach to investigating mechanisms of toxicity. **Chemosphere**, v. 210, p. 458–466, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.183>.

FIGUEIREDO, A.C.P. **Piretróides: Uma nova geração de insecticidas**. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2014, 33f.

FRANÇA, F.M. *et al.* Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. **J. Environ. Sci. Health. B.**, v. 50, n. 6, p. 406–410, 2015. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011950>.

FRANCO-BELUSSI, L. *et al.* Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7-a-melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. **Zoology** (Jena), v. 116, p. 316-324. 2013. Doi: 10.1016/j.zool.2013.06.003

FROST, D. R. **Amphibian species of the world: an online reference**. American Museum of Natural History, New York, 2019. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Ranidae/Lithobates/Lithobates-catesbeianus>>. Acesso em: 29 ago. 2019.

GAMISANS, F. *et al.* Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **Int. J. Pharm.**, v. 179, n. 1, p. 37-48, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00381-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00381-0).

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

GARDNER, S.C.M.; Oberdöster, E. **Toxicology of Reptiles**. CRC press – Taylor & Francis Group, 328p. 2005.

GATTOO, M.A. *et al.* Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. **BioMed Res. Int.**, v. 2014, p. 1–8, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/498420>.

GATTEN, R.E.; BROOKS, G.R. Blood physiology of a tropical frog, *Leptodactylus fallax*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 15, n. 30, p. 1019–1028, 1969. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91039-1](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91039-1).

GELDMANN, J.; GONZÁLEZ-VARO, J. P. Conserving honey bees does not help wildlife. **Science**, v, 359, n. 6374, p. 392–393, 2018. doi:10.1126/science.aar2269

GIANNINI, T.C. *et al.* The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **J. Econ. Entomol.**, v. 108, p. 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1093/jee/fov093>.

GLAVAN, G. *et al.* Feeding preference and sub-chronic effects of ZnO nanomaterials in honey bees (*Apis mellifera carnica*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 72, n. 3, p. 471-480, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0385-x>

GONÇALVES, S. L.; *et al.* (2007). **Rotação de Cultura**. Circulação Técnica - Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/470323/rotacao-de-culturas>. Acesso em: 01 jul 2019.

GONZÁLEZ, J.O.W. *et al.* **J. Pest. Sci.**, v. 88, p. 393-404, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0607-1>.

GOPAL, M., KUMAR, R., GOSWAMI, A., Nano-pesticides - a recent approach for pest control. **The J. Plant Protec. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 2012.

GOSNER, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, p. 183–190, 1960.

GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.

GOVENDER, T., 1999. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **J. Control. Release**, 57, 171–185.

GRELLA, T.C. *et al.* Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, p. 124255, dec. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.225>.

GRIFFITT, R.J. *et al.* Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms, **Environ. Toxicol. Chem.** v. 27, p. 1972–1978, 2008. <https://doi.org/10.1897/08-002.1>.

GRILLITSCH, B.; SCHISEARI, L. (2010) The ecotoxicology of metals and reptiles. In: Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK (eds) Ecotoxicology of amphibians and reptiles, Second edn. CRC Press, p. 337.

GRILLO, R. *et al.* Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **J. Polym. Environ.**, v. 18, p. 26-35, 2010.

GRILLO, R. *et al.* Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **J. Hazard. Mater.**, v. 186, p. 1645-1651, 2011. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.044

GRILLO, R. *et al.* Poly(-caprolactone)nanocapsulesas carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **J. Hazard. Mater.**, v. 231-232, p. 1-9, 2012. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.06.019

GRILLO, R. *et al.* Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: Na environmentally safer alternative for weed control. **J. Hazard Mater.**, v. 278, p. 163–171, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.079>.

GRILLO, R. *et al.* Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: Na environmentally safer alternative for weed control. **J. Hazard Mater.**, v. 278, p. 163–171, 2014a. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.079>.

GRILLO, R. *et al.* Poly(e-caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating agent on physico-chemical stability and herbicide release profile. **Int. J. Env. Sci. and Tech.**, v. 11, p. 1691-1700, 2014b. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.044

GRILLO, R., ABHILASH, P.C., FRACETO, L.F. Nanotechnology applied to bioencapsulation of pesticides. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 16, p. 1231-1234, 2016. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12332>.

GUIRGUIS, O.W., MOSELHEY, M.T.H. Thermal and structural studies of poly(vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends. **Nat. Sci.**, v. 4, n. 1, p. 57-67, 2012. <https://doi.org/10.4236/ns.2012.41009>.

HAMMOND, S.A., CAREW, A.C., HELBING, C.C. Evaluation of the effects of titaniumdioxide nanoparticles on cultured *Rana catesbeiana* tailfin tissue. **Front. Genet.**, v. 4., p. 251, 2013. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00251>.

HANDY, R.D. *et al.* Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. **Aquat. Toxicol.**, v. 47, p. 23-41, 1999.

HAYES, T. B. *et al.* The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's Perspective. **J. Exp. Biol.**, v. 213, p. 921-933, 2010a. doi: 10.1242/jeb.040865

HAYES, T. B. *et al.* Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 107, n. 10, p. 4612–4617, 2010b. <http://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>

HAYES, T.B. *et al.* The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **J. Exp. Biol.**, v. 213, p. 921–933, 2010. <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>.

HEATLEY, J.J.; JOHNSON, M. Clinical technique: Amphibian hematology: a practitioner's guide. **J. Exotic. Pet. Med. Sug.**, v. 18, p. 14–19, 2009. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2008.10.004>.

HIKAL, W.M. *et al.* Botanical insecticide as simple extractives for pest control. **Cogent Biol.**, v. 3, p. 1–16, 2017. <https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1404274>.

HOGAN, S.P. *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709–750, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02958.x>.

HOWARD, A.G. On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment. **J. Environ. Monit.**, v. 12, n. 1, p. 135-142, 2010.

HUNG, K.L.J., *et al.* The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proc. R. Soc. B.**, v. 285, p. 20172140, 2018. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>

IBARRA, Luis E. *et al.* Assessment of polyaniline nanoparticles toxicity and teratogenicity in aquatic environment using *Rhinella arenarum* model. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 114, p. 84-92, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.013>

ISMAN M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 51, p. 45–66, 2006.

ISMAN M.B. Perspective Botanical insecticides: for richer, for poorer. **Pest Manag. Sci.**, v. 64, p. 8–11, 2008. <https://doi:10.1002/ps.1470>.

ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L., Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends Plant. Sci.**, v. 19, n. 3, p. 140-145, 2014. doi: 10.1016/j.tplants.2013.11.005

JACQUES, M.T. *et al.* Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 139, p. 245-253, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.045>.

JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein J. Nanotechnol.**, v. 9, n. 1, p. 1050-1074, 2018.

JOHNSON, R.M. *et al.* Pesticides and honey bee toxicity e USA. **Apidologie**, v. 41, p. 312-331, 2010. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>.

JOLLY, AL, *et al.* (1978) Acute toxicity of permethrin to several aquatic animals. **Trans Am Fish Soc.**, 107:825-827

KAH, M. *et al.* A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nat. Nanotechnol.**, v. 13, p. 677-684, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>.

KAH, M. *et al.* Analysing the fate of nanopesticides in soil and the applicability of regulatory protocols using a polymer-based nanoformulation of atrazine. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 21, n. 20, p. 11699-11707, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2523-6>.

KAH, M., HOFMANN, T. Nanopesticide research: current trends and future priorities. **Environ. Int.**, v. 63, p. 224-235, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>.

KAIN, J. *et al.* DNA damage induced by micro- and nanoparticles--interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. **Mutagenesis**, v. 27, p. 491-500, 2012. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges010>.

KAKAMAND, F.A.K., MAHMOUD, T.T., AMIN, A.M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. Workers. **J. Dohuk Univ.**, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

KAKAR, Sanjay; KAMATH, Patrick S.; BURGART, Lawrence J. Sinusoidal dilatation and congestion in liver biopsy: is it always due to venous outflow impairment?. **Arch Pathol Lab Med**, v. 128, n. 8, p. 901-904, 2004.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C., From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicol.**, v. 269, p. 105-19, 2010. doi: 10.1016/j.tox.2009.08.016.

KAPHLE, M.; BASTAKOTI, N. A case study on botanical pesticides and vermicompost fertilizer for adopting new agricultural practice by farmers. **J. Agric. and Envi.**, v. 17, p. 56-64, 2018. <https://doi.org/10.3126/aej.v17i0.19860>

KARERU, P.; ROTICH Z.K; MAINA, E.W. Use of botanicals and safer insecticides designed in controlling insects: the African case, In: Trdan S., (Ed), *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies* vol. 10, 2013, Intech. Croatia; Rijeka, pp297-310 <https://doi:10.5772/53924>.

KARLSSON, H.L. The comet assay in nanotoxicology research. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 398, p. 651-666, 2010. <https://doi:10.1007/s00216-010-3977-0>.

KAYSER, O. *et al.* Interactions of fluorescent solid Lipid nanoparticles (SLN) with macrophage-like cells visualised by CLSM, In: **3rd World Meeting of APV/APGI**, Germany: Berlin, April 3-6, APV/APGI, 2000, APG/APGI; Germany, 2000.

KELLY, C.M. *et al.* Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 719-727, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00003-6).

KILIC, A.C. *et al.* Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. **J. Microencapsul.**, v. 22, p. 633-641, 2005.

KIM, D.Y. *et al.* Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities. **J. Sci. Food Agric.**, v. 98, n. 3, p. 849-864, 2018. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8749>.

KONONENKO, V. *et al.* Nanoparticle interaction with the immune system. **Arh. Hig. Rada. Toksikol.**, v. 66, p. 97–108, 2015.

KOO, J. Opportunities, Trends, and Challenges for Polymer Nanocomposites. Fundamentals, Properties, and Applications of Polymer Nanocomposites. **Cambridge University Press**, 648–692, 2016. Doi:10.1017/cbo9781139342766.016.

KOOKANA, R.S., *et al.* Nanopesticides: guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, n. 19, p. 4227–4240, 2014. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf500232f>.

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

KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, n. 2, p. 234–258, 2000.

KUMAR, R.; LAL, S. Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review. **J Nanomater Mol Nanotechnol.**, v. 3, n. 4., p. 1-11, 2014. <http://dx.doi.org/10.4172/2324-8777.1000150>

LAJMANOVICH R.C. *et al.* Inducion of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of cammon toad (*Rhinella annerarum*) treated with the herbicides Liberty® and glifosinate-ammonium. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 769, p. 7–12, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009>.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Mar Pollut Bull**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LIAO, C.H. *et al.* Shortterm exposure to Lambda-cyhalothrin negatively affects the survival and memory related characteristics of worker bees *Apis mellifera*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 75, n. 1, 59-65, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0514-1>.

LIU, Y., TONG, Z., PRUD'HOMME, R.K. Stabilized polymeric nanoparticles for controlled and efficient release of bifenthrin. **Pest Manag. Sci.**, v. 64, n. 8, p. 808-812, 2008. <https://doi.org/10.1002/ps.1566>.

LOURENÇO, J. *et al.* Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *Carassius auratus* to uranium. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 58, n. 4, p. 1023–1031, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9432-6>.

LOURENÇO, C. *et al.* Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. **Int. J. Pharm.**, v. 138, n. 1, p. 1-12, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(96\)04486-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04486-9).

LU, Y.; OZCAN, S. Green nanomaterials: on track for a sustainable future. **Nano Today**, v. 10, p. 417–420, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.010>.

LUNA-GOMES, T. *et al.* Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. **Front. Pharmacol.**, v. 4, p. 1–8, 2013. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00027>.

MAGESKY, A.; PELLETIER, É. Cytotoxicity and physiological effects of silver nanoparticles on marine invertebrates. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 1048, p. 285–309, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_17.

MAGGI, M. *et al.* Honeybee health in South America. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 835–854, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0445-7>.

MAHAYE, N. *et al.* Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: a Review. **Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.**, v. 773, p. 134–160, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.004>.

MAHMOUDI, M. *et al.* Cytotoxicity of uncoated and polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles, **J. Phys. Chem.** v. 113, p. 9573–9580, 2009. <https://doi.org/10.1021/jp9001516>.

MAJEED, A. Application of agrochemicals in agriculture: benefits, risks and responsibility of stakeholders. **J. Food Sci. Toxicol.**, v. 2 n. 1, p.2, 2018.

MALAGOLI, D. *et al.* Autophagy and its physiological relevance in arthropods: current knowledge and perspectives. **Autophagy**, v. 6, n. 5, p. 575–588, 2010. <https://doi.org/10.4161/auto.6.5.11962>.

MALASPINA, O. *et al.* Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8., 2008, Ribeirão Preto. **Anais de Resumos...** Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2008. p. 41–48.

MALHAT, F. M. *et al.* Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. **Chemosphere**, v. 120, p. 457–461, 2015. [Doi:10.1016/j.chemosphere.2014.08.032](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.032)

MANIATIS, G.M.; INGRAM, V.M., Erythropoiesis during amphibian metamorphosis: site of maturation of erythrocytes in *Rana catesbeiana*. **J. Cell Biol.**, v. 49, p. 372–379, 1971.

MANSANO, A.S. *et al.* Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. **Environ. Pollut.**, v. 243, (Pt. A), p. 723–733, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.020>.

MANSO de ABREU, P.P. *et al.* Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Cell Tissue Res.**, v. 337, p. 301–312, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0803-0>.

MARTINS, G.F. *et al.* The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.07.003>.

MARUYAMA, C.R. *et al.* Nanoparticles based on chitosan as carriers for the combined herbicides imazapic and imazapyr. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 19768, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep19768>, 19768.

MASARUDIN, M.J. *et al.* Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin. **Nanotechnol. Sci. Appl.**, v. 8, p. 67-80, 2015. <http://doi.org/10.2147/NSA.S91785>.

MAURER-JONES, M.A. *et al.* Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. **Analyt. Chem.**, v. 85, n. 6, p. 3036-3049, 2013.

MCCALLUM, M. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. **J. Herpetol.**, v. 41, n. 3, p. 483-491, 2007. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[483:ADOECD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[483:ADOECD]2.0.CO;2)

MCKENNA, M.M. *et al.* Effect of melia azedarach (sapindales: meliaceae) fruit extracts on citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: gracillariidae). **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 144, 2013.

MEHNERT, W.; Mader K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Adv Drug Del Rev.** v. 47, p. 165–96, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)

MENON, J.U. *et al.* Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles, **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 100, n. 8, p. 1998–2005, 2012. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34040>.

MILIVOJEVIC, T *et al.* Neurotoxic potential of ingested ZnO nanomaterials on bees. **Chemosphere**, v. 120, p. 547-554, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.054>

MISHRA, S. *et al.* Integrated approach of agri-nanotechnology: challenges and future trends. **Front. Plant Sci.**, v. 8, p. 1-12, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.00471

MIYAKE, K.; KARASUYAMA, H., Emerging roles of basophils in allergic inflammation. **Allergol. Int.**, v. 66, p. 382–391, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.04.007>

MOISSET B.; BUCHMANN, S. **Bee Basics - An Introduction to Our Native Bees**. A USDA Forest Service and Pollinator Partnership Publication, 2^a ed., 42p, 2015.

MONTANHA, F.P.; PIMPÃO, C.T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes. **Rev. Cient. Elet. Med. Vet.**, v; 9, n. 18, p. 1-58, 2012.

MOORE, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environ. Int.**, v. 32, p. 967–976, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>.

MUKHOPADHYAY, S.S. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. **Nanotechnol. Sci. Appl.**, v. 7, p. 63-71, 2014. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39409>.

MULLER, R.H.; RÜHL, D.; RUNGE, S.A., Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. **Int. J. Pharm.**, v. 144, n. 1, p. 115-121, 1996.

MULLER, R.H.; MEADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00087-4).

MULLER, R.H., SHEGOKAR, R., KECK, C.M. 20 Years of lipid nanoparticles (SLN e NLC): present state of development e industrial applications. **Curr. Drug Discov. Technol.**, v. 8, p. 207-227, 2011. <https://doi.org/10.2174/157016311796799062>.

NAFEE, N. *et al.* Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. **Int. J. Pharm.**, v; 381, n. 2-3, p. 130-139, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.049>.

NAGGAR, Y. AL *et al.* Sublethal effects of chronic exposure to CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture on the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Environ. Sci. Pollut. R.**, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3314-2>

NARAHASHI, T. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, n. 1, p. 1-26, 2000.

NASERI, N., VALIZADEH, H., ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. **Adv. Pharmaceut. Bull.**, v. 5, n. 3, p. 305-313, 2015. <http://doi.org/10.15171/apb.2015.043>.

NASSERI, M. *et al.* Antifungal activity of Zataria multiflora essential oil-loaded solid lipid nanoparticles in vitro condition. **Iran. J. Basic Med. Sci.**, v. 19, n. 11, p. 1231-1237, 2016. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2016.7824>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. PubChem Database. **Pyrethrin I**, CID=5281045, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrethrin-I> (accessed on July 23, 2019)

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. PubChem Database. **Pyrethrin II**, CID=5281555, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrethrin-II> (accessed on July 23, 2019)

NATIONAL INSTITUTE OF FOOD AND AGRICULTURE (NIFA) - United States Department of Agriculture (USDA). 2018. **About NIFA**. White House Office of Science and Technology Policy, Alexandria, VA, 2018. <https://nifa.usda.gov/about-nifa>. (Accessed 4 March 2018).

NEVES, C.A. *et al.* FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera Apidae). **Micron**, v. 33, n. 5, p. 453-460, 2002. [https://doi.org/10.1016/S09684328\(01\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S09684328(01)00043-9).

NOWACK, B.; BUCHELI, T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environ. Pollut.**, v. 150, n. 1, p. 5-22, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>.

NUNES, B. *et al.* Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceutical and detergent. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 71, p. 341–354, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.006>.

ÖZKAN, Y. *et al.* Evaluation of the comparative acute toxic effects of TiO₂, Ag-TiO₂ and ZnO-TiO₂ composite nanoparticles on honey Bee (*Apis mellifera*). **J. Int. Environ. Appl. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 26-36, 2015.

OLIVE, P.L.; Banáth, J.P. *et al.* The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 23–29, 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.076>.

OLIVEIRA, J.L. *et al.* Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. **J. Agric. Food Chem.** v. 63, p. 422–432, 2015. <https://doi.org/10.1021/jf5059045>.

OLIVEIRA, C.R. *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. **Environ. Poll.**, v. 236, p. 124282, 2019.

OLIVEIRA, J.L. *et al.* Zein nanoparticles as ecofriendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture. **J. Agric. Food Chem.**, v. 66, p. 1330-1340, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>.

OLIVEIRA, R.A. *et al.* Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environ. Toxicol.**, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2014. <https://doi.org/10.1002/tox.21842>.

OLIVEIRA, R.L., PASSOS, F.B. Estudo da oxidação parcial do ethanol em catalisadores de Rh por DRIFTS. **Quim. Nova**, v. 36, n. 3, p. 375-381. 2013.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS DO BRASIL - ONU/BR. (2015). **2 Fome zero e Agricultura sustentável: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável.** Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso em: 10 de jun. 2019.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO. 2013. **FAO discute demanda mundial por alimentos.** Disponível em: <<https://www.fao.org.br/FAOddma.asp>>. Acesso em: 01 ago. 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO. 2019. **Pesticidas.** Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>. Acesso em: 01 ago. 2014.

PAL, K. K.; GARDENER, B.M. Biological Control of Plant Pathogens. **Plant Health Instr.**, v.1, p. 1-25, 2006. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

PALMQUIST, K., SALATAS, J., FAIRBROTHER, A., 2012. Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology. In: Perveen, F. (Ed.), **Insecticides: Advances in Integrated Pest Management**, vol. 11. InTech, Rijeka: Croatia, pp. 251-278 cap.

PARMAR, T.K. *et al.* Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution, **Front. Life Sci.**, v. 9, n. 2, p. 110–118, 2016. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>.

PASQUOTO-STIGLIANI, T. *et al.* Nanocapsules containing neem (*Azadirachta indica*) oil: development, characterization, and toxicity evaluation. **Sci. Rep.**, v. 7, n.1, p. 5929, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06092-4>.

PĂUNESCU, A. *et al.* Histopathological changes in the liver and kidney tissues of marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) induced by the action of Talstar 10EC insecticide. **Analele Universității din Oradea-Fascicula Biologie**, v. 19, n. 1, p. 5-10, 2012.

PEAY, S. *et al.* Biocide treatment of ponds in Scotland to eradicate signal crayfish. **Bull. Fr. Peche Piscic.**, v. 380-381, p. 1363e-1379, 2006. <https://doi.org/10.1051/kmae:2006041>.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **J. Hazard. Mater.**, v. 268, p. 207-215, 2014. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.01.025.

PEREZ-DE-LUQUE, A., RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. **Pest Manag. Sci.**, v. 65, n. 5, p. 540-545. 2009. <https://doi.org/10.1002/ps.1732>.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M. *et al.* Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 23, p. 1–10, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M. *et al.* Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: bufonidae) Neotropical tadpoles. **Environ. Pollut.**, v. 244, p. 733–746, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>.

PESTICIDES DATABASE (PAN). **Pyrethrins**. 2014. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC34291>. Acesso em: 12 ago. 2016.

PETTIS, J.S. *et al.* Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0070182

PIRES, C. S. S. *et al.* Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **SciELO**, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.

PIZZOL, C.D. *et al.* Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 11, p. 8581–8596, 2014. <https://doi:10.3390/ijerph110808581>.

POLLETO, F.S. *et al.* Rate modulating PHBHV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 345, p. 70-80, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.040>.

POLLO, F.E., *et al.* Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. **Environ. Monit. Assess.**, v. 187, n. 581, p. 2–9, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>.

POTTS, S.G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends Ecol. Evol.**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.

PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q.D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. **Front. Microbiol.**, v. 20, n. 8, p. 1014, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01014>.

QUALHATO, G. *et al.* Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. **Aquat. Toxicol.**, v. 198, p. 63-72, 2018.

RAHEEM, H.Q. Study effect of silver nanoparticles on some blood parameters in rabbits, **Biochem. Cell. Arch.**, v. 18, n. 1, p. 267–269, 2018.

RAHMAN, L. *et al.* Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-fibrotic responses in mice: investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis, **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 823, p. 28–44, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.005>.

RANZANI-PAIVA, M.J.T., *et al.* **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1ed. Maringá: Eduem, 2013. 140p.

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, 2013, cap. 138, p. 4087-4107.

RIBEIRO, H. J. *et al.* Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. **Cell Tissue Res.**, v. 346, n. 3, p. 417-425, Dec. 2011.

RICHARDS, S.M.; KENDALL, R.J. Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 21, n. 9, p. 1826–1835, 2002. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210910>.

RICHARDSON, J.R., *et al.* Neurotoxicity of pesticides. **Acta Neuropathol**, v. 1, pp 1–20, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>

RIEHMANN, K. *et al.* Nanomedicine-challenge and perspectives. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 48, n. 5, p. 872–897, 2009. <https://doi.org/10.1002/anie.200802585>.

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

RITTER, L. *et al.* Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. **J Toxicol Environ Health A.**, v. 65, n. 1, p. 1-142, 2011. <https://doi.org/10.1080/152873902753338572>

ROBBENS, J. *et al.* Eco-, geno-and human toxicology of bio-active nanoparticles for biomedical applications. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 170-181, 2010.

ROBERTS, J.R.; REIGART, J.R. **Recognition and Management of Pesticide Poisonings**. 6 ed. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, 2013, 277p. Disponível em: http://www2.epa.gov/sites/production/files/documents/rmpp_6thed_final_lowresopt.pdf. Acesso em: 08 ago 2016.

ROCHA, T.L., *et al.* Environmental behaviour and ecotoxicity of quantum dots at various trophic levels: a review. **Environ. Int.**, v. 98, p. 1–17, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.021>.

ROHR, J.R.; CRUMRINE, P.W. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. **Ecol. Appl.**, v. 15. n. 4, p. 1135-1147, 2005. <https://doi.org/10.1890/03-5353>

ROMANOVA, E.B.; EGORIKHINA, N. Changes in hematological parameters of Rana frogs in a transformed urban environment, **Russ. J. Ecol.**, v. 37, n. 3, p. 188–192, 2006.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudos de diversos fatores. **Memórias de Instituto Butantã**, v. 20, p. 315-328. 1947.

ROSSI, C.A. *et al.* Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microsc. Res. Tech.**, v. 76, n. 5, p. 552-558, 2011. <https://doi.org/10.1002/jemt.22199>.

ROSSI, P. A. **Alterações bioquímico-fisiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887) exposto a um inseticida à base de deltametrina**. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2013. 89f.

ROUF, M.A. Hematology of the leopard frog, *Rana pipiens*. **Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol.**, v. 4, p. 682–687, 1969. <https://doi.org/10.2307/1441793>.

RUBEN, L. N.; STEVENS, J. M. A comparison between granulomatosis and lymphoreticular neoplasia in *Diemictylus viridescens* and *Xenopus laevis*. **Cancer Res.**, v. 30, n. 11, p. 2613-2619, Nov. 1970.

SADEGHI-HASHJIN, G. *et al.* Influence of Permethrin and Cypermethrin on behavior in the mouse. **Int. J. Vet. Res.**, v. 5, n. 2, p. 119-124, 2011.

SAJID, M. et al. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. **Environ. Sci. Pollut. R.**, v. 22, n. 6, p. 4122-4143, 2015.

SALLA, R.F. *et al.* Impact of an environmental relevant concentration of 17a-ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1862-1868, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.042>.

SALVATERRA, T. *et al.* Biochemical and metabolic effects of a short-term exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezi* (Seoane). **Aquat. Toxicol.**, v. 128, p. 190–192, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.014>.

SANCHEZ-BAYO., F; GOKA, K. Pesticide residues and bees--a risk assessment. **PLoS One.**, v. 9, n. 4, e94482, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0094482

SANDERS, J. S. **Department of Pesticide Regulation**. 2006. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/surfwtr/swanalysismemo/swanal05.pdf>. Acesso em: 08 ago.14.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G. Piretróides e uma visão geral. **Alim. Nutr.**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, M. L. A. **Pólen coletado por *Apis mellifera* no diagnóstico da poluição ambiental causada por praguicidas e metais no Brasil**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Botucato, 2005. 89f.

SARANGI, M.J.; PADHI, S. Solid lipid nanoparticles e a Review. **J. Crit. Rev.**, v. 3, n. 3, p. 5-12, 2016.

SARLAK, N.; TAHERIFAR, A.; SALEHI, F. Synthesis of nanopesticides by encapsulating pesticide nanoparticles using functionalized carbon nanotubes and application of new nanocomposite for plant disease treatment. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, n. 21, p. 4833-483, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf404720d>,

SAYED, A. H.; YOUNES, H. AM. Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. **J. micros. ultrastruc.**, v. 5, n. 2, p. 97-104, 2017.

SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003. <https://doi.org/10.1590/S010040422003000500017>.

SCHLEIER, J.J., PETERSON, R.K.D., 2011. Pyrethrins and pyrethroid insecticides. In: Lopez, O., Fernandez-Bolaños, J.G. (Eds.), **Green Trend**. Insect Cont, vol. 3. J. Publishing, London: Burlington House, pp. 94-131.

SCHOLER, N. *et al.* Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. **Int. J. Pharm.**, v. 231, p. 167–176, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00882-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00882-1).

SCHWARZ, C. *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **J. Control. Release.**, v. 30, n. 1, p. 83-96, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90047-7).

SCOTT, N.; CHEN, H. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. **Ind. Biotechnol.**, v. 9, n. 1, p. 17-18, 2012. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.1555>.

SEKHON, B.S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnol. Sci. Appl.**, v. 7, p. 31-53, 2014. <http://doi.org/10.2147/NSA.S39406>.

SENTHIL-NATHAN, S. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. **Front. Physiol.**, v. 4, p. 1–17, 2013. <https://doi:10.3389/fphys.2013.00359>.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 38, p. 38–45, 2001. <https://doi.org/10.1002/em.1048>.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytobios**, v. 88, p. 161-171, 1996.

SHALUEI, F. *et al.* Effect of subacute exposure to silver nanoparticle on some hematological and plasma biochemical indices in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 32, n. 12, p. 1270–1277, 2013. <https://doi:10.1177/0960327113485258>.

SHARIFIA, S. *et al.* Toxicity of nanomaterials. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 6, p. 2323–2343, 2012. <https://doi.org/10.1039/c1cs15188f>.

SHARMA, S.; BHATTACHARYA, A. Drinking water contamination and treatment techniques. **Appl. Water Sci.**, v. 7, n. 3, p. 1043–1067, 2017.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquat. Toxicol.**, v. 76, n. 2, p. 111-121, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.002>

SILVA, M.S. *et al.* Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **J. Hazard. Mater.**, v. 190, p. 366-374, 2011. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.03.057

SILVA, M.S. *et al.* Efeito da associação do herbicida clomazone a nanoesferas de alginato/quitosana na sorção em solos. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 102–107, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100019>.

SILVA-ZACARIN, E.C.M. *et al.*, 2012. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Formatex Research Center, Badajoz, 5. ed., vol. 1, pp. 696e703,

SIMON, E. *et al.* 2011. Frogs and toads as biological indicators in environmental assessment, In: Murray J.L., (Ed), **Frogs: Biology, Ecology and Uses**. Nova Science Publishers, Inc.; USA, v. 7, pp. 141–150.

SIMON-DELISO, N. *et al.* Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The Role of Pesticides and Viruses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103073, 2014. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0103073>

SINGH, N.P. The comet assay: reflections on its development, evolution and applications. **Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.**, v. 767, p. 23–30, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.05.004>.

Soares-Lima, H.M., Silva-Zacarin, E.C.M., Camargo, I., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2018. **Histopathological alterations on honeybees midgut infected by Nosema ceranae and exposed to imidacloprid**. In: SETAC, A.P. (Ed.), Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia-Pacific Conference, Daegu, Korea, Sep 16-19, 2018. SETAC, Korea.

SODERLUND, D. M. *et al.* Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3–59, 2002.

SODERLUND, D.M.; BLOOMQUIST, J.R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 34, p. 77-96, 1989.

SOUFY, H. *et al.* Some biochemical and pathological investigations on monosex Tilapia following chronic exposure to carbofuran pesticides. **Global Vet.**, v. 1, p. 45-52, 2007.

SPENCE, A. R. *et al.* Detrimental effects of zinc oxide nanoparticles on amphibian life stages. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.**, v. 325, n. 7, p. 415-424, 2016. <https://doi.org/10.1002/jez.2026>

STEBBINS, R.C.; COHEN, N.W. **A natural history of amphibians**. New Jersey: Princeton University Press, 1995. 320 p.

STEINEL, N.C.; BOLNICK, D.I. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. **Front. Immunol.** v. 8, p. 827, 2017.

STOKSTAD, E. The Case of the Empty Hives. **Science**, v. 316, p. 970–973, 2007.

SURENDER, V; DEEPIKA, M. Solid lipid nanoparticles: a comprehensive review. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 8, n. 8, p. 102–114, 2016.

TANG, W. *et al.* Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview, **Chemosphere**, v. 191, p. 990–1007, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.115>.

TERRA, W.R., Ferreira, C., 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert, L.I. (Ed.), **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. Academic Press, San Diego, pp. 365-418. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-62118-8>.

THOMPSON, L.B. Fong Differential uptake of gold nanoparticles by 2 species of tadpole, the wood frog (*Lithobates sylvaticus*) and the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 36, p. 3351-3358, 2017. 10.1002/etc.3909

TRAVER, B.E. *et al.* Seasonal Effects and the Impact of In-Hive Pesticide Treatments on Parasite, Pathogens, and Health of Honey Bees. **J. Econ. Entomol.**, v. 111, n. 2, p. 517-527, 2018. doi: 10.1093/jee/toy026.

U.S. Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture (USDA/NIFA) (2018). **National Nanotechnology Initiative (NANO)**. White House Office of Science and Technology Policy, Alexandria, VA. <https://www.nano.gov/node/137>. Accessed 4 March 2018.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA (2006) **Reregistration eligibility decision for pyrethrins**. White House Office of Science and Technology Policy, Philadelphia, PA. Disponível em: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/pyrethrins_red.pdf. Accessed 14 March 2018.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. 1991. **Data Evaluation Record - Pyrethrum extract**. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-069001_3-Sep-91_a.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2018.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. 2006. **Reregistration Eligibility Decision for Pyrethrins**. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-069001_7-Jun-06.pdf>. Acesso em: 12 ago 2016.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. 2013. **Pyrethroids and Pyrethrins**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html>>. Acesso em: 12 ago 2016.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquat. Toxicol.**, v. 79, p. 201–204, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>.

VANCE, M. E. *et al.* Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein J. Nanotech.**, v. 6, n. 1, p. 1769-1780, 2015.

VAN METER R.J. *et al.* Agrochemical mixtures and amphibians: the combined effects of pesticides and fertilizer on stress, acetylcholinesterase activity and bioaccumulation in a terrestrial environment. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 38, n. 5, 2019, 1052–1061, <https://doi.org/10.1002/etc.4375>.

VaNENGELSDORP, D. *et al.* A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. **J. Apicultural Res.**, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2011.

VASCONCELOS, Y. **Agrotóxicos na berlinda**. Economia, 2018. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/09/18/agrotoxicos-na-berlinda/>. Acesso em: 01 set. 2019.

VELISEK, J. *et al.* Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Vet. Med.**, v. 51, n. 10, p. 469-476, 2006.

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

VENKATRAMAN, S.S. Micelle-like nanoparticles of PLAePEGePLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **Int. J. Pharm.**, v. 298, p. 219-232, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.023>.

VENTURINO, A. *et al.* Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, v. 8, n. 3-4), p. 167-186, 2003. <https://doi.org/10.1080/1354700031000120116>.

VIGNARDI, C.P. *et al.* Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). **Aquatic. Toxicol.**, 158, 218-229, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.008>.

VITORINO, C. *et al.* The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. **Colloids Surf. B**, v. 84, n. 1, p. 117-130, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.024>.

WACKER, M.G. *et al.* Dealing with nanosafety around the globe-Regulation vs. Innovation. **Int. J. Pharm.**, v. 509, n. 1-2, p. 95-106, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.015>.

WAKE, D.B.; VREDENBURG, V.T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 105, n. 1, p. 11466-11473, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>.

WALKER, G.W. Ecological risk assessment of nano-enabled pesticides: a perspective on problem formulation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 66, n. 26, p. 6480e6486, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02373>.

WALTERS, C.; POOL, E.; SOMERSET, V. **Nanotoxicology**: a review. Toxicology - new aspects to this scientific conundrum. InTech, p. 45-63, 2016.

WANG, Q. *et al.* Microparticle formation of sodium cellulose sulfate using supercritical fluid assisted atomization introduced by hydrodynamic cavitation mixer. **Chem. Eng. J.**, v. 159, n. 1-3, p. 220-229, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.004>.

WERNER, I.; MORAN, K. Effects of Pyrethroid Insecticides on Aquatic Organisms. In **Synthetic Pyrethroids**; American Chemical Society: v. 991, p. 310-334, 2008.

WINTER, E. *et al.* Development and evaluation of lipid nanoparticles for drug delivery: study of toxicity in vitro and in vivo. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 16, n. 2, p. 1321-1330, 2016. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11667>.

WORLDOMETERS, 2019. **World Population**. Disponível em: <https://www.worldometers.info/world-population/>. Acesso em 01 jul 2019.

YAMAMOTO, A. *et al.* Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. **J. Lab. Autom.**, v. 19, n. 5, p.483-7. Oct 2014doi: 10.1177/2211068214532254. Epub 2014 Apr 21.

YSLAS, E. I. *et al.* Polyaniline nanofibers: acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. **Chemosphere**, v. 87, n. 11, p. 1374-1380, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.033>

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

ZAIN, N.A.M., SUHAIMI, M.S., IDRIS, A. Development and modification of PVA alginate as a suitable immobilization matrix. **Process Biochem.**, v. 46, n. 11, p. 2122-2129, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.010>.

ZHANG, W. Global pesticide use: profile, trend, cost/benefit and more. **Proc. Int. Acad. Eco. Environ. Sci.**, v. 8, n. 1, p. 1–27, 2018.

ZHAO, D. *et al.* Preparation of high encapsulation efficiency fragrance microcapsules and their application in textiles. **RSC Adv.**, v. 84, p. 80924-80933, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA16030A>.

ZHELEV, Z. *et al.* Morphological and hematological parameters of *Carassius gibelio* (pisces: cyprinidae) in conditions of anthropogenic pollution in southern Bulgaria. Use of hematological parameters as biomarkers. **Trakia J. Sci.**, v. 1, p. 1–15, 2016.

ZHU, Y. *et al.* Behavior, remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments. **Environ. Res.**, v. 174, p. 54–60, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.014>.

ZOLNIK, B.S. *et al.* Minireview: nanoparticles and the immune system, **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 458–465, 2010. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1082>.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - Protocolo nº 1472160516/2016 - CEUA/UFSCar. Extraído de CEUA/UFSCAR, 2016.

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO SISTEMAS CARREADORES DE PIRETRINAS E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA EM ORGANISMOS ALVOS E NÃO-ALVOS", protocolada sob o CEUA nº 1472160516, sob a responsabilidade de **Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin** e equipe; *Cristiane Ronchi de Oliveira; Thais Deluno Garcia; Felipe Augusto Pinto Vidal; Fernando Urban Gamero; Leonardo Fernandes Fraceto; Monica Jones; Raquel Fernanda Salla* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/07/2016.

We certify that the proposal "SOLID LIPID NANOPARTICLES AS CARRIERS SYSTEMS OF PYRETHRINS AND TOXICOLOGICAL EVALUATION IN TARGET AND NON-TARGET ORGANISMS", utilizing 330 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 1472160516, under the responsibility of **Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin** and team; *Cristiane Ronchi de Oliveira; Thais Deluno Garcia; Felipe Augusto Pinto Vidal; Fernando Urban Gamero; Leonardo Fernandes Fraceto; Monica Jones; Raquel Fernanda Salla* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 07/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **06/2019** Área: **Biologia**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Anfíbios**

sexo: **Machos e Fêmeas**

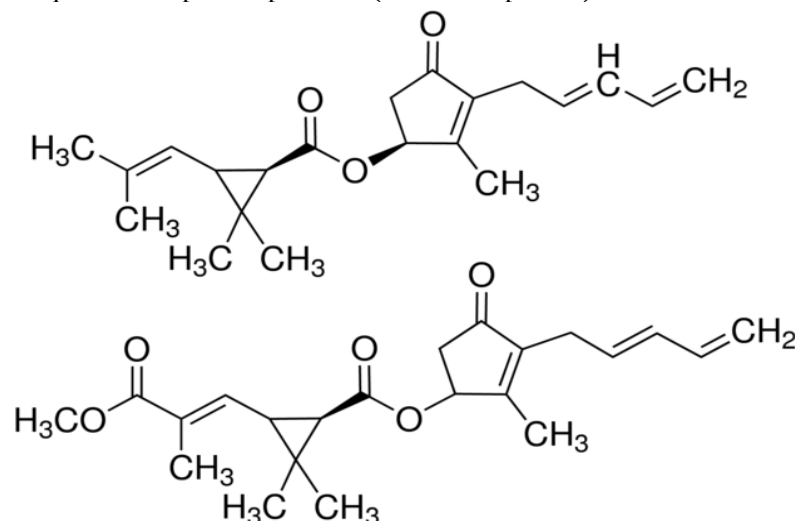
Idade: **9 a 10 dias**

N: **330**

Linhagem: **Lithobates catesbeianus**

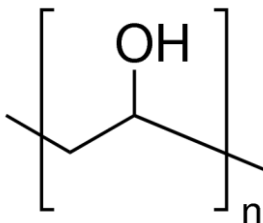
Peso: **10 a 20 g**

Anexo 2 – Estrutura química do piretro pestanal (extrato de piretro).



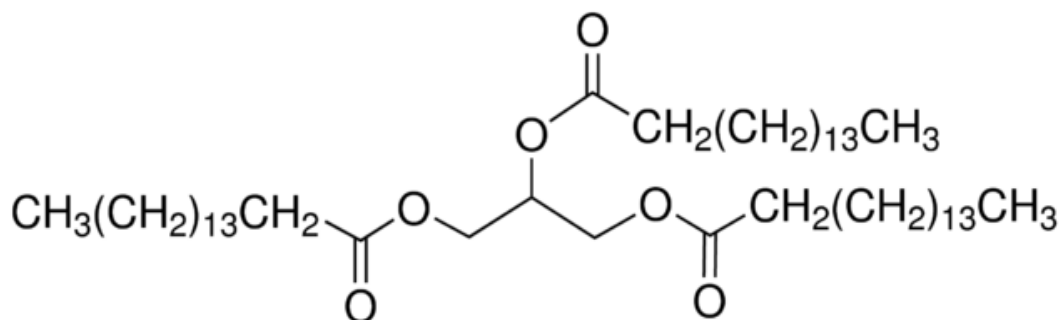
Fonte: Sigma-Aldrich (2018).

Anexo 3 - Estrutura química do álcool polivinílico (PVA).



Fonte: Sigma-Aldrich (2018).

Anexo 4 - Estrutura química do tripalmitato de glicerol (tripalmitina). Extraído de Sigma-Aldrich, 2018.



Fonte: Sigma-Aldrich (2018).

Anexo 5

Protocolo - Hematoxilina-Eosina (H.E)

Hidratar os cortes nas lâminas histológicas por 10 minutos em água destilada;

Corar por 15-20 minutos em Hematoxilina;

Lavar em água corrente por 15 minutos;

Corar por 2-5 minutos em Eosina 0,5%;

Lavar em água corrente por 5 minutos

Secar e montar ERV-Mount

Anexo 6

Protocolo - Azul de Bromofenol

Hidratar os cortes nas lâminas histológicas por 10 minutos em água destilada;

Corar em Azul de Bromofenol por 3 horas no escuro;

Lavar em água corrente por 5 minutos.

Secar e montar em ERV-Mount.

Anexo 7

Protocolo - Xilidine Ponceau

Hidratar os cortes nas lâminas histológicas por 10 minutos em água destilada;

Corar por 30 min no Xilidine Ponceau;

Lavagem rápida em água destilada (3 -5 vezes)

Secar e montar em ERV-Mount.

Anexo 8

Protocolo - Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.)

Hidratar os cortes nas lâminas histológicas por 10 minutos em água destilada;

Corar por 30 minutos em Ácido Periódico 0,4%;

Lavar três vezes em água destilada por 3 minutos;

Secar as lâminas histológicas para remoção de todo o ácido;

Colocar em reativo de Schiff por 3 horas no escuro;

Lavar em água corrente por 15-20 minutos;

Secar e montar em ERV-Mount.

Anexo 9

Protocolo - Sudan Black-B 1%

Hidratar os cortes nas lâminas histológicas por 10 minutos em água destilada;

Colocar as lâminas deitadas em uma bandeja específica para coloração;

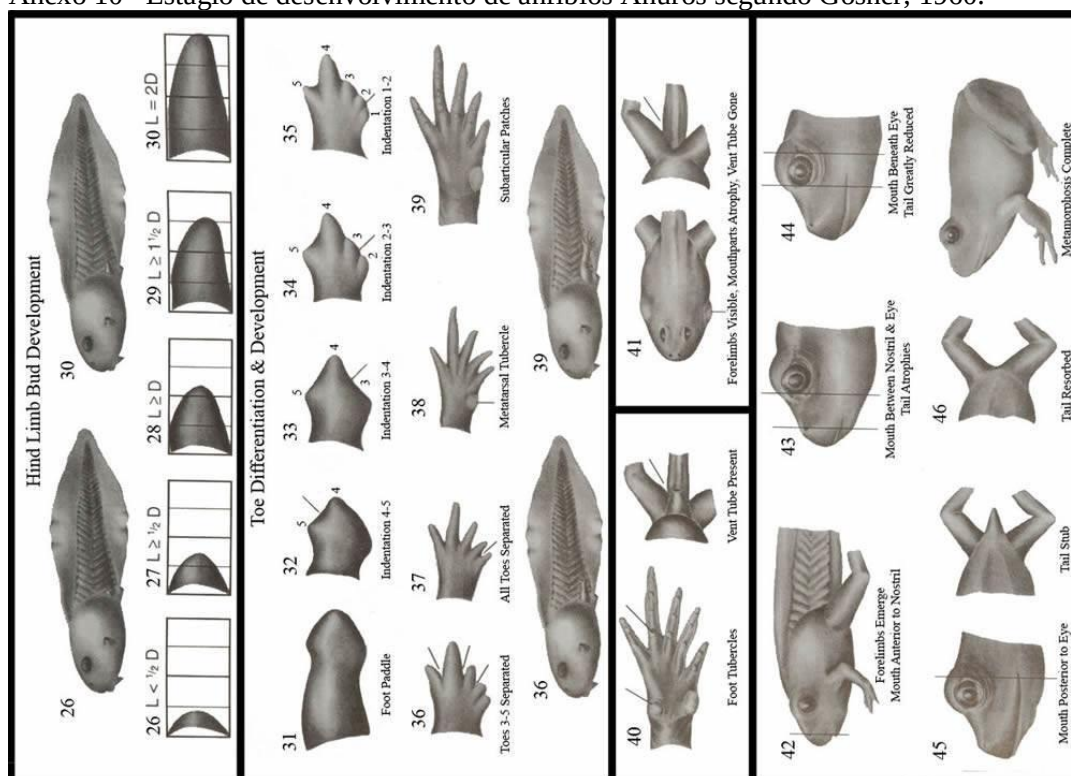
Pingar Sudan Black nos cortes histológicos por 10 minutos;

Retirar todo o excesso do corante e deixe secar a temperatura ambiente;

Lavar em água destilada rapidamente;

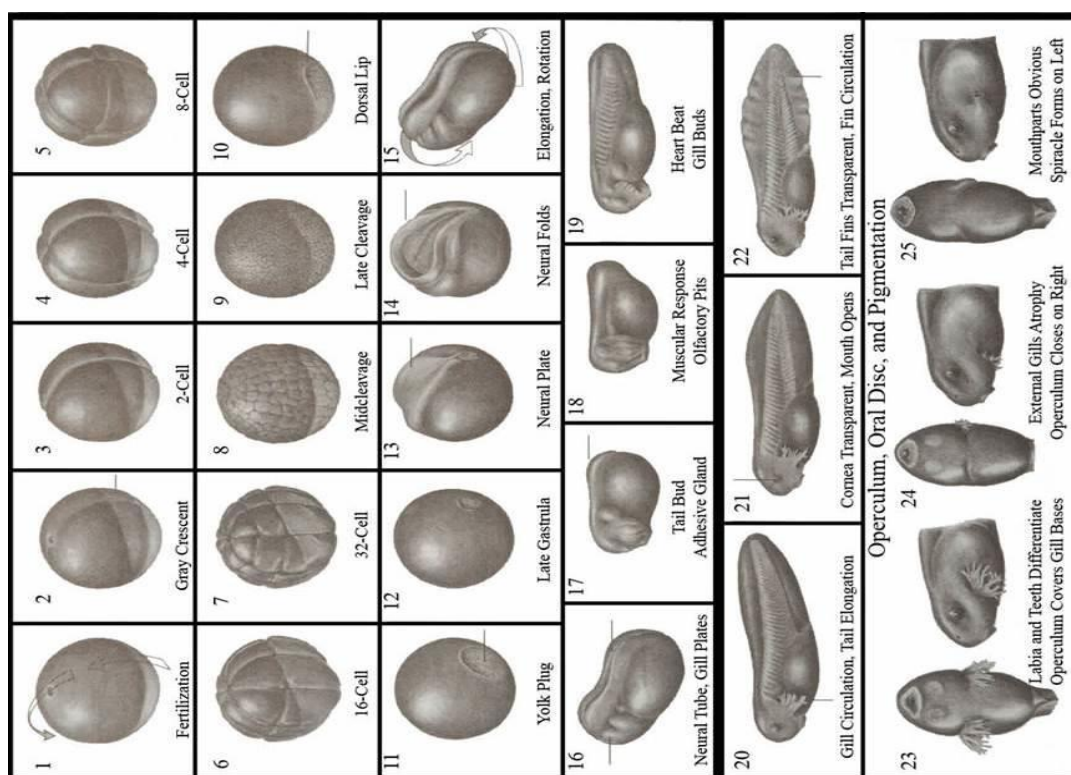
Secar e montar em Bálsamo.

Anexo 10 –Estágio de desenvolvimento de anfíbios Anuros segundo Gosner, 1960.



LARVAE

METAMORPHS



EMBRYOS

HATCHLINGS

Fonte: Virginia Herpetological Society (2013).

Anexo 11

Protocolo – Rosenfeld (May-Grunwald e Giemsa)

Pingar 15 gotas de May-Grunwald nos cortes histológicos por 3-4 minutos;

Pingar 15 gotas de água destilada nos cortes histológicos por 1 minuto e descartar o excesso;

Pingar 15 gotas de Giemsa 7,5% nos cortes histológicos por 15 minutos;

Retirar todo o excesso do corante e lavar em água corrente;

Secar e montar em ERV-mount.

Anexo 12

Protocolo – Azul de Toluidina com Bórax (1:1)

Hidratar os cortes nas lâminas histológicas por 10 minutos em água destilada;

Colocar as lâminas deitadas em uma bandeja específica para coloração;

Cobrir os cortes histológicos com solução de Azul de Toluidina por 30 segundos;

Lavar em água corrente e retirar todo o excesso do corante;

Secar e montar em ERV-Mount.

Anexo 13

Protocolo - Azul da Prússia

Hidratar os cortes nas lâminas histológicas por 10 minutos em água destilada;

Incubar as lâminas em solução de 0,1g de ferrocianeto de potássio em 5mL ácido clorídrico (0,75 mol/L) por 15 minutos;

Lavar em água destilada;

Contra corar os núcleos com vermelho neutro aquoso 0,5% rapidamente;

Contra corar o citoplasma com eosina aquosa 0,5% rapidamente;

Lavar em água destilada rapidamente;

Secar e montar em ERV-Mount.

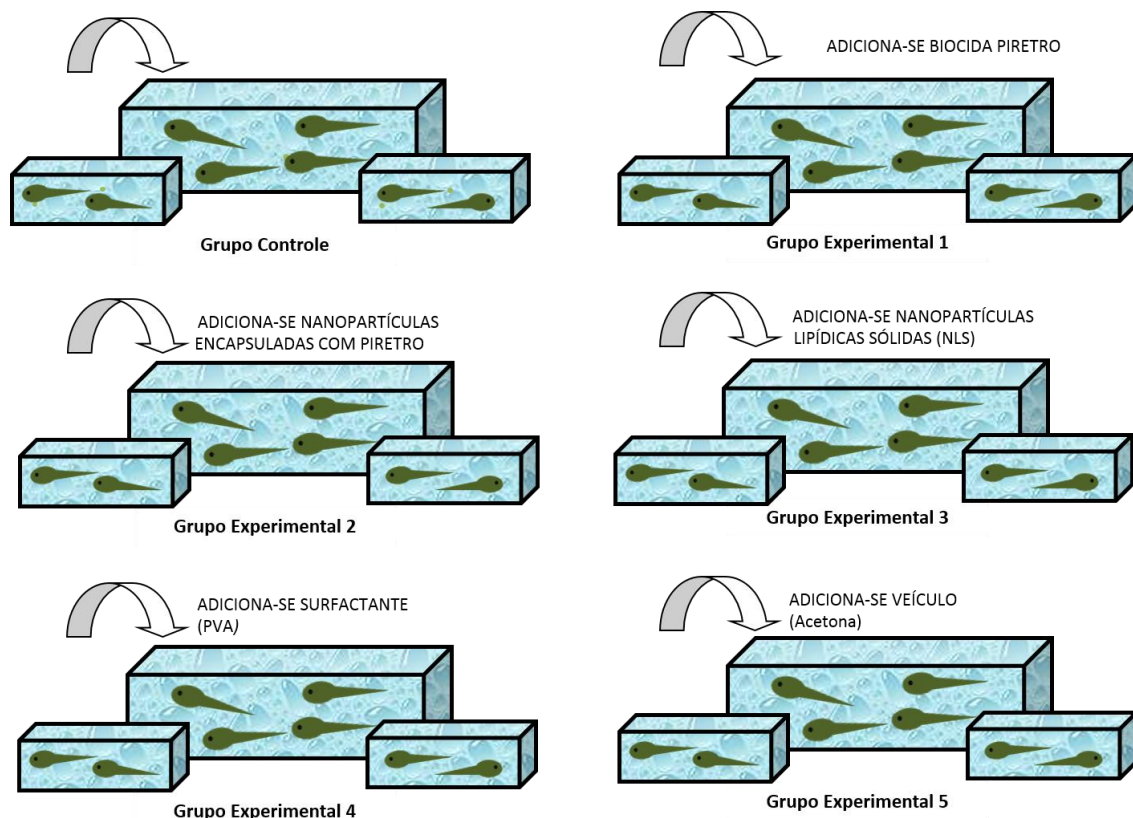
APÊNDICES

Apêndice 1 – Esquema experimental do bioensaio de exposição aguda em abelhas (*Apis mellifera* Africanizada).



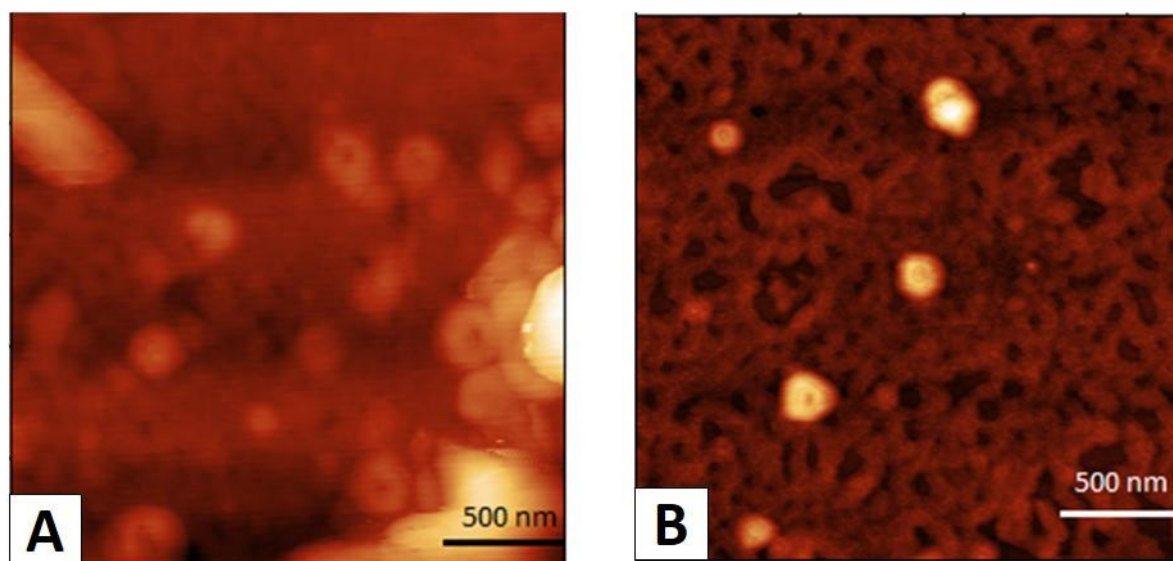
Fonte: Autoria própria (2018).

Apêndice 2 – Esquema experimental do bioensaio de exposição aguda em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).

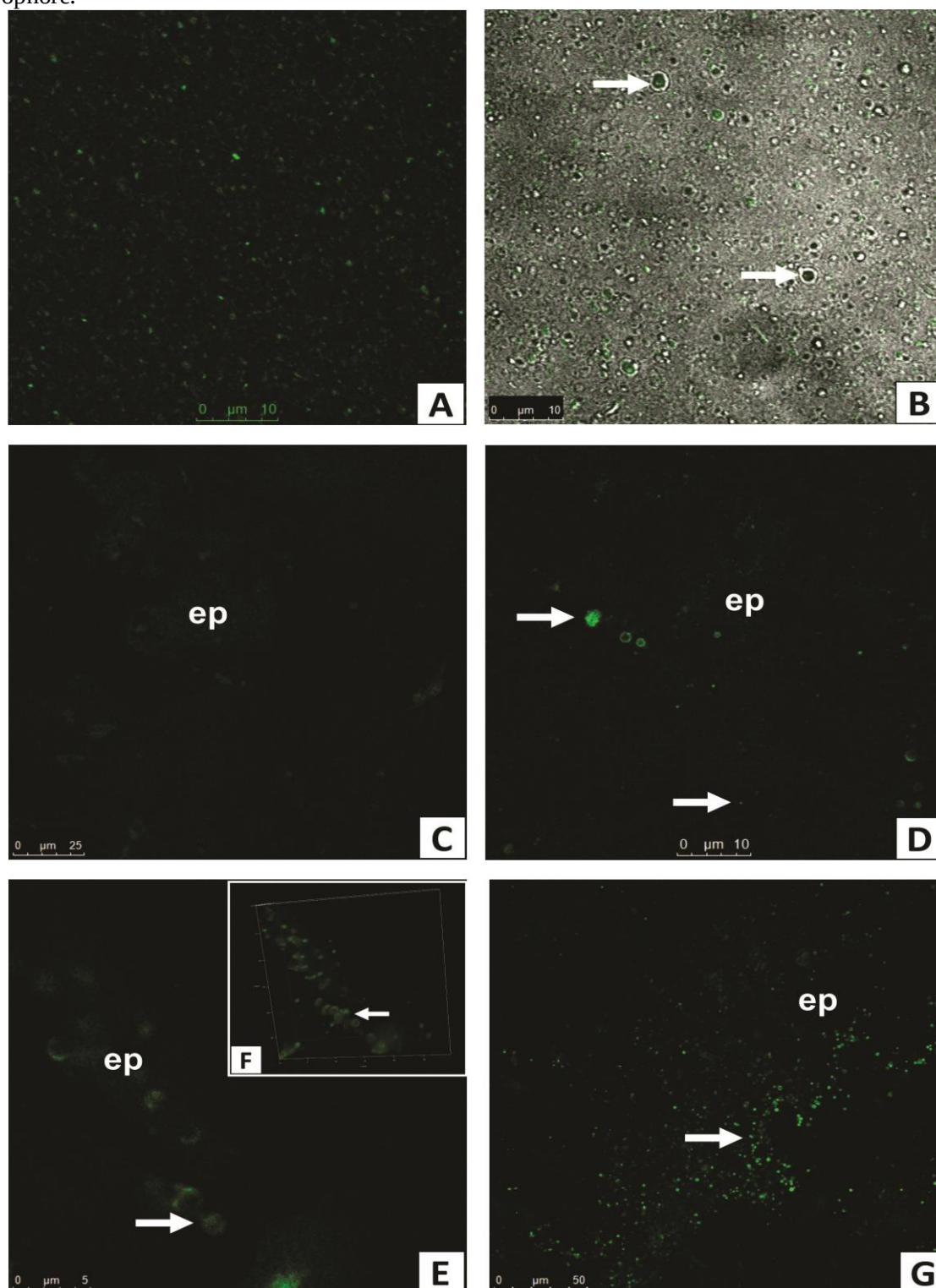


Fonte: Autoria própria (2018).

Apêndice 4 (Appendix 4) - The morphology of nanoparticles with and without pyrethrum extract using AFM technique. The nanoparticles showed spherical shape and mean diameter of A) SLN with 271 ± 74 nm, and B) SLN+PYR with 274 ± 52 nm. The samples were diluted 10000 times in distilled water and deposited onto silica plates. The images were carried out using non-contact mode.



Apêndice 5 (Appendix 5) – Solid lipid nanoparticles with fluorophore-labelled and absorption in honeybee midgut after oral ingestion using Laser Confocal Scanning Microscope (Leica®). A-B) Solid lipid nanoparticles with fluorophore-labelled; C) Honeybee midgut of control group no-labelled; D) Honeybee midgut of exposed group showed positive labell in 2 h after oral exposure; E-G) Honeybee midgut of exposed group showed positive labell in 4 h after oral exposure. The samples of SLN were prepared with 18:0 NDB/PE (NBD-DSPE) fluorophore, the intensity of labelledion is evidenced by green fluorescence. Legend: ep – epithelium of digestive cells, White arrow – positive marking for flurophore.



Fonte: Autoria própria (2019).