



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

WILLIAN DE PAULA SANTOS

**EFEITOS DE EXPOSIÇÕES AGUDAS AO GERANIOL EM
GIRINOS *Aquarana catesbeiana*:
COMPARAÇÃO ENTRE AS FORMAS LIVRE E
NANOENCAPSULADA**

Londrina
2024



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Instituto Nacional de
Ciência e Tecnologia em
Nanotecnologia para
Agricultura Sustentável

WILLIAN DE PAULA SANTOS

**EFEITOS DE EXPOSIÇÕES AGUDAS AO GERANIOL EM
GIRINOS *Aquarana catesbeiana*: COMPARAÇÃO ENTRE
AS FORMAS LIVRE E NANOENCAPSULADA**

WILLIAN DE PAULA SANTOS

**EFEITOS DE EXPOSIÇÕES AGUDAS AO GERANIOL EM
GIRINOS *Aquarana catesbeiana*: COMPARAÇÃO ENTRE
AS FORMAS LIVRE E NANOENCAPSULADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

W732e Santos, Willian de Paula.
Efeitos de exposições agudas ao geraniol em girinos *Aquarana catesbeiana* : comparação entre as formas livre e nanoencapsulada / Willian de Paula Santos. - Londrina, 2024.
155 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Anuros - Tese. 2. Biomarcadores - Tese. 3. Nanotecnologia - Tese. 4. Monoterpeno - Tese. I. Martinez, Claudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA REMOTA DE DISSERTAÇÃO

Aos 29 dias do mês de julho do ano de 2024, em sala remota do Google Classroom, desta Universidade, às 09:30 horas, reuniu-se a Banca Examinadora homologada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, composta por Dra. Claudia Bueno Dos Reis Martinez como presidente da banca, Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob e Dr. Eduardo Alves De Almeida. A reunião teve por objetivo julgar o trabalho do estudante WILLIAN DE PAULA SANTOS sob o título: "EFEITOS DE UM NANOBIOPESTICIDA A BASE DE GERANIOL EM GIRINOS DE AQUARANA CATESBEIANA". Os trabalhos foram abertos pela professora Dra. Claudia Bueno Dos Reis Martinez. A seguir, foi dada a palavra ao estudante para apresentação do trabalho. Cada examinador arguiu o Mestrando, com tempos iguais de arguição e resposta. Terminadas as arguições, procedeu-se ao julgamento do trabalho, sendo que os membros remotos Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob e Dr. Eduardo Alves De Almeida enviaram simultaneamente seus formulários de avaliação os quais foram impressos e anexados à presente ata, concluindo a Banca Examinadora por sua APROVAÇÃO. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelo presidente.

O estudante deverá reformular seu trabalho no prazo de _____ dias: () SIM (X) Não

Se houver alteração no título do trabalho, informar o novo título abaixo:

Efeitos de exposições agudas ao geraniol em girinos *Aquarana catesbeiana*: comparação entre as formas livre e nanoencapsulada

Obs.: Este documento não deve conter rasuras ou corretivo e deve ser preenchido de forma legível.

Londrina, 29 de Julho de 2024.

PRESIDENTE

Dra. CLAUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ

UEL

TITULARES

Dra. RAQUEL FERNANDA SALLA JACOB

UH

Dr. EDUARDO ALVES DE ALMEIDA

FURB

AGRADECIMENTOS

Todo ciclo que se encerra é marcado por pessoas com as quais compartilhamos momentos que nos ajudaram de alguma forma. Não posso deixar de lembrar delas.

Gostaria de começar agradecendo meus pais, Ester e Osmar. Obrigado por sempre terem sido meu incentivo e suporte durante todos os anos da minha vida. Esse suporte me ensinou e ainda me ensina coisas que nenhuma graduação ou mestrado podem ensinar.

Aos meus irmãos e suas esposas, Guilherme e Jean, Juliana e Amanda. Obrigado por darem sentido à palavra “fraternidade”, e também pela ternura e carinho.

Aos meus sobrinhos, Ana Laura e Luiz Guilherme. Cada sorrisos, risadas, abraços e brincadeiras nossas me fazem ter mais vontade de ser um exemplo para vocês.

À minha tia, Maria Elena. Obrigado por todo seu suporte quanto à educação. Sou quem eu sou hoje, em partes por conta do seu constante incentivo.

À Prof^a. Dr^a. Claudia. Obrigado por ter me aceitado como orientando há alguns anos e ter me dado a oportunidade de descobrir e me apaixonar pela ecotoxicologia. Sobretudo, obrigado pela paciência e também por compartilhar seus conhecimentos, que considero uma das coisas mais valiosas.

À todas as gerações de integrantes do LEFA das quais eu fiz parte, que me ensinaram tanto e pude desenvolver ótimas amizades. Em especial a atual: Carol G., Carol S., Gabi, Jamille, Ju, Letícia, Milena, Raquel, Sarah, Tiago, Vanessa e Wagner. Compartilhar a rotina com vocês, faz com que ela fique mais leve. Obrigado por todos as figurinhas trocadas e também por todos os *happy hours* (“Bora” no Tomio?).

Particularmente, gostaria de agradecer à Carol G. Chegar antes de todos (mais específico, às 7h30 da manhã haha), passar um café e conversar sobre qualquer coisa, sempre ficará registrado com carinho em minhas lembranças. Muito obrigado por toda a parceria durante esses anos de LEFA. Sei que posso contar com você para tudo, dentro e fora do lab.

À minha família londrinense, Bi, Josué, Gamora e Shazan. Chegar em casa e saber que sempre tenho um ambiente acolhedor e aconchegante, onde se pode ser quem realmente é, não tem preço.

Aos amigos que fiz pelo caminho: Tay, Mayla, Let, Ju, Gi, Bela e Andrey. Alguns dos momentos que sou mais feliz são quando estou com vocês. Obrigado por me permitirem dividir as conquistas e angústias com vocês.

Excepcionalmente, gostaria de agradecer à Bela e Let. Obrigado por terem aceitado se tornarem “ecotoxicólogas” por alguns dias, me auxiliando nos meus experimentos. A ajuda de vocês contribuiu significativamente para o meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Aline Theodoro, que auxiliou nas análises químicas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e ao Dr. Jhones Luís de Oliveira e toda a equipe do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da UNESP, que sintetizaram e caracterizaram os xenobióticos utilizados neste trabalho.

Gostaria de agradecer aos membros titulares da banca examinadora, Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida e Prof^a. Dr^a. Raquel Fernanda Salla. Obrigado por terem prontamente aceitado a compor minha banca de defesa e por agregarem com seus conhecimentos para a minha formação.

Aos membros suplentes da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Caroline Santos e Prof. Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira. Obrigado por terem aceitado contribuir para este trabalho com seus conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UEL.

Não poderia deixar de agradecer às agências financiadoras deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado. Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro (Processo: 405799/2021-7) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanotecnologia para Agricultura Sustentável (INCT-NanoAgro).

Por fim, gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Londrina, que tem sido minha casa pelos últimos seis anos. Por toda a infraestrutura e oportunidade de desenvolver os trabalhos.

"Nunca seja tão inteligente que se esqueça de sua gentileza. Nunca seja tão gentil que se esqueça de sua inteligência."
– *Taylor Swift*

SANTOS, Willian de Paula. **Efeitos de exposições agudas ao geraniol em girinos *Aquarana catesbeiana*: comparação entre as formas livre e nanoencapsulada.** 2024. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

Na busca por uma agricultura verde, algumas alternativas para os agrotóxicos sintéticos de uso atual surgem como promessas sustentáveis. O emprego da nanotecnologia na forma de nanopesticidas tem se mostrado eficaz e as nanocápsulas de zeína se mostram candidatas para o nanoencapsulamento de substâncias com atividade biológica. O geraniol é um monoterpreno extraído de diversas espécies vegetais e que apresenta uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos fungicidas e inseticidas. Desta forma, nanocápsulas de zeína carregadas com geraniol podem ser uma opção promissora para substituir os agrotóxicos de uso atual, ao combinar as características únicas das nanopartículas com os efeitos pesticidas do geraniol, a fim de evitar seus potenciais efeitos prejudiciais em organismos não-alvo. Os anuros estão dentre os vertebrados que mais sofrem com as atividades agrícolas, visto que a diminuição global da população de anfíbios está intimamente atrelada ao uso exacerbado de agrotóxicos. Assim, esta dissertação teve o objetivo de avaliar e comparar os efeitos de exposições agudas (24 e 96h) ao geraniol nanoencapsulado (nGER) e seus constituintes: nanocápsulas de zeína (NANO) e geraniol livre (GER), para girinos de *Aquarana catesbeiana*. Para decidir qual concentração seria utilizada nos experimentos, foi conduzido um experimento piloto, onde os animais (n=60) foram expostos à água desclorada, ao solvente (pluronic), e à diferentes concentrações do nGER (1, 5, 10 e 20 mg L⁻¹), totalizando 6 grupos constituídos por 6 aquários (n=10 animais/aquário). Os resultados apontaram que altas concentrações de nGER (10 e 20 mg L⁻¹) induzem letargia nos animais. Entretanto, efeitos sobre a acetilcolinesterase foram observados apenas na concentração de 5 mg L⁻¹. Com base nestes resultados, foram conduzidos experimentos com animais (n=192) expostos (24 e 96h, experimentos independentes) à água desclorada + solvente, NANO, GER e nGER (todos à 5 mg L⁻¹). Os grupos de cada tratamento continham 8 aquários (n=3 animais/aquário), com até 10 L de meio de exposição. Análises físico-químicas das nanopartículas nos aquários revelaram que elas podem ter sido absorvidas pelos animais. O Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) indicou que NANO provocou menores efeitos sobre os biomarcadores avaliados em *A. catesbeiana* em comparação aos demais tratamentos. Já nGER produziu efeitos intermediários, mas mais parecidos com GER, que foi o tratamento que mais alterou os biomarcadores dos girinos, em ambos os tempos experimentais. De maneira geral, pode-se perceber uma maior relação de NANO com os biomarcadores de osmorregulação, enquanto GER e nGER estavam mais relacionados às alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo. Entretanto, todos os tratamentos induziram alterações nucleares eritrocíticas em 24h, indicando um potencial genotóxico. As brânquias foram o tecido menos sensível aos tratamentos, ao passo que mais alterações foram observadas no plasma e sangue, seguido do fígado. A hipótese de que o nGER induziria menos alterações que GER foi atendida. Além disso, as NANO parecem ser seguras aos girinos *A. catesbeiana*. Porém, embora nGER tenha causado menos efeitos que GER, seus efeitos ainda foram consideráveis para classificá-lo como seguro para estes animais.

Palavras-chave: Anuros. Biomarcadores. Nanotecnologia. Monoterpeno. Rã-touro.

SANTOS, Willian de Paula. **Effects of acute exposure to geraniol on *Aquarana catesbeiana* tadpoles: comparison between free and nanoencapsulated forms.** 2024. (78) 155pp. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

In the search for a greener agriculture, some alternatives to synthetic pesticides have emerged, with sustainable promises. The use of nanotechnology in the form of nanopesticides has proven effective and zein nanocapsules are candidates for the nanoencapsulation of substances with biological activity. Geraniol is a monoterpene that is extracted from several plant species which presents a wide range of biological activities, including fungicidal and insecticidal effects. Thus, zein nanocapsules loaded with geraniol can be a promising option to currently used pesticides, by combining the unique characteristics of nanoparticles with the pesticide effects of geraniol in order to avoid its harmful potential effects on non-target organisms. Anurans are one of the vertebrates that most suffer from agricultural activities, given that the global decline in the amphibian population is closely linked to the exacerbated use of pesticides. Thus, this dissertation aimed to evaluate and compare the effects of acute exposures (24 and 96h) to nanoencapsulated geraniol (nGER) and its constituents: zein nanocapsules (NANO) and free geraniol (GER), on *Aquarana catesbeiana* tadpoles. A pilot experiment was conducted to establish the concentrations to be used in the experiments, where the animals (n=60) were exposed to dechlorinated water, the solvent (pluronic) and different concentrations of nGER (1, 5, 10 and 20 mg L⁻¹), totaling 6 groups consisting of 6 aquariums each (n=10 animals/aquarium). The results showed that high concentrations of nGER (10 and 20 mg L⁻¹) induced lethargy in the animals. However, effects on acetylcholinesterase were only observed at a concentration of 5 mg L⁻¹. Based on these results, experiments were conducted with animals (n=192) exposed (for 24 and 96h, in independent experiments) to dechlorinated water + solvent, NANO, GER and nGER (all at 5 mg L⁻¹). For each treatment, tadpoles were distributed in 8 aquariums (n=3 animals/aquarium) with up to 10 L of exposure medium. Physicochemical analyses of nanoparticles in the aquariums revealed that they may have been absorbed by the animals. The Integrated Biomarker Response Index (IBR) indicated that NANO caused lesser effects on the biomarkers in comparison to the other treatments. nGER produced intermediate effects, that were more similar to GER, which was the treatment that most altered tadpole biomarkers at both experimental times. In general, a greater relationship between NANO and osmoregulation biomarkers was found, while GER and nGER were more related to alterations in energy metabolism and oxidative stress. However, all xenobiotics induced erythrocytic nuclear abnormalities within 24 hours, demonstrating a genotoxic potential. The gills were the tissue least sensitive to exposure to the treatments, while plasma and blood demonstrated the greatest alterations, followed by the liver. The hypothesis that nGER would induce fewer changes than GER was proven. Furthermore, NANO appears to be safe for *A. catesbeiana* tadpoles. However, although nGER caused fewer effects than GER, its effects were still considerable, making it difficult to be classified as safe for these animals.

Key-words: Anuran. Biomarkers. Bullfrog. Nanotechnology. Monoterpene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes vias de entrada de agrotóxicos nas águas superficiais	30
Figura 2 – Vias dos Efeitos Adversos de um agente tóxico no organismo	32
Figura 3 – Principais enzimas e transportadores presentes nas células ricas em mitocôndrias, das brânquias de animais aquáticos.	34
Figura 4 – Mobilização das reservas energéticas durante o estresse fisiológico ...	35
Figura 5 – Estresse Oxidativo gerado pelo desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e concentração de moléculas antioxidantes com subsequente dano em diferentes compartimentos celulares.	36
Figura 6 – Representação esquemática dos sistemas antioxidantes celulares....	37
Figura 7 – Diferentes classes de danos ao DNA de eritrócitos de <i>Prochilodus lineatus</i>	48
Figura 8 – Formação de micronúcleo e outras alterações eritrocíticas nucleares durante o ciclo celular. A) Célula binucleada; B) Núcleo evaginado; C) Núcleo lobado; D) Núcleo vacuolado	39
Figura 9 – Localização e ação da enzima acetilcolinesterase em sinapses colinérgicas	41
Figura 10 – Rã-touro-americana (<i>Aquarana catesbeiana</i>) adulta.....	45
Figura 11 – Acasalamento de rãs-touro americanas (<i>A. catesbeiana</i>).....	46
Figura 12 – Girino <i>A. catesbeiana</i> entre os estágios 25-31 (Gosner, 1960).....	47
Figura 13 – Distribuição nativa da rã-touro-Americana (<i>A. catesbeiana</i>)	47
Figura 14 – Estrutura química do geraniol	49
Figura 15 – Modelo de estrutura da zeína proposto por Momany et al., 2006	52
Figura 16 – Concentração de partículas (eixo Y) pelo seu tamanho (eixo X) ao decorrer do tempo (0, 48 e 96h) para cada grupo experimental (A-C: nGER 1; D-F: nGER 5; G-I: nGER 10; e J-K: nGER 20)	76
Figura 17 – Número de indivíduos de <i>Aquarana catesbeiana</i> letárgicos durante exposição de 96h aos diferentes tratamentos (CTR, PLU, nGER1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Média $\pm$ E.P.; n = 8	77
Figura 18 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo caudal de	

girinos de <i>Aquarana catesbeiana</i> após 96h de exposição aos diferentes tratamentos (CTR, PLU, nGER 1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Média $\pm$ E.P.; $n = 8$	78
Figura 19 – Concentração de partículas (eixo Y) pelo seu tamanho (eixo X) ao decorrer do tempo (0, 48 e 96h) para cada grupo experimental (A-C: NANO; D-F: nGER)	98
Figura 20 – Caracterização dos leucócitos (A: basófilo; B: eosinófilo; C: linfócito; D: monócito e E: neutrófilo) e trombócitos (F) no sangue de <i>Aquarana catesbeiana</i> de diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) em 24 e 96h. Escala: 20 μ m. Aumento: 1000x. Coloração: kit Panótico rápido.	100
Figura 21 – Concentração de hemoglobina (Hb) no sangue de girinos de <i>Aquarana catesbeiana</i> dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., $n = 8$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).....	100
Figura 22 – Atividade das bombas de sódio/potássio (NKA) (A), prótons (HATP) (B) e cálcio (CaATP) (C) nas brânquias de girinos de <i>Aquarana catesbeiana</i> dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., $n = 8$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).....	102
Figura 23 – Glicemia (A), concentração de lactato plasmática (B), conteúdo de glicogênio hepático (C) e muscular (D) de girinos de <i>Aquarana catesbeiana</i> dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., $n = 8$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).....	103
Figura 24 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro (A) e no músculo (B) de girinos de <i>Aquarana catesbeiana</i> dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., $n = 8$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$)	104
Figura 25 – Análise de componentes principais (PCA) usando respostas significativas de biomarcadores (Ab: acetilcolinesterase cerebral;	

Am: acetilcolinesterase muscular; CaATP: cálcio-ATPase; Cl: cloreto; Eosi: eosinófilos; G: glicose; GLYh: glicogênio hepático; GLYm: glicogênio muscular; HATP: hidrogênio-ATPase; Hb: hemoglobina; K: potássio; L: lactato; Lynf: linfócitos; Na: sódio) em amostras de diferentes tecidos de *A. catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER, após 24 e 96 h de exposição..... 105

Figura 26 – Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos seguintes biomarcadores: Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), H⁺-ATPase (HATP), Ca²⁺-ATPase (CaATP), Glicogênio (Glycogen), Ca²⁺ (Calcium), Cl⁻ (Chloride), Na⁺ (Sodium), K⁺ (Potassium), Glicose (Glucose), Lactato (Lactate), Hemohlobina (Hemoglobin) e acetilcolinesterase (AChE) em diferentes tecidos (G = brânquia, L = fígado, P = plasma, B = sangue, Br = cérebro e M = músculo) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), nGER (radar vermelho) e GER (radar verde) por 24h (esquerda) e 96h (direita). Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador 106

Figura 27 – Escore de danos no DNA (Média ± E.P, n=8) de eritrócitos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER. (p < 0,05)..... 132

Figura 28 – Diferentes classes de dano ao DNA de eritrócitos de *Aquarana catesbeiana* expostos aos grupos CTR, NANO, GER e nGER por 24h (A) e 96h (B). Letras diferentes sinalizam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05)..... 132

Figura 29 – Caracterização dos diferentes tipos de alterações nucleares eritrocíticas (ENA) no sangue de girinos *Aquarana catesbeiana*: micronúcleo (MN); célula binucleada (BC); núcleo lobulado (LN); núcleo reniforme (RN); núcleo segmentado (SN); núcleo vacuolado (VN). Aumento: 1000x. Coloração: Laranja de Acridina..... 133

Figura 30 – Ocorrência de lipoperoxidação (LPO) nas brânquias (A) e fígado (B) de girinos *Aquarana catesbeiana* dos diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER). Média ± E.P. (n=8). Letras diferentes

indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo tempo experimental ($p < 0,05$) 134

Figura 31 – Defesas antioxidantes nas brânquias de girinos *Aquarana catesbeiana* em diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) após exposições agudas (24 e 96h). A: atividade da superóxido dismutase (SOD); B: atividade da catalase (CAT); C: atividade da glutathione-S-transferase (GST); D: concentração de glutathione reduzida (GSH). Média $\pm$ E.P. (n=8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo tempo experimental..... 135

Figura 32 – Defesas antioxidantes no fígado de girinos *Aquarana catesbeiana* em diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) após exposições agudas (24 e 96h). A: atividade da superóxido dismutase (SOD); B: atividade da catalase (CAT); C: atividade da glutathione-S-transferase (GST); D: concentração de glutathione reduzida (GSH). Média $\pm$ E.P. (n=8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo tempo experimental..... 135

Figura 33 – Análise de componentes principais (PCA) dos biomarcadores de *A. catesbeiana* expostos a NANO, GER e nGER durante 24 e 96h. Os vetores representam os biomarcadores analisados que apresentaram diferenças significativas em cada tecido. Eles são apresentados pelas abreviações dos biomarcadores + abreviações dos tecidos + tempo de exposição. Biomarcadores: DNA1 (danos ao DNA de classe 0); DNA2 (danos ao DNA de classe 2); DNA3 (danos ao DNA de classe 3); AEN (alterações nucleares eritrocíticas); LN (núcleo lobulado); SN (núcleo segmentado); SOD (atividade da superóxido dismutase); CAT (atividade da catalase); GST (atividade da glutathione-S-transferase); GSH (concentração de glutathione reduzida); LPO (lipoperoxidação). Tecidos: brânquias (g); fígado (l), sangue (sem código). Tempos experimentais: 24 (24h); 96 (96h). Separação dos grupos por cores: CTR (vermelho); NANO (azul); GER (verde) e nGER (roxo)..... 136

Figura 34 – Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos

seguintes biomarcadores: glutathione-S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA (DNA_Damage), alterações nucleares eritrocíticas (ENA) em diferentes tecidos (G = brânquia, L = fígado e B = sangue) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), nGER (radar verde) e GER (radar lilás) por 24h (esquerda) e 96h (direita). Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador..... 138

Figura 35 – Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos seguintes biomarcadores: Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HATP), Ca^{2+} -ATPase (CaATP), Glicogênio (Glycogen), Ca^{2+} (Calcium), Cl^- (Chloride), Na^+ (Sodium), K^+ (Potassium), Glicose (Glucose), Lactato (Lactate), Hemoglobina (Hemoglobin), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA (DNA_Damage), alterações nucleares eritrocíticas (ENA) e acetilcolinesterase (AChE) em diferentes tecidos (G = brânquias; L = fígado; Br = cérebro e M = músculo) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), GER (radar verde) e nGER (radar vermelho) por 24h. Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador..... 151

Figura 36 – Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos seguintes biomarcadores: Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HATP), Ca^{2+} -ATPase (CaATP), Glicogênio (Glycogen), Ca^{2+} (Calcium), Cl^- (Chloride), Na^+ (Sodium), K^+ (Potassium), Glicose (Glucose), Lactato (Lactate), Hemoglobina (Hemoglobin), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA (DNA_Damage), alterações nucleares eritrocíticas (ENA) e acetilcolinesterase (AChE) em diferentes

tecidos (G = brânquias; L = fígado; Br = cérebro e M = músculo) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), GER (radar verde) e nGER (radar vermelho) por 96h. Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador 152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho, spam e concentração de nanopartículas obtidas por ARN em amostras coletadas dos diferentes tratamentos experimentais (nGER 1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20) no tempo 0, após 48 e 96h de exposição	76
Tabela 2 – Tamanho, spam e concentração de nanopartículas obtidas por NTA em amostras coletadas dos diferentes tratamentos experimentais (NANO e nGER) no tempo 0, após 48 e 96h de exposição	98
Tabela 3 – Concentração de geraniol na água dos aquários em diferentes tempos experimentais	99
Tabela 4 – Caracterização dos leucócitos no sangue de <i>A. catesbeiana</i>	99
Tabela 5 – Concentrações plasmáticas dos principais íons envolvidos na osmorregulação de <i>A. catesbeiana</i>	101
Tabela 6 – Alterações nucleares eritrocíticas em <i>A. catesbeiana</i>	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-SH	Grupamento Sulfidrila
$\approx$	Aproximadamente Igual a
%	Por Cento
‰	Por Milhar
°C	Graus Célsius
®	Registrado
>	Maior que
A549	Carcinoma Pulmonar Humano
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina Difosfato
Ag	Prata
ATP	Adenosina Trifosfato
BASO	Basófilo
BC	Célula Binucleada
BN	Botões Nucleares
bNAg	Nanopartículas de Prata Biogênicas
Ca²⁺	Cálcio
CaATP	Cálcio-ATPase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CbE	Carboxilesterase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Ch	Colina

Cl⁻	Cloreto
CL₅₀	Concentração Letal Média
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
CO₂	Dióxido de Carbono
CTR	Controle
D.P.	Desvio Padrão
DIO3	Deiodinase III
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	5,5-ditiobis-2-ácido Nitrobenzóico
E.P.	Erro Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ENA	Alterações Nucleares Eritrocíticas
EOSI	Eosinófilo
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAPESP	Fundação de Apoio ao Pesquisador do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Força G
G6PDH	Glicose-6-fosfato Desidrogenase
GC	Glicocorticoide
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
GER	Geraniol
GPP	Geranil Difosfato
GPx	Glutationa Peroxidase

GSH	Glutationa Reduzida
GST	Glutationa-S-transferase
h	hora
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
HATP	Próton-ATPase
Hb	Hemoglobina
HepG2	Carcinoma Hepatocelular Humano
IA	Ingrediente Ativo
IBR	Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
IP	Pastagem Intensiva
K⁺	Potássio
K₂SO₄	Sulfato de Potássio
KH₂PO₄	Fosfato de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
LDH	Lactato Desidrogenase
LEFA	Laboratório de Ecofisiologia Animal
LEIMAA	Laboratório de Estudos Interdisciplinares do Meio Ambiente e de Alimentos
LN	Núcleo Lobulado
LPO	Lipoperoxidação
LYNF	Linfócito
m	Massa
M	Molar

MCR	Células Ricas em Mitocôndrias
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
MgSO₄	Sulfato de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MN	Micronúcleo
MONO	Monócito
mOsm	Miliosmoles
mV	Milivolts
N	Normal
Na⁺	Sódio
NAD⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
NaHPO₄	Fosfato de Sódio
NANO	Nanocápsulas de Zeína
NaOH	Hidróxido de Sódio
NEUT	Neutrófilo
nGER	Geraniol Nanoencapsulado
NKA	Sódio/Potássio-ATPase
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NP	Nanopartícula
NTA	Análise de Rastreamento de Nanopartículas
O₂	Oxigênio

O₂^{•-}	Ânion Superóxido
OE	Óleos Essenciais
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
P.M.	Peso Molecular
PC1	Componente 1
PC2	Componente 2
PCA	Análise de Componentes Principais
PCO	Carbonilação de Proteínas
PI	Padrão Interno
Pi	Fosfato Inorgânico
PLU	Pluronic F-68®
ppb	Partes por bilhão
ptn	Proteína
RN	Núcleo Reniforme
SC	Conversão Pasto-cana-de-açúcar
SN	Núcleo Segmentado
SN	Sistema Nervoso
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TR-β	Receptor De Tireoide Beta
TROM	Trombócito
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNILA	Universidade Federal da Integração Latino Americana
UT	Unidade Nefelométrica de Turbidez
UV	Ultravioleta
v	Volume
VN	Núcleo Vacuolado
vs	<i>versus</i>
x	Vezes
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometros
µmol	Micromol
µS	Microsiemens

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho está organizado de forma a atender às normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, para a defesa de dissertação. O Capítulo I, se trata de uma introdução geral para contextualização do tema abordado neste trabalho, bem como os objetivos gerais e específicos, além da hipótese levantada. Em seguida, os Capítulos II, III e IV referem-se aos manuscritos elaborados a partir do projeto de pesquisa desenvolvido. O Capítulo II contém o manuscrito “Diferentes concentrações de geraniol nanoencapsulado induzem letargia e atividade da acetilcolinesterase em girinos *Aquarana catesbeiana*” e está formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (fator de impacto: 2,7). O Capítulo III apresenta o manuscrito “Efeitos do geraniol livre e nanoencapsulado em girinos *Aquarana catesbeiana*: biomarcadores fisiológicos”, que está formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico *Journal of Hazardous Materials* (fator de impacto: 12,2). Já o Capítulo IV refere-se ao manuscrito “Efeitos do geraniol nanoencapsulado para girinos da rã-touro-americana: biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade”, formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico *Chemosphere* (fator de impacto: 8,1). Por fim, os resultados gerados nos diferentes capítulos estão integrados no Capítulo V, na forma de considerações finais.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	28
1.1	CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR AGROTÓXICOS	29
1.2	BIOMARCADORES	31
1.2.1	Biomarcadores Osmorrespiratórios	32
1.2.2	Biomarcadores Metabólicos	34
1.2.3	Biomarcadores de Estresse Oxidativo	35
1.2.4	Biomarcadores de Genotoxicidade	38
1.2.5	Biomarcadores de Neurotoxicidade	39
1.3	TOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS DE ANUROS	41
1.4	DECLÍNIO DA POPULAÇÃO DA POPULAÇÃO MUNDIAL DE ANFÍBIOS	44
1.4.1	<i>Aquarana catesbeiana</i> : Organismo Modelo	45
1.5	SOLUÇÕES A BASE DE PLANTAS: ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS AOS AGROTÓXICOS SINTÉTICOS	48
1.5.1	Geraniol	49
1.6	O EMPREGO DA NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA	50
1.6.1	Nanocápsulas de Zeína	51
1.7	JUSTIFICATIVA	53
1.8	OBJETIVOS E HIPÓTESE	53
1.8.1	Objetivo Geral	53
1.8.2	Objetivos Específicos	53
1.8.3	Hipótese	54
	REFERÊNCIAS	55
2	CAPÍTULO II	68
	RESUMO	70
2.1	INTRODUÇÃO	71
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	72
2.2.1	Síntese e caracterização das nanopartículas	72
2.2.2	Obtenção e aclimação dos animais	73
2.2.3	Delineamento experimental	73

2.2.4	Teste de sensibilidade	74
2.2.5	Atividade da acetilcolinesterase	74
2.2.6	Análises estatísticas	75
2.3	RESULTADOS	75
2.3.1	Caracterização das nanopartículas	75
2.3.2	Teste de sensibilidade	77
2.3.3	Atividade da acetilcolinesterase	78
2.4	DISCUSSÃO	79
2.5	CONCLUSÃO	81
2.6	AGRADECIMENTOS	81
	REFERÊNCIAS	82
3	CAPÍTULO III	87
	DESTAQUES	89
	RESUMO GRÁFICO	89
	RESUMO	90
3.1	INTRODUÇÃO	91
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	93
3.2.1	Síntese e Caracterização das Nanopartículas.....	93
3.2.2	Quantificação Química do Geraniol.....	93
3.2.3	Obtenção e Aclimação dos Animais	94
3.2.4	Delineamento Experimental.....	95
3.2.5	Biomarcadores Sanguíneos	96
3.2.6	Biomarcadores Osmoiônicos.....	96
3.2.7	Biomarcadores Metabólicos	97
3.2.8	Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)	97
3.2.9	Análises Estatísticas.....	98
3.3	RESULTADOS	98
3.3.1	Síntese e Caracterização das Nanopartículas.....	98
3.3.2	Quantificação Química do Geraniol.....	99
3.3.3	Biomarcadores Sanguíneos	100

3.3.4	Biomarcadores Osmoiônicos.....	102
3.3.5	Biomarcadores Metabólicos	103
3.3.6	Neurotoxicidade.....	104
3.3.7	Análise de Componentes Principais (PCA)	105
3.3.8	Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)	106
3.4	DISCUSSÃO	108
3.5	CONCLUSÃO	113
3.6	AGRADECIMENTOS	113
	REFERÊNCIAS.....	114
4	CAPÍTULO IV.....	122
	DESTAQUES	124
	RESUMO GRÁFICO	124
	RESUMO	125
4.1	INTRODUÇÃO	126
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	127
4.2.1	Síntese e Caracterização das Nanopartículas.....	127
4.2.2	Quantificação Química do Geraniol.....	128
4.2.3	Obtenção e Aclimação dos Animais	128
4.2.4	Delineamento Experimental.....	128
4.2.5	Biomarcadores de Genotoxicidade.....	129
4.2.6	Biomarcadores de Estresse Oxidativo.....	130
4.2.7	Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)	131
4.2.8	Análises Estatísticas.....	132
4.3	RESULTADOS.....	132
4.3.1	Biomarcadores de Genotoxicidade.....	132
4.3.2	Biomarcadores de Estresse Oxidativo.....	134
4.3.3	Análise de Componentes Principais (PCA)	137
4.3.4	Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)	137
4.4	DISCUSSÃO	140
4.5	CONCLUSÃO	143

4.6	AGRADECIMENTO	143
	REFERÊNCIAS	144
5	CAPÍTULO V	149

1 CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR AGROTÓXICOS

Recentemente, a população humana global atingiu a marca de 8 bilhões e está projetada para chegar a 9 bilhões até 2050 (Ocwa et al., 2023). Assim, a demanda alimentar aumentará (Choruma et al., 2019), colocando pressão sobre os sistemas agrícolas atuais. Dessa forma, há uma complexa interação entre crescimento populacional e segurança alimentar, considerando as implicações nas práticas agrícolas, gestão de recursos ambientais e bem-estar social. Os avanços nas tecnologias agrícolas têm desempenhado um papel crucial no atendimento às demandas alimentares de uma população crescente. Técnicas mais precisas, organismos geneticamente modificados (OGMs), sistemas de irrigação aprimorados e a aplicação de diferentes tipos de agrotóxicos aumentaram a produtividade agrícola, contribuindo para aumentar a segurança alimentar (Godfray et al., 2010).

Entretanto, métodos agrícolas intensivos, uso excessivo de agrotóxicos, desmatamento e intensa conversão de ecossistemas naturais em terras agrícolas levam à degradação do solo, contaminação aquática e perda de biodiversidade. Essa expansão contribui para as mudanças climáticas e coloca em risco ainda maior a segurança alimentar (Foley et al., 2011). Encontrar um equilíbrio entre a necessidade de maior produção de alimentos com práticas agrícolas sustentáveis continua sendo um desafio para a ciência (Tilman & Clark, 2014).

O modelo de produção agrícola adotado no Brasil baseia-se principalmente na monocultura, tornando as plantações mais vulneráveis ao ataque de pragas causadoras de doenças. As doenças infligem danos substanciais ao crescimento e à produção das plantas em nível mundial (Chhipa, 2019). Como consequência, mais de 3 milhões de toneladas de agrotóxicos são utilizados anualmente no mundo para mitigar estas doenças (Pandey et al., 2016; Slattery et al., 2019).

Os agrotóxicos, quando aplicados às culturas, podem chegar às águas superficiais através de vários caminhos, incluindo escoamento superficial, lixiviação, drenagem de águas subterrâneas contaminadas e deposição direta de aerossóis. Além disso, os agrotóxicos podem contaminar o ambiente aquático durante a sua produção, transporte, armazenamento e descarte (Zhang & Goss, 2022) (Fig. 1).

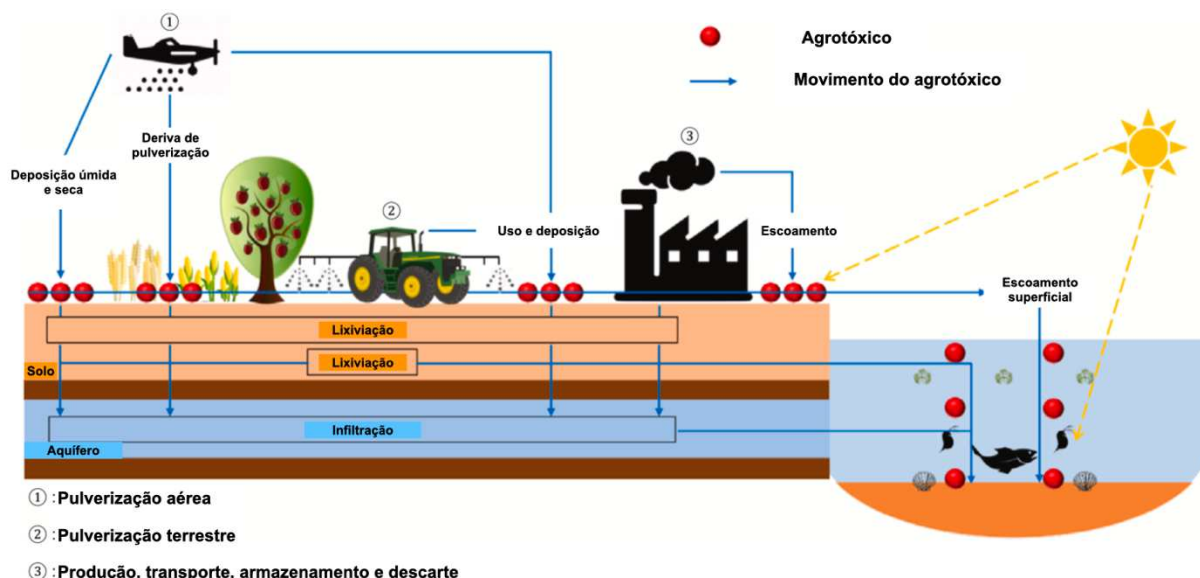


Figura 1. Diferentes vias de entrada de agrotóxicos nas águas superficiais. Adaptado de: Zhang & Goss (2022).

Vieira et al. (2019) detectaram a presença de mais de 17 agrotóxicos na água e no sedimento de um riacho associado a atividades agrícolas no norte do Paraná. E, ao expor indivíduos de *Prochilodus lineatus* neste riacho durante 120 dias, observou que esses animais acumulavam esses agrotóxicos em seus tecidos, o que estava associado com várias alterações genotóxicas, bioquímicas e histológicas. Sparling et al. (2015) detectou a presença de mais de 20 agrotóxicos na água e sedimento de pântanos da Serra Nevada (EUA). Quando os autores expuseram girinos *Pseudacris regilla*, também descobriram que esses animais acumulavam esses compostos em seus tecidos, o que associaram a alterações metamórficas, danos genéticos e bioquímicos.

Desta maneira, fica claro que quando esses agentes químicos entram no ambiente aquático, eles podem interagir com organismos não-alvo que habitam o ecossistema, causando efeitos adversos em peixes (Vieira et al., 2019), anfíbios (Borges et al., 2019), bivalves (Damásio et al., 2010), caramujos (Fernández San Juan et al., 2020), microcrustáceos (Bownik & Szabelak, 2021) e até mesmo em algas (Stenström et al., 2021).

Em resumo, o modelo agrícola de monocultura do Brasil, o uso de agrotóxicos e seu subsequente impacto no ambiente aquático e nos organismos não-alvo destacam a necessidade de práticas agrícolas sustentáveis e ecologicamente responsáveis.

1.2 BIOMARCADORES

Quando um contaminante, como os agrotóxicos, entra no organismo, ele pode interagir com biomoléculas, como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos, encontrados nas células e na matriz extracelular dos tecidos. A natureza específica do contaminante determina sua afinidade por essas biomoléculas e a maneira como interage com elas. Porém, os efeitos tóxicos do contaminante só se manifestam quando atinge uma concentração no corpo que perturba as funções fisiológicas normais dessas biomoléculas (Carriquiriborde, 2021).

As respostas aos contaminantes nos indivíduos podem manifestar-se em vários níveis, desde moleculares até fisiológicos. Estas respostas podem, em última análise, resultar em efeitos adversos no crescimento, reprodução e sobrevivência dentro do ecossistema (Fig. 2). O nível molecular de interação é o estágio inicial, no qual o contaminante interage diretamente com o sistema biológico, afetando potencialmente a expressão gênica, a atividade enzimática ou outros processos subcelulares, como a função da membrana (Carriquiriborde, 2021).

As interações no nível molecular levam subsequentemente a respostas celulares, alterando a fisiologia normal das células, como por exemplo. Essas alterações celulares podem resultar em alterações histológicas, que podem ser detectadas como alterações histopatológicas, conforme mostrado por Bach et al. (2018) e Vieira et al. (2019). Entretanto, nem sempre ocorrem alterações histológicas, mas ainda assim pode haver impacto em nível fisiológico, afetando o funcionamento de órgãos e sistemas.

Assim, os desvios de saúde causados por contaminantes podem ser medidos e quantificados, e essas medições são consideradas biomarcadores. Os biomarcadores são ferramentas essenciais em Ecotoxicologia para avaliar o estado de saúde de um animal em relação aos xenobióticos (Cazenave et al., 2021).

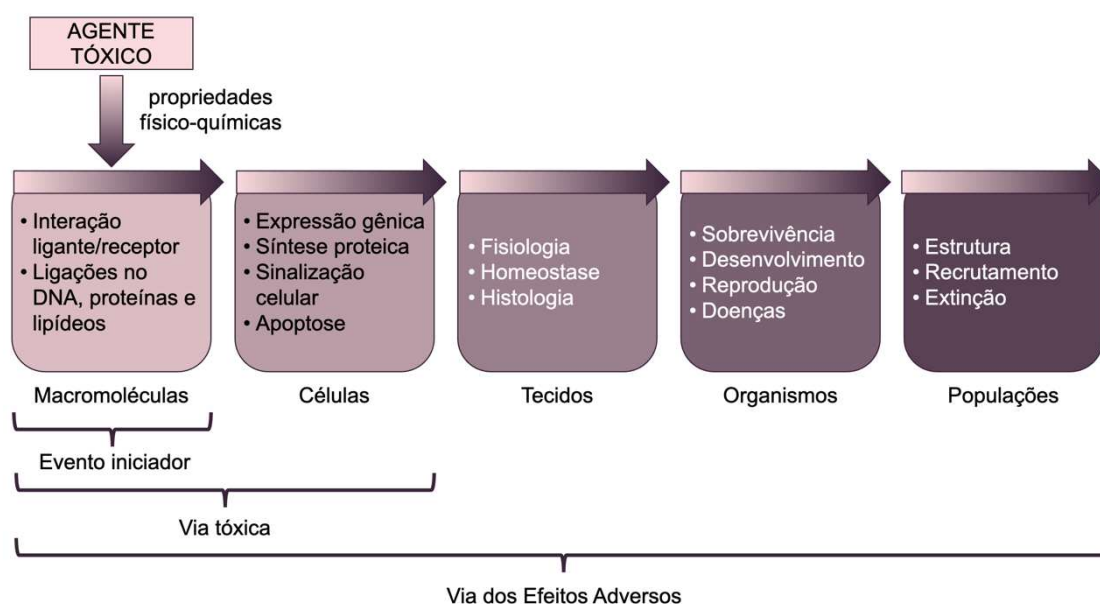


Figura 2. Vias dos Efeitos Adversos de um agente tóxico no organismo. Adaptado de: Carriquiriborde, 2021.

1.2.1 Biomarcadores Osmorrespiratórios

O sangue dos anuros apresenta um notável grau de plasticidade (Carvalho et al., 2017). Em particular, a hemoglobina (Hb) dos girinos (fase larval) demonstra uma maior afinidade pelo oxigênio e não é afetada pelo pH, enquanto a Hb dos adultos tem baixa afinidade ao oxigênio e é altamente afetada pelo pH (Aggarwal & Riggs, 1969). Essa maior afinidade pode ser atribuída à necessidade de captura, transporte e distribuição eficiente de oxigênio, dada a respiração aquática dos girinos (Dorn & Broyles, 1982). Os xenobióticos podem alterar a concentração de Hb no sangue dos animais (Cazenave et al., 2021), comprometendo a eficiência no transporte de oxigênio. Desta forma, a concentração de Hb é considerada um biomarcador clássico para avaliar a exposição a xenobióticos em vertebrados aquáticos (Andrade et al., 2019; Carvalho et al., 2017; Rocha et al., 2010). Quando combinada com outros biomarcadores, como concentrações iônicas no plasma e atividades enzimáticas nas brânquias relacionadas à regulação osmótica, ajudam a indicar uma resposta fisiológica ao estresse (Bezerra et al., 2022; Ferroni et al., 2022; Witeska et al., 2022), visto que os xenobióticos também podem alterar as concentrações dos íons no plasma e a atividade de enzimas da osmorregulação (Ferroni et al., 2022).

Em relação à água doce ($\approx 1 \text{ mOsm} \cdot \text{L}^{-1}$), os anfíbios são

hiperosmóticos. Seus estágios larvais apresentam osmolaridade plasmática que varia de 100-300 mOsm·L⁻¹ dependendo da espécie (Funkhouser, 1977). Para enfrentar o desafio de manter essa osmolaridade frente a perda passiva de íons, os girinos apresentam tecidos com mecanismos especializados para recaptação ativa de íons. Antes dos estágios de clímax, há pouco transporte iônico através da pele (Hillyard, 1999), sendo as brânquias responsáveis pelo papel de osmorregulação nesses animais, assim como nos teleósteos (Bradley, 2009). Nos peixes, o transporte ativo de íons acontece nas células ricas em mitocôndrias (MCR) com grande quantidade de Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), promovendo ativamente o efluxo de sódio (Na⁺) e o influxo de potássio (K⁺), mantendo a homeostase intracelular e, criando uma força motriz para outros canais e transportadores iônicos (Hwang & Lee, 2007) (Fig. 3). A NKA nas brânquias dos girinos também é a principal enzima para o transporte ativo de íons (Lai et al., 2019).

Alguns agrotóxicos, como a bifentrina, podem induzir a atividade da NKA nas brânquias de peixes, como observado por Blewett et al. (2019) ao comparar a toxicidade da bifentrina (3 µg·L⁻¹) e de sua fórmula nanoencapsulada (3 µg·L⁻¹) sobre trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas por 96h, onde apenas os animais expostos ao agrotóxico livre apresentaram este aumento. Ainda, os metais também podem alterar a atividade da NKA. Ferroni et al. (2022) observaram um aumento na atividade desta enzima ao exporem *Prochilodus lineatus* à 25 µg·L⁻¹ de prata livre (Ag) e nanopartículas de prata biogênicas (bNAg) durante 96h.

Embora existam poucos estudos que avaliem a atividade das ATPases em girinos expostos a contaminantes, essas enzimas se mostram bons biomarcadores para estes animais. Girinos *Xenopus laevis* expostos a diferentes concentrações de tiacloprida e trifloxistrobina, tanto isolados como em mistura, demonstraram inibição da NKA e outras ATPases, o que acarretou alterações no desenvolvimento desses animais (Uçkun & Özmen, 2021). Portanto, a atividade da NKA e de outras ATPases se mostram um biomarcador sensível à ação de xenobióticos nos organismos aquáticos.

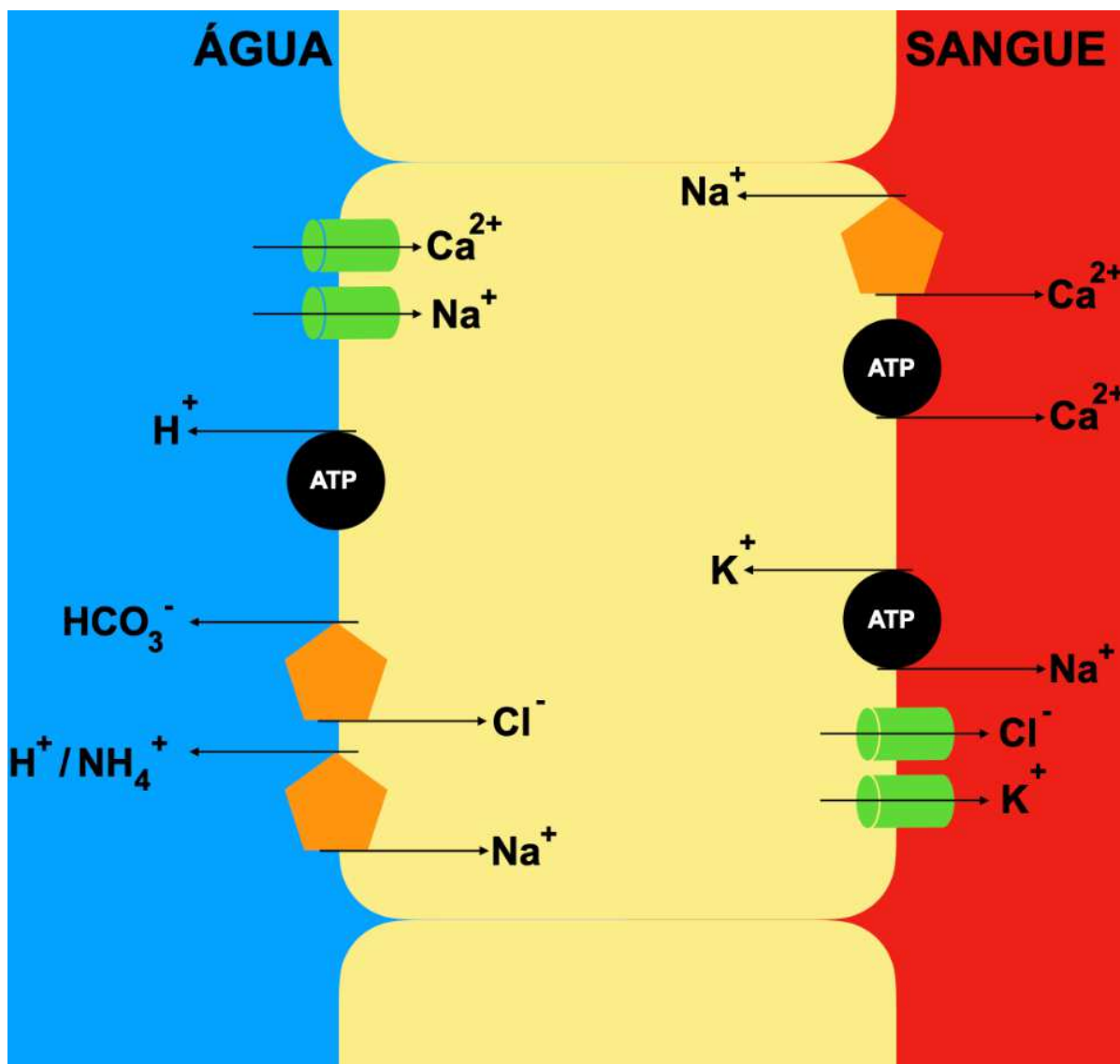


Figura 3. Principais enzimas e transportadores presentes nas células ricas em mitocôndrias, das brânquias de animais aquáticos. Adaptado de: Marshall, 2002.

1.2.2 Biomarcadores Metabólicos

A resposta ao estresse tem impacto direto no metabolismo energético, principalmente através da mobilização de energia durante a resposta de “lutar ou fugir”. Esse processo envolve a mobilização das reservas de glicogênio armazenadas no fígado, que são rapidamente decompostas para liberar glicose. Simultaneamente, a atividade das enzimas hepáticas responsáveis pela glicólise é inibida para preservar esta fonte de energia. Além disso, há também um aumento da atividade das enzimas envolvidas na gliconeogênese hepática, permitindo que o fígado sintetize glicose a partir de substratos alternativos, como glicerol e aminoácidos específicos (Fig. 4).

Esse sistema integrado, sob a regulação dos glicocorticoides (GCs), garante o fornecimento eficiente de energia para atender às crescentes demandas dos tecidos periféricos durante períodos de estresse fisiológico (Hill et al., 2021).

No músculo, em períodos de alta demanda de ATP e baixo estoque de oxigênio, a enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a oxidação do NADH pelo piruvato para formar NAD^+ e lactato, que é transportado até o fígado pela corrente sanguínea, onde será reconvertido em piruvato e, por fim, em glicose, estabelecendo um ciclo, conhecido como ciclo de Cori (Voet & Voet, 2011). Portanto, a avaliação da concentração de glicose e de lactato no plasma, juntamente com a quantificação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular, servem como biomarcadores valiosos que refletem a mobilização de energia em resposta a eventos estressantes, incluindo a exposição a xenobióticos (Dornelles & Oliveira, 2014, 2016; Tesser et al., 2022).

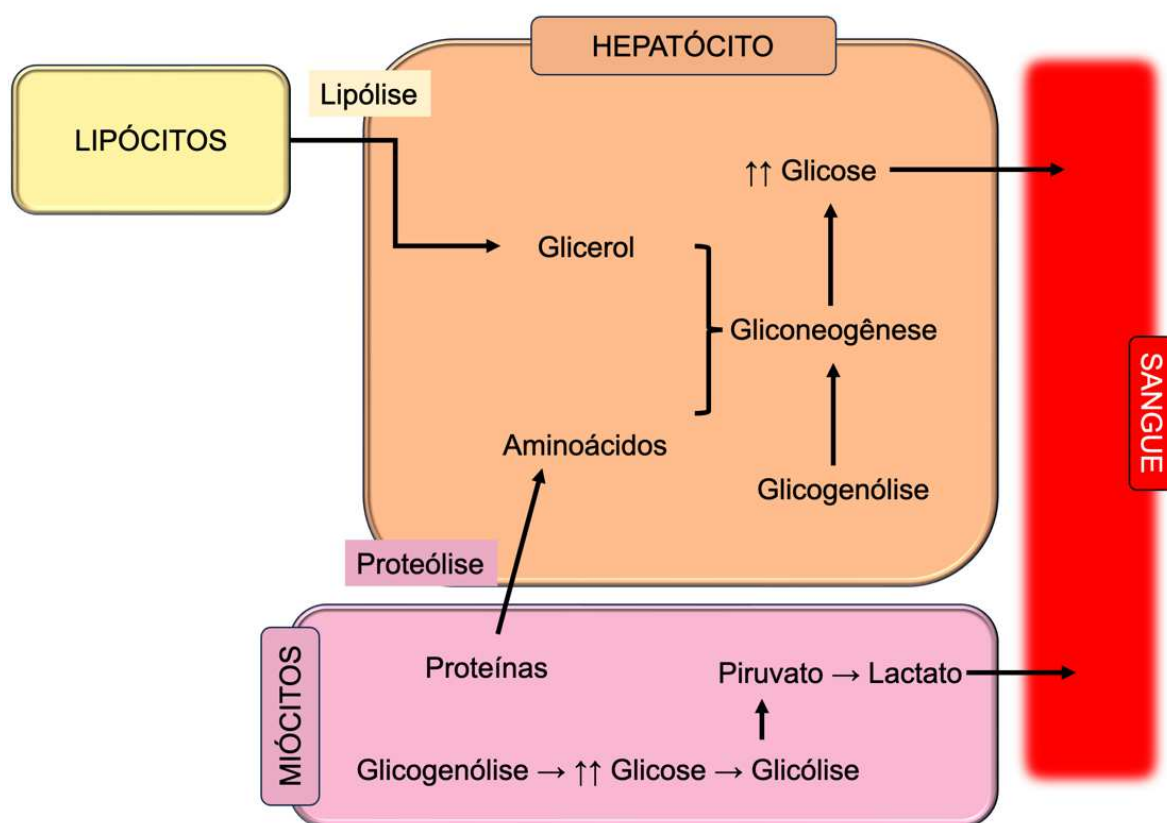


Figura 4. Mobilização das reservas energéticas durante o estresse fisiológico. Adaptado de: Voet & Voet, 2011.

1.2.3 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

A respiração aeróbica gera naturalmente espécies reativas de

oxigênio (ERO), que são moléculas altamente instáveis e em excesso são capazes de causar danos a diversos compartimentos celulares. Estes danos podem comprometer o funcionamento normal da célula (Monserrat, 2021). Para neutralizar os efeitos nocivos das ERO, os organismos apresentam uma maquinaria antioxidante que compreende sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Nikinmaa, 2014).

Em condições normais e saudáveis, existe um equilíbrio delicado entre a produção de ERO e a sua neutralização pelos sistemas antioxidantes do corpo. No entanto, vários fatores, incluindo salinidade, temperatura e exposição a compostos tóxicos, podem perturbar este equilíbrio e alterar as concentrações de compostos antioxidantes e pró-oxidantes (Monserrat, 2021). Este desequilíbrio pode levar à oxidação de biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em última análise num estado de estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2015) (Fig. 5).

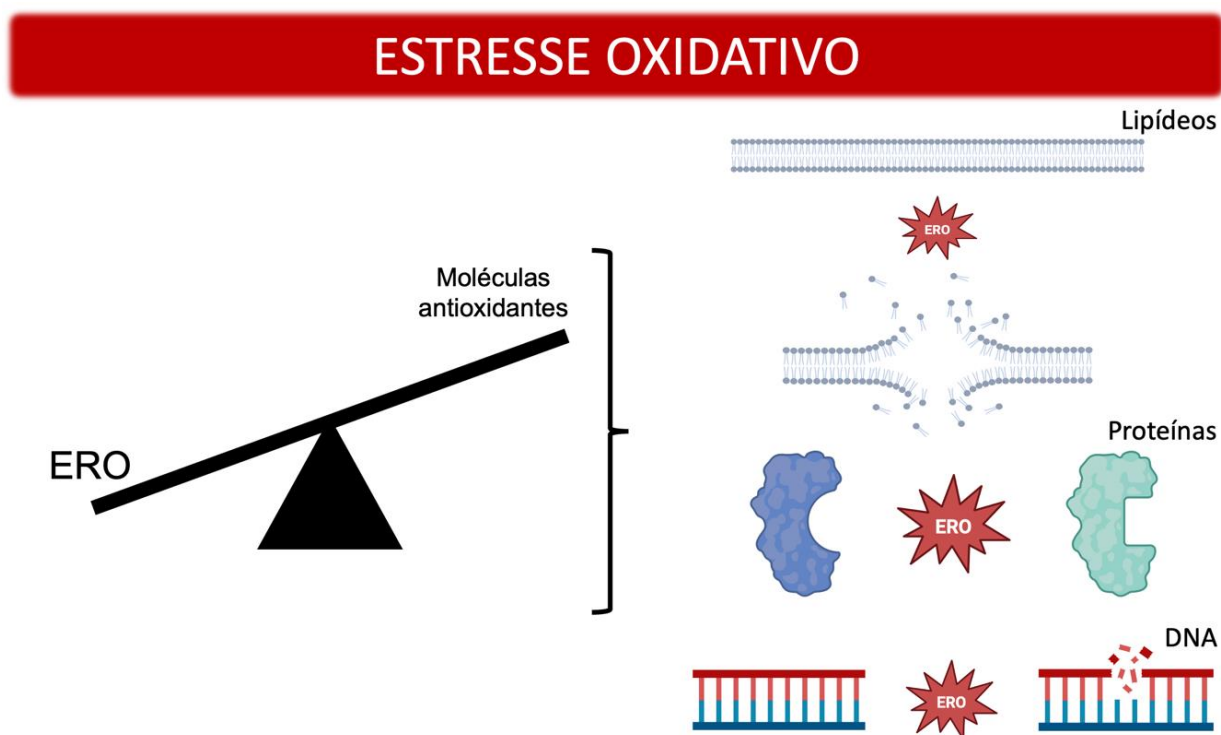


Figura 5. Estresse Oxidativo gerado pelo desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e concentração de moléculas antioxidantes com subsequente dano em diferentes macromoléculas. Fonte: Carriquiriborde, 2021.

Vários biomarcadores são utilizados para avaliar a extensão do dano oxidativo. Estes incluem peroxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas (PCO) e a detecção de danos no DNA (Nikinmaa, 2014). Métodos comuns para avaliar a LPO

e danos ao DNA incluem o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa et al., 1979) e o ensaio cometa (Singh et al., 1988), respectivamente. Esses métodos são amplamente empregados em estudos ecotoxicológicos (Alvim & Martinez, 2019; Roda et al., 2020; Vieira et al., 2019).

Para avaliar o estado redox de um organismo, é essencial quantificar as moléculas antioxidantes e monitorar a atividade das enzimas antioxidantes (Monserrat, 2021). A glutathiona (GSH) destaca-se como principal molécula antioxidante endógena devido ao seu pequeno tamanho e capacidade de se ligar e neutralizar radicais livres. Enzimas da família da glutathiona-S-transferase (GST) podem conjugar GSH a moléculas pró-oxidativas, neutralizando-as efetivamente e auxiliando na sua excreção (Nikinmaa, 2014). A enzima superóxido dismutase (SOD) desempenha um papel crucial na catalisação da degradação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ainda ser decomposto em água e oxigênio por enzimas, como a catalase (CAT) (Monserrat, 2021) (Fig. 6).

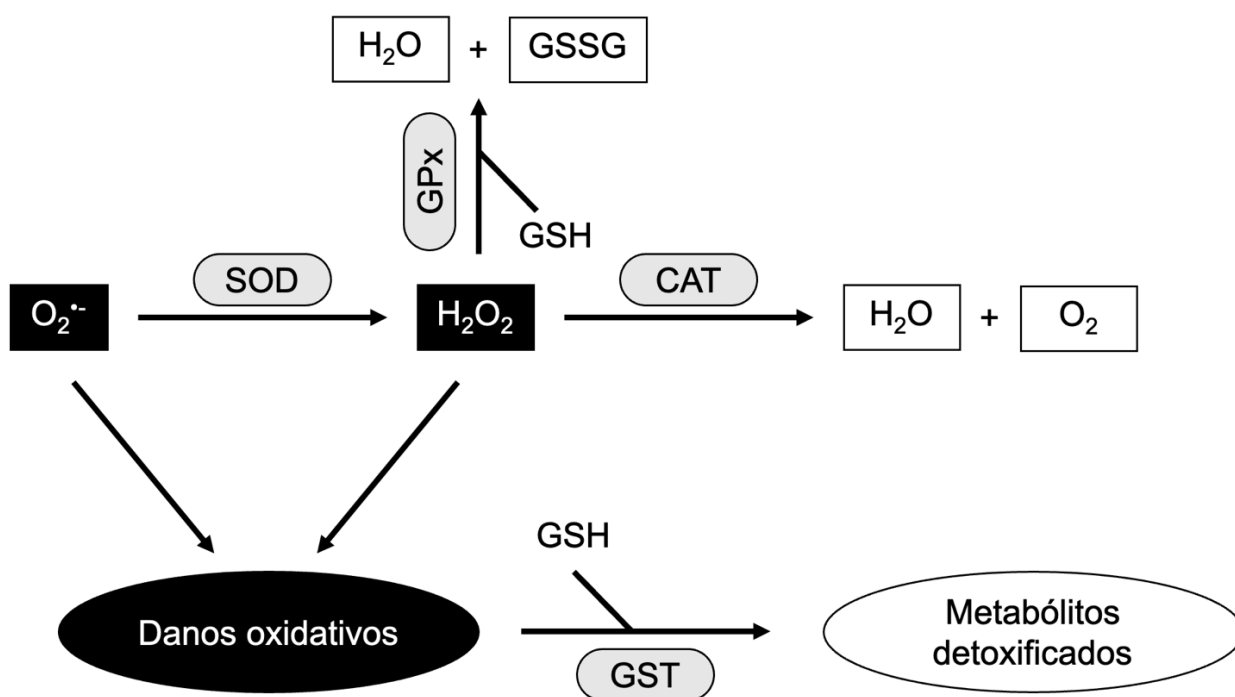


Figura 6. Representação esquemática dos sistemas antioxidantes celulares. Fonte: Carriquiriborde, 2021.

1.2.4 Biomarcadores de Genotoxicidade

Agentes que causam danos no material genético que podem ser herdados são chamados de mutagênicos. Exemplos de mutagênicos incluem substâncias radioativas, raios X, radiação UV e alguns produtos químicos (Ruiz de Arcaute et al., 2021). ERO também podem induzir tais danos ao DNA. Por outro lado, o termo “genotóxico” abrange uma gama mais ampla de agentes, incluindo aqueles que causam outros tipos de danos no DNA celular (Ruiz de Arcaute et al., 2021). Neste caso, o dano ao DNA ocorre como resultado de modificações na estrutura primária desta molécula. Tais modificações podem potencialmente resultar em alterações na função proteica, inativação ou ativação de genes e na geração de mutações no DNA. Para avaliar danos no DNA, vários testes padronizados são empregados no campo da ecotoxicologia. Um desses testes é o ensaio alcalino do cometa, uma técnica sensível, rápida, direta e visual usada para analisar quebras nas ligações da molécula de DNA (Cavaş, 2017).

O ensaio alcalino do cometa oferece vantagens distintas, incluindo a sua aplicabilidade a qualquer população de células eucarióticas nucleadas, independentemente da sua atividade mitótica ou fase do ciclo celular no momento da exposição xenobiótica. Além disso, requer apenas uma pequena quantidade de tecido ou células de uma amostra (Ruiz de Arcaute et al., 2021). Esta análise tem ampla utilização em estudos envolvendo peixes (Alvim & Martinez, 2019; Andrade et al., 2019; Roda et al., 2020; Vieira et al., 2019) e anfíbios (Gonçalves et al., 2019; Jayawardena et al., 2021; Yin et al., 2009). O dano ao DNA pode ser classificado em quatro estágios diferentes, que dependem da quantidade de fragmentos de DNA formados: classe 0 = sem danos aparentes; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo (Vieira et al., 2016) (Fig.7).

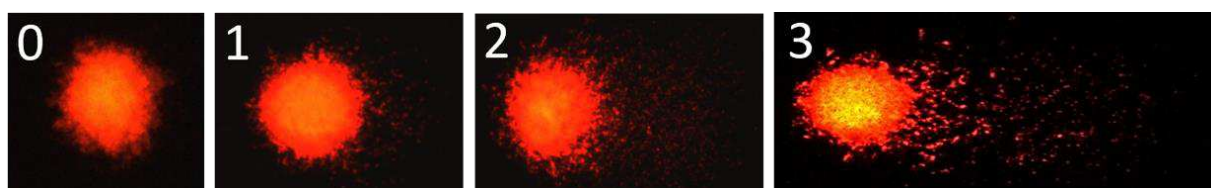


Figura 7. Diferentes classes de danos ao DNA de eritrócitos de *P. lineatus*. Foto: Tiago Tomiama Alvim, 2023.

O teste de micronúcleo (MN) é uma ferramenta valiosa para avaliar danos cromossômicos causados por xenobióticos em vários tipos de células. A formação do MN ocorre por efeitos aneugênicos (durante a anáfase anormal) ou por efeitos clastogênicos (quebra cromossômica) (Canedo et al., 2021). Quando examinados microscopicamente, aparecem como material extranuclear localizado no citoplasma, distinto do núcleo celular, e sempre circundado pela membrana nuclear (Ruiz de Arcaute et al., 2021). Além dos MNs, diversas outras alterações eritrocíticas nucleares (ENA) foram identificadas como potenciais sinais de danos ao material genético induzidos por diferentes agentes xenobióticos (Carrasco et al., 2011). Essas alterações nucleares abrangem células binucleadas (BC), caracterizadas pela presença de dois núcleos de tamanho semelhante e com membranas nucleares intactas; botões nucleares (BN), onde o núcleo da célula apresenta uma pequena saliência de material genético que se estende desde a membrana nuclear; núcleo lobulado (LN), identificados pela presença de uma ou mais bolsas externas na membrana nuclear, maiores que as observadas no BN; e núcleo vacuolado (VN), caracterizado pela presença de vacúolos e pronunciada invaginação da membrana nuclear (Ruiz de Arcaute et al., 2021) (Fig. 8).

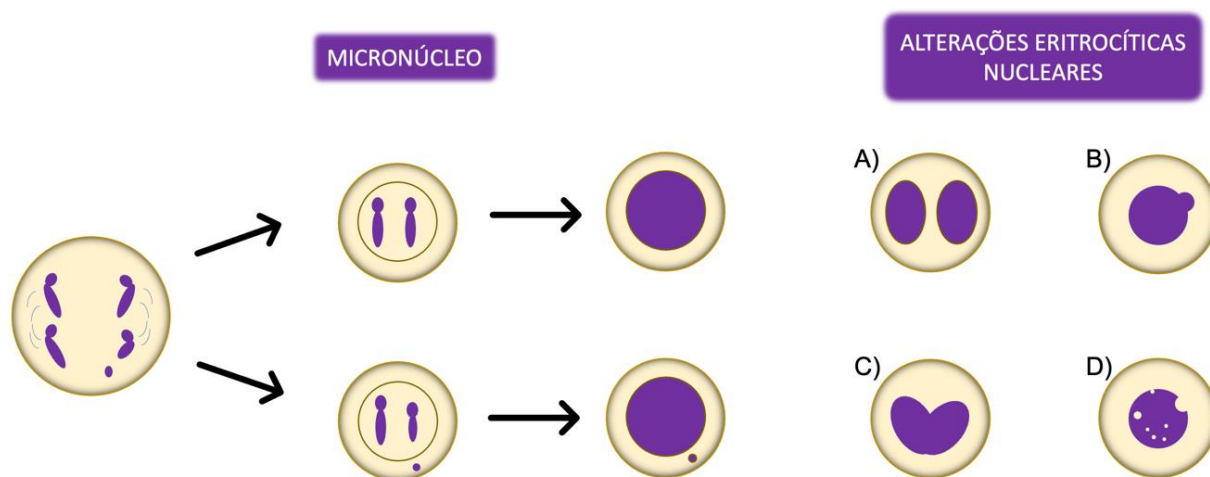


Figura 8. Formação de micronúcleo e outras alterações eritrocíticas nucleares durante o ciclo celular. A) Célula binucleada; B) Botões nucleares; C) Núcleo lobulado; D) Núcleo vacuolado. Fonte: o próprio autor.

1.2.5 Biomarcadores de Neurotoxicidade

Neurotoxicidade refere-se a qualquer impacto adverso na química, estrutura ou função do sistema nervoso (SN) durante o desenvolvimento ou na idade adulta, resultante da exposição a agentes químicos ou físicos (Ladefoged et al., 1995).

Esta definição enfatiza que estes efeitos adversos podem manifestar-se como alterações estruturais, neuroquímicas ou comportamentais, que podem ser temporárias ou permanentes. É essencial reconhecer que mesmo pequenas alterações na estrutura ou função do SN podem afetar significativamente as funções neurológicas, comportamentais e corporais (Gilbert, 2012).

As substâncias, sejam xenobióticas ou seus metabólitos, que interagem diretamente com o sistema nervoso e induzem efeitos adversos são classificadas como agentes neurotóxicos. Numerosos compostos químicos, como metais, solventes orgânicos, agrotóxicos, medicamentos e toxinas naturais, podem ser tóxicos para o sistema nervoso. Notavelmente, o sistema nervoso em desenvolvimento parece ser mais suscetível a substâncias tóxicas do que o sistema nervoso maduro (Costa, 2019).

O sistema nervoso depende da acetilcolina (ACh) como neurotransmissor excitatório das sinapses colinérgicas (Hill et al., 2021). Para terminar o seu efeito fisiológico, a ACh deve ser degradada enzimaticamente em colina e ácido acético pela acetilcolinesterase (AChE). Os inibidores da AChE, como os inseticidas organofosforados, bloqueiam esse processo de degradação, levando à estimulação colinérgica excessiva e à potencial interrupção do impulso nervoso, resultando em última análise em morte (Ferrari & Anguiano, 2021) (Fig. 9). Como resultado, a atividade da AChE é um biomarcador bem estabelecido para indicar exposição xenobiótica em organismos aquáticos (Bezerra *et al.*, 2022; Carneiro *et al.*, 2023; Grott *et al.*, 2022; Roda *et al.*, 2020; Rutkoski *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2015; Tesser *et al.*, 2022; Vieira *et al.*, 2016).

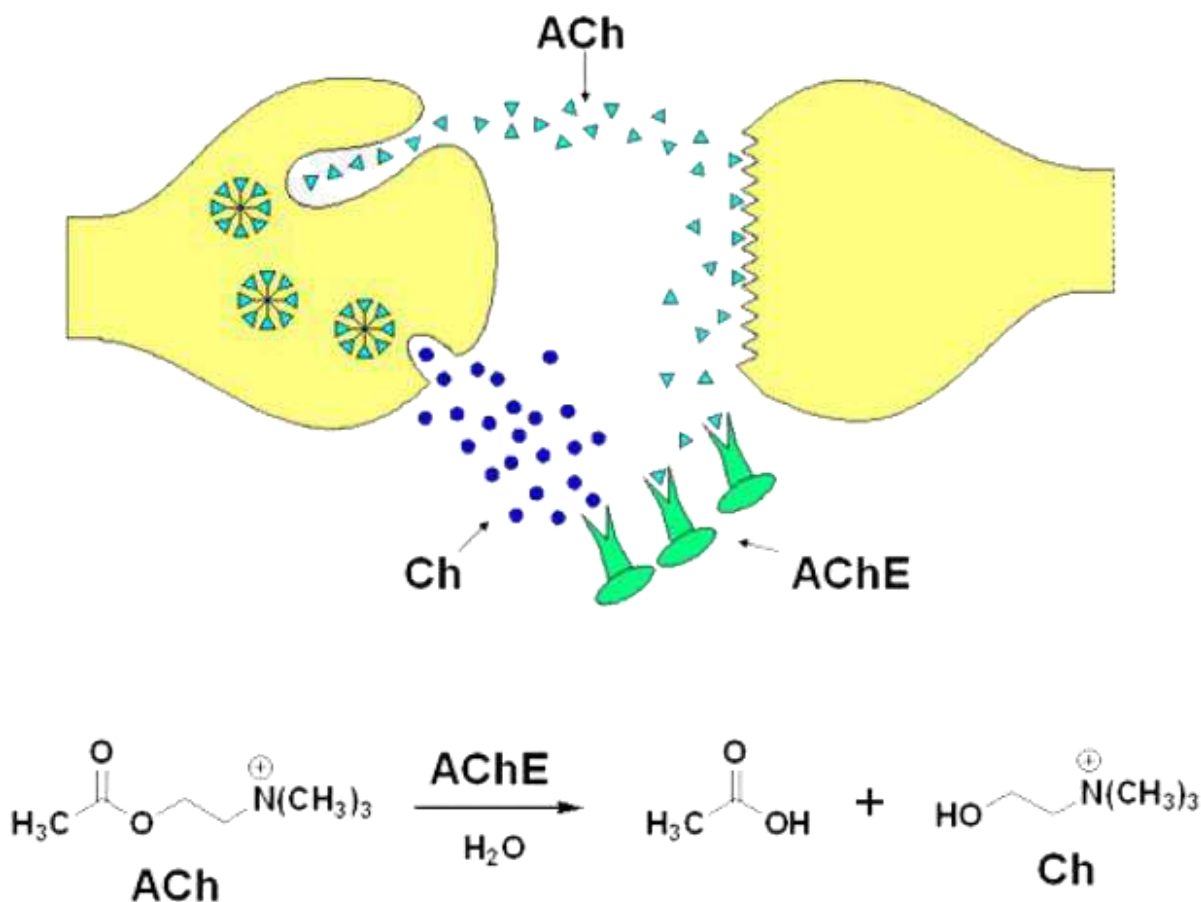


Figura 9. Localização e ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) em sinapses colinérgicas. Fonte: (Da Petronilho & Figueroa-Villar, 2014).

1.3 TOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS DE ANUROS

Nas últimas décadas, os girinos de anuros têm sido amplamente empregados em estudos de ecotoxicologia, principalmente devido ao declínio das populações de anfíbios atrelado à restrição aquática da sua fase larval, proporcionando íntimo contato com agrotóxicos na água (Carrasco et al., 2021).

Por exemplo, Margarido et al. (2013) investigaram girinos de *Scinax fuscovarius* expostos ao Regent® 800WG, um inseticida à base de fipronil. O estudo revelou atividade inibida da GST e alterações concentração-dependentes na atividade da glutatona redutase. Da mesma forma, *Rana nigromaculata* exposta a 10 mg L⁻¹ de ciproconazol por 42 dias apresentou bioacumulação, alterações morfológicas, metamorfose retardada e alterações comportamentais (Zhang et al., 2019). Além disso, o mesmo estudo mostrou alterações nas concentrações de antioxidantes, na histologia da tireoide e das gônadas, e variações genéticas, a partir de 1 mg L⁻¹ do fungicida.

Uçkun & Özmen (2021) mostraram que *Xenopus laevis* expostos ao tiacloprida e à trifloxistrobina apresentaram concentrações letais médias em 96 h (CL₅₀) de 3,41 mg L⁻¹ e 0,09 mg L⁻¹, respectivamente. A exposição subsequente a diluições seriadas da CL₅₀, tanto isoladas como em mistura, durante 96 h, resultou em várias alterações bioquímicas. Notavelmente, a mistura destes pesticidas acentuou estes efeitos, sugerindo uma sinergia entre eles.

Bassó et al. (2022) determinaram que girinos de diferentes espécies (*Rhinella arenarum*, *Rhinella dorbignyi* e *Odontophrynus americana*) exibiram respostas distintas à exposição à cipermetrina, clorpirifós, glifosato e glifosinato-amônio, sendo as espécies de *Rhinella* mais suscetíveis aos efeitos dos agrotóxicos. Além disso, *Boana pulchella* exposta ao clorpirifós por 96 h apresentou estresse oxidativo, neurotoxicidade e alterações comportamentais associadas (Barreto et al., 2020). O clorpirifós também induziu alterações comportamentais em girinos de *Ceratophrys ornata* expostos por 72 h (Rimoldi et al., 2023) e em girinos de *X. laevis* expostos por 8 dias (Boualit et al., 2023).

Girinos de *Scinax squalirostris* expostos a diferentes concentrações dos herbicidas 2,4-D e glifosato, isolados, exibiram aumento de crescimento, redução da LPO e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST). Por outro lado, a exposição ao 2,4-D resultou em um aumento concentração-dependente de PCO, indicativo de estresse oxidativo e aumento do potencial tóxico desse herbicida (Wingen et al., 2023).

Exposições em mesocosmo, com três tratamentos (pastagem extensiva não tratada, conversão de pastagem intensiva com herbicida 2,4-D e conversão pasto-cana-de-açúcar com fipronil e 2,4-D), foram realizadas para examinar os efeitos dos diferentes tratamentos sobre girinos, após 7 dias de exposição. O tratamento de conversão intensiva de pastagem (IP) resultou na redução da atividade da CAT e aumento da LPO em *Physalaemus nattereri*, enquanto diminuiu as atividades da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e CAT em *S. fuscovarius*. O tratamento de conversão pasto-cana-de-açúcar (SC) levou à diminuição das atividades de CAT, G6PDH e GST em *P. nattereri*, e em *S. fuscovarius*, reduziu atividade das G6PDH, AChE e carboxilesterase (CbE). As respostas integradas de biomarcadores revelaram pontuações mais altas em ambas as espécies expostas ao SC, ressaltando os impactos adversos do tratamento de conversão pasto-cana-de-açúcar e os agrotóxicos associados nos girinos estudados (Giroto et al., 2023).

Ao analisar a ocorrência de diferentes agrotóxicos em seis paisagens agrícolas do Cerrado, Lopes et al. (2023) encontraram maior ocorrência de atrazina e clomazona. Avaliando biomarcadores em girinos de três espécies de anuros (*Boana albopunctata*, *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus minutus*), coletadas nessas lagoas, os autores observaram genotoxicidade por danos ao DNA e ENAs, além de hepatotoxicidade por avaliação histopatológica. Entretanto, o estudo não foi capaz de confirmar uma ligação sistemática entre os danos genotóxicos encontrados nos girinos e as variáveis físico-químicas locais ou as características da paisagem (Lopes et al., 2023).

Considerando o impacto das mudanças climáticas, torna-se evidente que os efeitos prejudiciais dos agrotóxicos sobre os girinos podem ser amplificados. A exposição de *Aquarana catesbeiana* ao herbicida tebutiuron em diferentes temperaturas gerou resultados notáveis. A 25 °C, o tebutiuron induziu uma aceleração na metamorfose dos girinos; entretanto, a 32 °C, levou a um atraso na metamorfose juntamente com uma diminuição substancial da massa corporal. Este resultado é corroborado pelas alterações observadas na expressão gênica relacionada à função tireoidiana. Especificamente, a 25 °C, o tebutiuron elevou os níveis de transcritos do receptor de tireoide do tipo beta (TR-β) e da deiodinase III (DIO3), alinhando-se com o desenvolvimento acelerado dos girinos. Em contrapartida, a 32 °C, os níveis de transcrição de TR-β foram menores em comparação com aqueles a 25 °C. Esses girinos também exibiram um aumento no diâmetro do folículo tireoidiano quando expostos ao herbicida em temperaturas mais altas (Grott et al., 2023a). Outro estudo (Carneiro et al., 2023) mostrou que um metabólito da atrazina, 2-hidroxiatrazina, impactou negativamente os girinos de *A. catesbeiana*. A exposição à 25 °C diminuiu a atividade da SOD e induziu alterações histopatológicas no fígado e nos rins. Esses efeitos adversos persistiram a 32 °C, com os rins apresentando danos mais graves quando os girinos foram expostos simultaneamente ao agrotóxico e a temperatura mais elevada (Carneiro et al., 2023). Na mesma linha, Grott et al. (2023b) mostraram que a exposição ao herbicida ametrina, em conjunto com a temperatura de 32 °C, resultou na redução da atividade de diversas enzimas envolvidas nos sistemas antioxidantes e de biotransformação de girinos de *A. catesbeiana*.

Em resumo, os estudos discutidos demonstram a intrincada relação entre agrotóxicos e a saúde de girinos, com as mudanças climáticas atuando como um amplificador influente dos seus efeitos. Destacando a vulnerabilidade dos girinos

a classes distintas de agrotóxicos, resultando numa ampla gama de respostas fisiológicas e de desenvolvimento adversas. Os efeitos interativos da temperatura e da exposição aos agrotóxicos demonstram a urgência de se compreender e abordar estas dinâmicas complexas, uma vez que têm implicações não só para as populações de girinos, mas também para os ecossistemas aquáticos mais amplos no contexto das mudanças climáticas e das práticas agrícolas em curso.

1.4 DECLÍNIO DA POPULAÇÃO DA POPULAÇÃO MUNDIAL DE ANFÍBIOS

As populações de anfíbios, especialmente anuros, estão sofrendo um declínio global significativo (Carrasco et al., 2021; Sodhi et al., 2008). Este declínio é atribuído a vários fatores, tais como perda de habitat, mudanças climáticas, doenças, uso exacerbado de agrotóxicos e muito mais. Espécies de anfíbios com pequena distribuição geográfica e sazonalidade pronunciada em temperatura e precipitação, têm maior probabilidade de estar ameaçadas (Sodhi et al., 2008).

O Brasil apresenta a maior diversidade de anfíbios do mundo, mesmo assim, a situação não é diferente. A Mata Atlântica, um bioma brasileiro que perdeu mais de 80% de sua vegetação nativa (Zabel et al., 2019), está entre as regiões com as maiores taxas de declínio de anfíbios (Toledo et al., 2023). Pelo menos 50 espécies ou populações foram afetadas, sendo 12 delas extintas e 38 em declínio (Moura-Campos et al., 2021).

As atividades agrícolas desempenham um papel significativo neste declínio. A transformação de paisagens naturais para uso agrícola leva à perda de habitat, que é a principal ameaça para 51% das espécies ameaçadas no Brasil. Os impactos incluem redução de habitat, contaminação por agrotóxicos, erosão e introdução de espécies não-nativas (Oliveira et al., 2021). A extração madeireira, uma prática comum neste bioma, também tem potencial para causar declínios nas populações de anfíbios (Semlitsch et al., 2009).

Assim, o declínio das populações de anfíbios, especialmente dos anuros, é uma questão complexa que requer atenção urgente. Os esforços de conservação devem centrar-se na proteção dos habitats, bem como em alternativas agrícolas mais sustentáveis.

1.4.1 *Aquarana catesbeiana*: Organismo Modelo

As rãs-touro americanas (*Aquarana catesbeiana*; sin. *Lithobates catesbeianus*; Shaw, 1802) adultas (Fig. 10) são predominantemente aquáticas e têm uma preferência por habitats de águas paradas, como poças com vegetação, áreas de água calma e margens arqueadas, lagoas de fazendas, reservatórios, pântanos e águas estagnadas com restos de madeira morta e vegetação densa. Elas também são encontradas nas margens de lagos e córregos. Os girinos da rã-touro têm a capacidade de se transformar em juvenis em apenas alguns meses, no entanto, nas populações do norte da América do Norte, eles podem permanecer como larvas por 3 ou 4 anos devido às temperaturas extremamente baixas (Green et al., 2013).



Figura 10. Rã-touro-americana (*Aquarana catesbeiana*) adulta. Fonte: unsplash.com

O processo de acasalamento e desova da rã-touro americana começa com os machos fazendo chamados de acasalamento para atrair as fêmeas. Os bem-sucedidos abraçarão uma fêmea em um processo conhecido como *amplexo* para fertilizar os óvulos liberados (Fig. 11) (Medeiros et al., 2016). Os ovos fertilizados eclodem em girinos que passam por um processo de metamorfose para se transformarem em rãs-touro adultas.



Figura 11. Acasalamento de rãs-touro americanas (*A. catesbeiana*). Formação do amplexo com fecundação externa. Fonte: BibliOdyssey: *Ranarum Nostratium*, 2008.

O desenvolvimento dos girinos de anuros é separado em diferentes fases compreendidas por vários estágios com critérios morfológicos observáveis para diferenciação entre eles (Gosner, 1960). Os estágios embrionários (1-20) envolvem o desenvolvimento intracapsular por meio de clivagem, gastrulação e aparecimento do tubo neural e, eventualmente, brânquias e cauda. Já os estágios de filhote (21-24) marcam a transição de um embrião relativamente imóvel para um girino que consegue nadar e se alimentar livremente. Os estágios de girinos propriamente ditos (25-41) são os mais longos e são marcados pelo crescimento e desenvolvimento dos membros. Por fim, os estágios metamorfos (42-46) envolvem a perda de caracteres larvais e desenvolvimento de estruturas adultas; está normalmente associado à transição de habitats aquáticos para habitats terrestres.

Girinos de rã-touro (Fig. 12) são amplamente utilizados como modelo biológico em estudos de ecotoxicologia, devido à sua alta disponibilidade, fácil manutenção e sensibilidade a diversos contaminantes, fornecendo informações valiosas sobre seus efeitos agudos e crônicos (Carneiro et al., 2023; de Mello et al., 2023; Dornelles & Oliveira, 2014; Grott et al., 2023a; Vasconcelos et al., 2017).



Figura 12. Girino de *A. catesbeiana* entre os estágios 25-31 (Gosner, 1960). Barra de escala = 1 cm. Foto: Willian de Paula Santos.

Uma das vantagens de usar girinos de rã-touro como organismo modelo é que eles não são espécies nativas ou ameaçadas de extinção na maioria das regiões onde são empregados para testes ecotoxicológicos. As rãs-touro são nativas da América do Norte (Fig. 13), mas foram introduzidas em muitos outros continentes, como América do Sul, Europa, Ásia e Austrália, onde se estabeleceram (Nori et al., 2011). Portanto, o uso de girinos de rã-touro para estudos de ecotoxicologia não representa risco de erradicar ou prejudicar as populações locais de anfíbios, que já podem estar vulneráveis à perda de habitat, mudanças climáticas, doenças e contaminação.



Figura 13. Distribuição nativa da rã-touro-Americana (*A. catesbeiana*). Fonte: Green et al., 2013.

Desta forma, os girinos de rã-touro constituem um modelo biológico adequado e estabelecido para estudos de ecotoxicologia, pois oferecem diversas vantagens, enquanto os impactos sobre a anurofauna nativa são minimizados.

1.5 SOLUÇÕES A BASE DE PLANTAS: ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS AOS AGROTÓXICOS SINTÉTICOS

Em discussões recentes, foram destacados os efeitos adversos dos agrotóxicos sintéticos em organismos não-alvo, especialmente anfíbios (Agostini et al., 2020; Wolmarans et al., 2021). Consequentemente, há um interesse crescente na procura de alternativas a estes compostos, e um caminho promissor é a utilização de substâncias derivadas de plantas (Khursheed et al., 2022).

Neste contexto, uma classe de compostos derivados de plantas que tem chamado atenção, são os óleos essenciais (OE). Os OE são extratos de várias plantas que contêm uma ampla gama de substâncias conhecidas por suas potentes propriedades antipatogênicas (Ahmed et al., 2023; Duque et al., 2023; Ghoorchian et al., 2023; Gokturk et al., 2023; Konan et al., 2023; Li et al., 2024; Terzić et al., 2023). Destacam-se entre essas substâncias os flavonoides (Xiao, 2022), polifenóis (Jain & Parihar, 2018), alcaloides (Luo et al., 2022), cumarinas (Alexopoulos et al., 2022), polissacarídeos (Zhao et al., 2023a), peptídeos (Shwaiki et al., 2021), pigmentos (Alshahrani et al., 2022), saponinas (Chang et al., 2023) e terpenos (Achika et al., 2020).

Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários que abrangem vários compostos, incluindo isopreno, monoterpeno, diterpeno, hemiterpeno, esteroides, acetatos e piperitonas (Li et al., 2023; Xiao, 2022). Esses compostos exibem diversas atividades biológicas, incluindo a modulação do crescimento fúngico (Li et al., 2023), efeitos inseticidas (Almadiy et al., 2023; Dai et al., 2023; Zhao et al., 2023b) e atividade acaricida (Teixeira et al., 2023). Consequentemente, os terpenoides estão ganhando cada vez mais atenção como potenciais ingredientes ativos para biopesticidas (Smith et al., 2018).

Liu et al. (2021) demonstraram que monoterpenos extraídos de artemísia são potenciais candidatos como bioinseticidas, ao diminuírem a alimentação e inibirem a AChE de larvas da lagarta-desfolhadora. Além disso, os terpenos L-carvona e carvacrol promovem mortalidade de pupas e deformidades nos adultos da mosca-da-asa-manchada, sendo que o carvacrol está associado com mudanças histológicas severas nesta espécie. Esses terpenos ainda se mostraram seguros para a espécie não-alvo *Doru luteipes*, demonstrando o uso dessas moléculas como bioinseticidas seguros (Souza et al. 2024).

1.5.1 Geraniol

O geraniol (GER) (Fig. 14) é um monoterpene encontrado em mais de 250 óleos essenciais, isolado de espécies vegetais que representam um grande número de famílias e gêneros. É formado a partir da transformação do geranyl difosfato (GPP), precursor universal dos monoterpenos, pela geraniol sintase (Farasat et al., 2014). No organismo de mamíferos, especificamente de ratos, o GER é metabolizado e excretado na urina como ácido de Hildebrandt, ácido gerânico, ácido 3-hidroxicitronílico e 8-carboxigeraniol (Jäger et al., 2020), este último servindo como um biomarcador confiável de exposição ao GER (Pluym et al., 2022).

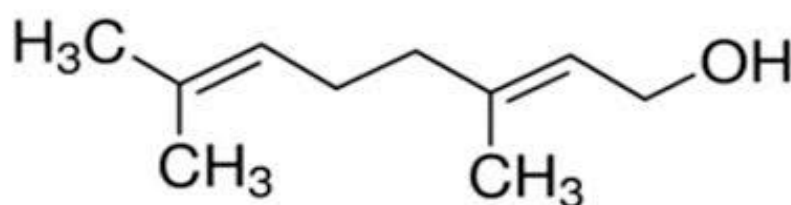


Figura 14. Estrutura química do geraniol. Fonte: ChemBioDraw.

A maioria dos estudos sobre a biodisponibilidade do GER foi realizada em roedores, predominantemente ratos e camundongos, revelando uma taxa de absorção intestinal significativa de 92% após administração oral (Pavan et al., 2018). A administração intravenosa resulta em disponibilidade imediata na corrente sanguínea, enquanto a administração oral com uma formulação emulsificada leva à detecção de GER no líquido cefalorraquidiano, indicativo de seu potencial para distribuição sistêmica (Pavan et al., 2018). Além disso, a administração nasal demonstrou um aumento da biodisponibilidade do GER, particularmente no líquido cefalorraquidiano (Bonferoni et al., 2019). Estudos de absorção dérmica indicam que a escolha do solvente impacta significativamente a penetração do GER na pele, com menor penetração dérmica observada quando aplicado em etanol em comparação com solução salina (Hewitt et al., 2020).

O GER é amplamente utilizado em diversas aplicações comerciais, como perfumes, cosméticos, produtos de higiene pessoal e produtos farmacêuticos. É um ingrediente comum em produtos como desodorantes, utensílios domésticos e cosméticos feitos com ingredientes naturais (Hagvall et al., 2012). Reconhecido pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA dos EUA)

como um aditivo aromatizante alimentar seguro, o GER é permitido para uso em alimentos como bebidas, doces e sorvetes (FDA, 2016). Apesar do potencial biopesticida do GER devido às suas atividades biológicas terpenoides, apenas 13,3% dos artigos publicados até 2022 sobre o GER eram sobre este potencial (Chen & Viljoen, 2022).

O GER compartilha atividades biológicas comuns com outros terpenos, mas sua atividade antifúngica se destaca por duas vias: interrupção da síntese de ergosterol, levando à alteração da permeabilidade da membrana, e indução de geração de ERO, causando estresse oxidativo, inibição do crescimento e até morte celular (Tang et al., 2018). Por outro lado, o GER atua como um antioxidante em mamíferos, ao induzir a atividade de enzimas antioxidantes como CAT, SOD e GPx, enquanto aumenta o conteúdo de GSH, resultando na redução da LPO (Farokhchah et al., 2021; Madji et al., 2019; Venzon et al., 2018).

Sendo assim, a natureza multifacetada do GER com aplicações de amplo alcance e potenciais benefícios merece maior atenção da comunidade científica. Com a sua presença em diversos óleos essenciais e o seu papel como aditivo aromatizante alimentar seguro, o GER já se faz presente nas áreas de perfumaria, cosmética e farmacêutica, bem como em produtos de consumo cotidiano. No entanto, seu uso como biopesticida, dadas suas atividades antifúngicas e inseticidas, pode causar efeitos sobre organismos não-alvo, o que apresenta um caminho interessante para futuras investigações.

1.6 O EMPREGO DA NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

A nanotecnologia emergiu como uma intervenção fundamental no controle de pragas agrícolas, devido aos seus atributos distintivos, tais como o tamanho diminuto das partículas e a maior área superficial. Neste domínio, o desenvolvimento de agrotóxicos à base de nanomateriais, muitas vezes referidos como “nanopesticidas”, demonstrou uma eficácia notável quando comparado com os agrotóxicos tradicionais. Os nanopesticidas apresentam uma melhoria de mais de 30% no controle do organismo alvo em ensaios de laboratório, enquanto ensaios de campo comprovaram ainda mais esta eficácia, revelando uma melhoria de 19% comparados às suas formulações livres (Wang et al., 2022).

Outra característica importante dos nanopesticidas é a redução

significativa de efeitos adversos em espécies não-alvo comparada aos agrotóxicos convencionais, com uma redução superior a 40% (Wang et al. 2022). Isso é atribuído ao seu mecanismo de liberação controlada de ingredientes ativos (IA), oferecendo precisão no manejo de pragas (Kumar et al., 2019; Walker et al., 2017; Wang et al., 2022). Nanopesticidas apresentam uma taxa de liberação de ingredientes ativos 75% mais lenta que os agrotóxicos convencionais (Kah et al., 2018).

Wang et al. (2022) ressaltam as vantagens dos nanopesticidas devido a uma redução de mais de 40% na perda de ingrediente ativo (IA) antes de chegar ao seu alvo e mais de 20% na perda de IA por lixiviação. Além disto, estas formulações apresentam um aumento de mais de 25% na liberação cumulativa de IA. Tais atributos contribuem para os efeitos consistentes no controle de pragas, diminuindo potencialmente a necessidade de múltiplas aplicações e mitigando assim a contaminação ambiental (Kah & Hofmann, 2014; Kumar et al., 2019; Pourzahedi et al., 2018).

O advento das nanoformulações tem um potencial significativo para revolucionar as práticas de controle de pragas e aumentar a produtividade agrícola. No entanto, é imperativo reconhecer que os nanopesticidas podem entrar no ambiente de uma forma semelhante aos agrotóxicos convencionais (conforme ilustrado na Fig. 1). Consequentemente, tem havido um aumento nas investigações científicas dirigidas à avaliação das implicações ambientais da nanotecnologia na esfera agrícola (Usman et al., 2020).

1.6.1 Nanocápsulas de Zeína

As nanopartículas de zeína (NANO) são amplamente utilizadas como veículo para fitoquímicos - compostos com atividade biológica derivada de plantas, sendo reconhecidas pela FDA dos EUA como uma opção segura (De Marco, 2022; Hassan et al., 2022). Elas têm sido empregadas em vários estudos como carreadoras de drogas sintéticas e de origem natural na indústria farmacêutica (De Marco, 2022; Tivano & Chiono, 2023), carreadoras de óleos essenciais (Wu et al., 2012) e carreadoras de fitoquímicos eficazes no controle de pragas (Oliveira et al., 2019; Oliveira et al., 2018; Proença et al., 2024).

As NANO são formadas devido à alta capacidade de compactação da zeína, uma proteína extraída do milho (*Zea sp.*), que é abundante e possui baixa

solubilidade em água (Hassan et al., 2022; Matsushima et al., 1997). A zeína (Fig. 15) é composta por quatro subunidades: α , β , γ , δ -zeína, sendo a subunidade α a mais predominante, constituindo cerca de 80% da estrutura desta proteína. Ela pertence à classe das prolaminas, o que lhe confere características anfifílicas (insolúvel em água e etanol puros, mas solúvel em solventes hidroalcológicos) e uma carga de superfície positiva (Esen, 1990; Padua & Guardiola, 2015; Wilson, 1991).

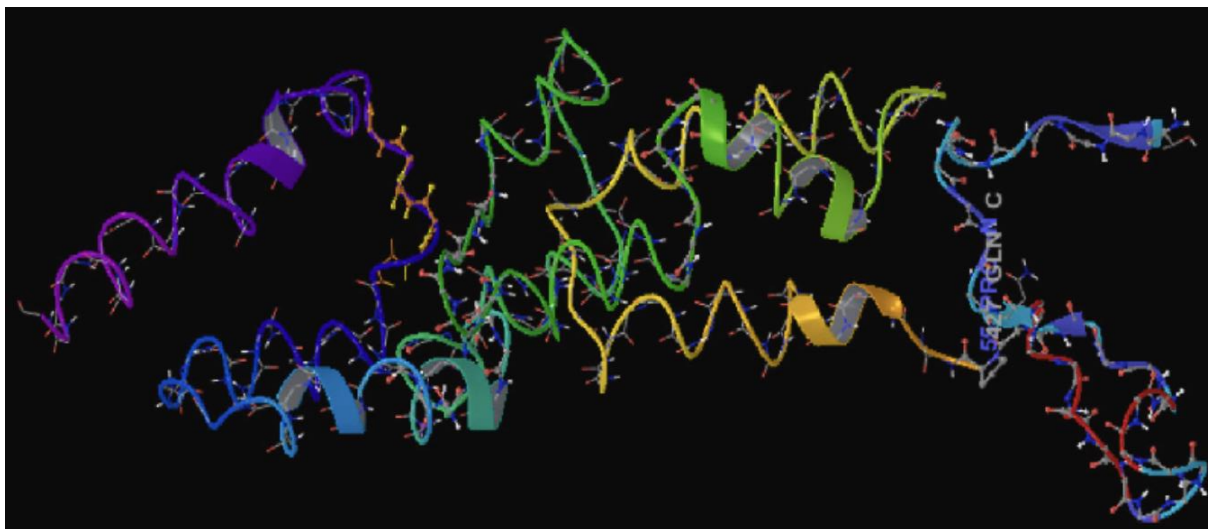


Figura 15. Modelo de estrutura da zeína proposto por Momany et al., 2006).

A estrutura secundária mais presente na zeína é a de α -hélice, mas essa proporção pode variar dependendo da polaridade do solvente, temperatura, pH e pressão aplicada à solução de zeína (Cabra et al., 2006; Dong et al., 2021; Wang et al., 2020; Wei et al., 2021). Essas variações na estrutura secundária da zeína podem afetar sua agregação, propriedades coloidais e estabilidade (Hassan et al. 2022). Fatores que alteram a estrutura secundária da zeína podem modular as propriedades da esfera final formada, incluindo o tamanho da esfera e a hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície (Wang et al., 2008). Além disso, o tamanho das partículas das NANO é principalmente afetado pela concentração de zeína e sua proporção em relação ao IA. A porcentagem de carga de IA e a eficiência de aprisionamento também podem ser afetadas pela concentração de solvente e o pH (Hashem et al., 2015; Lai & Guo, 2011).

Por fim, as nanopartículas de proteínas, incluindo as NANO, têm sido reconhecidas como candidatas ideais para objetivos de sustentabilidade devido à sua fonte natural, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Hathout et al., 2020; Hathout & Omran, 2016). De fato, como demonstrado por Proença et al. (2024) e Oliveira et

al. (2018), as nanopartículas de zeína são eficazes em carregar e liberar componentes de óleos essenciais que, por sua vez, exibem efeitos significativos sobre o controle de pragas agrícolas, enquanto demonstram menor citotoxicidade comparadas ao ingrediente ativo livre em células não-alvo.

1.7 JUSTIFICATIVA

Os anfíbios, sobretudo os da ordem Anura, compõem uma das classes de vertebrados mais seriamente prejudicadas pela agricultura, uma vez que a fragmentação de habitat, causada por essa atividade, é a principal razão do declínio da biodiversidade desses animais (Ferrante et al., 2017) e, associado ao uso intensivo de agrotóxicos, esse declínio pode ser ainda maior (Borges et al., 2019). Esses animais dependem da água para se reproduzir e sua fase larval (girinos) é restrita ao ambiente aquático, o que os coloca em contato íntimo com contaminantes presentes na água. Aproximadamente 41% das espécies de anfíbios conhecidas estão ameaçadas de extinção em algum grau (IUCN, 2020). O Brasil abriga 1.235 espécies de anfíbios, sendo considerado o país com maior riqueza desses animais (Frost, 2024). Desta maneira, o desenvolvimento de alternativas agrícolas que visem a proteção dos anfíbios no Brasil, é de extrema importância.

1.8 OBJETIVOS E HIPÓTESE

1.8.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar os efeitos toxicológicos de exposições agudas (24 e 96h) aos geraniol livre, geraniol nanoencapsulado e das nanocápsulas de zeína vazias em girinos *Aquarana catesbeiana*.

1.8.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar os efeitos tóxicos por meio de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo, à genotoxicidade, ao metabolismo energético, à homeostase iônica e à neurotoxicidade em girinos *A. catesbeiana*;

- b. Comparar os efeitos do geraniol livre, nanoencapsulado e das nanocápsulas de zeína vazias em girinos *A. catesbeiana*;
- c. Entender a influência do geraniol livre, nanoencapsulado e das nanocápsulas de zeína vazias na saúde geral de *A. catesbeiana* através do Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores;
- d. Entender a influência dos diferentes tratamentos (geraniol livre, nanoencapsulado e nanocápsulas de zeína vazias) sobre cada biomarcador através da Análise de Componentes Principais.

1.8.3 Hipótese

Espera-se encontrar um estado de saúde dos animais expostos ao geraniol nanoencapsulado similar ao dos animais controle, em ambos os tempos experimentais. O geraniol livre irá induzir maiores alterações que sua forma nanoencapsulada, em ambos os tempos experimentais. As nanocápsulas de zeína serão seguras aos girinos *Aquarana catesbeiana*, mostrando efeitos similares ao controle em ambos os tempos experimentais.

REFERÊNCIAS

- Achika, J. I., Ayo, R. G., Habila, J. D., & Oyewale, A. O. (2020). Terpenes with antimicrobial and antioxidant activities from *Lannea humilis* (Oliv.). *Scientific African*, 10, 552. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00552>
- Aggarwal, S. J., & Riggs, A. (1969). The Hemoglobins of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(9), 2372–2383.
- Agostini, M. G., Roesler, I., Bonetto, C., Ronco, A. E., & Bilenca, D. (2020). Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biological Conservation*, 241, 108355. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2019.108355>
- Ahmed, H. A., Nassrallah, A. A., Abdel-Raheem, M. A., & Elbehery, H. H. (2023). Lemon peel essential oil and its nano-formulation to control *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific Reports*, 13, 17922. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44670-x>
- Alexopoulos, S., Gkouskou, A., Stravodimos, G., Tsagkarakou, A. S., Tsialtas, I., Katounis, D., Psarra, A.-M. G., Leonidas, D., Brahmachari, G., Hayes, J. M., & Skamnaki, V. (2022). The druggability of the ATP binding site of glycogen phosphorylase kinase probed by coumarin analogues. *Current Research in Chemical Biology*, 2, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.crchbi.2022.100022>
- Almadiy, A. A., Nenaah, G. E., Albogami, B. Z., Shower, D. M., & Alasmari, S. (2023). *Cupressus sempervirens* Essential Oil, Nanoemulsion, and Major Terpenes as Sustainable Green Pesticides against the Rice Weevil. *Sustainability*, 15, 8021. <https://doi.org/10.3390/su15108021>
- Alshahrani, M. Y., Ibrahim, E. H., Asiri, M., Kilany, M., Alkhathami, A. G., Alshahrani, M. N., & Chandramoorthy, H. C. (2022). Lycopene augments and enhances antioxidant/antibacterial efficiency of ethanolic leaf extract of *Helianthus annuus* over multidrug-resistant bacterial isolates. *Journal of King Saud University - Science*, 34, 102250. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102250>
- Alvim, T. T., & Martinez, C. B. dos R. (2019). Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2018.11.011>
- Andrade, L. L. de, do Espirito Santo Pereira, A., Fernandes Fraceto, L., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2019). Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. *Science of the Total Environment*, 663, 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.380>
- Bach, N. C., Marino, D. J. G., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.110>
- Barreto, E., Salgado Costa, C., Demetrio, P., Lascano, C., Venturino, A., & Natale, G. S. (2020). Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) Tadpoles to Environmentally Relevant Concentrations of Chlorpyrifos: Effects at the Individual and Biochemical Levels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(4), 834–841. <https://doi.org/10.1002/ETC.4664>

- Bassó, A., Devin, S., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., & Lajmanovich, R. C. (2022). The integrated biomarker response in three anuran species larvae at sublethal concentrations of cypermethrin, chlorpyrifos, glyphosate, and glufosinate-ammonium. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 57(9), 687–696. <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2099197>
- Bezerra, V., Risso, W. E., Martinez, C. B. dos R., & Simonato, J. D. (2022). Can *Lemna minor* mitigate the effects of cadmium and nickel exposure in a Neotropical fish? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 92, 103862. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2022.103862>
- Blewett, T. A., Qi, A. A., Zhang, Y., Weinrauch, A. M., Blair, S. D., Folkerts, E. J., Sheedy, C., Nilsson, D., & Goss, G. G. (2019). Toxicity of nanoencapsulated bifenthrin to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science: Nano*, 6, 2777. <https://doi.org/10.1039/c9en00598f>
- Bonferoni, M. C., Ferraro, L., Pavan, B., Beggiato, S., Cavalieri, E., Giunchedi, P., & Dalpiaz, A. (2019). Uptake in the Central Nervous System of Geraniol Oil Encapsulated in Chitosan Oleate Following Nasal and Oral Administration. *Pharmaceutics*, 11, 106. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030106>
- Borges, R. E., Santos, L. R. de S., Benvindo-Souza, M., Modesto, R. S., Assis, R. A., & de Oliveira, C. (2019). Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(1), 22–28. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>
- Boualit, L., Cayuela, H., Ballu, A., Cattin, L., Reis, C., & Chèvre, N. (2023). The Amphibian Short-Term Assay: Evaluation of a New Ecotoxicological Method for Amphibians Using Two Organophosphate Pesticides Commonly Found in Nature—Assessment of Behavioral Traits. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(7), 1595–1606. <https://doi.org/10.1002/ETC.5642>
- Bownik, A., & Szabelak, A. (2021). Short-term effects of pesticide fipronil on behavioral and physiological endpoints of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 33254–33264.
- Bradley, T. J. (2009). *Animal osmoregulation* (Bradley T J, Ed.). Oxford University Press.
- Cabra, V., Arreguin, R., Vazquez-Duhalt, R., & Farres, A. (2006). Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(6), 1110–1118. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2006.04.002>
- Canedo, A., de Jesus, L. W. O., Bailão, E. F. L. C., & Rocha, T. L. (2021). Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution*, 290, 118019. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118019>
- Carneiro, F. E., Grott, S. C., Israel, N. G., Bitschinski, D., Abel, G., Alves, T. C., de Albuquerque, C. A. C., da Silva, E. B., & de Almeida, E. A. (2023). Influence of temperature on the biomarker responses of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) to 2-hydroxyatrazine exposure. *Aquatic Toxicology*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106468>
- Carrasco, G. H., de Souza, M. B., & Santos, L. R. S. (2021). Effect of multiple stressors and population decline of frogs. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(42), 59519–59527. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-16247-6/FIGURES/5>
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant

- Effects. <https://doi.org/10.1139/F90-237>, 47(11), 2123–2136.
- Carriquiriborde, P. (2021). Bases sobre los efectos tóxicos inducidos por los contaminantes. In *Principios de Ecotoxicología* (pp. 1–308). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/131170>
- Carvalho, C. S., Utsunomiya, H. S. M., Pasquoto, T., Lima, R., Costa, M. J., & Fernandes, M. N. (2017). Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. *Environmental Pollution*, 221, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012>
- Cavaş, T. (2017). The use of fish as model aquatic organisms in genotoxicity studies. In M. L. Larramendy (Ed.), *Issues in Toxicology, Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-Traditional Aquatic Models* (Vol. 33, pp. 245–277). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Cazenave, J., Amé, M. V., & Menone, M. L. (2021). Biomarcadores de Contaminación. In *Principios de Ecotoxicología* (Vol. 1, pp. 1–308). Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/161075>
- Chang, Y., Wang, S., Xu, J., Zhu, T., Ma, S., Zhou, A., Song, Y., Liu, M., Tian, C., & Journal, A. (2023). Optimization of extraction process of *Dioscorea nipponica* Makino saponins and their UPLC-QTOF-MS profiling, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 16, 104630. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104630>
- Chen, W., & Viljoen, A. M. (2022). Geraniol – A review update. *South African Journal of Botany*, 150, 1205–1219. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.012>
- Chhipa, H. (2019). Applications of nanotechnology in agriculture. In *Methods in Microbiology* (Vol. 46, pp. 115–142). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2019.01.002>
- Choruma, D., Balkovic, J., & Odume, O. N. (2019). Calibration and validation of the EPIC model for maize production in the Eastern Cape, South Africa. *Agronomy*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy9090494>
- Costa, L. G. (2019). Central Nervous System Toxicity Biomarkers. In R. C. Gupta (Ed.), *Biomarkers in Toxicology* (2nd ed., pp. 173–182). Academic Press.
- Da Petronilho, E. C., & Figueroa-Villar, J. D. (2014). Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. *Revista Virtual de Química*, 6(3), 671–686. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140042>
- Dai, H., Liu, B., Yang, L., Yao, Y., Liu, M., Xiao, W., Li, S., Ji, R., & Sun, Y. (2023). Investigating the Regulatory Mechanism of the Sesquiterpenol Nerolidol from a Plant on Juvenile Hormone-Related Genes in the Insect *Spodoptera exigua*. *Int. J. Mol. Sci*, 2023, 13330. <https://doi.org/10.3390/ijms241713330>
- Damásio, J., Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D., Soares, A. M. V. M., López, M. A., Riva, M. C., & Barata, C. (2010). Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology*, 19(6), 1084–1094. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0490-3>
- De Marco, I. (2022). Zein Microparticles and Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Polymers*, 14(11), 2172. <https://doi.org/10.3390/POLYM14112172>
- de Mello, M. E., França, F. M., Vieira, E., Bach, E. E., Marcantônio, A. S., & Ferreira,

- C. M. (2023). Atrazine contaminated sites and bullfrog tadpoles: evasive trends and biochemical consequences. *Ecotoxicology*, 32(3), 344–356. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02644-9>
- de Oliveira, M. M., Morato, R. G., Jorge, R. S. P., & de Paula, R. C. (2021). Agricultural activities and threat to fauna in Brazil: an analysis of the Red Book of Endangered Brazilian Fauna. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 61, e20216193. <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2021.61.93>
- Dong, S. R., Han, Q., Xu, W., & Bian, C. (2021). Effect of solvent polarity on the formation of flexible zein nanoparticles and their environmental adaptability. *Journal of Cereal Science*, 102, 103340. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2021.103340>
- Dorn, A. R., & Broyles, R. H. (1982). Erythrocyte differentiation during the metamorphic hemoglobin switch of *Rana catesbeiana* (cell separation/cellular differentiation/globin gene expression/erythrocyte removal). *Developmental Biology*, 79, 5592–5596. <https://www.pnas.org>
- Dornelles, M. F., & Oliveira, G. T. (2014). Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(3), 415–429. <https://doi.org/10.1007/S00244-013-9967-4/FIGURES/4>
- Dornelles, M. F., & Oliveira, G. T. (2016). Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1610–1620. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5388-4>
- Duque, J. E., Urbina, D. L., Vesga, L. C., Ortiz-Rodríguez, L. A., Vanegas, T. S., Stashenko, E. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2023). Insecticidal activity of essential oils from American native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): an introduction to their possible mechanism of action. *Scientific Reports*, 13, 2989. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30046-8>
- Esen, A. (1990). An immunodominant site of γ -zein1 is in the region of tandem hexapeptide repeats. *Journal of Protein Chemistry*, 9(4), 453–460. <https://doi.org/10.1007/BF01024621/METRICS>
- Farasat, I., Kushwaha, M., Collens, J., Easterbrook, M., Guido, M., & Salis, H. M. (2014). Efficient search, mapping, and optimization of multi-protein genetic systems in diverse bacteria. *Molecular Systems Biology*, 10, 731. <https://doi.org/10.15252/msb.20134955>
- Farokhchah, M., Hejazian, L., Akbarnejad, Z., Pourabdolhossein, F., Hosseini, S. M., Mehraei, T. M., & Soltanpour, N. (2021). Geraniol improved memory impairment and neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles in male wistar rats through its antioxidant effect. *Life Sciences*, 282, 119823. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119823>
- Fernández San Juan, M. R., Cortelezzi, A., Albornoz, C. B., Landro, S. M., Arrighetti, F., Najle, R., & Lavarías, S. M. L. (2020). Toxicity of pyrethroid cypermethrin on the freshwater snail *Chilina parchappii*: Lethal and sublethal effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110565. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.110565>
- Ferrante, L., Baccaro, F. B., Ferreira, E. B., Sampaio, M. F. de O., Santos, T., Justino, R. C., & Angulo, A. (2017). The matrix effect: how agricultural matrices shape forest fragment structure and amphibian composition. *Journal of Biogeography*, 44(8), 1911–1922. <https://doi.org/10.1111/jbi.12951>

- Ferrari, A., & Anguiano, O. L. (2021). Neurotoxicidad. In P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (1st ed., pp. 126–147). Editora de la Universidad de La Plata - EDULAP.
- Ferroni, H. I., Bezerra, V., Risso, W. E., Martinez, C. B. dos R., & Simonato, J. D. (2022). Sublethal Effects of Biogenic Silver Nanoparticles and Silver Nitrate in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*: Is the Nanoform Really Less Toxic? *Water, Air, and Soil Pollution*, 233(3), 1–21. <https://doi.org/10.1007/S11270-022-05547-3/FIGURES/8>
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, C., Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., ... Zaks, D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>
- Funkhouser, A. (1977). Plasma osmolarity of *Rana catesbeiana* and *Scaphiopus hammondi* tadpoles. *Herpetologica*, 33(3), 272–274.
- Ghoorchian, M., Rahmani, S., & Weisany, W. (2023). Toxicity effects of several medicinal plants essential oils on Angoumois grain moth (*Sitotroga cerealella*) female adults. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130, 1263–1271. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00792-y>
- Gilbert, S. G. (2012). *A Small Dose of Toxicology* (S. G. Gilbert, Ed.; 2nd ed.). Healthy World Press.
- Giroto, L., Isabele, , Ferreira Freitas, B., Paula, M., Yoshii, C., Bianca, , Goulart, V., Cassiana, , Montagner, C., Luis, , Schiesari, C., Luiz, E., Espíndola, G., & Freitas, J. S. (2023). Using mesocosms to evaluate the impacts of pasture intensification and pasture-sugarcane conversion on tadpoles in Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 21010–21024. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23691-5>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818. <http://science.sciencemag.org/>
- Gokturk, T., Chachkhiani Anasashvili, N., & Dumbadze, G. (2023). Chemical compositions and larvicidal effectiveness of *Rhododendron ponticum* essential oil on *Neodiprion sertifer* larvae. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 26, 1226–8615. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2023.102117>
- Gonçalves, M. W., de Campos, C. B. M., Godoy, F. R., Gambale, P. G., Nunes, H. F., Nomura, F., Bastos, R. P., da Cruz, A. D., & de Melo e Silva, D. (2019). Assessing Genotoxicity and Mutagenicity of Three Common Amphibian Species Inhabiting Agroecosystem Environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(3), 409–420. <https://doi.org/10.1007/S00244-019-00647-4/FIGURES/5>
- Green, D. M., Weir, L. A., Casper, G. S., & Lannoo, M. J. (2013). *North American amphibians: distribution and diversity* (1st ed.). University of California Press.
- Grott, S. C., Israel, N. G., Bitschinski, D., Abel, G., Carneiro, F., Alves, T. C., & Alves de Almeida, E. (2023). Influence of temperature on biomarker responses of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide ametryn. *Chemosphere*, 308. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136327>
- Grott, S. C., Israel, N., Lima, D., Bitschinski, D., Abel, G., Alves, T. C., da Silva, E. B., de Albuquerque, C. A. C., Mattos, J. J., Bairy, A. C. D., & de Almeida, E. A. (2023). Influence of temperature on growth, development and thyroid metabolism of

- American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide tebuthiuron. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103910>
- Hagvall, L., Karlberg, A.-T., Bråred, J., & Christensson, B. B. (2012). Contact allergy to air-exposed geraniol: clinical observations and report of 14 cases. *Contact Dermatitis*, 67, 20–27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2012.02079.x>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Hashem, F. M., Al-Sawahli, M. M., Nasr, M., & Ahmed, O. A. A. (2015). Optimized zein nanospheres for improved oral bioavailability of atorvastatin. *International Journal of Nanomedicine*, 10(1), 4059–4069. <https://doi.org/10.2147/IJN.S83906>
- Hassan, E. A., Hathout, R. M., Gad, H. A., & Sammour, O. A. (2022). A holistic review on zein nanoparticles and their use in phytochemicals delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 73, 103460. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103460>
- Hathout, R. M., Abdelhamid, S. G., & Metwally, A. K. A. (2020). Chloroquine and hydroxychloroquine for combating COVID-19: Investigating efficacy and hypothesizing new formulations using Bio/chemoinformatics tools. *Informatics in Medicine Unlocked*, 21, 100446. <https://doi.org/10.1016/J.IMU.2020.100446>
- Hathout, R. M., & Omran, M. K. (2016). Gelatin-based particulate systems in ocular drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 21(3), 379–386. <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.999786>
- Hewitt, N. J., Grégoire, S., Cubberley, | Richard, Duplan, H., Eilstein, J., Ellison, | Corie, Lester, C., Fabian, E., Fernandez, J., Génies, C., Jacques-Jamin, C., Klaric, M., Rothe, H., Sorrell, I., Lange, D., & Schepky, A. (2020). Measurement of the penetration of 56 cosmetic relevant chemicals into and through human skin using a standardized protocol. *J Appl Toxicol*, 40, 403–415. <https://doi.org/10.1002/jat.3913>
- Hill, R. W., Cavanaugh, D., & Anderson, M. (2021). *Animal physiology* (Vol. 5). <https://global.oup.com/academic/product/animal-physiology-9780197553596>
- Hillyard, S. D. (1999). Behavioral, molecular and integrative mechanisms of amphibian osmoregulation. *Journal of Experimental Zoology*, 283(7), 662–674. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990601\)283:7<662::AID-JEZ5>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990601)283:7<662::AID-JEZ5>3.0.CO;2-L)
- Hwang, P. P., & Lee, T. H. (2007). New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(3), 479–497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.416>
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE RED LIST OF THREATENED SPECIES (IUCN). 2020. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 21 abr. 2024.
- Jäger, T., Bäcker, S., Brodbeck, T., Leibold, E., & Bader, M. (2020). Quantitative determination of urinary metabolites of geraniol by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Analytical Methods*, 12, 5718. <https://doi.org/10.1039/d0ay01582b>
- Jain, A., & Parihar, D. K. (2018). Antibacterial, biofilm dispersal and antibiofilm potential of alkaloids and flavonoids of Curcuma. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.023>
- Jayawardena, U. A., Wickramasinghe, D. D., & Udagama, P. V. (2021). Cytogenotoxicity evaluation of a heavy metal mixture, detected in a polluted urban

- wetland: Micronucleus and comet induction in the Indian green frog (*Euphlyctis hexadactylus*) erythrocytes and the *Allium cepa* bioassay. *Chemosphere*, 277, 130278. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130278>
- Kah, M., & Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International*, 63, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>
- Kah, M., Singh Kookana, R., Gogos, A., & Daniel Bucheli, T. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 13, 677–684. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>
- Khursheed, A., Rather, M. A., Jain, V., Wani, A. R., Rasool, S., Nazir, R., Malik, N. A., & Majid, S. A. (2022). Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microbial Pathogenesis*, 173, 105854. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105854>
- Konan, K. A. J., N'cho, A. J., Kouadio, M.-F. N., Gadji, G. A., Coulibaly, N. D., Ouali-N'goran, S.-W. m, & Martin, T. (2023). Effect of biological activity of *Carapa procera* seed oil on the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130, 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00785-x>
- Kumar, A., Gupta, · K, Dixit, · S, Mishra, · K, & Srivastava, · S. (2019). A review on positive and negative impacts of nanotechnology in agriculture. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(3), 2175–2184. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2119-7>
- Ladefoged, O., Lam, H. R., Ostergaard, G., Nielsen, E., & Arlien Soborg, P. (1995). *Neurotoxicology: Review of definitions, methodology and criteria*.
- Lai, J. C., Kam, Y. C., Lin, H. C., & Wu, C. S. (2019). Enhanced salt tolerance of euryhaline tadpoles depends on increased Na⁺, K⁺-ATPase expression after salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 227, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.025>
- Lai, L. F., & Guo, H. X. (2011). Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 404(1–2), 317–323. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2010.11.025>
- Li, S., Jiang, S., Jia, W., Guo, T., Wang, F., Li, J., & Yao, Z. (2024). Natural antimicrobials from plants: Recent advances and future prospects. *Food Chemistry*, 432, 137231. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.137231>
- Li, X., Chou, M.-Y., Bonito, G. M., & Last, R. L. (2023). Anti-fungal bioactive terpenoids in the bioenergy crop switchgrass (*Panicum virgatum*) may contribute to ecotype-specific microbiome composition. *Communications Biology*, 6, 917. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05290-3>
- Lopes, A. T. de C., de Benvindo-Souza, M., Sotero, D. F., Pedroso, T. M. A., Guerra, V., Vieira, T. B., Andreani, T. L., Benetti, E. J., Simões, K., Bastos, R. P., & de Melo e Silva, D. (2023). The Use of Multiple Biomarkers to Assess the Health of Anuran Amphibians in the Brazilian Cerrado Savanna: An Ecotoxicological Approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/ETC.5723>
- Luo, M.-L., Huang, W., Zhu, H.-P., Peng, C., Zhao, Q., & Han, B. (2022). Advances in indole-containing alkaloids as potential anticancer agents by regulating autophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112827. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112827>

- Madji, A., Hosseini, S. H., Roozbeh, M., & Mohammadi, A. (2019). Antidepressant and Anxiolytic Effects of Geraniol in Mice: The Possible Role of Oxidative Stress and Apoptosis. *Iran Red Crescent Med J*, 21(6), 91593. <https://doi.org/10.5812/ircmj.91593>
- Margarido, T. C. F., Felício, A. A., De Cerqueira Rossa-Feres, D. C., & De Almeida, E. A. (2013). Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. *Marine Environmental Research*, 91, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.001>
- Matsushima, N., Danno, G. I., Takezawa, H., & Izumi, Y. (1997). Three-dimensional structure of maize α -zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1), 14–22. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00212-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00212-9)
- Medeiros, C. I., Both, C., Kaefer, I. L., & Cechin, S. Z. (2016). Reproductive phenology of the American Bullfrog in subtropical Brazil: photoperiod as a main determinant of seasonal activity. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 88(3), 1909–1921. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150694>
- Momany, F. A., Sessa, D. J., Lawton, J. W., Selling, G. W., Hamaker, S. A. H., & Willett, J. L. (2006). Structural characterization of α -zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 543–547. <https://doi.org/10.1021/JF058135H/ASSET/IMAGES/LARGE/JF058135HF00008.JPEG>
- Monserrat, J. M. (2021). Estrés Oxidativo. In P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (pp. 1–308). Editora de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Moura-Campos, D., Greenspan, S. E., DiRenzo, G. V, Neely, W. J., Felipe Toledo, L., & Guilherme Becker, C. (2021). Fungal disease cluster in tropical terrestrial frogs predicted by low rainfall. *Biological Conservation*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109246>
- Narayan, E. J. (2013). Non-invasive reproductive and stress endocrinology in amphibian conservation physiology. *Conservation Physiology*, 1(1), cot011–cot011. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot011>
- Nikinmaa, M. (2014). *An Introduction to Aquatic Toxicology*.
- Nori, J., Nicolás Urbina-Cardona, J., Loyola, R. D., Lescano, J. N., & Leynaud, G. C. (2011). Climate Change and American Bullfrog Invasion: What Could We Expect in South America? *Plos One*, 6(10), e25718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025718>
- Ocwa, A., Harsanyi, E., Széles, A., Holb, I. J., Szabó, S., Rátonyi, T., & Mohammed, S. (2023). A bibliographic review of climate change and fertilization as the main drivers of maize yield: implications for food security. *Agriculture and Food Security*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40066-023-00419-3>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Germano-Costa, T., Lima, R., Franciosi, J., Vechia, D., Soares, S. T., Junior De Andrade, D., Gonçalves, K. C., Do Nascimento, J., Polanczyk, R. A., & Fernandes Fraceto, L. (2019). Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. *Pest Management Science*, 75, 1855–1865. <https://doi.org/10.1002/ps.5338>
- Oliveira, J. L. D., Campos, E. V. R., Pereira, A. E. S., Pasquoto, T., Lima, R., Grillo, R., Andrade, D. J. De, Santos, F. A. Dos, & Fraceto, L. F. (2018). Zein

- Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(6), 1330–1340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>
- Padua, G. W., & Guardiola, L. V. (2015). Microcapsules Produced from Zein. *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*, 3–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00002-9>
- Pandey, S., Giri, K., Kumar, R., Mishra, G., & Raja Rishi, R. (2016). Nanopesticides: Opportunities in Crop Protection and Associated Environmental Risks. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(4), 1287–1308. <https://doi.org/10.1007/S40011-016-0791-2>
- Pavan, B., Dalpiaz, A., Marani, L., Beggiato, S., Ferraro, L., Canistro, D., Paolini, M., Vivarelli, F., Valerii, M. C., Comparone, A., & De Fazio, L. (2018). Geraniol Pharmacokinetics, Bioavailability and Its Multiple Effects on the Liver Antioxidant and Xenobiotic-Metabolizing Enzymes. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00018>
- Pluym, N., Stöckelhuber, M., Scherer, G., Scherer, M., & Kolossa-Gehring, M. (2022). Time trend of the exposure to geraniol in 24-h urine samples derived from the German Environmental Specimen Bank from 2004 to 2018. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 239, 113880. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113880>
- Pourzahedi, L., Pandorf, M., Ravikumar, D., Zimmerman, J. B., Seager, T. P., Theis, T. L., Westerhoff, P., Gilbertson, L. M., & Lowry, G. V. (2018). Life cycle considerations of nano-enabled agrochemicals: are today's tools up to the task? *Environmental Science: Nano*, 5, 1057. <https://doi.org/10.1039/c7en01166k>
- Proença, P. L. de F., Campos, E. V. R., Costa, T. G., de Lima, R., Preisler, A. C., de Oliveira, H. C., da Rocha, C. M., de Andrade, D. J., Goncalves, K. C., Polanczyk, R. A., & Fraceto, L. F. (2024). Curcumin and carvacrol co-loaded zein nanoparticles: Comprehensive preparation and assessment of biological activities in pest control. *Plant Nano Biology*, 8, 100067. <https://doi.org/10.1016/J.PLANA.2024.100067>
- Rimoldi, F., Salgado Costa, C., Pantucci Saralegui, M. J., Bahl, M. F., & Natale, G. S. (2023). Recovery of *Ceratophrys ornata* tadpoles exposed to environmental concentrations of chlorpyrifos: evaluation of biomarkers of exposure. *Ecotoxicology*, 32(5), 638–645. <https://doi.org/10.1007/S10646-023-02670-7/TABLES/1>
- Rocha, G. C., Ferreira, C. M., Teixeira, P. C., Dias, D. C., França, F. M., Antonucci, A. M., Marcantonio, A. S., & Lauretto, M. (2010). Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(10), 891–896.
- Roda, J. F. B., Lauer, M. M., Risso, W. E., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2020). Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 242, 110659. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2020.110659>
- Ruiz de Arcaute, C., Laborde, M., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2021). Genotoxicidad y carcinogénesis. In P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (1st ed., pp. 148–183). Editora de la Universidad Nacional de La Plata - EDULAP.
- Semlitsch, R. D., Todd, B. D., Blomquist, S. M., Calhoun, A. J. K., Gibbons, J. W., Gibbs, J. P., Graeter, G. J., Harper, E. B., Hocking, D. J., Hunter Jr., M. L., Patrick,

- D. A., Rittenhouse, T. A. G., & Rothermel, B. B. (2009). Effects of Timber Harveston Amphibian Populations: Understanding Mechanisms from Forest Experiments. *BioScience*, 59(10), 853–862. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.10.7>
- Shwaiki, L. N., Lynch, K. M., & Arendt, E. K. (2021). Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application-A focus on synthetic peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.010>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Slattery, M., Harper, B., & Harper, S. (2019). Pesticide Encapsulation at the Nanoscale Drives Changes to the Hydrophobic Partitioning and Toxicity of an Active Ingredient. *Nanomaterials* 2019, Vol. 9, Page 81, 9(1), 81. <https://doi.org/10.3390/NANO9010081>
- Smith, G. H., Roberts, J. M., & Pope, T. W. (2018). Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. *Crop Protection*, 110, 125–130. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2018.04.011>
- Sodhi, N. S., Bickford, D., Diesmos, A. C., Lee, T. M., & Koh, L. P. (2008). Measuring the Meltdown: Drivers of Global Amphibian Extinction and Decline. *PLoS ONE*, 3(2), 1636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001636>
- Souza, L., das Graças Cardoso, M., König, I., de Souza, S. P., Silva, A. L. R., Melo, N., ... & Haddi, K. (2024). Terpenes and phenylpropanoids for the control of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Toxicity, oxidative stress, histopathology, and selectivity. *Industrial Crops and Products*, 220, 119159.
- Sparling, D. W., Bickham, J., Cowman, D., Fellers, G. M., Lacher, T., Matson, C. W., & McConnell, L. (2015). In situ effects of pesticides on amphibians in the Sierra Nevada. *Ecotoxicology*, 24(2), 262–278. <https://doi.org/10.1007/S10646-014-1375-7/FIGURES/7>
- Stenström, J. R., Kreuger, J., & Goedkoop, W. (2021). Pesticide mixture toxicity to algae in agricultural streams – Field observations and laboratory studies with in situ samples and reconstituted water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 215, 112153. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112153>
- Tang, X., Shao, Y. L., Tang, Y. J., & Zhou, W. W. (2018). Antifungal Activity of Essential Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules*, 23(9), 2108. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092108>
- Teixeira, A. L. C., Marreto, L. C. N. L., Vale, F. L., Pereira e Sousa, L. J. M., Gonzaga, B. C. F., Silva, I. S., Santos, E. F., Lopes, F. F. S., Morais, S. M., Lopes, W. D. Z., Gomes, G. A., & Monteiro, C. (2023). Combinations of amitraz with essential oils from *Lippia sidoides* and *Thymus vulgaris*, thymol and thymol acetate for *Rhipicephalus microplus* control: studies under laboratory and field conditions. *Veterinary Parasitology*, 321, 109997. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109997>
- Terzić, D., Tabaković, M., Oro, V., Poštić, D., Štrbanović, R., Filipović, V., & Stanisavljević, R. (2023). Chemical and Biological Technologies in Agriculture Impact of essential oils on seed quality and seed-borne pathogens of *Althea officinalis* seeds of different ages. *Chem. Biol. Technol. Agric*, 10, 33. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00405-8>

- Tesser, M. E., Guilger, M., Bilesky-José, N., Risso, W. E., de Lima, R., & Martinez, C. B. dos R. (2022). Biogenic metallic nanoparticles (Ag, TiO₂, Fe) as potential fungicides for agriculture: are they safe for the freshwater mussel *Anodontites trapesialis*? *Chemosphere*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136664>
- Tilman, D., & Clark, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, 515(7528), 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature13959>
- Tivano, F., & Chiono, V. (2023). Zein as a renewable material for the preparation of green nanoparticles for drug delivery. *Frontiers in Biomaterials Science*, 2, 1156403. <https://doi.org/10.3389/FBIOM.2023.1156403>
- Toledo, L. F., Carvalho-e-Silva, S. P., Carvalho-e-Silva, A. M. P. T., Gasparini, J. L., Baêta, D., Rebouças, R., Haddad, C. F. B., Becker, C. G., & Carvalho, T. (2023). A retrospective overview of amphibian declines in Brazil's Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 277, 109845. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109845>
- Uçkun, M., & Özmen, M. (2021). Evaluating Multiple Biochemical Markers in *Xenopus laevis* Tadpoles Exposed to the Pesticides Thiachloprid and Trifloxystrobin in Single and Mixed Forms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(10), 2846–2860. <https://doi.org/10.1002/ETC.5158>
- Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, A., Ur Rehman, H., Ashraf, I., Sanaullah, M., & Gan, J. (2020). Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*, 721, 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>
- Vasconcelos, A. M., Daam, M. A., De Resende, J. C., Casali-Pereira, M. P., Evaldo, •, & Espíndola, L. G. (2017). Survival and development of bullfrog tadpoles in microcosms treated with abamectin. *Ecotoxicology*, 26, 729–737. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1804-5>
- Venzon, L., Mariano, L. N. B., Somensi, L. B., Boeing, T., de Souza, P., Wagner, T. M., Andrade, S. F. de, Nesello, L. A. N., & da Silva, L. M. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.12.020>
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Caldas, S. S., Tesser, M. E., Risso, W. E., Escarrone, A. L. V., Primel, E. G., Bianchini, A., & dos Reis Martinez, C. B. (2019). An integrated approach in subtropical agro-ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. *Science of the Total Environment*, 666, 508–524. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.209>
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., Primel, E. G., Meletti, P. C., Fillmann, G., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of The Total Environment*, 542, 44–56. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.10.071>
- Voet, D., & Voet, J. G. (2011). *Biochemistry* (4th ed.). John Wiley and Sons.
- Walker, G. W., Kookana, R. S., Smith, N. E., Kah, M., Doolette, C. L., Reeves, P. T., Lovell, W., Anderson, D. J., Turney, T. W., & Navarro, D. A. (2017). Ecological Risk Assessment of Nano-enabled Pesticides: A Perspective on Problem Formulation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 66, 6480–6486. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02373>
- Wang, D., Saleh, N. B., Byro, A., Zepp, R., Sahle-Demessie, E., Luxton, T. P., Ho, K.

- T., Burgess, R. M., Flury, M., White, J. C., & Su, C. (2022). Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. *Nature Nanotechnology*, 17, 347–360. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01082-8>
- Wang, D., Tao, S., Yin, S. W., Sun, Y., & Li, Y. (2020). Facile preparation of zein nanoparticles with tunable surface hydrophobicity and excellent colloidal stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 591, 124554. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2020.124554>
- Wang, Q., Xian, W., Li, S., Liu, C., & Padua, G. W. (2008). Topography and biocompatibility of patterned hydrophobic/hydrophilic zein layers. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 844–851. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2008.01.017>
- Wei, Y., Wang, C., Liu, X., Liao, W., Zhang, L., Chen, S., Liu, J., Mao, L., Yuan, F., & Gao, Y. (2021). Effects of microfluidization and thermal treatment on the characterization and digestion of curcumin loaded protein–polysaccharide–tea saponin complex nanoparticles. *Food & Function*, 12(3), 1192–1206. <https://doi.org/10.1039/D0FO02283G>
- Wilson, C. M. (1991). Multiple Zeins from Maize Endosperms Characterized by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiology*, 95(3), 777–786. <https://doi.org/10.1104/PP.95.3.777>
- Wingen, N. M. de A., Cubas, G. K., & Oliveira, G. T. (2023). Impact of 2,4-D and glyphosate-based herbicides on morphofunctional and biochemical markers in *Scinax squalirostris* tadpoles (Anura, Hylidae). *Chemosphere*, 340, 139918. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139918>
- Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K., & Bojarski, B. (2022). Hematological methods in fish – Not only for beginners. *Aquaculture*, 547. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737498>
- Wolmarans, N. J., Bervoets, L., Gerber, R., Yohannes, Y. B., Nakayama, S. M., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., Meire, P., Smit, N. J., & Wepener, V. (2021). Bioaccumulation of DDT and other organochlorine pesticides in amphibians from two conservation areas within malaria risk regions of South Africa. *Chemosphere*, 274, 129956. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129956>
- Wu, Y., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.03.027>
- Xiao, J. (2022). Recent advances in dietary flavonoids for management of type 2 diabetes. *Current Opinion in Food Science*, 44, 100806. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.01.002>
- Yin, X., Zhu, G., Bing Li, X., & Liu, S. (2009). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research*, 680, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.018>
- Zabel, F., Delzeit, R., Schneider, J. M., Seppelt, R., Mauser, W., & Václavík, T. (2019). Global impacts of future cropland expansion and intensification on agricultural markets and biodiversity. *Nature Communications*, 10, 2844. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10775-z>
- Zhang, W., Chen, L., Xu, Y., Deng, Y., Zhang, L., Qin, Y., Wang, Z., Liu, R., Zhou, Z., & Diao, J. (2019). Amphibian (*Rana nigromaculata*) exposed to cyproconazole: Changes in growth index, behavioral endpoints, antioxidant biomarkers, thyroid and gonad development. *Aquatic Toxicology*, 208, 62–70. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2018.12.015>

- Zhang, Y., & Goss, G. G. (2022). Nanotechnology in agriculture: Comparison of the toxicity between conventional and nano-based agrochemicals on non-target aquatic species. *Journal of Hazardous Materials*, 439. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129559>
- Zhao, X., Wu, H., Yue, S., Chen, X., Huang, Y., Cao, H., & Liao, M. (2023). Role of CYP6MS subfamily enzymes in detoxification of *Sitophilus zeamais* after exposure to terpinen-4-ol and limonene. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 193, 105426. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105426>
- Zhao, Z., Wang, L., Ruan, Y., Wen, C., Ge, M., Qian, Y., & Ma, B. (2023). Physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from the peel of *Dioscorea opposita* Thunb. extracted by four different methods. *Food Science and Human Wellness*, 12(1), 130–139. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2022.07.031>

2 CAPÍTULO II

Diferentes concentrações de geraniol nanoencapsulado induzem letargia e atividade da acetilcolinesterase em girinos *Aquarana catesbeiana*

Manuscrito a ser submetido à revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

Guia para submissões: <https://link.springer.com/journal/128/submission-guidelines>

Diferentes concentrações de geraniol nanoencapsulado induzem letargia e atividade da acetilcolinesterase em girinos *Aquarana catesbeiana*

Willian de Paula Santos^a; Caroline Santos^a; Letícia Paduan Tavares^a; Jhones Luís de Oliveira^b; Leonardo Fernandes Fraceto^b; Claudia Bueno dos Reis Martinez^{b,*}

a: Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina;

b: Departamento de Engenharia Ambiental, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

*: Autor correspondente: Tel.: +55-43-33715146; E-mail: cbueno@uel.br

RESUMO

O geraniol nanoencapsulado (nGER) vem sendo estudado como uma alternativa promissora aos agrotóxicos sintéticos de uso atual ao combinar efeitos pesticidas do geraniol com a proteção contra a degradação ambiental proporcionada pelas nanocápsulas de zeína. Os anuros são organismos não-alvo extremamente prejudicados pelos efeitos de agrotóxicos. Entretanto, estudos que investiguem os efeitos causados por biopesticidas em anfíbios ainda são escassos. Desta maneira, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do nGER, através de análises comportamentais e da atividade da acetilcolinesterase (AChE) muscular, em girinos de *Aquarana catesbeiana* expostos a diferentes concentrações de nGER (em mg L⁻¹): 1 (nGER 1); 5 (nGER 5); 10 (nGER 10); e 20 (nGER 20). A caracterização das nanopartículas na água do aquário ao longo do tempo de exposição (96 h) revelou tamanhos similares entre os diferentes grupos. Porém, a concentração de partículas dos grupos nGER 10 e nGER 20 diminuiu, o que indica um processo de agregação e precipitação das partículas nesse grupo. Os resultados dos biomarcadores mostram que concentrações de nGER de 10 e 20 mg L⁻¹ induzem letargia nos animais em 96h de exposição. No entanto, alteração da AChE muscular, no caso indução, foi notada apenas nos animais expostos a 5 mg L⁻¹. Assim, o efeito neurodepressor do nGER parece não estar relacionado com a atividade da AChE nos girinos de rã-touro. Desta forma, a hipótese deste trabalho foi parcialmente aceita, visto que as concentrações mais altas de nGER alteraram significativamente o comportamento de *A. catesbeiana*, entretanto não induziram alterações na AChE. Este foi o primeiro trabalho a avaliar a toxicidade do GER e nGER em anfíbios, especificamente girinos *A. catesbeiana*, demonstrando a importância de verificar os efeitos sobre organismos não-alvo antes de determinar se uma alternativa é, de fato, mais sustentável.

Palavras-chave: anuros; comportamento; monoterpeno; nanotecnologia; óleos essenciais.

2.1 INTRODUÇÃO

Os anuros, uma classe de vertebrados significativamente impactada pelas atividades agrícolas, experimentaram um declínio notável nas populações globais na última década (Carrasco et al., 2021; Sodhi et al., 2008). A entrada de agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos afeta principalmente os girinos, estágio larval dos anuros, que ficam confinados a esses ambientes. Esta exposição leva a numerosos efeitos prejudiciais (Boualit et al., 2023; Margarido et al., 2013; Rimoldi et al., 2023; Uçkun & Özmen, 2021; Zhang et al., 2019), que podem dificultar o seu desenvolvimento até a idade adulta.

Em resposta aos impactos adversos dos agrotóxicos tradicionais, o geraniol (GER), um monoterpene acíclico produzido pelo metabolismo secundário de várias espécies de plantas, emergiu como um candidato promissor para biopesticida. O GER é conhecido por sua ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos fungicidas (Kaur et al., 2019; Tang et al., 2018) e propriedades inseticidas (Chen & Viljoen, 2022; Kaur et al., 2019; Radwan et al., 2024). Notavelmente, o GER é um componente de dois biofungicidas utilizados contra o mofo cinzento nas vinhas europeias (EFSA, 2012; EPA, 2020). Embora o GER possa apresentar toxicidade em altas concentrações em ensaios *in vitro* (Mamur, 2022) e para embriões de peixes (Singulani et al., 2018), tem sido considerado seguro quando administrado a roedores (Pavan et al., 2018).

A aplicação da nanotecnologia na agricultura apresenta uma alternativa inovadora aos agrotóxicos convencionais. As nanopartículas (NPs) liberam o ingrediente ativo (IA) gradativamente, protegendo-os da degradação ambiental, prolongando seu tempo de ação e reduzindo a necessidade de aplicações frequentes de agrotóxicos. Além disso, devido ao seu tamanho diminuto, as NPs possuem uma área superficial elevada, aumentando sua adsorção aos alvos (Zhang & Goss, 2022). Estas propriedades reduzem a pegada ambiental destes compostos. Vários estudos relataram menor toxicidade dos nanopesticidas para animais em comparação com seus ingredientes ativos livres (Andrade et al., 2019; Hennig et al., 2023; Zhang & Goss, 2022).

A proteína zeína, extraída do milho (*Zea sp.*), é abundante, possui baixa solubilidade em água (Matsushima et al., 1997) e apresenta alta capacidade de compactação (Hassan et al., 2022). Essas características tornam a zeína ideal para a

confeção de NPs, e as nanopartículas de zeína são amplamente utilizadas como veículo para fitoquímicos, tendo sido estabelecidas como seguras pela FDA (*Food and Drug Administration Agency*, EUA) (De Marco, 2022).

Combinando os efeitos pesticidas do geraniol com a proteção contra a degradação proporcionada pelas nanopartículas, a nanoencapsulação de geraniol em nanocápsulas de zeína (nGER) surge como uma abordagem promissora para a agricultura sustentável (De Oliveira et al., 2018). Estudos *in vitro* demonstraram que o nGER apresenta menor citotoxicidade em células de fibroblastos humanos quando comparados ao geraniol livre (Oliveira et al., 2019); entretanto, não existem estudos *in vivo* sobre os efeitos do nGER em animais aquáticos.

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda (96h) de diferentes concentrações de geraniol nanoencapsulado (nGER) em girinos de *Aquarana catesbeiana* (sin. *Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802) através de análise comportamental e atividade da acetilcolinesterase muscular (AChE). A hipótese deste trabalho é de que concentrações mais altas de nGER ocasionarão maiores efeitos comportamentais, que estarão associados a alterações na atividade da enzima AChE. Este trabalho é inédito ao ser o primeiro a avaliar os efeitos do geraniol livre e nanoencapsulado em *A. catesbeiana*, abrindo caminho para futuras investigações mais específicas nesta e em outras espécies de anfíbios.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

As nanocápsulas de zeína (Sigma Aldrich, EUA; CAS n° 9010-66-6) contendo geraniol (Quinarí, Brasil; CAS n° 106-24-1) foram sintetizadas seguindo a metodologia descrita por Hu & McClements (2014), com algumas modificações (Rogerio et al., 2022). Emulsões contendo as nanocápsulas com uma concentração de ativo de 20 mg mL⁻¹ (nGER), assim como emulsões contendo apenas o ingrediente ativo (GER) na mesma concentração, foram preparadas utilizando o tensoativo Pluronic F-68 (Sigma Aldrich, EUA; CAS n° 9003-11-6).

As formulações de nanopartículas foram submetidas à caracterização físico-química por meio de espectroscopia de correlação de fótons para determinação

do diâmetro hidrodinâmico e da polidispersidade das nanopartículas (ZetaSizer ZS 90 - Malvern) e microeletroforese para medição do potencial zeta. Ainda, amostras obtidas da água dos aquários ao longo do tempo foram submetidas a análise de rastreamento de nanopartículas empregando NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm) e uma câmera CMOS com software NanoSight para determinar a concentração e distribuição de tamanho das nanopartículas.

2.2.2 Obtenção e aclimação dos animais

Girinos de *A. catesbeiana* com comprimento de $5,9 \pm 0,05$ cm e peso de $1,7 \pm 0,05$ g (média $\pm$ E.P.; $n = 60$), nos estágios 25-31 de desenvolvimento segundo Gosner (1960), foram adquiridos do Ranário Nova Fátima (Nova Fátima, PR) e levados ao Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (LEFA/UEL; Londrina, PR). O transporte foi realizado em sacos plásticos contendo água desclorada e com aeração adequada. No laboratório, os girinos foram aclimatados durante 7 dias em um tanque contendo 100 L de água desclorada e com aeração constante. Nesse período, receberam alimentação duas vezes ao dia com ração comercial para peixes (*Nutrifish*®), e 80% da água era trocada diariamente. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados (Horiba U-52), apresentando temperatura de $22,4 \pm 1,3$ °C, oxigênio dissolvido de $7,2 \pm 0,1$ mg L⁻¹, pH de $7,42 \pm 0,13$, condutividade de $99,2 \pm 0,2$ µS cm⁻¹ e turbidez de $5,7 \pm 1,8$ UT (média $\pm$ E.P.). O fotoperíodo foi mantido em 10h de luz e 14h de escuridão.

2.2.3 Delineamento experimental

Após a fase de aclimação, a alimentação dos girinos foi interrompida 24 horas antes do início do experimento, que durou 96 horas. Os girinos foram transferidos para aquários de 10 L ($n = 10$ animais/aquário) e distribuídos em seis grupos ($n = 1$ aquário/grupo): aquário contendo apenas água desclorada (CTR); aquário com água contendo o solvente Pluronic® F-68 0,002% (PLU); e aos demais aquários foi adicionado à água geraniol nanoencapsulado nas seguintes concentrações: 1 mg L⁻¹ (nGER 1); 5 mg L⁻¹ (nGER 5); 10 mg L⁻¹ (nGER 10); e 20 mg L⁻¹ (nGER 20). Os girinos foram alimentados após 48 horas, seguida da renovação de 80% do meio de exposição com reestabelecimento das concentrações dos

xenobióticos. Durante o experimento, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e mantiveram-se constantes (temperatura: $21,5 \pm 0,9$ °C; oxigênio dissolvido: $6,8 \pm 0,3$ mg L⁻¹; pH: $7,1 \pm 0,12$; condutividade: $91,9 \pm 0,5$ µS cm⁻¹; turbidez: $2,3 \pm 0,6$ UT; média ± E.P.).

As concentrações foram definidas baseando-se na concentração de geraniol presente nos biopesticidas Novellus® (EFSA, 2012) e Mevalone® (EPA, 2020). Levando em consideração o efeito da diluição no ambiente após aplicação, as diferentes concentrações foram estabelecidas a partir da concentração de 5 mg L⁻¹, que equivale à ≤ 10.000 vezes que nos biopesticidas.

Ao final da exposição, os girinos foram anestesiados com benzocaína ($0,1$ g L⁻¹) e submetidos à eutanásia por secção medular para a remoção do músculo caudal, que foi armazenado a -80 °C até o momento da análise da atividade da AChE. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA/UEL: 009.2023).

2.2.4 Teste de sensibilidade

O comportamento dos animais foi avaliado em 6, 24, 48 e 96 horas de exposição, pelo método descrito por do Amaral et al. (2018) com modificações, conforme descrito a seguir. A água dos aquários foi agitada com o auxílio de um bastão de vidro durante 15 segundos e observação da resposta natatória dos animais pelos próximos 45 segundos, totalizando 1 minuto de análise por aquário. A análise foi gravada para posterior contagem, às cegas, do número de indivíduos que não exibiram resposta natatória ao estímulo da agitação, caracterizando assim um estado letárgico. Foi certificado de que os animais não estavam mortos pois, ao tocá-los, eles respondiam nadando. Para cada tratamento (CTR, PLU, nGER 1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20), foi realizado uma média e desvio padrão considerando o número de indivíduos letárgicos em cada momento analisado (6, 24, 48 e 96h). Os resultados foram expressos em número de indivíduos letárgicos.

2.2.5 Atividade da acetilcolinesterase

As amostras de músculo caudal foram homogeneizadas (1:10; m:v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,3) e centrifugadas (30.000 g; 4 °C; 20 min)

para a obtenção do sobrenadante, que foi utilizado para a avaliação da atividade da enzima AChE. A análise consistiu na reação do DTNB com o iodeto de acetilcolina, promovida pela AChE presente na amostra, formando um composto amarelado que foi quantificado em espectrofotometria (Victor³_{TM}, PerkinElmer, USA) de acordo com Alves Costa et al. (2007) e Ellman et al. (1961). Para a padronização da variação interindividual das amostras, a quantidade de proteínas presente em cada uma delas foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976). O resultado da atividade da enzima foi expresso em nmol DTNB min⁻¹.mg ptn⁻¹.

2.2.6 Análises estatísticas

Utilizando o software R, os resultados obtidos para o teste de sensibilidade e análise da AChE foram comparados entre os diferentes tratamentos (CTR, PLU, nGER 1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20) por meio de testes paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis), conforme a distribuição dos dados (normalidade e homoscedasticidade). Quando necessário, para identificar as diferenças, foram aplicados testes de comparações múltiplas Student Newman Keuls para dados paramétricos, ou Dunn's para dados não paramétricos. Considerou-se como significativos os valores de $p < 0,05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Caracterização das nanopartículas

A análise da formulação das nanopartículas mostrou tamanho de 106,7-126,7 nm; polidispersão de 0,16-0,22; e potencial zeta de 14,9-25,6 mV. A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) na água dos aquários revelou um tamanho hidrodinâmico médio similar entre os diferentes grupos (nGER 1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20; Tabela 1). A distribuição do tamanho das partículas obtida do NTA indica a presença de diferentes populações na água dos aquários de todos os grupos (valores de spam, Tabela 1), com duas populações principais apresentando tamanhos em torno ou superiores a 100 nm, bem como populações de nanopartículas com tamanho < 100 nm (Fig. 16).

As nanopartículas dos grupos nGER 1 e nGER 5 apresentaram diminuição em seu tamanho ao final do experimento em relação ao início, entretanto a concentração de partículas aumentou (Tabela 1; Fig. 16A-16F). Este achado pode representar um processo de desagregação em condições de aquários. Já as nanopartículas dos grupos nGER 10 e nGER 20 apresentaram um comportamento inverso, ou seja, o tamanho das partículas ao final do experimento estava maior que no início, enquanto a sua concentração diminuiu (Tabela 1; Fig. 16G-16L), o que indica um processo de agregação das nanopartículas na água dos aquários.

Tabela 1 – Tamanho, spam e concentração de nanopartículas obtidas por NTA em amostras coletadas dos diferentes tratamentos experimentais (nGER 1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20) no tempo 0, 48 e 96h de exposição.

Tempo	Grupo	Tamanho Médio (nm)	Spam	Concentração (partículas mL ⁻¹)
0h	nGER 1	269.8 ± 4.60	1.22	7.03 ⁸ ± 0.45 ⁸
	nGER 5	292.7 ± 13.5	1.00	6.58 ⁸ ± 0.31 ⁸
	nGER 10	240.6 ± 24.8	0.96	8.33 ⁸ ± 1.17 ⁸
	nGER 20	232.5 ± 7.80	1.02	13.9 ⁸ ± 1.24 ⁸
48h	nGER 1	204.0 ± 15.7	1.18	2.90 ⁸ ± 6.84 ⁷
	nGER 5	251.3 ± 22.0	1.13	3.26 ⁸ ± 0.9.9 ⁷
	nGER 10	228.4 ± 20.7	0.92	4.80 ⁸ ± 6.33 ⁷
	nGER 20	314.0 ± 7.90	1.09	9.62 ⁸ ± 3.40 ⁷
96h	nGER 1	194.3 ± 10.3	1.02	11.9 ⁸ ± 7.77 ⁷
	nGER 5	273.3 ± 4.30	1.08	9.23 ⁸ ± 6.12 ⁸
	nGER 10	255.4 ± 20.4	1.20	4.01 ⁸ ± 2.76 ⁷
	nGER 20	232.4 ± 9.10	1.44	1.84 ⁸ ± 1.22 ⁷

Os resultados foram expressos em média ± D.P. Spam = polidispersão.

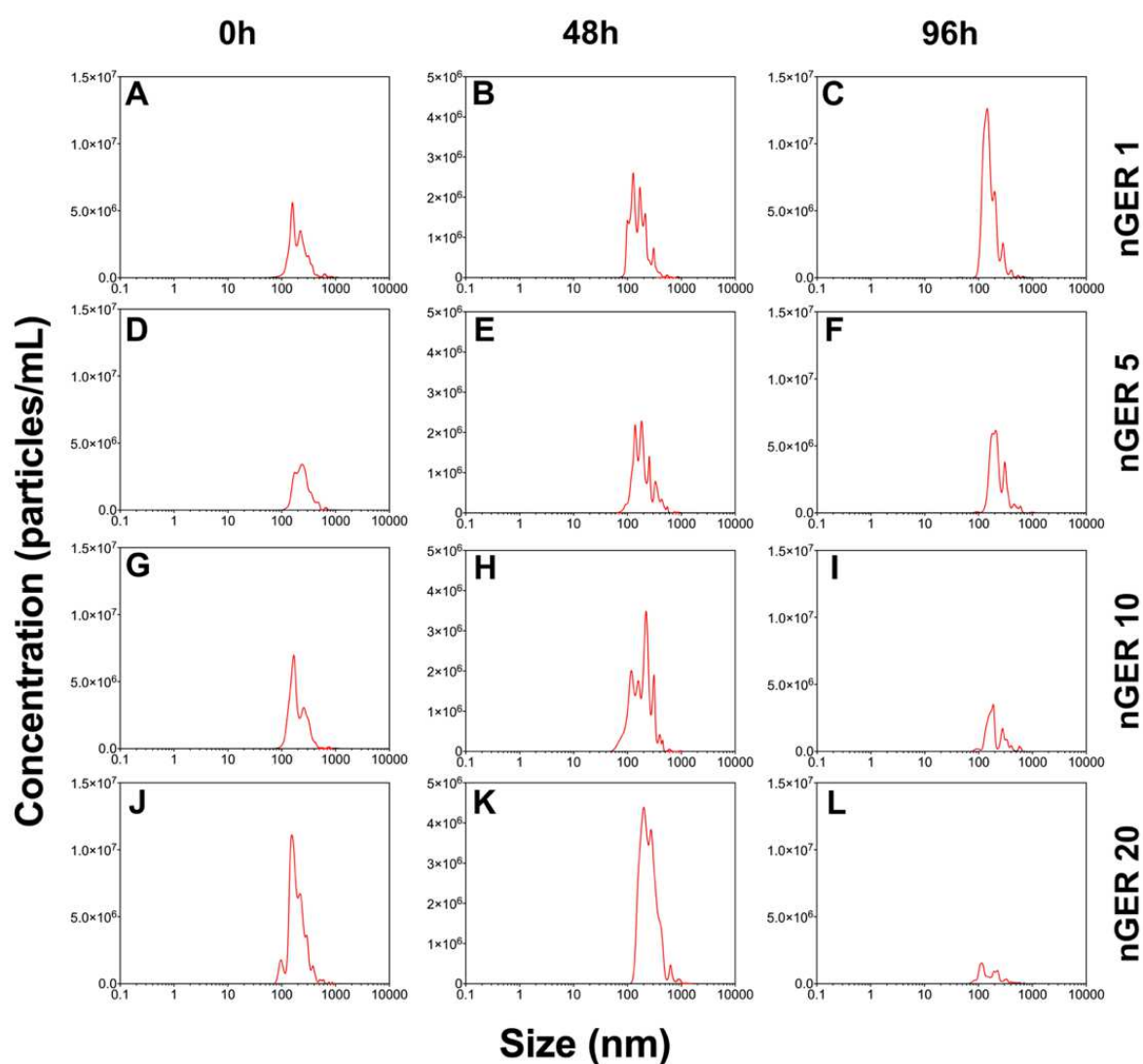


Figura 16. Concentração de partículas (eixo Y) pelo seu tamanho (eixo X) ao decorrer do tempo (0, 48 e 96h) para cada grupo experimental (A-C: nGER 1; D-F: nGER 5; G-I: nGER 10; e J-K: nGER 20).

2.3.2 Teste de sensibilidade

Ao longo das 96h de exposição, tanto o grupo nGER 10 quanto nGER 20 apresentaram um número significativamente maior de indivíduos letárgicos comparados ao grupo CTR ($p = 0,002$ e $p = 0,03$, respectivamente). O grupo nGER 10 ainda apresentou mais indivíduos letárgicos que PLU ($p = 0,003$) e nGER 1 ($p = 0,007$) (Fig. 17).

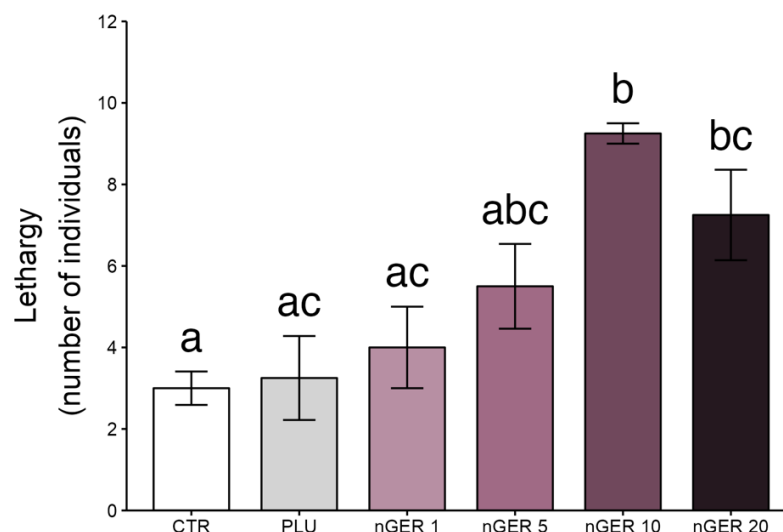


Figura 17. Número de indivíduos de *Aquarana catesbeiana* letárgicos durante exposição de 96h aos diferentes tratamentos (CTR, PLU, nGER1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Média $\pm$ E.P.; $n = 10$.

2.3.3 Atividade da acetilcolinesterase

Ao final das 96h de exposição, apenas os animais de nGER 5 apresentaram atividade da AChE significativamente maior em comparação aos demais grupos ($p = 0,01$) (Fig. 18).

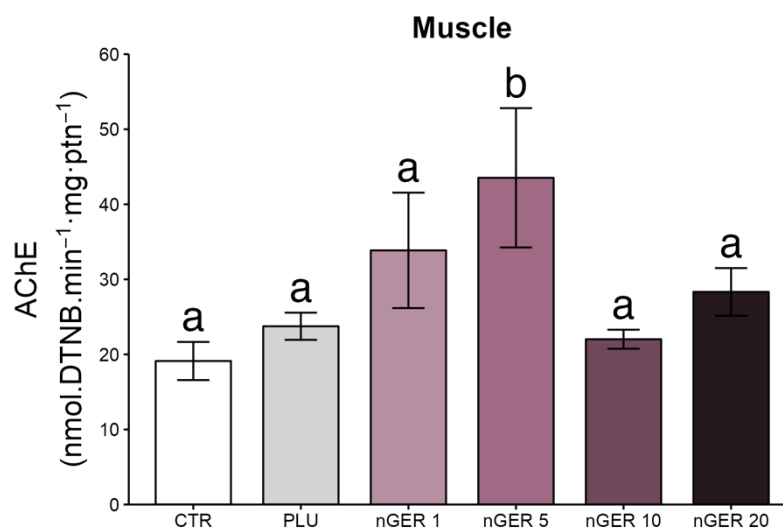


Figura 18. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo caudal de girinos de *Aquarana catesbeiana* após 96h de exposição aos diferentes tratamentos (CTR, PLU, nGER 1, nGER 5, nGER 10 e nGER 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Média $\pm$ E.P.; $n = 10$.

2.4 DISCUSSÃO

Até onde sabemos este é o primeiro estudo que avaliou alterações comportamentais causadas pelo geraniol livre e nanoencapsulado em anuros. As nanocápsulas de zeína apresentam baixa estabilidade em soluções aquosas, tendendo a formar agregados e precipitar-se (Chen & Zhong, 2014; Pascoli et al., 2018; Proença et al., 2024). Esta instabilidade está de acordo com os resultados de caracterização destas partículas na água do aquário, onde foram notadas alterações no tamanho e concentração ao longo do tempo. Especificamente, o tamanho das nanopartículas diminuiu enquanto a sua concentração aumentou nos grupos nGER 1 e nGER 5, provavelmente devido aos girinos terem sido expostos em pH neutro. Em pH próximos ao neutro, a zeína torna-se ainda mais instável porque seu ponto isoelétrico é pH 6,2 (Cheng & Jones, 2017; Hu & McClements, 2015; Pascoli et al., 2018; Proença et al., 2024). Desta maneira, as partículas podem ter sofrido um processo de desagregação, aumentando o número de partículas de tamanhos menores. Já nos grupos nGER 10 e nGER 20, o comportamento das nanopartículas é semelhante aos já registrados em diferentes trabalhos de nanoecotoxicologia aquática: aumento de tamanho e diminuição na concentração de partículas, indicando agregação e precipitação das mesmas (Andrade et al., 2019; Ferroni et al., 2022; Tesser et al., 2020).

De acordo com nossos resultados, na concentração de 5 mg L⁻¹ os girinos apresentaram atividade natatória semelhante a todos os grupos, inclusive o CTR. Esta concentração (5 mg L⁻¹) também foi a única que induziu a atividade da enzima AChE muscular. Desta maneira, a hipótese deste trabalho foi parcialmente aceita, visto que as maiores concentrações de nGER causaram efeitos comportamentais nos girinos, porém essas concentrações não alteraram a atividade da AChE.

Apesar de não ter sido observada mortalidade entre os grupos experimentais, concentrações mais elevadas de nanocápsulas de zeína contendo geraniol (10 e 20 mg L⁻¹) alteraram significativamente o comportamento dos animais, induzindo letargia em comparação ao grupo CTR. Componentes de óleos essenciais, principalmente os monoterpenos, já demonstraram potencial de alterar o comportamento de animais, principalmente produzindo efeitos ansiolíticos e induzindo menor locomoção em peixes e mamíferos (Bianchini et al. 2017; do Amaral et al. 2023;

Rocha et al. 2024). Williams et al. (2024) estudando a resposta olfatória de camundongos expostos a concentrações variadas de 9 diferentes monoterpenos, determinou que os camundongos são mais sensíveis ao geraniol que aos demais, pois eram capazes de lamber os frascos e receber uma recompensa hídrica em concentrações a partir de $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de geraniol.

O geraniol é um fitoconstituente primário de certos óleos essenciais (de Araújo et al., 2021, 2023) e é conhecido por seu alto potencial anestésico, tanto em peixes (Aydın & Barbas, 2020) quanto em ratos (Medeiros et al., 2018; Xu et al., 2022). Como molécula terpenóide, o geraniol exerce seus efeitos anestésicos ativando alostericamente os receptores GABA_A (Koziol et al., 2014). Essa ligação aos receptores GABA_A no núcleo paraventricular desencadeia sua ativação, levando a efeitos inibitórios através do influxo de íons cloreto e subsequente hiperpolarização das membranas neuronais, o que impede a propagação de potenciais de ação. Esses efeitos foram demonstrados por meio de técnicas de acoplamento molecular e eletroencefalografia em ratos tratados com diversas concentrações de geraniol (Xu et al., 2022). Além de sua ação nos receptores GABA_A, outra hipótese testada no presente trabalho foi a de que nanocápsulas contendo geraniol apresentariam atividade neurodepressora por meio da indução de acetilcolinesterase (AChE). A AChE, localizada nas fendas sinápticas dos neurônios colinérgicos, interrompe a transmissão sináptica ao degradar o neurotransmissor acetilcolina (ACh). A superativação da AChE pode diminuir rapidamente as concentrações de ACh, dificultando a propagação do impulso nervoso e causando efeitos adversos como fraqueza muscular e fadiga. Curiosamente, nos grupos com animais mais letárgicos (nGER 10 e nGER 20), a atividade da AChE não se alterou, enquanto aumentou apenas no grupo nGER 5. Este resultado está alinhado com os achados de López et al. (2015), que observaram que concentrações mais baixas de geraniol ativaram a AChE *in vitro*, enquanto concentrações mais altas a inibiram.

Portanto, considerando os resultados comportamentais, parece que a atividade neurodepressora do geraniol não está relacionada com a modulação da AChE. A letargia comportamental observada pode estar relacionada ao mesmo mecanismo de ativação alostérica dos receptores GABA_A responsáveis pelos efeitos neurodepressores em ratos. Este mecanismo também poderia explicar as mudanças comportamentais observadas nos girinos, uma vez que estes animais possuem neurônios responsivos ao GABA mesmo em estágios iniciais de desenvolvimento

(Mathieson, 1996; Miraucourt et al., 2012; Simmons & Chapman, 2002).

Medeiros et al. (2018) relataram de forma semelhante locomoção mais lenta e aumento da duração do sono em ratos machos aos quais foram administradas diferentes doses de geraniol, atribuindo essas alterações à sua ação nos receptores GABA_A e identificando o geraniol como uma molécula neurodepressora. Assim, os paralelos entre estes resultados destacam o potencial da interação do geraniol com os receptores GABA_A na condução das alterações neurocomportamentais observadas nos animais.

2.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, o geraniol nanoencapsulado em altas concentrações (10 e 20 mg L⁻¹), induz alterações comportamentais relacionadas a ocorrência de letargia em girinos. Notavelmente, efeitos bioquímicos na enzima acetilcolinesterase foram detectados na concentração de 5 mg L⁻¹, apesar desses animais exibirem padrões comportamentais semelhantes aos dos grupos de controle. Como este é o primeiro estudo a investigar os efeitos do geraniol nanoencapsulado em girinos, este trabalho estabelece bases para estudos futuros. Pesquisas subsequentes devem envolver um número maior de réplicas e se concentrar em elucidar os mecanismos moleculares subjacentes à letargia observada e às alterações na atividade da acetilcolinesterase.

2.6 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Pesquisador do Estado de São Paulo (FAPESP Processo: 2017/21004-5); Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (INCT-NanoAgro); À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa a W. P. Santos. C. B. R Martinez é pesquisadora associada ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Alves Costa, J. R. M., Mela, M., Silva de Assis, H. C. da, Pelletier, É., Randi, M. A. F., & Oliveira Ribeiro, C. A. de. (2007). Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2006.03.013>
- Andrade, L. L. de, do Espírito Santo Pereira, A., Fernandes Fraceto, L., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2019). Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. *Science of the Total Environment*, 663, 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.380>
- Araújo, E. R. L. de, da Silva e Silva, J., Lopes, L. M., Torres, M. F., da Costa, B. M. P. A., do Amarante, C. B., Hamoy, M., Barbas, L. A. L., & Sampaio, L. A. (2021). Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. *Aquaculture*, 537, 736517. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736517>
- Aydın, B., & Barbas, L. A. L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture*, 520, 734999. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.734999>
- Bianchini, A. E., Garlet, Q. I., Da Cunha, J. A., Bandeira Junior, G., Brusque, I. C. M., Salbego, J., ... & Baldisserotto, B. (2017). Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50, e6346. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176346>
- Boualit, L., Cayuela, H., Ballu, A., Cattin, L., Reis, C., & Chèvre, N. (2023). The Amphibian Short-Term Assay: Evaluation of a New Ecotoxicological Method for Amphibians Using Two Organophosphate Pesticides Commonly Found in Nature—Assessment of Behavioral Traits. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(7), 1595–1606. <https://doi.org/10.1002/ETC.5642>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carrasco, G. H., de Souza, M. B., & Santos, L. R. S. (2021). Effect of multiple stressors and population decline of frogs. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(42), 59519–59527. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-16247-6/FIGURES/5>
- Chen, H., & Zhong, Q. (2014). Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 358–366. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.06.012>
- Chen, W., & Viljoen, A. M. (2022). Geraniol – A review update. *South African Journal of Botany*, 150, 1205–1219. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.012>
- Cheng, C. J., & Jones, O. G. (2017). Stabilizing zein nanoparticle dispersions with ι-carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 69, 28–35. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.01.022>
- de Araújo, E. R. L., Torres, M. F., Hamoy, M., Barbas, L. A. L., & Sampaio, L. A. (2023). Cardiac response of tambaqui *Colossoma macropomum* anaesthetised with geraniol and citronellol. *Aquaculture*, 565, 739101.

- <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.739101>
- do Amaral, D.F., Montalvão, M.F., de Oliveira Mendes, B. et al. (2018). Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 12932–12946. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1562-9>
- do Amaral, M. P. D. M., Silva Junior, M. P. D., Lima, F. D. C. A., Gutierrez, S. J. C., Arcanjo, D. D. R., & Oliveira, R. D. C. M. (2023). Anxiolytic/Sedative Effect of Monoterpene (–)-Borneol in Mice and In Silico Molecular Interaction with GABAA Receptor. *Future Pharmacology*, 3(1), 132-141. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol3010009>
- De Marco, I. (2022). Zein Microparticles and Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Polymers*, 14(11), 2172. <https://doi.org/10.3390/POLYM14112172>
- De Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Pereira, A. E. S., Nunes, L. E. S., Da Silva, C. C. L., Pasquoto, T., Lima, R., Smaniotto, G., Polanczyk, R. A., & Fraceto, L. F. (2018). Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(21), 5325–5334. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B00331/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2018-00331T_0007.JPEG
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AUTHORITY (EPA). 2020. Science memo for application to import or manufacture NOVELLUS FUNGICIDE for release (APP203836). Disponível em: https://www.epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsnoar/APP203836/APP203836_Science_Memorandum.pdf. Acesso em: 13 out. 2022.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance geraniol. EFSA Journal 10(11):2915. doi:10.2903/j.efsa.2012.2915
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ferroni, H. I., Bezerra, V., Risso, W. E., Martinez, C. B. dos R., & Simonato, J. D. (2022). Sublethal Effects of Biogenic Silver Nanoparticles and Silver Nitrate in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*: Is the Nanoform Really Less Toxic? *Water, Air, and Soil Pollution*, 233(3), 1–21. <https://doi.org/10.1007/S11270-022-05547-3/FIGURES/8>
- Hassan, E. A., Hathout, R. M., Gad, H. A., & Sammour, O. A. (2022). A holistic review on zein nanoparticles and their use in phytochemicals delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 73, 103460. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103460>
- Hennig, T. B., Bandeira, F. O., Puerari, R. C., Fraceto, L. F., & Matias, W. G. (2023). A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non-target organisms: Estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach – The case of atrazine. *Science of The Total Environment*, 871, 162094. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.162094>
- Hu, K., & McClements, D. J. (2014). Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. *Food Research International*, 64, 329–335. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.07.004>
- Hu, K., & McClements, D. J. (2015). Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 101–108.

- <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.09.015>
- Kaur, G., Ganjewala, D., Bist, V., & Verma, P. C. (2019). Antifungal and larvicidal activities of two acyclic monoterpenes; citral and geraniol against phytopathogenic fungi and insects. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(5–6), 458–469. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1651579>
- Kozioł, A., Stryjewska, A., Librowski, T., Salat, K., Gawel, M., Moniczewski, A., & Lochyński, S. (2014). An Overview of the Pharmacological Properties and Potential Applications of Natural Monoterpenes. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(14), 1156–1168.
- López, M. D., Campoy, F. J., Pascual-Villalobos, M. J., Muñoz-Delgado, E., & Vidal, C. J. (2015). Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner. *Chemico-Biological Interactions*, 229, 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2015.01.006>
- Mamur, S. (2022). Geraniol, a natural monoterpene, identifications of cytotoxic and genotoxic effects in vitro. *Journal of Essential Oil Research*, 34(1), 54–64. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1974581>
- Margarido, T. C. F., Felício, A. A., De Cerqueira Rossa-Feres, D. C., & De Almeida, E. A. (2013). Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. *Marine Environmental Research*, 91, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.001>
- Mathieson, W. B. (1996). Development of arginine vasotocin innervation in two species of anuran amphibian: *Rana catesbeiana* and *Rana sylvatica*. *Histochemistry and Cell Biology*, 105(4), 305–318. <https://doi.org/10.1007/BF01463933/METRICS>
- Matsushima, N., Danno, G. I., Takezawa, H., & Izumi, Y. (1997). Three-dimensional structure of maize α -zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1), 14–22. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00212-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00212-9)
- Medeiros, K. A. A. L., dos Santos, J. R., Melo, T. C. de S., de Souza, M. F., Santos, L. de G., de Gois, A. M., Cintra, R. R., Lins, L. C. R. F., Ribeiro, A. M., & Marchioro, M. (2018). Depressant effect of geraniol on the central nervous system of rats: Behavior and ECoG power spectra. *Biomedical Journal*, 41(5), 298–305. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2018.08.008>
- Miraucourt, L. S., da Silva, J. S., Burgos, K., Li, J., Abe, H., Ruthazer, E. S., & Cline, H. T. (2012). GABA Expression and Regulation by Sensory Experience in the Developing Visual System. *PLOS ONE*, 7(1), e29086. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0029086>
- Oliveira, J. L. D., Campos, E. V. R., Pereira, A. E. S., Pasquoto, T., Lima, R., Grillo, R., Andrade, D. J. De, Santos, F. A. Dos, & Fraceto, L. F. (2018). Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(6), 1330–1340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>
- Pascoli, M., de Lima, R., & Fraceto, L. F. (2018). Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. *Frontiers in Chemistry*, 6(JAN), 303239. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00006/BIBTEX>
- Pavan, B., Dalpiaz, A., Marani, L., Beggiato, S., Ferraro, L., Canistro, D., Paolini, M., Vivarelli, F., Valerii, M. C., Comparone, A., & De Fazio, L. (2018). Geraniol Pharmacokinetics, Bioavailability and Its Multiple Effects on the Liver Antioxidant and Xenobiotic-Metabolizing Enzymes. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 18.

- <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00018>
- Proença, P. L. de F., Campos, E. V. R., Costa, T. G., de Lima, R., Preisler, A. C., de Oliveira, H. C., da Rocha, C. M., de Andrade, D. J., Goncalves, K. C., Polanczyk, R. A., & Fraceto, L. F. (2024). Curcumin and carvacrol co-loaded zein nanoparticles: Comprehensive preparation and assessment of biological activities in pest control. *Plant Nano Biology*, 8, 100067. <https://doi.org/10.1016/J.PLANA.2024.100067>
- Radwan, I. T., Ghazawy, N. A. R., Alkhaibari, A. M., Gattan, H. S., Alruhaili, M. H., Selim, A., Salem, M. E., AbdelFattah, E. A., & Hamama, H. M. (2024). Nanostructure Lipid Carrier of Curcumin Co-Delivered with Linalool and Geraniol Monoterpenes as Acetylcholinesterase Inhibitor of *Culex pipiens*. *Molecules*, 29(1), 271. <https://doi.org/10.3390/molecules29010271>
- Rimoldi, F., Salgado Costa, C., Pantucci Saralegui, M. J., Bahl, M. F., & Natale, G. S. (2023). Recovery of *Ceratophrys ornata* tadpoles exposed to environmental concentrations of chlorpyrifos: evaluation of biomarkers of exposure. *Ecotoxicology*, 32(5), 638–645. <https://doi.org/10.1007/S10646-023-02670-7/TABLES/1>
- Rocha, C. A., Félix, L. M., Monteiro, S. M., & Venâncio, C. (2024). Antinociceptive Analysis of Natural Monoterpenes Eugenol, Menthol, Carvacrol and Thymol in a Zebrafish Larval Model. *Pharmaceuticals*, 17(4), 457. <https://doi.org/10.3390/ph17040457>
- Simmons, A. M., & Chapman, J. A. (2002). Metamorphic Changes in GABA Immunoreactivity in the Brainstem of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Behavior and Evolution*, 60(4), 189–206. <https://doi.org/10.1159/000066701>
- Singulani, J. L., Pedroso, R. S., Ribeiro, A. B., Nicolella, H. D., Freitas, K. S., Damasceno, J. L., Vieira, T. M., Crotti, A. E. M., Tavares, D. C., Martins, C. H. G., Mendes-Giannini, M. J. S., & Pires, R. H. (2018). Geraniol and Linalool Anticandidal Activity, Genotoxic Potential and Embryotoxic Effect on Zebrafish. *Future Microbiology*, 13(15), 1637–1646. <https://doi.org/10.2217/FMB-2018-0200>
- Sodhi, N. S., Bickford, D., Diesmos, A. C., Lee, T. M., & Koh, L. P. (2008). Measuring the Meltdown: Drivers of Global Amphibian Extinction and Decline. *PLoS ONE*, 3(2), 1636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001636>
- Tang, X., Shao, Y. L., Tang, Y. J., & Zhou, W. W. (2018). Antifungal Activity of Essential Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules*, 23(9), 2108. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092108>
- Tesser, M. E., Alves De Paula, A., Risso, E., Monteiro, R. A., Do Espirito, A., Pereira, S., Fernandes Fraceto, L., Bueno, C., Martinez, R., & Bueno, C. (2020). Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. *Science of the Total Environment*, 704, 135332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135332>
- Uçkun, M., & Özmen, M. (2021). Evaluating Multiple Biochemical Markers in *Xenopus laevis* Tadpoles Exposed to the Pesticides Thiacloprid and Trifloxystrobin in Single and Mixed Forms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(10), 2846–2860. <https://doi.org/10.1002/ETC.5158>
- Williams, E., Pauley, A., & Dewan, A. (2024). The behavioral sensitivity of mice to acyclic, monocyclic, and bicyclic monoterpenes. *PLOS ONE*, 19(2), e0298448. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0298448>
- Xu, L., Liu, M. Z., Yang, Y. Y., Wang, Y., Hua, X. X., Du, L. X., Zhu, J. Y., Shen, Y.,

- Wang, Y. Q., Zhang, L., Mi, W. L., & Mu, D. (2022). Geraniol enhances inhibitory inputs to the paraventricular thalamic nucleus and induces sedation in mice. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 98, 153965–153965. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2022.153965>
- Zhang, W., Chen, L., Xu, Y., Deng, Y., Zhang, L., Qin, Y., Wang, Z., Liu, R., Zhou, Z., & Diao, J. (2019). Amphibian (*Rana nigromaculata*) exposed to cyproconazole: Changes in growth index, behavioral endpoints, antioxidant biomarkers, thyroid and gonad development. *Aquatic Toxicology*, 208, 62–70. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2018.12.015>
- Zhang, Y., & Goss, G. G. (2022). Nanotechnology in agriculture: Comparison of the toxicity between conventional and nano-based agrochemicals on non-target aquatic species. *Journal of Hazardous Materials*, 439. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129559>

3 CAPÍTULO III

**Efeitos do geraniol livre e nanoencapsulado em girinos *Aquarana catesbeiana*:
biomarcadores fisiológicos**

Manuscrito a ser submetido à revista Journal of Hazardous Materials

Guia para autores: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-hazardous-materials/publish/guide-for-authors>

**Efeitos do geraniol livre e nanoencapsulado em girinos *Aquarana catesbeiana*:
biomarcadores fisiológicos**

Willian de Paula Santos^a; Letícia Paduan Tavares^a; Carolina Guerra Pontes^a;
Wagner Ezequiel Risso^a; Aline Theodoro Toci^b; Jhones Luís de Oliveira^c; Leonardo
Fernandes Fraceto^c; Claudia Bueno dos Reis Martinez^{a,*}.

a: Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Londrina (UEL);

b: Laboratório de Estudos Interdisciplinares do Meio Ambiente e de Alimentos
(LEIMAA); Universidade Federal da Integração Latino Americana (UNILA);

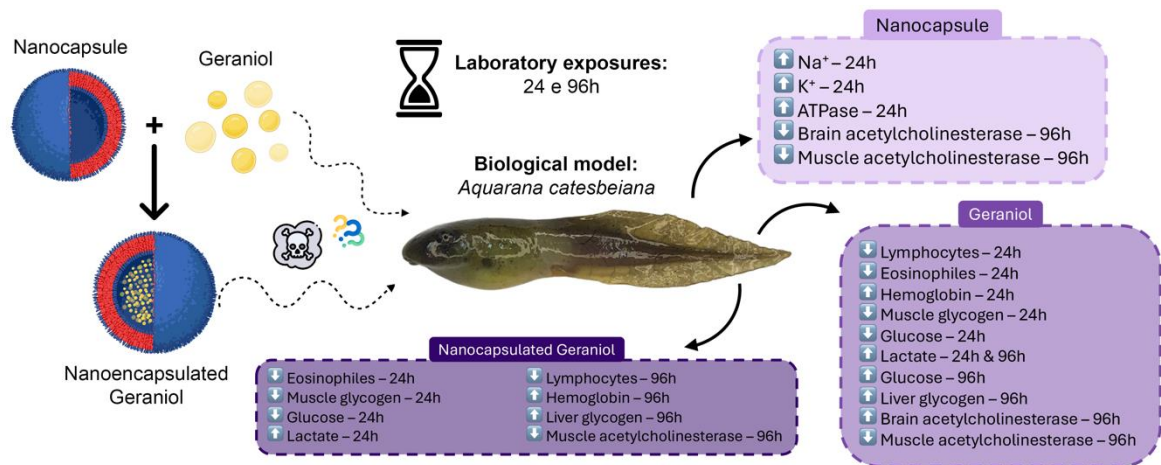
c: Departamento de Engenharia Ambiental, Instituto de Ciência e Tecnologia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP);

*: Autor correspondente: Tel.: +55-43-33715146; E-mail: cbueno@uel.br

DESTAQUES

- GER alterou um maior número de biomarcadores, seguido de nGER e NANO;
- GER e nGER influenciaram biomarcadores metabólicos, indicando estresse;
- NANO interferiu com a homeostase iônica em 24h, mas não em 96h
- PCA demonstrou que nGER possui efeitos intermediários entre NANO e GER.

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

Nanopesticidas demonstram muitas vantagens em relação aos agrotóxicos convencionais. O geraniol, extraído de óleos essenciais de plantas, demonstra atividades inseticidas e fungicidas. O nanoencapsulamento do geraniol em nanocápsulas de zeína, pode ser uma alternativa mais sustentável aos agrotóxicos sintéticos de uso atual. Anfíbios (vertebrados que sofrem diretamente com efeitos adversos causados pelos agrotóxicos). Assim, para verificar os possíveis efeitos agudos causados pelo geraniol livre (GER), nanoencapsulado (nGER) e pelas nanocápsulas de zeína (NANO), girinos de *Aquarana catesbeiana* foram expostos a 5 mg L⁻¹ dos xenobióticos durante 24 e 96h e biomarcadores imunológicos (perfil leucocitário), metabólicos (glicemia, lactato e glicogênio), osmoiônicos (íons plasmáticos e atividade das ATPases branquiais) e de neurotoxicidade (atividade da acetilcolinesterase) foram analisados. O Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores revelou que GER induziu maiores respostas nos girinos, seguido de nGER e NANO, em ambos os tempos de exposição. A Análise de Componentes Principais (PCA) demonstrou uma separação clara entre os grupos, relacionando NANO com efeitos sobre a osmorregulação e GER com efeitos sobre o metabolismo energético. Ainda, a PCA demonstrou que nGER teve efeitos intermediários entre GER e NANO, uma vez que foi relacionado tanto com biomarcadores osmoiônicos como metabólicos. Os resultados demonstram que GER estabelece um estado de estresse fisiológico em girinos de *A. catesbeiana* na concentração testada e, embora tenha provocado menos alterações. Os efeitos sobre a homeostase iônica em NANO foram percebidos em 24h, mas não em 96h, indicando que as nanocápsulas podem ser seguras a esses animais. Assim, o presente estudo indica que nGER ainda não pode ser considerado seguro aos girinos *A. catesbeiana*, visto que não se sabe a distribuição e comportamento de nanopartículas carregadoras de ingredientes ativos no ambiente aquático.

Palavras-chave: anuros; AChE; ATPase; ecotoxicologia; monoterpenos.

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização da nanotecnologia na agricultura, principalmente através dos nanopesticidas, surge como uma alternativa promissora e mais sustentável aos agrotóxicos convencionais (Zhang & Goss, 2022). As nanopartículas (NPs), devido ao seu tamanho extremamente pequeno, possuem uma elevada área de superfície de contato, levando a uma alta capacidade de adsorção ao alvo (Wang et al., 2022). Além disso, esses materiais liberam seu ingrediente ativo (IA) até 75% mais lentamente do que os agrotóxicos convencionais, reduzindo significativamente a necessidade de aplicações frequentes de alta concentração e mitigando seus efeitos em organismos não-alvo (Kah et al., 2018; Kah & Hofmann, 2014; Kumar et al., 2019; Pourzahedi et al., 2018).

Paralelamente, compostos extraídos de óleos essenciais (OE), como o geraniol (GER), oferecem outra alternativa promissora aos agrotóxicos sintéticos. O GER, um monoterpene proveniente do metabolismo secundário de diversas espécies vegetais, possui uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos fungicidas e inseticidas (Farasat et al., 2014; Germano-Costa et al., 2022; Kaur et al., 2019; Singulani et al., 2018). Este composto já faz parte da formulação de biofungicidas utilizados contra o mofo cinzento nos vinhedos europeus (EFSA, 2012; EPA, 2013). Além disso, o GER é considerado seguro como aditivo alimentar aromático (FDA, EUA) e estudos em mamíferos indicam que é facilmente metabolizado e excretado na urina (Bonferoni et al., 2019; Chen & Viljoen, 2022; Jäger et al., 2020; Pavan et al., 2018; Venzon et al., 2018). No entanto, apesar dos seus efeitos antioxidantes em animais, o GER pode ser embriotóxico e causar imobilização em peixes (de Araújo et al., 2021, 2023; Farokhcheh et al., 2021; Hacke et al., 2020; 2021; Singulani et al., 2018).

A encapsulação do geraniol em nanocápsulas de zeína (nGER) representa uma alternativa mais sustentável aos agrotóxicos sintéticos, combinando os efeitos pesticidas do geraniol com as propriedades das nanopartículas. A zeína, proteína extraída do milho (*Zea sp.*) e considerada segura pela FDA, é utilizada na fabricação de nanocápsulas contendo IA para diversas aplicações (De Marco, 2022; Hassan et al., 2022; Oliveira et al., 2018; Proença et al., 2024). Estudos demonstraram que o nGER apresenta menor fito e citotoxicidade em comparação ao GER, reforçando seu potencial como opção sustentável voltada à proteção de organismos

não-alvo (Oliveira et al., 2018).

Os anfíbios, principalmente na fase larval, estão entre os organismos não-alvo mais afetados pela contaminação aquática devido ao uso exacerbado de agrotóxicos (Oliveira et al., 2021). Os girinos, que ficam restritos ao ambiente aquático e apresentam respiração branquial, são especialmente vulneráveis a contaminantes. As populações de anfíbios têm diminuído devido a fatores que incluem a exposição a agrotóxicos, a fragmentação do habitat e as mudanças climáticas (Carrasco et al., 2021; Sodhi et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de alternativas ecológicas aos agrotóxicos sintéticos de uso atual é crucial para a proteção dos anfíbios.

Os biomarcadores são parâmetros para avaliar os impactos da exposição a xenobióticos na saúde dos animais. No entanto, nenhum biomarcador único pode diagnosticar completamente os efeitos dos xenobióticos, tornando necessária a utilização de uma bateria de biomarcadores para uma compreensão mais abrangente (Cazenave et al., 2021; Vieira et al., 2016). Análises multivariadas, como análise de componentes principais (PCA), e índices como o Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR), ajudam a alcançar uma compreensão holística dos biomarcadores (Andrade et al., 2019; Santos & Martinez, 2020; Vieira et al., 2016, 2019).

Neste contexto, o presente estudo avaliou e comparou os efeitos do nGER, GER e nanocápsulas vazias de zeína (NANO) sobre biomarcadores sanguíneos, osmoiônicos e metabólicos em girinos de *Aquarana catesbeiana*, após exposições agudas (24 e 96 horas). A hipótese deste trabalho é de que o nGER causa menos efeitos sobre a fisiologia dos girinos *A. catesbeiana* comparado à sua forma livre (GER). Ainda, os efeitos de NANO serão mais parecidos com os dos animais controle. A rã-touro americana, por sua sensibilidade a diversos contaminantes ambientais e por seu status não-nativo e não-ameaçado no Brasil, foi escolhida como modelo biológico. Esta escolha permite pesquisas significativas e ao mesmo tempo poupa espécies nativas que podem estar em risco de extinção (Carneiro et al., 2023; Fernandes et al., 2021; Grott et al., 2023; Pinto Vidal et al., 2021; Salla et al., 2024).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Síntese e Caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas utilizando uma versão modificada do método de precipitação antissolvente descrito por Hu & McClements (2015). Inicialmente, uma solução de zeína a 2% (m/v) foi preparada em álcool etílico a 85% (v/v) e agitada durante a noite. Em seguida, a solução foi aquecida a 75°C em banho-maria durante 5 minutos, arrefecida até à temperatura ambiente e depois centrifugada a 869 g durante 25 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de uma membrana Millipore® de 0,45 µm para remover partículas insolúveis. Posteriormente, 600 mg de geraniol (Quinari®, Brasil) foram adicionados a 10 mL da solução de zeína e agitados durante 5 minutos. Essa mistura foi então injetada lentamente em 30 mL de solução Pluronic F-68® (pH 4,0) por meio de uma seringa, sob agitação magnética. A formulação foi evaporada rotativamente a 40°C para remover o etanol, produzindo um volume final de 30 mL com uma concentração ativa de 20 mg.mL⁻¹ (nGER). Também foram preparadas emulsões contendo apenas o princípio ativo (GER).

As formulações de nanopartículas passaram por caracterização físico-química por meio de espectroscopia de correlação de fótons para medição do diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade das nanopartículas (ZetaSizer ZS 90 - Malvern), e microeletroforese para determinação do potencial zeta. Além disso, amostras coletadas da água do aquário ao longo do tempo foram analisadas usando análise de rastreamento de nanopartículas com um NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm) e uma câmera CMOS, utilizando o software NanoSight para avaliar a concentração e distribuição de tamanho das nanopartículas.

3.2.2 Quantificação Química do Geraniol

Um experimento independente, nas mesmas condições físico-químicas dos experimentos biológicos descritos a seguir, foi realizado para determinar a concentração de geraniol na água dos aquários através do tempo (96h) (temperatura: 22,2 ± 0,14 °C; pH: 7,46 ± 0,06; oxigênio dissolvido: 5,6 ± 0,2 mg L⁻¹; condutividade: 100 ± 1 µS cm⁻¹; turbidez: 0 UT; média ± E.P.). O experimento consistia

em dois grupos (GER: geraniol livre; e nGER: geraniol nanoencapsulado) com quatro aquários de até 1,5 L de água desclorada, nos quais foi adicionada uma concentração nominal de 5 mg L⁻¹ dos respectivos xenobióticos (uma solução de 20 mg mL⁻¹ foi utilizada para pipetar 375 µL em cada aquário). Às 48h, houve uma renovação total do meio de exposição com reestabelecimento das concentrações de GER e nGER. A água dos aquários foi coletada nos tempos 0h, 6h, 12h, 24h, 48h pré-renovação, 48h pós-renovação e 96h e imediatamente congeladas a -20 °C.

Uma semana depois, as amostras foram descongeladas e submetidas a um processo de extração: em 15 mL das amostras foram adicionados 5 mL de hexano e 0,08 g de MgSO₄ (P.M.: 246,48) que ficaram agitando por 2 min, a fim de promover um *salting out* das moléculas de geraniol da fase aquosa para a orgânica, que foi separada após centrifugação (5.000 g; 10 min). Este processo foi repetido mais duas vezes para a mesma amostra, para a obtenção de um volume final de 15 mL de fase orgânica, que foi evaporada até 500 µL com jato de CO₂. Às amostras evaporadas, foi adicionado 1 mg L⁻¹ de 2-Undecanona (Sigma-Aldrich®, EUA) como um padrão interno (PI) para a normalização das porcentagens obtidas na quantificação (Rubiolo et al., 2010). As amostras foram submetidas a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). O cálculo da concentração de geraniol nas amostras foi realizado a partir da equação da reta obtida de uma curva com concentrações conhecidas de geraniol e PI na mesma concentração das amostras. A razão entre a área do geraniol e do PI foi utilizada para a obtenção da equação da reta ($y = 1121,8x - 3,1637$; $R^2 = 0,9795$). Os resultados foram expressos em mg L⁻¹.

3.2.3 Obtenção e Aclimação dos Animais

Girinos de *Aquarana catesbeiana* com comprimento de $5,9 \pm 0,05$ cm e peso de $1,7 \pm 0,05$ g (média $\pm$ E.P.; $n = 192$), nos estágios 25-31 de desenvolvimento segundo Gosner (1960), foram adquiridos do Ranário Nova Fátima (Nova Fátima, PR) e levados ao Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (LEFA/UEL; Londrina, PR). O transporte foi realizado em sacos plásticos contendo água desclorada e com aeração adequada. No laboratório, os girinos foram aclimatados durante 7 dias em um tanque contendo 100 L de água desclorada e com aeração constante. Nesse período, receberam alimentação duas vezes ao dia com

ração comercial para peixes (*Nutrifish*®), e 80% da água era trocada diariamente. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados (Horiba U-52), apresentando temperatura de $21,3 \pm 0,2$ °C, pH de $7,3 \pm 0,04$, oxigênio dissolvido de $7,4 \pm 0,3$ mg L⁻¹, condutividade de 102 ± 1 µS cm⁻¹ e turbidez de 0 UT (média ± E.P.). O fotoperíodo foi mantido em 10h de luz e 14h de escuridão.

3.2.4 Delineamento Experimental

Após a fase de aclimação, a alimentação dos girinos foi interrompida 24 horas antes do início de cada experimento, sendo conduzidos dois estudos independentes com duração de 24 e 96 horas. Os girinos foram transferidos para aquários de 10 litros ($n = 3/\text{aquário}$) e distribuídos em quatro grupos ($n = 8$ aquários/grupo) expostos a diferentes condições: apenas água desclorada (CTR) ou água contendo xenobióticos (5 mg L^{-1}) nas formas de nanocápsulas de zeína sem ingrediente ativo (NANO), geraniol (GER) e geraniol nanoencapsulado (nGER). Todos os tratamentos, incluindo o controle, continham 0,0005% de solvente Pluronic F-68® devido à natureza hidrofóbica do geraniol. No experimento de 96 horas, os girinos foram alimentados após 48 horas, seguida da renovação de 80% do meio de exposição com reestabelecimento das concentrações dos xenobióticos. Durante os experimentos, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e mantiveram-se constantes (temperatura: $21,6 \pm 0,05$ °C; pH: $6,8 \pm 0,03$; oxigênio dissolvido: $5,6 \pm 0,2$ mg L⁻¹; condutividade: $97,5$ µS cm⁻¹; turbidez: $0,4 \pm 0,3$ UT; média ± E.P.). A concentração de 5 mg L^{-1} dos xenobióticos foi estabelecida com base em experimento anterior (descrito no capítulo 2), que indicou esta concentração como subletal.

Ao final das exposições, os girinos foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e o sangue foi coletado por punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas, para a realização dos esfregaços e análise da concentração de hemoglobina. Em seguida, os girinos foram submetidos à eutanásia por secção medular, e as brânquias, o cérebro, o fígado e o músculo caudal foram removidos para as análises. O sangue foi centrifugado (1870 g ; 10 min) para a obtenção do plasma, que foi armazenado à -20 °C para as demais análises, enquanto os outros órgãos foram armazenados a -80 °C até serem analisados. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA/UEL:

009.2023).

3.2.5 Biomarcadores Sanguíneos

Alíquotas (5 μL) de sangue foram utilizadas para a realização de esfregaços em lâminas de vidro (1 lâmina/animal; $n=8$). Em seguida, as lâminas foram secas *overnight* e então fixadas em metanol absoluto. Depois, foram coradas com o *kit* Panótico (Laborclin, Brasil) para a montagem das lâminas permanentes. Um total de 100 leucócitos foram caracterizados por lâmina e diferenciados em: linfócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos, além dos trombócitos. A análise foi realizada pelo mesmo pesquisador, às cegas. A concentração de hemoglobina foi determinada em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, UK) a 540 nm, através de método colorimétrico da cianometahemoglobina (*Kit* comercial Labtest Diagnóstica, Brasil).

3.2.6 Biomarcadores Osmoiônicos

No plasma, a concentração dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) foi determinada em fotômetro de chama (DM-62, Digmed, Brazil), a partir de uma curva de calibração de solução padrão de ambos. A concentração de cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}) foi determinada por método colorimétrico (*Kit* comercial, Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA) a 470 e 570 nm, respectivamente. Quanto ao tecido branquial, a brânquia esquerda foi coletada de um animal de cada aquário durante a amostragem e armazenada em 1 mL de tampão SEI (sacarose 150 mM; EDTA 10 mM; imidazol 50 mM; pH 7,5) e posteriormente foram homogeneizadas (1:5 m/v) em tampão SEI contendo 2,4 mM de deoxicolato de sódio. As amostras foram centrifugadas (20 min; 20.000 g; 4°C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para a determinação da atividade de enzimas envolvidas em trocas iônicas. As atividades da bomba de Na^+/K^+ (NKA) e da bomba de prótons (H^+) (HATP) foram determinadas simultaneamente, pelo decaimento da absorbância do NADH a 340 nm (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA), de acordo com o método de Gibbs & Somero (1989), com modificações (McCormick, 1993). A atividade da bomba de Ca^{2+} (CaATP) foi avaliada de acordo com (Vijayavel et al., 2007) com modificações, através da quantificação do Pi em espectrofotômetro

(ELX 800, Bio-Tek Instruments) a 620 nm. Para a padronização da expressão dos resultados destas enzimas de transporte iônico, a concentração de proteínas das amostras de brânquias foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.2.7 Biomarcadores Metabólicos

A glicemia foi avaliada em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA) a 505 nm, pelo método enzimático da glicose-oxidase (*Kit* comercial Labtest, Brasil). A concentração de lactato plasmático também foi determinada em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, EUA) a 550 nm, por meio do método enzimático lactato desidrogenase (*Kit* comercial Labtest, Brasil). A quantificação de glicogênio em amostras de fígado e músculo foi realizada de acordo com Bidinotto et al. (1997), com modificações nos volumes utilizados. As amostras de fígado (100 mg) foram dissolvidas em 1,5 mL de KOH 6 N, enquanto as amostras de músculo (100 mg) foram dissolvidas em 1 mL da mesma solução, utilizando um banho-maria fervente por 5 minutos. Subsequentemente, uma alíquota de 125 μ L de cada amostra foi transferida em duplicata para microtubos e misturada com 1,5 mL de etanol 100% e 50 μ L de K₂SO₄ 10%. Após centrifugação (1.000 g, 3 min, 25 °C), o sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspensionado em 1,25 mL de água ultrapura. A reação final foi preparada com base no método de Dubois et al. (1956), utilizando 25 μ L (fígado) ou 250 μ L (músculo) da amostra, 250 μ L de fenol 4,1% e 1 mL de H₂SO₄. A cor resultante foi lida em espectrofotometria (Victor³™, PerkinElmer, USA) a 480 nm.

3.2.8 Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)

O Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) foi calculado para cada tratamento (NANO, nGER e GER) em relação ao CTR, para os dois tempos experimentais de acordo com o método descrito por Sanchez et al. (2013). Brevemente, para cada biomarcador individual, a razão entre o valor médio obtido em cada tratamento (NANO, nGER e GER) e o respectivo valor médio do CTR foi transformada em log (Y_i). Na etapa seguinte, foi calculada a média geral (μ) e o desvio padrão (s), considerando os valores de Y_i de um determinado biomarcador medido em cada tratamento. Em seguida, os valores de Y_i foram padronizados pela fórmula:

$Z_i = (Y_i - \mu)/s$ e a diferença entre Z_i e Z_0 (CTR) foi utilizada para definir o índice de desvio do biomarcador (A). Para obter uma resposta integrada de múltiplos biomarcadores, o valor de A de cada biomarcador foi calculado para cada tratamento e o IBRv2 foi calculado para cada tratamento pela soma dos valores absolutos de A.

3.2.9 Análises Estatísticas

Utilizando o software R, os resultados obtidos para cada biomarcador foram comparados entre os diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) por meio de testes paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis), conforme a distribuição dos dados (normalidade e homoscedasticidade). Quando necessário, para identificar as diferenças, foram aplicados testes de comparações múltiplas Student Newman Keuls para dados paramétricos, ou Dunn's para dados não paramétricos. Considerou-se como significativos os valores de $p < 0,05$. Além disso, uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para os biomarcadores que apresentaram diferenças significativas, utilizando o software R para MacOS 14.5.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Síntese e Caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas das soluções-estoque exibiram uma faixa de tamanho de 106,7-126,7 nm, um índice de polidispersidade de 0,16-0,22 e um potencial zeta de 14,9-25,6 mV. A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) na água dos aquários revelou um tamanho hidrodinâmico médio similar entre as nanocápsulas vazias e aquelas que continham o geraniol (Tabela 2). A distribuição do tamanho das partículas obtida da NTA indica a presença de populações homogêneas na água dos aquários de todos os grupos com tamanhos próximos à 100 nm (Fig. 19). O tamanho das nanopartículas de ambos os grupos diminuiu através do tempo e, bem como a concentração de partículas, o que indica um processo de formação de agregados (Tabela 2).

Tabela 2 – Tamanho, spam e concentração de nanopartículas obtidas por NTA em amostras coletadas dos diferentes tratamentos experimentais (NANO e nGER) no tempo 0, após 48 e 96h de exposição.

Tempo	Grupo	Tamanho Médio (nm)	Spam	Concentração (partículas mL ⁻¹)
0h	NANO	316.2 ± 5.30	0.54	13.4 ⁸ ± 4.05 ⁷
	nGER	305.0 ± 13.5	1.18	15.8 ⁸ ± 8.77 ⁷
48h	NANO	262.4 ± 5.80	1.28	8.97 ⁸ ± 3.36 ⁷
	nGER	286.0 ± 17.6	1.56	3.79 ⁸ ± 2.39 ⁷
96h	NANO	209.0 ± 5.30	0.86	8.17 ⁸ ± 2.62 ⁷
	nGER	224.8 ± 17.8	1.50	4.86 ⁸ ± 1.38 ⁷

Valores representam Média ± D.P. Spam = polidispersão

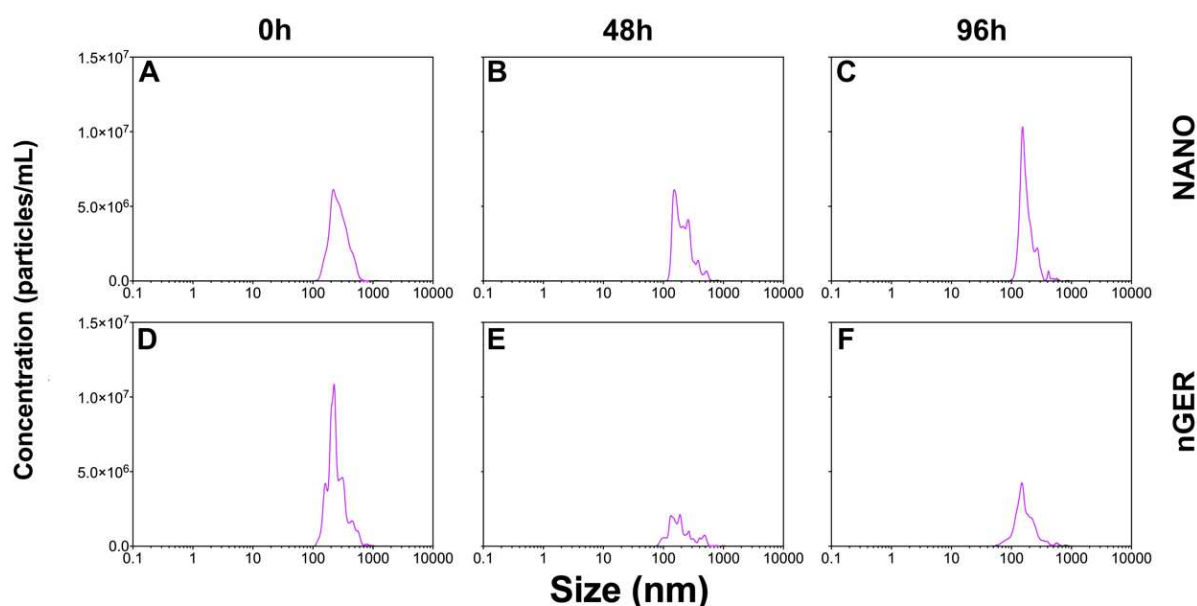


Figura 19. Concentração de partículas (eixo Y) pelo seu tamanho (eixo X) ao decorrer do tempo (0, 48 e 96h) para cada grupo experimental (A-C: NANO; D-F: nGER).

3.3.2 Quantificação Química do Geraniol

Os resultados da quantificação do geraniol na água dos aquários revelaram valores um pouco maiores do que a concentração nominal de 5 mg L⁻¹. Mesmo assim, os valores foram similares entre os grupos (Tabela 3). De maneira geral, pode-se observar uma diminuição mais acentuada da concentração de geraniol no grupo GER que em nGER.

Tabela 3 – Concentração de geraniol na água dos aquários em diferentes tempos experimentais.

Concentração de geraniol na água dos aquários (mg L⁻¹)		
Tempo	GER	nGER
0h	7,64 ± 1,84	6,92 ± 1,76
6h	5,87 ± 1,49	7,53 ± 2,02
12h	6,92 ± 1,02	6,78 ± 0,99
24h	6,18 ± 1,17	8,14 ± 2,25
48h pré	4,99 ± 0,82	4,96 ± 0,37
48h pós	4,51 ± 0,42	6,61 ± 0,93
96h	6,02 ± 0,18	7,36 ± 1,24

pré = pré-renovação; pós = pós-renovação. Média ± E.P. (n = 4).

3.3.3 Biomarcadores Sanguíneos

Os linfócitos foram as células brancas mais abundantes no sangue dos animais, seguido dos basófilos. Após 24h de exposição, os linfócitos do grupo nGER diminuíram em relação ao NANO ($p = 0,04$) e, após 96h, essa diminuição foi notada no grupo nGER em relação ao CTR ($p = 0,04$). Outro tipo celular que diminuiu significativamente no sangue dos animais NANO, GER e nGER em relação ao CTR ($p = 0,002$), após 24h de exposição, foram os eosinófilos. Os demais tipos celulares (basófilos, neutrófilos, monócitos e trombócitos) não diferiram significativamente entre os grupos em nenhum tempo experimental (Tabela 4). O perfil leucocitário, bem como os trombócitos, estão representados na Fig. 20.

Tabela 4 – Caracterização dos leucócitos e trombócitos no sangue de *A. catesbeiana*

Contagem diferencial de leucócitos no sangue (%)					
		CTR	NANO	GER	nGER
Linfócitos	24h	47,5 ± 10,5 ^{ab}	53,2 ± 4,29 ^a	37,6 ± 4,93 ^{ab}	27,0 ± 4,20 ^b
	96h	66,0 ± 6,40 ^a	55,5 ± 4,97 ^{ab}	62,7 ± 1,64 ^{ab}	39,2 ± 5,45 ^b
Basófilos	24h	38,5 ± 8,27	41,0 ± 4,68	61,5 ± 2,29	53,1 ± 5,21
	96h	32,8 ± 6,04	34,3 ± 2,63	28,3 ± 1,67	50,6 ± 6,01
Neutrófilos	24h	2,33 ± 0,41	1,00 ± 0	2,00 ± 0	2,75 ± 0,73
	96h	0,40 ± 0,32	0,33 ± 0,18	N.D.	0,60 ± 0,19
Eosinófilos	24h	3,75 ± 0,18 ^a	1,00 ± 0 ^b	1,75 ± 0,18 ^b	2,20 ± 0,34 ^b
	96h	0,20 ± 0,19	0,50 ± 0,29	1,00 ± 0,70	0,80 ± 0,16
Monócitos	24h	4,00 ± 0,71	5,00 ± 0	10,0 ± 3,50	4,50 ± 0,93
	96h	N.D.	1,17 ± 0,85	0,50 ± 0,35	2,80 ± 1,26
Trombócitos	24h	2,67 ± 0,41	4,67 ± 2,24	7,33 ± 3,88	10,7 ± 0,20
	96h	0,40 ± 0,32	8,17 ± 3,84	3,75 ± 1,60	0,40 ± 0,32

N. D. = Não detectada; Média $\pm$ E.P (n=100 céls./lâmina; n=8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental.

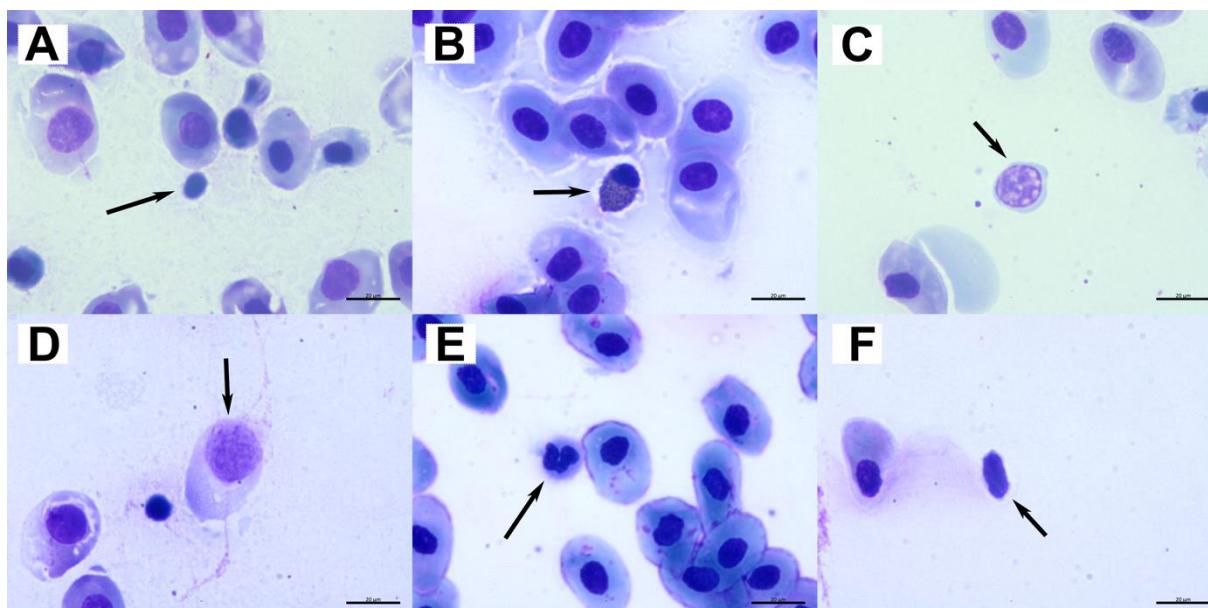


Figura 20. Caracterização dos leucócitos (A: basófilo; B: eosinófilo; C: linfócito; D: monócito e E: neutrófilo) e trombócitos (F) no sangue de *Aquarana catesbeiana* de diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) em 24 e 96h. Escala: 20 μ m. Aumento: 1000x. Coloração: kit Panótico rápido.

Após 24h de exposição, a concentração de Hb nos girinos GER foi maior que nos demais grupos ($p = 0,006$). Já em 96h, esse aumento foi observado apenas no grupo nGER comparado ao CTR ($p = 0,03$) (Fig. 21).

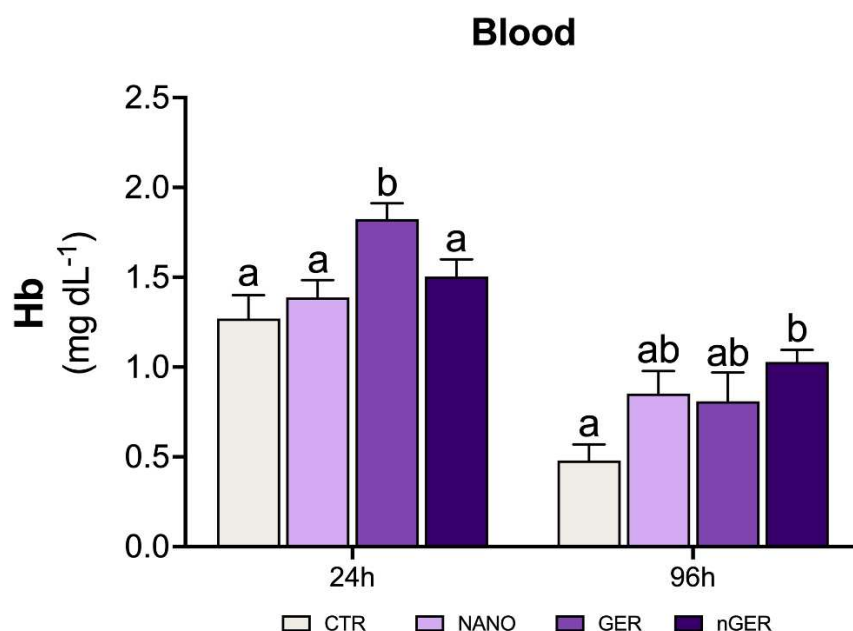


Figura 21. Concentração de hemoglobina (Hb) no sangue de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., n= 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

3.3.4 Biomarcadores Osmoiônicos

Com exceção do cálcio (Ca^{2+}), as concentrações dos demais íons plasmáticos foram alteradas em resposta aos xenobióticos, em ambos os tempos experimentais (Tabela 5). Em 24h, observou-se um aumento significativo de sódio (Na^+) nos animais NANO e nGER em comparação com os demais grupos ($p = 0,002$). Em 96h, esse aumento foi observado apenas no grupo GER em relação ao grupo NANO ($p = 0,04$). Quanto ao potássio (K^+), em 24h, todos os grupos experimentais apresentaram concentrações mais altas em comparação com o grupo CTR ($p = 0,03$). Em 96h, a concentração de K^+ nos animais nGER foi significativamente maior do que nos grupos CTR ($p = 0,009$) e GER ($p = 0,002$). Em relação ao cloreto (Cl^-), em 24 h, os animais GER apresentaram concentrações menores em comparação com os demais grupos, e esse decréscimo foi mais acentuado nos animais nGER ($p < 0,0001$). No entanto, em 96h, os animais NANO mostraram uma maior concentração de Cl^- em comparação com os grupos CTR e GER ($p = 0,04$; $0,01$), sendo que o grupo GER apresentou os valores mais altos em relação aos demais ($p = 0,0003$).

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas dos principais íons envolvidos na osmorregulação de *A. catesbeiana*

Concentrações iônicas no plasma (mM)					
		CTR	NANO	GER	nGER
Na^+	24h	127 $\pm$ 20,0 ^a	143 $\pm$ 60,0 ^b	126 $\pm$ 40,0 ^a	145 $\pm$ 20,0 ^b
	96h	127 $\pm$ 40,0 ^{ab}	120 $\pm$ 40,0 ^a	143 $\pm$ 80,0 ^b	132 $\pm$ 50,0 ^{ab}
K^+	24h	5,00 $\pm$ 0,10 ^a	6,00 $\pm$ 0,20 ^b	6,00 $\pm$ 0,20 ^b	6,00 $\pm$ 0,10 ^b
	96h	4,00 $\pm$ 0,30 ^a	5,00 $\pm$ 0,20 ^{ab}	4,00 $\pm$ 0,10 ^a	6,00 $\pm$ 0,30 ^b
Cl^-	24h	43,0 $\pm$ 0,60 ^a	45,0 $\pm$ 1,00 ^a	38,0 $\pm$ 7,00 ^b	41,0 $\pm$ 0,80 ^c
	96h	35,0 $\pm$ 1,00 ^a	38,0 $\pm$ 0,40 ^b	43,0 $\pm$ 1,00 ^c	39,0 $\pm$ 2,00 ^{ab}
Ca^{2+}	24h	0,80 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,08
	96h	0,80 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,08

Média $\pm$ E.P., n = 8. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental.

Nas brânquias dos animais, a atividade da bomba de sódio/potássio (NKA) não foi alterada em nenhum grupo em 24h (Fig. 22A). Porém, observou-se um aumento na atividade da bomba de prótons (HATP) dos animais NANO comparados aos CTR e GER ($p = 0,02$; $0,04$) (Fig. 22B). Além disso, a atividade da bomba de cálcio (CaATP) também aumentou nos animais NANO comparados aos CTR e nGER ($p =$

0,04; 0,008) (Fig. 22C). Em 96h, não foi possível observar diferenças significativas quanto a atividade das ATPases em nenhum grupo (Fig. 22).

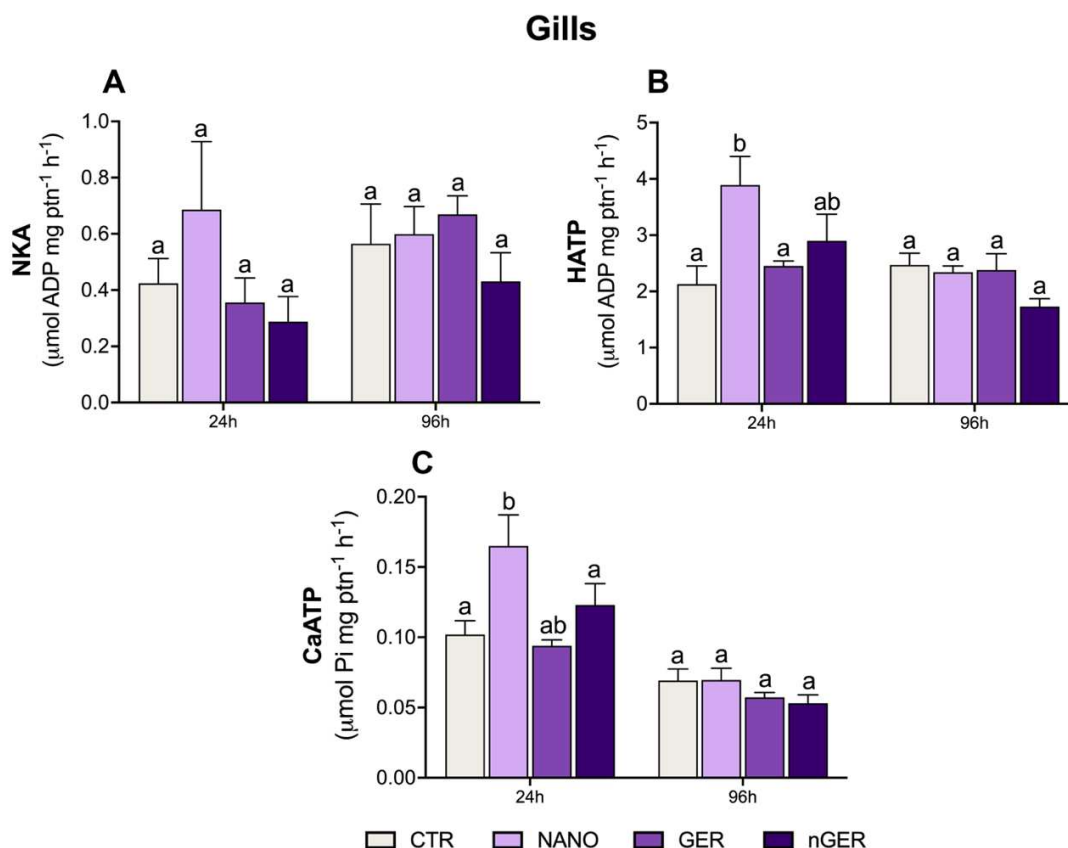


Figura 22. Atividade das bombas de sódio/potássio (NKA) (A), prótons (HATP) (B) e cálcio (CaATP) (C) nas brânquias de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

3.3.5 Biomarcadores Metabólicos

Após 24h de exposição, observou-se uma queda na glicemia dos animais GER e nGER em comparação com os CTR ($p = 0,0002$; $0,008$) (Fig. 23A), assim como um aumento nos níveis de lactato plasmático nos grupos GER e nGER em relação aos demais ($p = 0,0002$) (Fig. 23B). No entanto, após o mesmo período, não houve diferenças significativas no conteúdo de glicogênio hepático entre os grupos experimentais (Fig. 23C). Em contraste, todos os grupos apresentaram uma diminuição no conteúdo de glicogênio muscular em comparação com o grupo CTR ($p = 0,001$) (Fig. 23D). Após 96 horas, a glicemia dos animais GER aumentou em relação ao grupo CTR ($p = 0,04$) (Fig. 23A), e o mesmo efeito foi observado na concentração de lactato plasmático ($p = 0,02$) (Fig. 23B). Durante este período, o conteúdo de glicogênio hepático aumentou significativamente nos animais GER e nGER

comparados aos outros grupos ($p = 0,001$) (Fig. 23C), enquanto o glicogênio muscular não apresentou variações significativas entre os grupos (Fig. 23D).

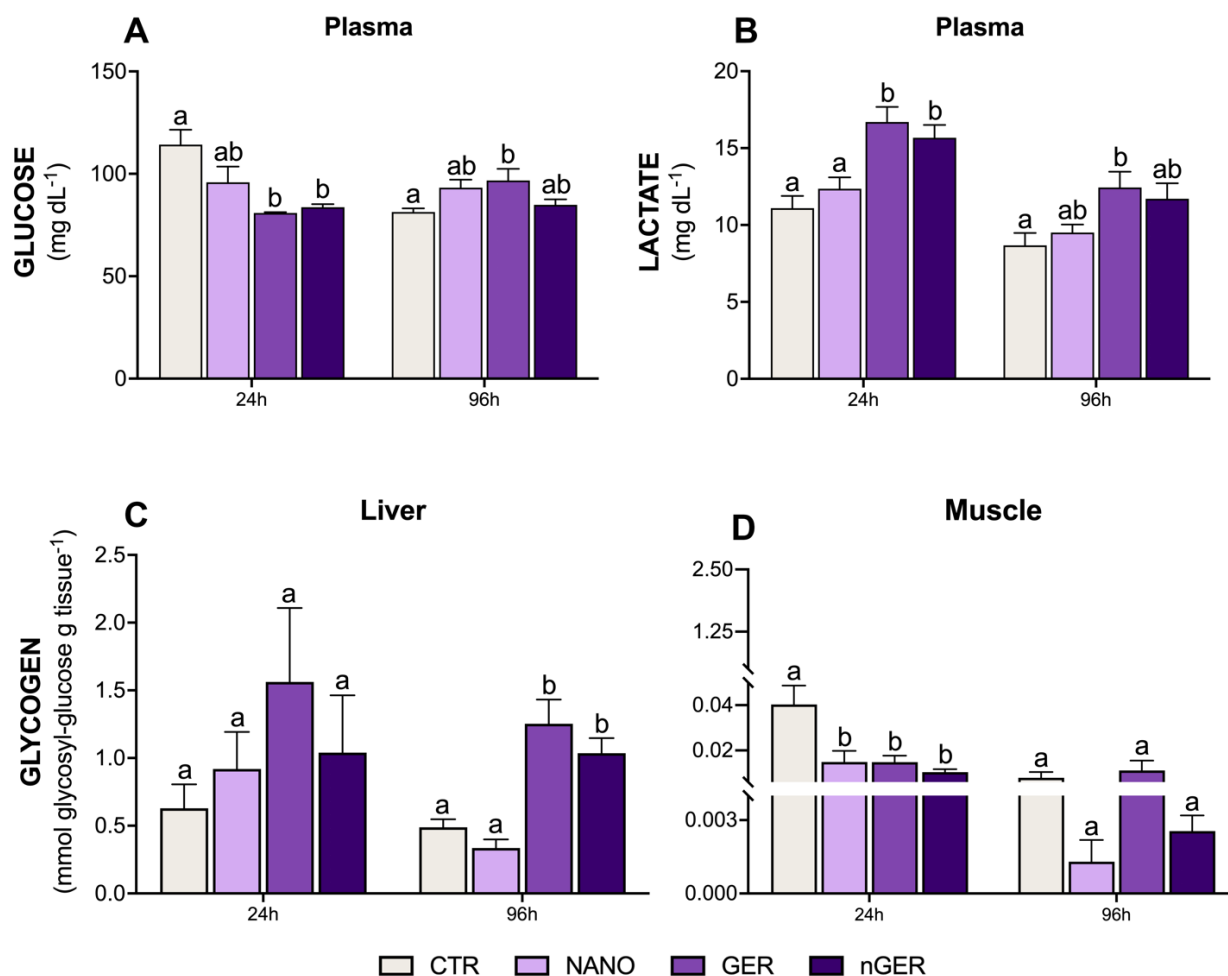


Figura 23. Glicemia (A), concentração de lactato plasmática (B), conteúdo de glicogênio hepático (C) e muscular (D) de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., $n = 8$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

3.3.6 Neurotoxicidade

Não foram observadas diferenças significativas quanto a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro ou no músculo dos animais expostos a nenhum dos tratamentos em 24h (Fig. 24). Entretanto, no cérebro em 96h, pode-se perceber uma menor atividade da AChE em NANO comparado aos demais grupos ($p < 0,0001$), ao mesmo tempo que foi reportada uma maior atividade dessa enzima em GER comparado aos demais grupos ($p < 0,0001$) (Fig. 24A). Ainda em 96h, no músculo, uma menor atividade da AChE foi notada em todos os grupos experimentais em relação ao CTR ($p = 0,003$) (Fig. 24B).

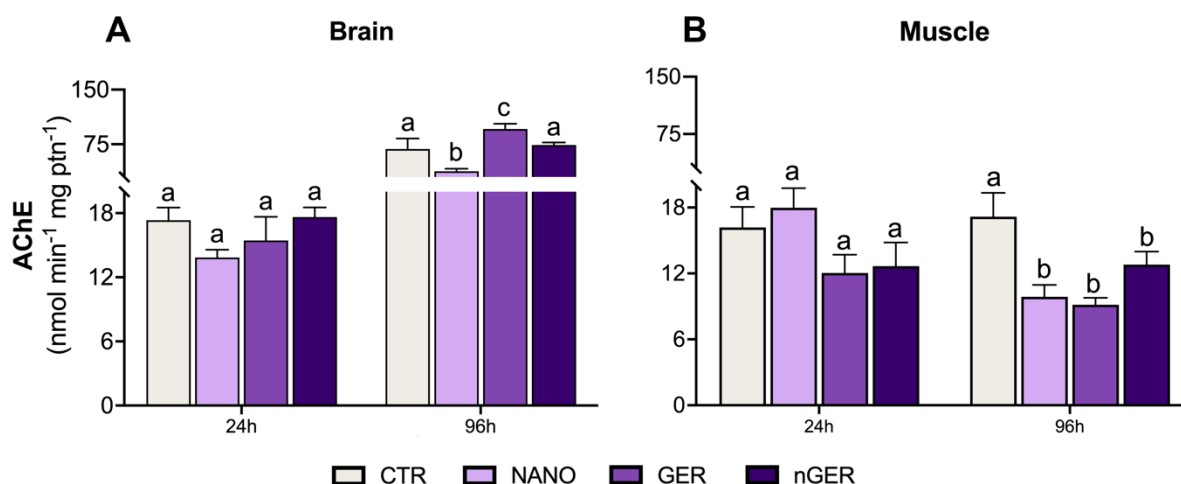


Figura 24. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro (A) e no músculo (B) de girinos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER (Média $\pm$ E.P., n= 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

3.3.7 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA foi aplicada apenas para os resultados dos biomarcadores que apresentaram variações significativas entre os grupos, em pelo menos um dos tempos experimentais (Fig. 25). Os dois primeiros eixos (PC1 e PC2) representaram 49% da variância total. Portanto, os demais eixos foram desconsiderados por não fornecerem informações adicionais significativas. O primeiro eixo (PC1) explicou 29% da variabilidade total e foi responsável pela separação dos grupos CTR e nGER, correlacionando este grupo com alterações nos íons sódio e cloreto, no lactato, na concentração de hemoglobina, de glicogênio hepático e atividade da acetilcolinesterase cerebral. Já o segundo eixo (PC2) foi responsável por 20% da variabilidade dos dados, separando os grupos NANO e GER dos CTR e nGER. O grupo NANO parece ter tido maior influência nos biomarcadores osmoiônicos, enquanto o grupo GER influenciou mais os biomarcadores metabólicos.

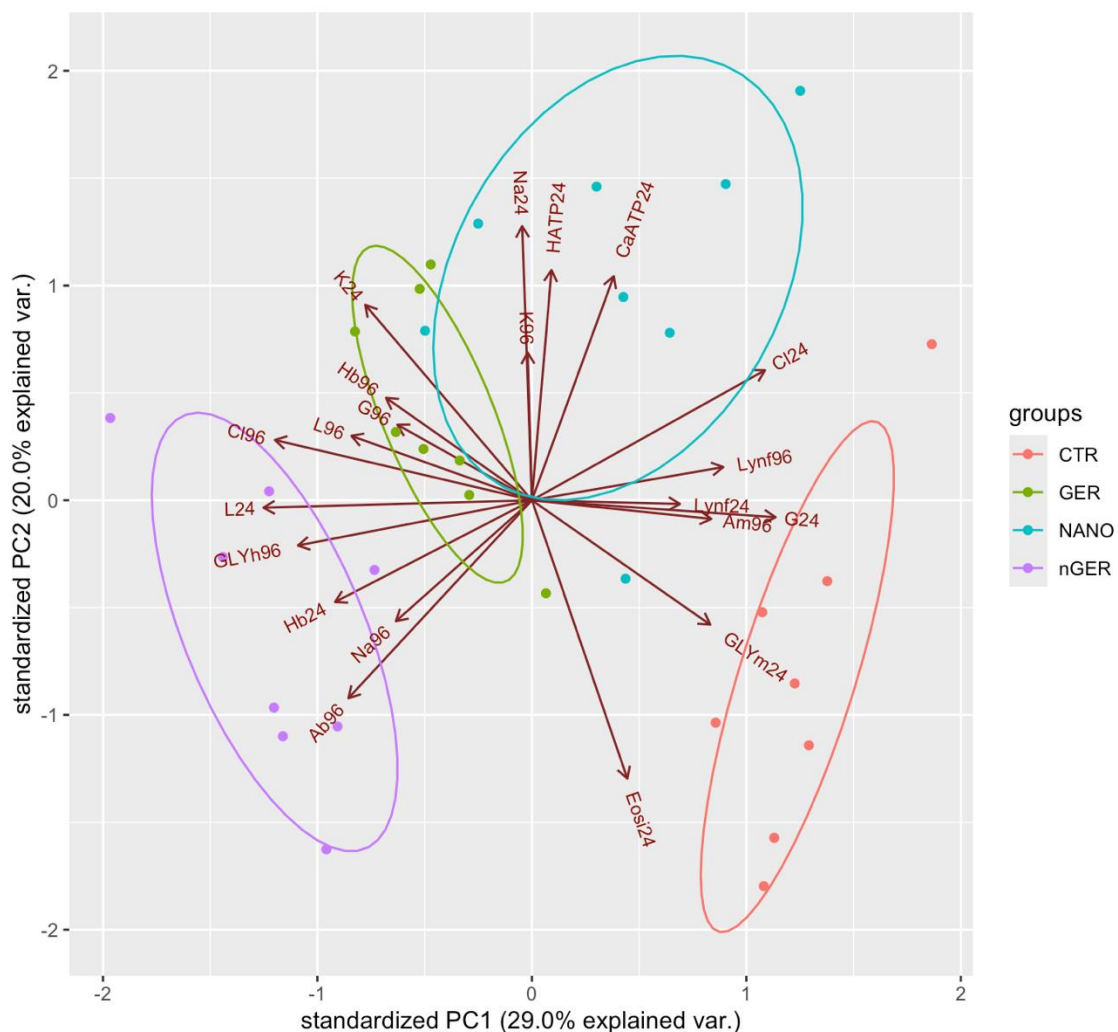


Figura 25. Análise de componentes principais (PCA) usando respostas significativas de biomarcadores (Ab: acetilcolinesterase cerebral; Am: acetilcolinesterase muscular; CaATP: cálcio-ATPase; Cl: cloreto; Eosi: eosinófilos; G: glicose; GLYh: glicogênio hepático; GLYm: glicogênio muscular; HATP: hidrogênio-ATPase; Hb: hemoglobina; K: potássio; L: lactato; Lynf: linfócitos; Na: sódio) em amostras de diferentes tecidos de *A. catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER, após 24 e 96 h de exposição.

3.3.8 Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)

A análise de caracterização de leucócitos não foi incluída para o cálculo do IBRv2 porque em alguns grupos, os valores eram iguais a zero, impossibilitando a aplicação do cálculo. De maneira geral, menores valores de IBR foram verificados após 24h (NANO: 14,5; nGER: 16,34; GER: 19,73) de exposição aos xenobióticos do que em 96h (NANO: 15,69; nGER: 20,9; GER: 23,43) (Fig. 26). Entretanto, a mesma sequência nos valores de IBR foi observada nos dois tempos experimentais: GER > nGER > NANO. Os gráficos de radar indicam que após 24h de exposição, o grupo NANO se separa dos demais pela indução das enzimas de osmorregulação nas brânquias, enquanto nGER e GER influenciaram mais a

concentração de lactato e hemoglobina (maior influência em GER). Já em 96h, a concentração de hemoglobina é induzida por todas as exposições, mas nGER e GER também induzem lactato, glicose e glicogênio.

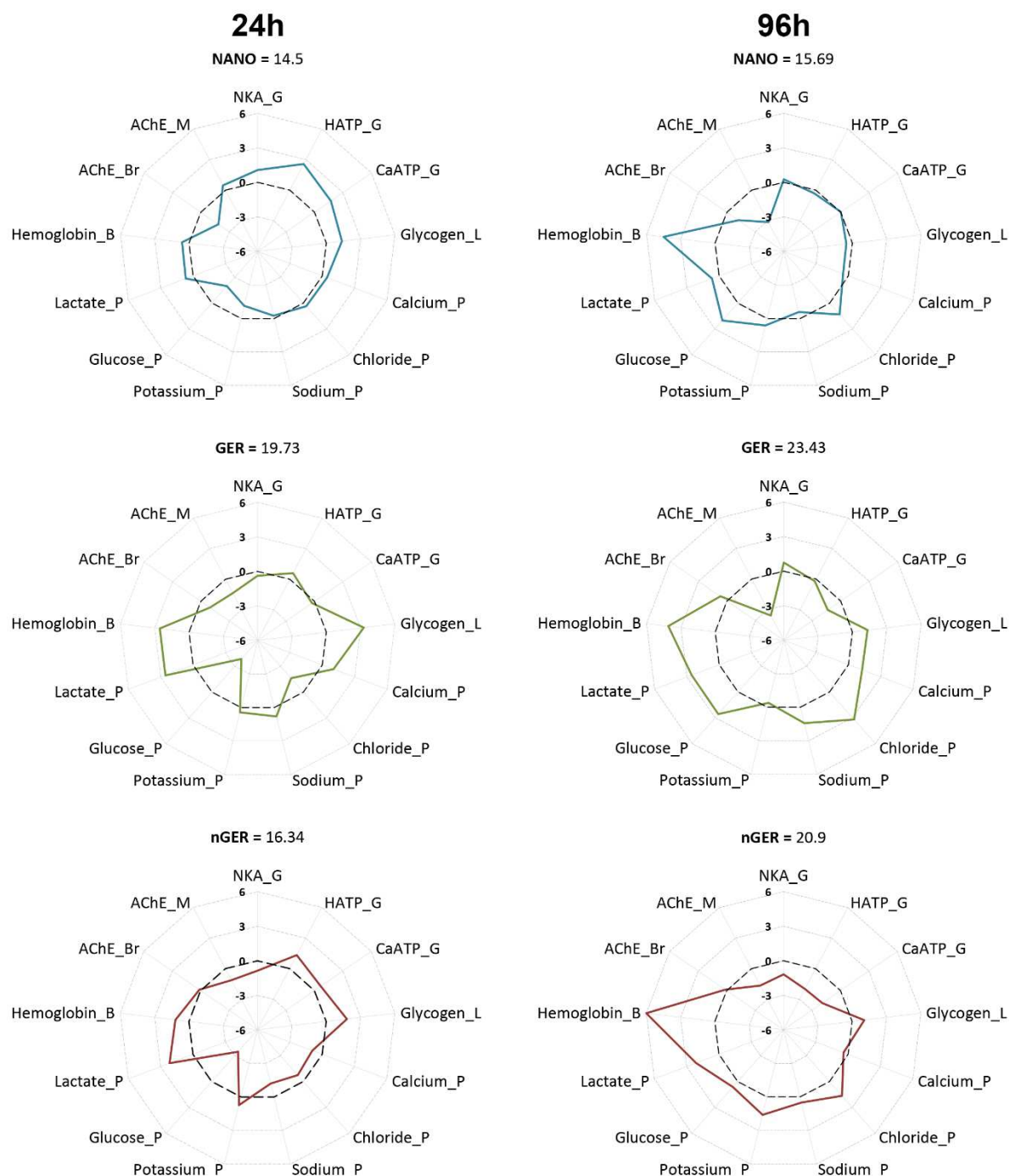


Figura 26. Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos seguintes biomarcadores: Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HATP), Ca^{2+} -ATPase (CaATP), Glicogênio (Glycogen), Ca^{2+} (Calcium), Cl^- (Chloride), Na^+ (Sodium), K^+ (Potassium), Glicose (Glucose), Lactato (Lactate), Hemoglobina (Hemoglobin) e acetilcolinesterase (AChE) em diferentes tecidos (G = brânquia, L = fígado, P = plasma, B = sangue, Br = cérebro e M = músculo) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), nGER (radar vermelho) e GER (radar verde) por 24h (esquerda) e 96h (direita). Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador.

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos das exposições agudas (24 e 96h) ao geraniol nanoencapsulado e seus componentes (ingrediente ativo livre e nanocápsulas de zeína) sobre diferentes biomarcadores fisiológicos de girinos de *Aquarana catesbeiana*. Os resultados mostram que alguns dos efeitos observados nos girinos expostos ao GER não foram observados nos girinos expostos ao composto nanoencapsulado, ou nos girinos expostos apenas às nanocápsulas. No entanto, os girinos expostos ao nGER apresentaram algumas alterações semelhantes aos girinos expostos ao GER. O Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) mostrou claramente efeitos intermediários provocados pelo nGER em comparação com seus componentes, sendo que GER causou o maior número de alterações entre os xenobióticos testados, em ambos os tempos experimentais. Isso sugere que tanto NANO quanto GER exibem efeitos sobre os biomarcadores analisados, mas quando estão combinados (nGER) formam um sistema onde seus efeitos são intermediários, na maioria das vezes.

Em relação à formulação inicial, as NPs dos aquários estavam ligeiramente maiores. Isso ocorre porque as NPs de zeína têm estabilidade baixa e tendem a formar agregados em soluções aquosas (Chen & Zhong, 2014; Pascoli et al., 2018; Proença et al., 2024). O tamanho da partícula influencia diretamente na sua absorção pelas células, por exemplo, partículas de até 500 nm são incorporadas por fagocitose enquanto partículas menores são tomadas por pinocitose (Oh & Park, 2014; Zhao et al., 2011). As NPs do presente estudo tinham até ~300 nm e suas concentrações foram diminuindo ao decorrer do tempo, o que pode estar relacionado a uma absorção pelo organismo (Andrade et al., 2019). As nanocápsulas podem ser inseridas nas células devido à sua alta área de superfície e tamanho diminuto, e modificações adicionais na superfície dessas partículas podem aumentar ainda mais a absorção celular (Hu & Gao, 2010; Yuan et al., 2016), e as nanocápsulas carregadas podem penetrar nas células dos animais (Clemente & Simpson, 2013). É provável que isso afete sua distribuição e toxicidade em comparação com os produtos não encapsulados (Meredith et al., 2016), o que pode explicar a diferença na toxicidade do GER para o nGER observada para o girino *A. catesbeiana*.

As concentrações de geraniol nos aquários, embora inicialmente um pouco maiores que a concentração nominal (5 mg L⁻¹), foram parecidas entre os dois

grupos (GER: $7,64 \pm 1,84 \text{ mg L}^{-1}$; nGER: $6,92 \pm 1,76 \text{ mg L}^{-1}$). Entretanto, a concentração de geraniol no grupo nGER apresentou maior oscilação, alternando entre concentrações maiores e menores, ao longo do tempo. Isso demonstra a capacidade das NPs em manter a liberação controlada do IA (Lao et al., 2010; Takei et al., 2008; Varona et al., 2009, 2010; Yang et al., 2009).

Vários estudos têm demonstrado que anfíbios residentes de ambientes contaminados ou expostos a contaminantes em condições experimentais apresentam parâmetros imunológicos diminuídos, tornando-os mais suscetíveis a doenças (Barni et al., 2007; Denise & Storfer, 2006; Salinas et al., 2024; Zhelev & Popgeorgiev, 2013) que é uma causa importante do declínio populacional dos anfíbios (Hayes et al., 2010). No presente estudo, foi percebida diminuição de linfócitos em ambos os tempos experimentais (apenas nGER), bem como de eosinófilos (todos os tratamentos) em 24h. Os linfócitos estão relacionados com resposta imune adaptativa, sendo responsivos a diferentes antígenos. Uma diminuição nessas células sugere que a capacidade dos girinos de montar uma resposta imune eficaz a patógenos está comprometida. Isso pode levar ao aumento da suscetibilidade a infecções, redução da capacidade de combater doenças e taxas de mortalidade potencialmente maiores. Já os eosinófilos estão mais relacionados com respostas inflamatórias, produzindo e liberando mediadores pro-inflamatórios como o $\text{TNF-}\alpha$ (Dautremepuits et al., 2005; Robert & Ohta, 2009). Uma redução nos eosinófilos pode prejudicar a capacidade dos girinos de controlar infecções parasitárias de forma eficaz, levando ao aumento da carga parasitária. Além disso, a diminuição de eosinófilos pode indicar uma capacidade reduzida de controlar a inflamação.

Um sistema imunológico enfraquecido pode atrasar o desenvolvimento e o crescimento, resultando em girinos menores e menos desenvolvidos, que são mais vulneráveis à predação. Girinos de rã-touro expostos a radiação UV e desreguladores endócrinos, e outros vertebrados expostos a altas concentrações de glicocorticoides, também exibiram padrões semelhantes de perfil leucocitário, indicando uma resposta ao estresse crônico e inflamação (Davis et al., 2008; De Gregorio et al., 2021; Franco-Belussi et al., 2018). Oliveira et al. (2019), ao expor girinos de *A. catesbeiana* ao extrato de piretro (OE com atividades pesticidas) em sua forma livre e nanoencapsulada, observaram respostas diferentes: não houve queda no número de linfócitos, mas aumento no número de eosinófilos e basófilos. Os autores relacionaram com as características da nanopartícula utilizada

(nanocápsulas de lipídeos sólidos).

O aumento na concentração de hemoglobina causado pela exposição ao GER em 24h pode estar relacionado a uma tentativa de aumentar a captação de oxigênio. Durante esse mesmo período, uma queda na glicemia e um aumento nas concentrações de lactato plasmático foram observados, indicando a ativação do metabolismo anaeróbico. A depleção do glicogênio muscular nesse mesmo tempo reforça ainda mais essa ideia, pois o organismo pode ter utilizado o glicogênio como uma fonte rápida de energia por meio da glicogenólise seguida pela glicólise. Em 96h, um aumento na concentração de hemoglobina foi observado apenas no grupo nGER. Isso sugere que as demandas metabólicas de oxigênio dos animais nGER foram supridas, restabelecendo a glicemia e lactato plasmático. No entanto, as maiores concentrações de glicose e lactato em animais expostos ao GER implicam dependência contínua de vias anaeróbicas para produção de energia. Além disso, o aumento na concentração de glicogênio hepático em grupos contendo geraniol (GER e nGER) durante esse período indica um aumento nas reservas de energia em resposta a um ambiente estressante.

Em apoio a esses achados, girinos *Microhyla fissipes* expostos a herbicidas à base de glifosato demonstraram inibição da glicogenólise hepática e uma troca para o metabolismo de aminoácidos (Wang et al., 2019). Da mesma forma, girinos de rã-touro expostos a três herbicidas diferentes (atrazina, glifosato e quinclorac) apresentaram depleção de glicogênio muscular, indicando uso rápido dessa molécula como substrato energético sob estresse (Dornelles & Oliveira, 2014, 2016). Peixes expostos a OE compostos principalmente de monoterpenos apresentaram alterações nas concentrações de hemoglobina, glicose, lactato e glicogênio no fígado e no músculo (Copatti et al., 2022; de Souza et al., 2019; Ventura et al., 2021). Além disso, as nanopartículas (NPs) podem interferir nas enzimas do metabolismo do glicogênio induzindo estresse oxidativo, desregulação endócrina ou interação direta com receptores de glicose em células de peixes (Massarsky et al., 2014; Ostaszewska et al., 2018). No entanto, no presente estudo, as nanocápsulas de zeína não afetaram o metabolismo energético de *A. catesbeiana*. Assim, os efeitos observados no metabolismo energético nos grupos GER e nGER são provavelmente atribuíveis ao geraniol.

O aumento de Na^+ após 24h é justificado pela maior atividade de HATP observada nos animais NANO. O bombeamento de prótons provavelmente

criou um gradiente que favoreceu o influxo de Na^+ , levando ao aumento da liberação de Na^+ no plasma pela ação da NKA. No entanto, o aumento observado em K^+ em ambos os tempos experimentais não é bem explicado pelos mecanismos avaliados neste estudo e a possibilidade de lise celular por diluição pode ser excluída, pois o conteúdo de Na^+ não diminuiu. Estudos específicos adicionais sobre homeostase iônica em girinos de *A. catesbeiana* expostos a condições semelhantes podem elucidar os mecanismos envolvidos no desequilíbrio de K^+ e Cl^- .

Uma ampla gama de óleos essenciais (OEs) exibe patogenicidade por meio da modulação de atividades enzimáticas envolvidas no equilíbrio osmótico de fungos, insetos e bactérias (Bhatia et al., 2012; Cui et al., 2018; Hu et al., 2021; Issa et al., 2019; Oboh et al., 2017). Os OEs também podem alterar a atividade das ATPases em peixes (Toni et al., 2014). No entanto, neste estudo, os grupos contendo geraniol (GER e nGER) não mostraram efeitos na atividade das ATPases. Apenas o grupo NANO mostrou aumento nas atividades de HATP e CaATP.

Tesser et al. (2022) observaram um aumento na atividade de CaATP e nenhuma alteração nas concentrações de íons Ca^{2+} na hemolinfa de bivalves *Anodontites trapesialis* expostos a NPs de titânio biogênicas por 24h. Um resultado semelhante foi observado no estudo atual, sugerindo que o aumento da atividade da enzima foi suficiente para manter a calcemia nos animais. Geralmente, a exposição a NPs tende a inibir a atividade da ATPase, pois esses compostos exibem toxicidade na osmorregulação por meio de interações físicas com canais iônicos. NPs menores foram consideradas mais tóxicas (Osborne et al., 2015). Carmo et al. (2018) notaram efeitos na osmorregulação de peixes *Prochilodus lineatus* expostos a NPs de titânio somente em tempos agudos, com esses efeitos diminuindo em maiores tempos de exposição. Esse padrão também foi observado no presente estudo, indicando uma adaptação dos mecanismos de osmorregulação dos organismos à presença de NPs.

Em relação à atividade da AChE, a exposição de 24h aos xenobióticos não induziu neurotoxicidade em nenhum dos tecidos avaliados. Esta falta de neurotoxicidade pode ser atribuída à distribuição dos xenobióticos nos organismos aquáticos, que chega mais lentamente nestes tecidos (cérebro e músculo). Além disso, o cérebro possui uma barreira hematoencefálica que oferece proteção extra (Dang et al., 2016; Schlenk & de Almeida, 2024).

No entanto, a exposição prolongada (96h) aos xenobióticos produziu neurotoxicidade no cérebro e no músculo de *A. catesbeiana*. O aumento na atividade

de AChE cerebral em animais expostos ao GER é consistente com os resultados observados em *Danio rerio* exposto ao OE de *Thymus vulgaris*, cujo maior componente é um monoterpeno (Capatina et al., 2020). Os autores atribuíram isso a uma diminuição do estresse oxidativo no cérebro, que pode modular a atividade da AChE. López et al. (2015) explicam ainda que, além da redução do estresse oxidativo, a AChE pode ser ativada por monoterpenos. Estas moléculas facilitam a ligação da acetilcolina (ACh) ao sítio periférico, aumentando assim a taxa de acetilação ou desacetilação e auxiliando na liberação acelerada dos produtos da hidrólise da AChE. A ativação da AChE e a diminuição resultante da ACh disponível podem ser significativas, uma vez que concentrações precisas de ACh no cérebro são cruciais para preservar as funções cognitivas.

A inibição da atividade da AChE em NANO pode estar relacionada à interação física entre NPs e a AChE, alterando a estrutura da enzima. No tecido muscular, todos os xenobióticos promoveram a inibição da AChE. Alguns monoterpenos, como o geraniol, podem ligar-se competitivamente à AChE, levando à sua inibição (Iqbal et al., 2021). A inibição da AChE pode resultar no acúmulo de ACh nas fendas sinápticas, causando uma crise colinérgica. Esse processo está bem documentado na literatura, principalmente no que se refere ao mecanismo de ação dos inseticidas organofosforados (Oliveira et al., 2014; Ozmen et al., 1999).

Por fim, a Análise de Componentes Principais (PCA) mostrou uma separação clara entre grupos. O grupo CTR está bem separado dos demais grupos, demonstrando que a exposição aos xenobióticos provocaram respostas diferentes às do CTR. Pode-se observar ainda, uma leve interpolação dos grupos GER e NANO, sendo que o primeiro está mais relacionado com os efeitos sobre o metabolismo energético dos girinos *A. catesbeiana* e, o segundo, aos efeitos sobre a osmorregulação destes animais. Já o grupo nGER está separado tanto de NANO, quanto de GER e também do CTR. Isso indica que esse grupo apresentou efeitos distintos do CTR, mas intermediários entre os demais, visto que está relacionado com biomarcadores de metabolismo energético, osmorregulação e neurotoxicidade.

3.5 CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro a avaliar efeitos da exposição aguda ao geraniol livre, geraniol nanoencapsulado e das nanocápsulas de zeína em anfíbios. Os resultados demonstram que o geraniol livre provocou maiores alterações nos biomarcadores avaliados em girinos de *A. catesbeiana*, seguido do geraniol nanoencapsulado e, por fim, das nanocápsulas de zeína. Embora tenham tido algum efeito sobre a osmorregulação desses animais em um primeiro momento, as nanocápsulas parecem ser seguras, visto que com o passar do tempo as alterações não foram mais observadas. Ao ser nanoencapsulado, o geraniol apresentou toxicidade intermediária para esses animais, o que pode estar atribuído à ação do próprio monoterpene, visto que este em forma livre induziu estresse metabólico nos girinos. Há necessidade de mais estudos sobre o destino e comportamento ambiental das nanopartículas carreadoras de IA para dizer que o nanoencapsulamento do geraniol é seguro para os organismos aquáticos, visto que a liberação de geraniol pode causar estresse em *A. catesbeiana*.

3.6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho faz parte da dissertação de Mestrado de W. P. Santos, que foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). O trabalho faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanotecnologia para Agricultura Sustentável (INCT-NanoAgro) e foi parcialmente financiado pela Fundação de Apoio ao Pesquisador do Estado de São Paulo (FAPESP Processo: 2017/21004-5) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). C. B. R. Martinez é uma pesquisadora associada ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- Andrade, L. L. de, do Espírito Santo Pereira, A., Fernandes Fraceto, L., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2019). Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. *Science of the Total Environment*, 663, 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.380>
- Araújo, E. R. L. de, da Silva e Silva, J., Lopes, L. M., Torres, M. F., da Costa, B. M. P. A., do Amarante, C. B., Hamoy, M., Barbas, L. A. L., & Sampaio, L. A. (2021). Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. *Aquaculture*, 537, 736517. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736517>
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2006.10.012>
- Bhatia, R., Shreaz, S., Khan, N., Muralidhar, S., Basir, S. F., Manzoor, N., & Khan, L. A. (2012). Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. *Journal of Basic Microbiology*, 52(5), 504–512. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201100272>
- Bidinotto, P., Moraes, G., & Souza, R. (1997). Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico Do CEPTA*, 10(14), 53–60.
- Bonferoni, M. C., Ferraro, L., Pavan, B., Beggiato, S., Cavalieri, E., Giunchedi, P., & Dalpiaz, A. (2019). Uptake in the Central Nervous System of Geraniol Oil Encapsulated in Chitosan Oleate Following Nasal and Oral Administration. *Pharmaceutics*, 11, 106. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030106>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Capatina, L., Todirascu-Ciornea, E., Napoli, E. M., Ruberto, G., Hritcu, L., & Dumitru, G. (2020). *Thymus vulgaris* Essential Oil Protects Zebrafish against Cognitive Dysfunction by Regulating Cholinergic and Antioxidants Systems. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 1083, 9(11), 1083. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9111083>
- Carmo, T. L. L., Azevedo, V. C., Siqueira, P. R., Galvão, T. D., Santos, F. A., Martinez, C. B. R., Appoloni, C. R., & Fernandes, M. N. (2018). Mitochondria-rich cells adjustments and ionic balance in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 200, 168–177. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2018.05.006>
- Carneiro, F. E., Grott, S. C., Israel, N. G., Bitschinski, D., Abel, G., Alves, T. C., de Albuquerque, C. A. C., da Silva, E. B., & de Almeida, E. A. (2023). Influence of temperature on the biomarker responses of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) to 2-hydroxyatrazine exposure. *Aquatic Toxicology*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106468>
- Carrasco, G. H., de Souza, M. B., & Santos, L. R. S. (2021). Effect of multiple stressors and population decline of frogs. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(42), 59519–59527. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-16247-6/FIGURES/5>
- Cazenave, J., Amé, M. V., & Menone, M. L. (2021). Biomarcadores de Contaminación. In *Principios de Ecotoxicología* (pp. 1–308). Universidad Nacional de La Plata.

- Facultad de Ciencias Exactas. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/161075>
- Chen, H., & Zhong, Q. (2014). Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 358–366. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.06.012>
- Chen, W., & Viljoen, A. M. (2022). Geraniol – A review update. *South African Journal of Botany*, 150, 1205–1219. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.012>
- Clemente, J. S., & Simpson, M. J. (2013). Physical protection of lignin by organic matter and clay minerals from chemical oxidation. *Organic Geochemistry*, 58, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2013.02.007>
- Copatti, C. E., Felix e Silva, A., Lorenzo, V. P., & Melo, J. F. B. (2022). Addition of essential oil from *Lippia sidoides* to the diet of tambaqui: An analysis of growth, metabolic and blood parameters, and intestinal enzymes. *Aquaculture*, 560, 738482. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738482>
- Cui, H., Bai, M., Sun, Y., Abdel-Samie, M. A. S., & Lin, L. (2018). Antibacterial activity and mechanism of *Chuzhou chrysanthemum* essential oil. *Journal of Functional Foods*, 48, 159–166. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.07.021>
- Dang, V. D., Kroll, K. J., Supowit, S. D., Halden, R. U., & Denslow, N. D. (2016). Tissue distribution of organochlorine pesticides in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from laboratory exposure and a contaminated lake. *Environmental Pollution*, 216, 877–883. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.06.061>
- Dautremepuits, C., Robert, J., Brousseau, P., Fournier, M., & Salo, H. (2005). Immunotoxicology of amphibians. *Applied Herpetology*, 2(3), 297–309. <https://doi.org/10.1163/1570754054507451>
- Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760–772. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2435.2008.01467.X>
- de Araújo, E. R. L., Torres, M. F., Hamoy, M., Barbas, L. A. L., & Sampaio, L. A. (2023). Cardiac response of tambaqui *Colossoma macropomum* anaesthetised with geraniol and citronellol. *Aquaculture*, 565, 739101. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.739101>
- De Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., & De Oliveira, C. (2021). Leukocyte Profile of Tadpoles and Juveniles of *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 (Anura) and the Effects of Nonylphenol and Cyproterone Acetate. *South American Journal of Herpetology*, 20(1), 75–83. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-19-00111.1>
- De Marco, I. (2022). Zein Microparticles and Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Polymers*, 14(11), 2172. <https://doi.org/10.3390/POLYM14112172>
- De Oliveira, G. M. T., Kist, L. W., Pereira, T. C. B., Bortolotto, J. W., Paquete, F. L., De Oliveira, E. M. N., Leite, C. E., Bonan, C. D., De Souza Basso, N. R., Papaleo, R. M., & Bogo, M. R. (2014). Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 162(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2014.03.010>
- de Oliveira, M. M., Morato, R. G., Jorge, R. S. P., & de Paula, R. C. (2021). Agricultural activities and threat to fauna in Brazil: an analysis of the Red Book of Endangered Brazilian Fauna. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 61, e20216193. <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2021.61.93>
- de Souza, E. M., de Souza, R. C., Melo, J. F. B., da Costa, M. M., de Souza, A. M., & Copatti, C. E. (2019). Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture*, 504, 7–12.

- <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.01.052>
- Denise, D., & Storfer, A. (2006). Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecological Applications*, 16(6), 2325–2332. <https://doi.org/10.1890/1051-0761>
- Dornelles, M. F., & Oliveira, G. T. (2014). Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(3), 415–429. <https://doi.org/10.1007/S00244-013-9967-4/FIGURES/4>
- Dornelles, M. F., & Oliveira, G. T. (2016). Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1610–1620. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5388-4>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AUTHORITY (EPA). 2020. Science memo for application to import or manufacture NOVELLUS FUNGICIDE for release (APP203836). Disponível em: https://www.epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsnoar/APP203836/APP203836_Science_Memorandum.pdf. Acesso em: 13 out. 2022.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance geraniol. *EFSA Journal* 10(11):2915. doi:10.2903/j.efsa.2012.2915
- Farasat, I., Kushwaha, M., Collens, J., Easterbrook, M., Guido, M., & Salis, H. M. (2014). Efficient search, mapping, and optimization of multi-protein genetic systems in diverse bacteria. *Molecular Systems Biology*, 10, 731. <https://doi.org/10.15252/msb.20134955>
- Farokhchah, M., Hejazian, L., Akbarnejad, Z., Pourabdolhossein, F., Hosseini, S. M., Mehraei, T. M., & Soltanpour, N. (2021). Geraniol improved memory impairment and neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles in male wistar rats through its antioxidant effect. *Life Sciences*, 282, 119823. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119823>
- Fernandes, I. F., Utsunomiya, H. S. M., de Lacerda Valverde, B. S., Ferraz, J. V. C., Fujiwara, G. H., Gutierrez, D. M., de Oliveira, C., Belussi, L. F., Fernandes, M. N., & Carvalho, C. dos S. (2021). Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Chemosphere*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130000>
- Franco-Belussi, L., Fanali, L. Z., & De Oliveira, C. (2018). UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 109–117. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.01.022>
- Germano-Costa, T., Bilesky-José, N., Guilger-Casagrande, M., Pasquoto-Stigliani, T., Rogério, C. B., Abrantes, D. C., Maruyama, C. R., Oliveira, J. L., Fraceto, L. F., & Lima, R. (2022). Use of 2D and co-culture cell models to assess the toxicity of zein nanoparticles loading insect repellents icaridin and geraniol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112564>
- Gibbs, A., & Somero, G. N. (1989). Pressure Adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in Gills of Marine Teleosts. *Journal of Experimental Biology*, 143(1), 475–492.

- <https://doi.org/10.1242/JEB.143.1.475>
- Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190. <https://www.jstor.org/stable/3890061>
- Grott, S. C., Israel, N. G., Bitschinski, D., Abel, G., Carneiro, F., Alves, T. C., & Alves de Almeida, E. (2023). Influence of temperature on biomarker responses of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide ametryn. *Chemosphere*, 308. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136327>
- Hacke, A. C. M., Miyoshi, E., Marques, J. A., & Pereira, R. P. (2021). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *Journal of Ethnopharmacology*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114142>
- Hassan, E. A., Hathout, R. M., Gad, H. A., & Sammour, O. A. (2022). A holistic review on zein nanoparticles and their use in phytochemicals delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 73, 103460. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103460>
- Hayes, T. B., Falso, P., Gallipeau, S., & Stice, M. (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 921–933. <https://doi.org/10.1242/JEB.040865>
- Hu, K., & McClements, D. J. (2015). Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.09.015>
- Hu, Y. L., & Gao, J. Q. (2010). Potential neurotoxicity of nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 394(1–2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2010.04.026>
- Hu, Z., Yuan, K., Zhou, Q., Lu, C., Du, L., & Liu, F. (2021). Mechanism of antifungal activity of *Perilla frutescens* essential oil against *Aspergillus flavus* by transcriptomic analysis. *Food Control*, 123, 107703. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107703>
- Iqbal, D., Khan, M. S., Waiz, M., Rehman, M. T., Alaidarous, M., Jamal, A., Alothaim, A. S., Alajmi, M. F., Alshehri, B. M., Banawas, S., Alsaweed, M., Madkhali, Y., Algarni, A., Alsagaby, S. A., & Alturaiki, W. (2021). Exploring the binding pattern of geraniol with acetylcholinesterase through in silico docking, molecular dynamics simulation, and in vitro enzyme inhibition kinetics studies. *Cells*, 10(12), 3533. <https://doi.org/10.3390/CELLS10123533/S1>
- Issa, D., Najjar, A., Greige-Gerges, H., & Nehme, H. (2019). Screening of Some Essential Oil Constituents as Potential Inhibitors of the ATP Synthase of *Escherichia coli*. *Journal of Food Science*, 84(1), 138–146. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14421>
- Jäger, T., Bäcker, S., Brodbeck, T., Leibold, E., & Bader, M. (2020). Quantitative determination of urinary metabolites of geraniol by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Analytical Methods*, 12, 5718. <https://doi.org/10.1039/d0ay01582b>
- Kah, M., & Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International*, 63, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>
- Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., & Bucheli, T. D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 13(8), 677–684. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>

- Kaur, G., Ganjewala, D., Bist, V., & Verma, P. C. (2019). Antifungal and larvicidal activities of two acyclic monoterpenes; citral and geraniol against phytopathogenic fungi and insects. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(5–6), 458–469. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1651579>
- Kumar, A., Gupta, K., Dixit, S., Mishra, K., & Srivastava, S. (2019). A review on positive and negative impacts of nanotechnology in agriculture. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(3), 2175–2184. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2119-7>
- Lao, S. B., Zhang, Z. X., Xu, H. H., & Jiang, G. B. (2010). Novel amphiphilic chitosan derivatives: Synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1136–1142. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.06.044>
- López, M. D., Campoy, F. J., Pascual-Villalobos, M. J., Muñoz-Delgado, E., & Vidal, C. J. (2015). Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner. *Chemico-Biological Interactions*, 229, 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2015.01.006>
- Massarsky, A., Labarre, J., Trudeau, V. L., & Moon, T. W. (2014). Silver nanoparticles stimulate glycogenolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 147, 68–75. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2013.11.026>
- McCormick, S. D. (1993). Methods for Nonlethal Gill Biopsy and Measurement of Na⁺, K⁺-ATPase Activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(3), 656–658. <https://doi.org/10.1139/F93-075>
- Mendes Hacke, A. C., Miyoshi, E., Marques, J. A., & Pereira, R. P. (2020). Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Ethnopharmacology*, 260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113036>
- Meredith, A. N., Harper, B., & Harper, S. L. (2016). The influence of size on the toxicity of an encapsulated pesticide: a comparison of micron- and nano-sized capsules. *Environment International*, 86, 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.10.012>
- Oboh, G., Ademosun, A. O., Olumuyiwa, T. A., Olasehinde, T. A., Ademiluyi, A. O., & Adeyemo, A. C. (2017). Insecticidal activity of essential oil from orange peels (*Citrus sinensis*) against *Tribolium confusum*, *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus oryzae* and its inhibitory effects on acetylcholinesterase and Na⁺/K⁺-ATPase activities. *Phytoparasitica*, 45(4), 501–508. <https://doi.org/10.1007/S12600-017-0620-Z/FIGURES/2>
- Oh, N., & Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9(SUPPL), 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>
- Oliveira, C. R., Garcia, T. D., Franco-Belussi, L., Salla, R. F., Souza, B. F. S., de Melo, N. F. S., Irazusta, S. P., Jones-Costa, M., Silva-Zacarin, E. C. M., & Fraceto, L. F. (2019). Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: Toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles. *Environmental Pollution*, 253, 1009–1020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.037>
- Oliveira, J. L. D., Campos, E. V. R., Pereira, A. E. S., Pasquoto, T., Lima, R., Grillo, R., Andrade, D. J. De, Santos, F. A. Dos, & Fraceto, L. F. (2018). Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(6), 1330–1340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>

- Osborne, O. J., Lin, S., Chang, C. H., Ji, Z., Yu, X., Wang, X., Lin, S., Xia, T., & Nel, A. E. (2015). Organ-Specific and Size-Dependent Ag Nanoparticle Toxicity in Gills and Intestines of Adult Zebrafish. *ACS Nano*, 9(10), 9573–9584. <https://doi.org/10.1021/ACSNANO.5B04583>
- Ostaszewska, T., Śliwiński, J., Kamaszewski, M., Sysa, P., & Chojnacki, M. (2018). Cytotoxicity of silver and copper nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1), 908–915. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-0494-0/FIGURES/9>
- Ozmen, M., Sener, S., Mete, A., & Kucukbay, H. (1999). In vitro and in vivo acetylcholinesterase-inhibiting effect of new classes of organophosphorus compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(2), 241–246. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620180221>
- Pascoli, M., de Lima, R., & Fraceto, L. F. (2018). Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. *Frontiers in Chemistry*, 6(JAN), 303239. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00006/BIBTEX>
- Pavan, B., Dalpiaz, A., Marani, L., Beggiato, S., Ferraro, L., Canistro, D., Paolini, M., Vivarelli, F., Valerii, M. C., Comparone, A., & De Fazio, L. (2018). Geraniol Pharmacokinetics, Bioavailability and Its Multiple Effects on the Liver Antioxidant and Xenobiotic-Metabolizing Enzymes. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00018>
- Pinto Vidal, F. A., Abdalla, F. C., Carvalho, C. dos S., Moraes Utsunomiya, H. S., Teixeira Oliveira, L. A., Salla, R. F., & Jones-Costa, M. (2021). Metamorphic acceleration following the exposure to lithium and selenium on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111101>
- Pourzahedi, L., Pandorf, M., Ravikumar, D., Zimmerman, J. B., Seager, T. P., Theis, T. L., Westerhoff, P., Gilbertson, L. M., & Lowry, G. V. (2018). Life cycle considerations of nano-enabled agrochemicals: are today's tools up to the task? *Environmental Science: Nano*, 5, 1057. <https://doi.org/10.1039/c7en01166k>
- Proença, P. L. de F., Campos, E. V. R., Costa, T. G., de Lima, R., Preisler, A. C., de Oliveira, H. C., da Rocha, C. M., de Andrade, D. J., Goncalves, K. C., Polanczyk, R. A., & Fraceto, L. F. (2024). Curcumin and carvacrol co-loaded zein nanoparticles: Comprehensive preparation and assessment of biological activities in pest control. *Plant Nano Biology*, 8, 100067. <https://doi.org/10.1016/J.PLANA.2024.100067>
- Robert, J., & Ohta, Y. (2009). Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*, 238(6), 1249–1270. <https://doi.org/10.1002/DVDY.21891>
- Rubiolo, P., Sgorbini, B., Liberto, E., Cordero, C., & Bicchi, C. (2010). Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 282–290. <https://doi.org/10.1002/FFJ.1984>
- Salinas, Z. A., Babini, M. S., Bionda, C. de L., Martino, A. L., & Lajmanovich, C. R. (2024). Agroecosystems under conventional and organic management: hematological analysis of anuran for environmental health assessment. *Environmental Advances*, 15, 100508. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2024.100508>
- Salla, R. F., Oliveira, F. N., Jacintho, J. C., Cirqueira, F., Tsukada, E., Vieira, L. G., & Rocha, T. L. (2024). Microplastics and TiO₂ nanoparticles mixture as an emerging threat to amphibians: A case study on bullfrog embryos. *Environmental Pollution*, 346, 123624. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2024.123624>

- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J. M. (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/S11356-012-1359-1/TABLES/2>
- Santos, C., & Martinez, C. B. dos R. (2020). Biotransformation in the fish *Prochilodus lineatus*: An organ-specific approach to cyp1a gene expression and biochemical activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103467>
- Singulani, J. L., Pedroso, R. S., Ribeiro, A. B., Nicolella, H. D., Freitas, K. S., Damasceno, J. L., Vieira, T. M., Crotti, A. E. M., Tavares, D. C., Martins, C. H. G., Mendes-Giannini, M. J. S., & Pires, R. H. (2018). Geraniol and Linalool Anticandidal Activity, Genotoxic Potential and Embryotoxic Effect on Zebrafish. *Future Microbiology*, 13(15), 1637–1646. <https://doi.org/10.2217/FMB-2018-0200>
- Sodhi, N. S., Bickford, D., Diesmos, A. C., Lee, T. M., & Koh, L. P. (2008). Measuring the Meltdown: Drivers of Global Amphibian Extinction and Decline. *PLoS ONE*, 3(2), 1636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001636>
- Takei, T., Yoshida, M., Hatate, Y., Shiomori, K., & Kiyoyama, S. (2008). Preparation of polylactide/poly(ε-caprolactone) microspheres enclosing acetamiprid and evaluation of release behavior. *Polymer Bulletin*, 61(3), 391–397. <https://doi.org/10.1007/S00289-008-0957-Z/METRICS>
- Tesser, M. E., Guilger, M., Bilesky-José, N., Risso, W. E., de Lima, R., & Martinez, C. B. dos R. (2022). Biogenic metallic nanoparticles (Ag, TiO₂, Fe) as potential fungicides for agriculture: are they safe for the freshwater mussel *Anodonta trapesialis*? *Chemosphere*, 309. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136664>
- Toni, C., Becker, A. G., Simões, L. N., Pinheiro, C. G., de Lima Silva, L., Heinzmann, B. M., Caron, B. O., & Baldisserotto, B. (2014). Fish anesthesia: Effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), 701–714. <https://doi.org/10.1007/S10695-013-9877-4/FIGURES/5>
- Varona, S., Kareth, S., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2010). Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54(3), 369–377. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2010.05.019>
- Varona, S., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2009). Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1121–1128. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2009.03.002>
- Ventura, A. S., Jerônimo, G. T., Corrêa Filho, R. A. C., Souza, A. I. de, Stringhetti, G. R., Cruz, M. G. da, Torres, G. dos S., Gonçalves, L. U., & Povh, J. A. (2021). *Ocimum basilicum* essential oil as an anesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum*: Hematological, biochemical, non-specific immune parameters and energy metabolism. *Aquaculture*, 533, 736124. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736124>
- Venzon, L., Mariano, L. N. B., Somensi, L. B., Boeing, T., de Souza, P., Wagner, T. M., Andrade, S. F. de, Nesello, L. A. N., & da Silva, L. M. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.12.020>
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Caldas, S. S., Tesser, M. E., Risso, W. E., Escarrone, A.

- L. V., Primel, E. G., Bianchini, A., & dos Reis Martinez, C. B. (2019). An integrated approach in subtropical agro-ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. *Science of the Total Environment*, 666, 508–524. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.209>
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., Primel, E. G., Meletti, P. C., Fillmann, G., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of The Total Environment*, 542, 44–56. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.10.071>
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., & Balasubramanian, M. P. (2007). Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, 69(6), 979–986. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.05.011>
- Wang, D., Saleh, N. B., Byro, A., Zepp, R., Sahle-Demessie, E., Luxton, T. P., Ho, K. T., Burgess, R. M., Flury, M., White, J. C., & Su, C. (2022). Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. *Nature Nanotechnology*, 17(4), 347–360. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01082-8>
- Wang, X., Chang, L., Zhao, T., Liu, L., Zhang, M., Li, C., Xie, F., Jiang, J., & Zhu, W. (2019). Metabolic switch in energy metabolism mediates the sublethal effects induced by glyphosate-based herbicide on tadpoles of a farmland frog *Microhyla fissipes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 186, 109794. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.109794>
- Yang, F. L., Li, X. G., Zhu, F., & Lei, C. L. (2009). Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10156–10162. https://doi.org/10.1021/JF9023118/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2009-023118_0004.JPEG
- Yuan, Z., Li, Y., Hu, Y., You, J., Higashisaka, K., Nagano, K., Tsutsumi, Y., & Gao, J. (2016). Chitosan nanoparticles and their Tween 80 modified counterparts disrupt the developmental profile of zebrafish embryos. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1–2), 644–656. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2016.10.071>
- Zhang, Y., & Goss, G. G. (2022). Nanotechnology in agriculture: Comparison of the toxicity between conventional and nano-based agrochemicals on non-target aquatic species. *Journal of Hazardous Materials*, 439. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129559>
- Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., & Zhao, Y. (2011). Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small*, 7(10), 1322–1337. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201100001>
- Zhelev, Z., & Popgeorgiev, G. (2013). Investigating the Changes in the Morphological Content of the Blood of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a Result of Anthropogenic Pollution and Its Use as an Environmental Bioindicator. *Acta Zoologica Bulgarica*, 65(2), 187–196. <https://www.researchgate.net/publication/271700400>

4 CAPÍTULO IV

**Efeitos do geraniol nanoencapsulado para girinos da rã-touro-americana:
biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade**

Manuscrito a ser submetido à revista Chemosphere

Guia para autores: [Guide for authors - Chemosphere - ISSN 0045-6535 | ScienceDirect.com by Elsevier](#)

Chemosphere

**Efeitos do geraniol nanoencapsulado para girinos da rã-touro-americana:
biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade**

Willian de Paula Santos^a; Letícia Paduan Tavares^a; Raquel Rodrigues Casotti^a; Tiago Tomiama Alvim^a; Jhones Luís de Oliveira^b; Leonardo Fernandes Fraceto^b; Claudia Bueno dos Reis Martinez^{a,*}.

a: Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL);

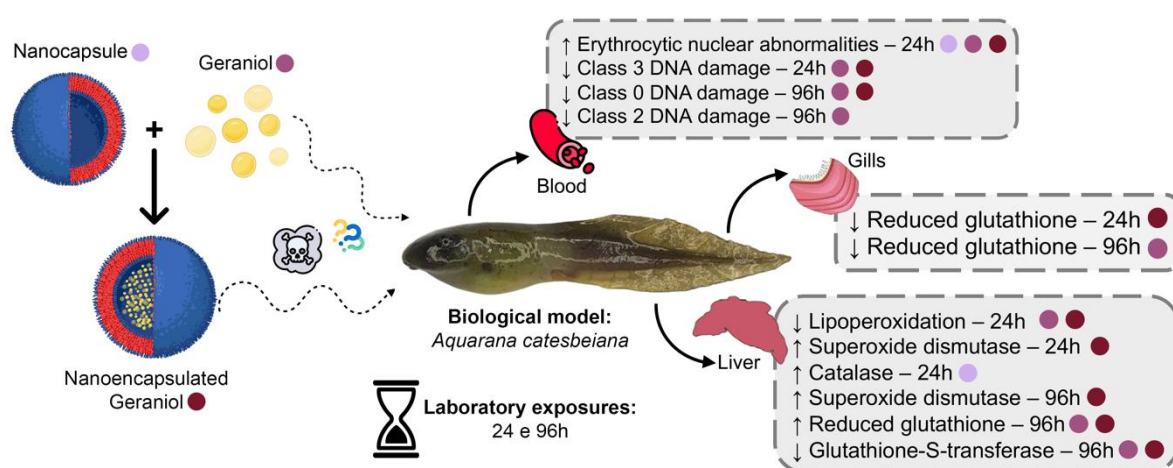
b: Departamento de Engenharia Ambiental, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP);

*: Autor correspondente: Tel.: +55-43-33715146; E-mail: cbueno@uel.br

DESTAQUES

- NANO, GER e nGER causam genotoxicidade no sangue;
- GER e nGER induzem defesas antioxidantes no fígado;
- GER provoca maior número de alterações que nGER e NANO;
- PCA mostra diferença entre os efeitos observados em NANO comparados a GER e nGER.

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

Devido ao consumo exacerbado de agrotóxicos no Brasil e no mundo, existe um incentivo para adoção de práticas agrícolas sustentáveis. O geraniol nanoencapsulado surge como uma opção promissora ao integrar os efeitos pesticidas do geraniol com as características únicas das nanopartículas. A fim de elucidar os efeitos do geraniol nanoencapsulado (nGER), sua forma livre (GER) e das nanocápsulas de zeína (NANO) sobre organismos não-alvo, no presente estudo, girinos de *Aquarana catesbeiana* foram expostos por 24 e 96h aos xenobióticos e avaliou-se os efeitos genotóxicos no sangue e biomarcadores de estresse oxidativo em diferentes tecidos. Os biomarcadores analisados nas brânquias se mostraram pouco sensíveis às exposições aos três xenobióticos. Entretanto, o fígado exibiu indução das defesas antioxidantes e diminuição da atividade da glutathione-S-transferase nos animais GER e nGER. Todos os xenobióticos induziram genotoxicidade em 24h, pelo aumento de alterações nucleares eritrocíticas. O Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores revelou que GER induziu maiores alterações, seguido de nGER e, por fim, NANO. A Análise de Componentes Principais mostrou uma clara separação entre o grupo GER vs CTR e NANO, ao passo que nGER teve efeitos parecidos com o CTR e GER. Desta forma, pode-se perceber que *A. catesbeiana* é suscetível à ação dos xenobióticos avaliados no presente estudo, sendo que o geraniol livre causa mais alterações que sua forma nanoencapsulada. Ainda, as nanocápsulas de zeína parecem ser seguras para estes animais.

Palavras-chave: anuros; biomarcadores; biopesticida; nanotecnologia; monoterpeno.

4.1 INTRODUÇÃO

O impacto crescente dos métodos agrícolas intensivos, da aplicação extensiva de agrotóxicos, do desmatamento e da conversão de ecossistemas naturais em terras agrícolas levou a consequências graves, como a degradação do solo, a contaminação aquática e a perda de biodiversidade. Alcançar um equilíbrio entre o imperativo aumento da produção de alimentos e a adoção de práticas agrícolas sustentáveis é um desafio aos esforços científicos atuais (Tilman & Clark, 2014).

Na busca de alternativas sustentáveis aos agrotóxicos sintéticos, o geraniol (GER) surge como uma opção devido à suas atividades fungicida e inseticida comprovadas em ensaios de laboratório (Germano-Costa et al., 2022; Tang et al., 2018). O GER, um monoterpene derivado de óleos essenciais (OE) de diversas plantas, é facilmente metabolizado e excretado pelo organismo, o que o torna uma opção ecologicamente atraente (Jäger et al., 2020; Pluym et al., 2022). Além disso, em mamíferos, o GER atua como antioxidante, aumentando ainda mais seu apelo para diversas aplicações (Farokhchah et al., 2021; Madji et al., 2019; Venzon et al., 2018).

A integração da nanotecnologia no controle de pragas agrícolas emergiu como uma intervenção fundamental devido às suas características únicas, incluindo o tamanho diminuto das partículas e a maior área de superfície (Zhang & Goss, 2022). As nanocápsulas de zeína (NANO), uma proteína extraída do milho (*Zea sp.*), são utilizadas na fabricação de nanocápsulas contendo IA para diversas aplicações (De Marco, 2022; Hassan et al., 2022; Proença et al., 2024). Nanopesticidas demonstraram uma melhoria substancial de mais de 30% no controle de organismos-alvo em comparação com os agrotóxicos tradicionais, em ensaios laboratoriais. Com ensaios de campo confirmando um aumento de 19% na eficácia dos nanopesticidas em relação aos agrotóxicos tradicionais (Wang et al., 2022).

Com base nesses avanços, o encapsulamento do geraniol (nGER) em nanopartículas de zeína, apresenta-se como uma alternativa sustentável e promissora (Oliveira et al. 2018; 2019). A formulação nanoencapsulada já mostrou eficácia como nanorepelente, abrindo caminhos para estratégias de controle de pragas ecologicamente sustentáveis (Germano-Costa et al., 2022). Entretanto, do mesmo modo que os agrotóxicos convencionais, os nanobiopesticidas podem ganhar os ecossistemas aquáticos (Zhang & Goss, 2022), ficando disponíveis para atuar sobre

organismos não-alvo. Desta forma, faz-se importante conhecer os efeitos do nGER e seus componentes (GER e NANO) sobre tais organismos.

Os anfíbios, sobretudo os da ordem Anura, compõem uma das classes de vertebrados mais seriamente prejudicadas pela agricultura, uma vez que a fragmentação de habitat, causada por essa atividade, é a principal razão do declínio da biodiversidade desses animais (Ferrante et al., 2017) e, associado ao uso intensivo de agrotóxicos, esse declínio pode ser ainda maior (Borges et al., 2019). Esses animais dependem da água para se reproduzir e sua fase larval (girinos) é restrita ao ambiente aquático, o que os coloca em contato íntimo com contaminantes presentes na água.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a toxicidade do GER, nGER e NANO utilizando biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade em girinos de rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*; sin. *Lithobates catesbeianus*; Shaw, 1802), para testar a hipótese de que o nGER e seus componentes (GER e NANO) não serão tóxicos para esta espécie ou de que o nGER seja, pelo menos, menos tóxico que GER. A rã-touro-americana, comumente empregada como modelo biológico em ensaios ecotoxicológicos, foi escolhida pela facilidade de aquisição e manutenção em laboratório. Além disso, *A. catesbeiana*, por ser uma espécie não-nativa do Brasil, oferece uma solução prática ao evitar o uso de espécies nativas potencialmente ameaçadas, considerando o declínio nas populações de anfíbios (Carrasco et al., 2021; de Oliveira et al., 2021).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Síntese e Caracterização das Nanopartículas

A síntese e caracterização das nanopartículas utilizadas no presente estudo estão detalhadas no Capítulo 2 desta dissertação. Brevemente, foram preparadas nanocápsulas de zeína vazias (NANO) e contendo geraniol (nGER) pelo método de Hu & McClements (2014). Além disso, uma emulsão de geraniol (GER) também foi preparada. Todas as emulsões estavam na concentração de 20 mg.mL⁻¹. As nanopartículas foram caracterizadas tanto na solução-estoque após o preparo, quanto na água dos aquários através do tempo (0, 48 e 96h). Resultados

apresentados no Capítulo 2.

4.2.2 Quantificação Química do Geraniol

Um experimento simulando as condições experimentais (descritas à seguir) foi realizado para quantificar a concentração de geraniol nos aquários ao longo de todo período experimental (96 h). As amostras de água dos aquários foram submetidas à Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) para a análise das concentrações de geraniol. Detalhes da metodologia e resultados estão apresentados no Capítulo 2 desta dissertação.

4.2.3 Obtenção e Aclimação dos Animais

Girinos de *Aquarana catesbeiana* com comprimento de $5,9 \pm 0,05$ cm e peso de $1,7 \pm 0,05$ g (média $\pm$ E.P.; $n = 192$), nos estágios 25-31 de desenvolvimento segundo Gosner (1960), foram adquiridos do Ranário Nova Fátima (Nova Fátima, PR) e levados ao Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (LEFA/UEL; Londrina, PR). O transporte foi realizado em sacos plásticos contendo água desclorada e com aeração adequada. No laboratório, os girinos foram aclimatados durante 7 dias em um tanque contendo 100 L de água desclorada e com aeração constante. Nesse período, receberam alimentação duas vezes ao dia com ração comercial para peixes (*Nutrifish*®), e 80% da água era trocada diariamente. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados (Horiba U-52), apresentando temperatura de $21,3 \pm 0,2$ °C, pH de $7,3 \pm 0,04$, oxigênio dissolvido de $7,4 \pm 0,3$ mg L⁻¹, condutividade de 102 ± 1 μ S cm⁻¹ e turbidez de 0 UT (média $\pm$ E.P.). O fotoperíodo foi mantido em 10h de luz e 14h de escuridão.

4.2.4 Delineamento Experimental

Após a aclimação, a alimentação foi suspensa 24h antes de cada experimento e foram realizados dois experimentos independentes, de 24 e 96h. Os animais ($n = 3$ /aquário de 10 L) foram divididos em 4 grupos ($n = 8$ aquários/grupo), um grupo exposto apenas à água desclorada (CTR) e os outros três grupo expostos aos xenobióticos (5 mg L⁻¹): NANO, GER e nGER. Todos os tratamentos, inclusive o

CTR, continham 0,0005% de solvente Pluronic F-68® por conta da natureza hidrofóbica do geraniol. No experimento de 96h, os animais foram alimentados em 48h e em seguida foi feita renovação de 80% do meio de exposição com reestabelecimento das concentrações dos xenobióticos. Durante os experimentos, os parâmetros físicos e químicos foram monitorados e permaneceram constantes temperatura: $21,6 \pm 0,05$ °C; pH: $6,8 \pm 0,03$; oxigênio dissolvido: $5,6 \pm 0,2$ mg L⁻¹; condutividade: $97,5$ µS cm⁻¹; turbidez: $0,4 \pm 0,3$ UT; média $\pm$ E.P.). Além disso, os animais eram monitorados constantemente a fim de verificar mortalidade e/ou efeitos comportamentais. A concentração de 5 mg L⁻¹ dos xenobióticos foi estabelecida com base nos resultados do experimento descrito no Capítulo 1 desta dissertação, sendo uma concentração subletal.

Ao término das exposições os animais foram anestesiados em benzocaína (0,1 g L⁻¹) e o sangue foi coletado por punção cardíaca, com seringas devidamente heparinizadas, para as análises de genotoxicidade. Na sequência, os girinos foram eutanasiados por secção medular para a retirada das brânquias e fígado, para as análises de estresse oxidativo. Uma alíquota do sangue (5 µL) foi utilizada para realização de esfregaços sanguíneos, outra alíquota (10 µL) foi adicionada a um tampão de criopreservação (sacarose 250 mM, citrato de sódio 40 mM, dimetil sulfoxido 5%, pH 7.6), e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. Os demais órgãos foram congelados a -80 °C até o momento das análises. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA/UEL: 009.2023).

4.2.5 Biomarcadores de Genotoxicidade

Alíquotas de 10 µL de sangue (n=8/grupo) foram utilizadas para a realização do ensaio cometa alcalino, de acordo com Singh et al. (1988), com modificações realizadas por Alvim & Martinez (2019). O dano ao DNA foi quantificado visualmente por um pesquisador experiente, às cegas. Para cada amostra (n=1 lâmina/amostra) foram selecionadas 100 células aleatoriamente e não sobrepostas e o dano quantificado pelo comprimento da cauda formada pela migração de fragmentos de DNA e classificado em quatro classes de cometas (de 0 a 3), segundo Collins (2004). O escore de danos ao DNA foi obtido multiplicando o número de células em cada classe pelo valor da classe. Os resultados foram expressos pela pontuação

média dos danos obtidos para cada grupo experimental, em cada tempo de exposição.

A frequência de micronúcleos (MN) e anomalias nucleares eritrocíticas (ENA) foi determinada de acordo com Ueda et al. (1992). Uma pequena gota de sangue (5 μ L) foi espalhada sobre as lâminas de vidro, secas durante a noite, fixadas com metanol e armazenadas refrigerada (4 °C). Para análise, cada lâmina foi corada com laranja de acridina (0,003%) em tampão Sorenson (KH_2PO_4 , NaHPO_4 , pH 6,8) e imediatamente examinada sob fluorescência com ampliação de 1000x. Para cada girino foram analisados 1.000 eritrócitos por lâmina ($n=8$), avaliando a presença de micronúcleos e ENA segundo Canedo et al. (2021). As ENA foram classificadas em cinco categorias: núcleo segmentado (SN), núcleo lobado (LN), núcleo reniforme (RN), núcleo vacuolado (VN), além da presença de células binucleadas (BC). A frequência média de MN, SN, LN, RN, VN e BC e ENA total (SN+LN+RN+VN+BC) para cada grupo, em cada tempo de exposição, foi calculada e expressa por 1000 células (‰).

4.2.6 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

Amostras de brânquia (*pool* = 2 indivíduos; $n = 8/\text{grupo}$) e fígado ($n = 8/\text{grupo}$) foram homogeneizadas (respectivamente 1:5 e 1:10; m/v) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,4) e centrifugadas (20.000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para as análises de estresse oxidativo.

4.2.6.1 Danos oxidativos

A peroxidação lipídica (LPO) foi avaliada pelo ensaio TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), originalmente descrito por Ohkawa et al. (1979), com algumas modificações. O ensaio envolveu a reação do malondialdeído (MDA), um produto final da LPO, com ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram tratadas (1:1:8) com ácido tricloroacético 10% (TCA) e em seguida adicionadas a uma solução contendo TBA, ácido acético glacial 25% e NaOH 0,7 M. A reação de cor resultante ocorreu a 90-100°C durante uma hora. Após centrifugação (5.000 g, 10 min, 4°C), a absorbância do sobrenadante foi medida a 530-540 nm. Os valores de MDA foram então ajustados usando uma curva padrão de MDA e expressos em nmol TBARS.mg ptn⁻¹.

4.2.6.2 Defesas antioxidantes

A quantificação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi realizada de acordo com Beutler et al. (1963), com algumas modificações descritas por Tesser et al. (2020), e expressa em $\mu\text{g.mg ptn}^{-1}$. A atividade da catalase (CAT) foi avaliada através da taxa de decomposição do H_2O_2 pela enzima, determinada pelo monitoramento da diminuição da absorbância em 240 nm (Beutler, 1975). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}.\text{mg ptn}^{-1}$. A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada pela conjugação da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), monitorada pelo aumento da absorbância ao longo do tempo, a 340 nm (Gagné, 2014) e expressa em $\text{nmol CDNB min}^{-1}.\text{mg ptn}^{-1}$. A determinação da atividade da SOD foi realizada através da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$, medida em 550 nm e 25 °C. A atividade foi quantificada como U SOD.mg ptn^{-1} , com U representando a quantidade de SOD necessária para atingir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c (Mccords & Fridovich, 1969).

4.2.6.3 Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais nas amostras foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976), para a normalização dos valores obtidos para cada biomarcador.

4.2.7 Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)

O Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) foi calculado para cada tratamento (NANO, nGER e GER) em relação ao CTR, para os dois tempos experimentais (24 e 96h) de acordo com o método descrito por Sanchez et al. (2013). Brevemente, para cada biomarcador individual, a razão entre o valor médio obtido em cada tratamento (NANO, nGER e GER) e o respectivo valor médio do CTR foi transformada em $\log(Y_i)$. Na etapa seguinte, foi calculada a média geral (μ) e o desvio padrão (s), considerando os valores de Y_i de um determinado biomarcador medido em cada tratamento. Em seguida, os valores de Y_i foram padronizados pela fórmula: $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ e a diferença entre Z_i e Z_0 (CTR) foi utilizada para definir o índice de desvio do biomarcador (A). Para obter uma resposta integrada de múltiplos

biomarcadores, o valor de A de cada biomarcador foi calculado para cada tratamento e o IBRv2 foi calculado para cada tratamento pela soma dos valores absolutos de A.

4.2.8 Análises Estatísticas

Utilizando o software R, os resultados obtidos para cada biomarcador foram comparados entre os diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) por meio de testes paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis), conforme a distribuição dos dados (normalidade e homoscedasticidade). Quando necessário, para identificar as diferenças, foram aplicados testes de comparações múltiplas Student Newman Keuls para dados paramétricos, ou Dunn's para dados não paramétricos. Considerou-se como significativos os valores de $p < 0,05$. Além disso, uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para os biomarcadores que apresentaram diferenças significativas, utilizando o software R para MacOS 14.5.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Biomarcadores de Genotoxicidade

Não foram observadas diferenças quanto a ocorrência de danos ao DNA pelo ensaio alcalino do cometa em nenhum dos tempos experimentais. Entretanto, pode-se notar uma tendência de diminuição de danos nos grupos GER e nGER após 24h ($p = 0,06$) (Fig. 27). Ao analisar as diferentes classes de danos, pode-se perceber um número significativamente menor de nucleoides com danos 3 em GER e nGER comparados ao CTR e NANO ($p = 0,04$) após 24h (Fig. 28A). Já após 96h, havia um número significativamente maior de nucleoides de classe 1 em GER e nGER comparados a NANO ($p = 0,04$) e, ainda, GER também apresentou menos nucleoides de classe 2 comparados a NANO ($p = 0,04$) (Fig. 28B).

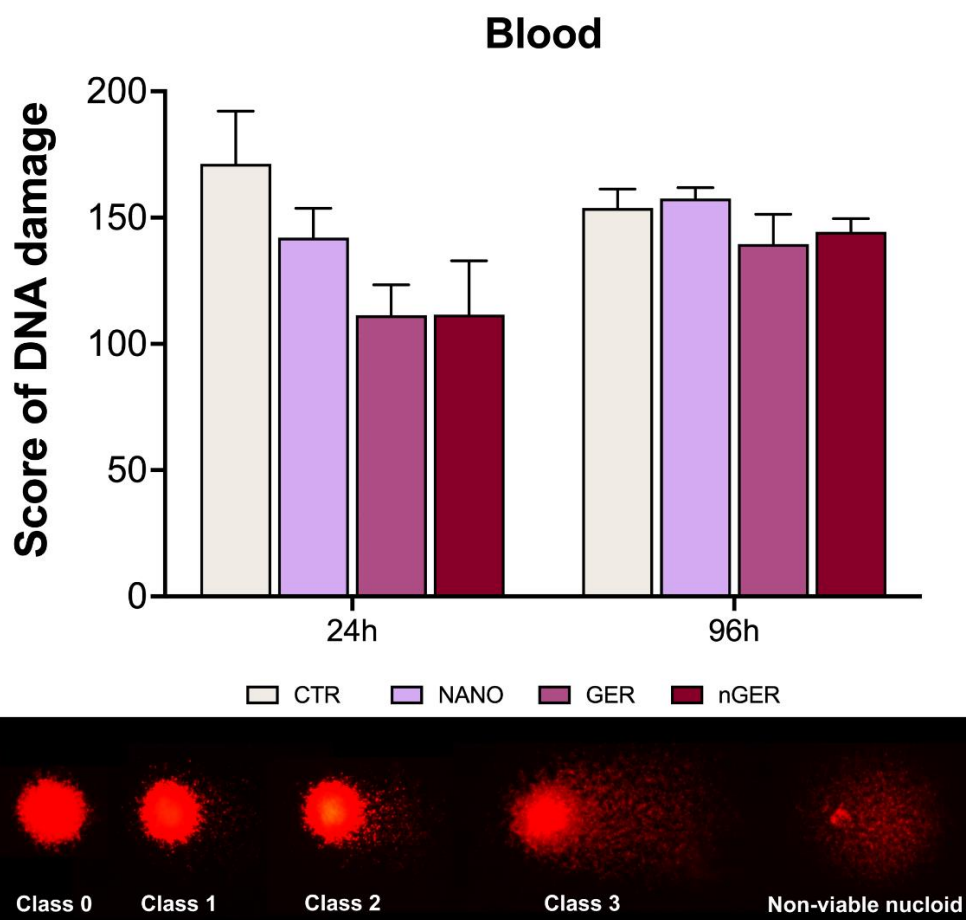


Figura 27. Escore de danos no DNA (Média $\pm$ E.P, n=8) de eritrócitos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER. ($p < 0,05$).

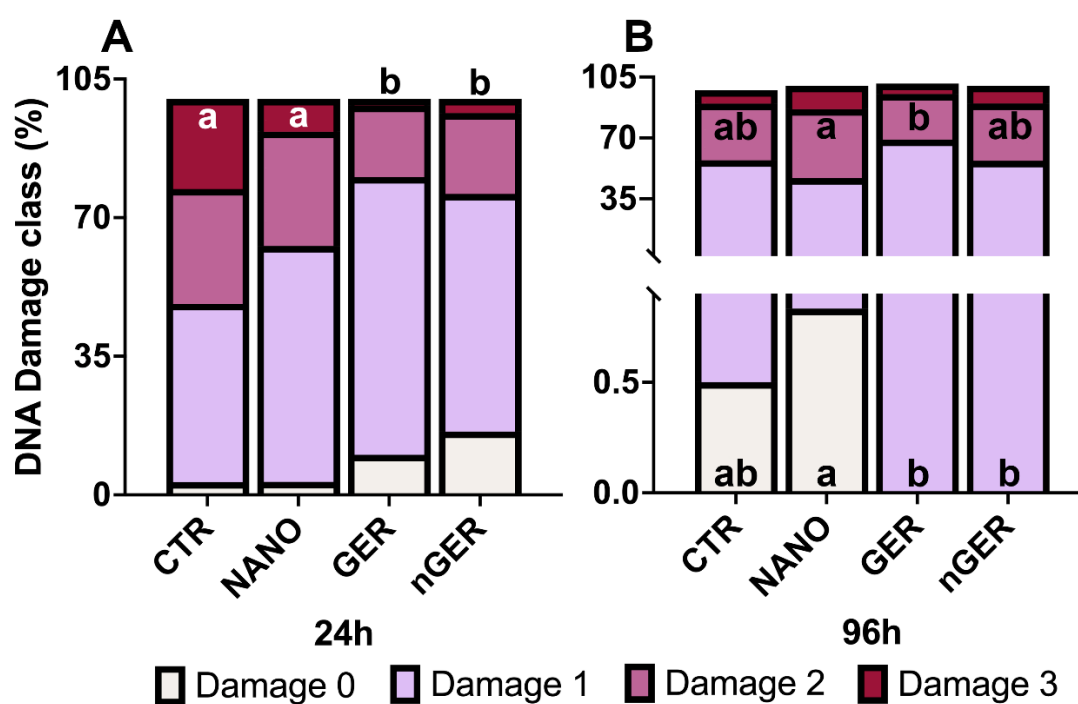


Figura 28. Diferentes classes de dano ao DNA de eritrócitos de *Aquarana catesbeiana* dos grupos CTR, NANO, GER e nGER. Letras diferentes sinalizam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Após 24h, a frequência de MN não foi significativamente alterada entre os grupos (Tabela 6), porém as frequências de ENAs totais, LN e SN (Tabela 6) foram maiores em todos os grupos experimentais comparados ao CTR ($p = 0,01$; $p = 0,008$; $p = 0,01$). As ENAs observadas estão exemplificadas na Fig. 29.

Tabela 6 – Alterações nucleares eritrocíticas em *A. catesbeiana*

Alterações nucleares eritrocíticas (‰)					
		CTR	NANO	GER	nGER
TOTAL	24h	28,6 ± 7,80 ^a	122 ± 13,7 ^b	109 ± 14,5 ^b	174 ± 31,1 ^b
	96h	47,9 ± 10,5	95,3 ± 10,5	90 ± 10,3	88,3 ± 11,5
MN	24h	0,50 ± 0,35	0,12 ± 0,12	0,50 ± 0,27	N.D.
	96h	0,33 ± 0,18	0,66 ± 0,36	0,28 ± 0,17	1,00 ± 0,68
BC	24h	N.D.	1,25 ± 0,45	0,50 ± 0,27	0,29 ± 0,17
	96h	0,17 ± 0,14	0,17 ± 0,14	0,57 ± 0,28	N.D.
LN	24h	21,2 ± 5,19 ^a	71,3 ± 9,81 ^b	69,1 ± 8,92 ^b	119 ± 22,7 ^b
	96h	36,8 ± 6,39	58,8 ± 3,94	52,3 ± 5,71	56,0 ± 6,49
RN	24h	2,50 ± 0,84	1,75 ± 0,75	1,87 ± 0,55	0,86 ± 0,31
	96h	0,33 ± 0,29	0,67 ± 0,29	2,28 ± 1,52	0,14 ± 0,13
SN	24h	10,5 ± 2,89 ^a	45,3 ± 4,96 ^b	36,7 ± 6,74 ^b	53,4 ± 9,82 ^b
	96h	17,3 ± 4,22	34,6 ± 6,53	34,3 ± 4,06	31,8 ± 6,71
VN	24h	0,50 ± 0,20	1,75 ± 0,45	0,50 ± 0,26	0,43 ± 0,28
	96h	1,17 ± 0,57	1,00 ± 0,55	0,57 ± 0,53	0,14 ± 0,13

MN = micronúcleo; BC = célula binucleada; LN = núcleo lobulado; RN = núcleo reniforme; SN = núcleo segmentado; VN = núcleo vacuolado; N. D. = não detectada; Média ± E.P (n=1000 céls./lâmina). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental.

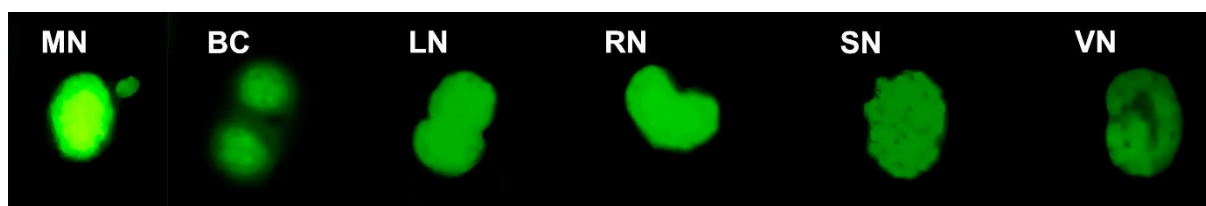


Figura 29. Caracterização dos diferentes tipos de alterações nucleares eritrocíticas (ENA) no sangue de girinos *Aquarana catesbeiana*: micronúcleo (MN); célula binucleada (BC); núcleo lobulado (LN); núcleo reniforme (RN); núcleo segmentado (SN); núcleo vacuolado (VN). Aumento: 1000x. Coloração: Laranja de Acridina.

4.3.2 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

4.3.2.1 Danos oxidativos

Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto a ocorrência de LPO nas brânquias dos animais, em nenhum dos tempos experimentais (Fig. 30A). Já no fígado, após 24h de exposição, notou-se menos LPO nos grupos

GER e nGER comparados a NANO ($p = 0,01$; $0,04$) e, em 96h, não foram mais observadas diferenças significativas neste tecido (Fig. 30B).

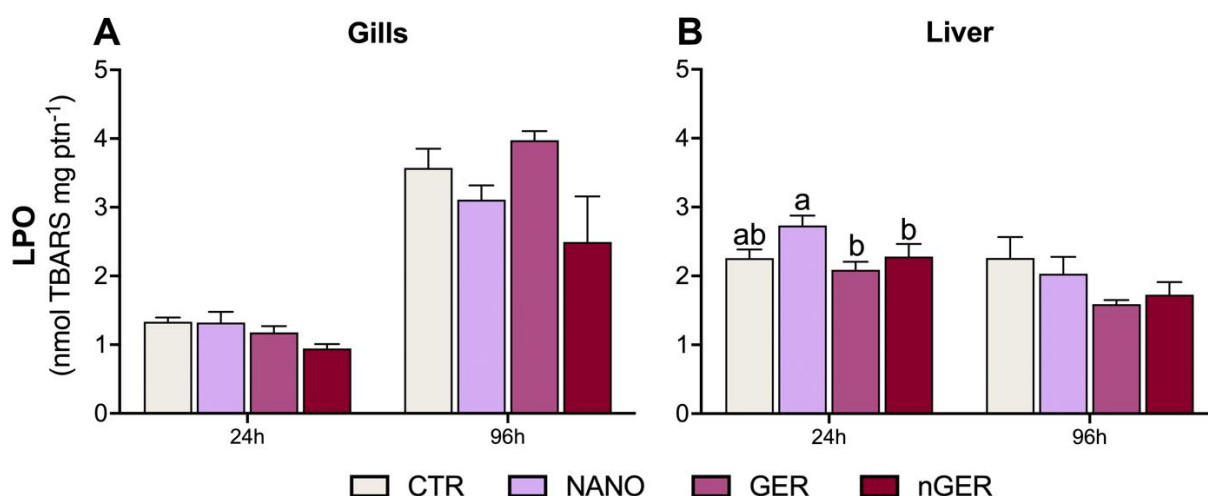


Figura 30. Ocorrência de lipoperoxidação (LPO) nas brânquias (A) e fígado (B) de girinos *Aquarana catesbeiana* dos diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER). Média $\pm$ E.P. ($n=8$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

4.3.2.2 Defesas antioxidantes

Nas brânquias não foram notadas diferenças significativas nas atividades das enzimas SOD, CAT e GST, em nenhum dos tempos experimentais (Fig. 31A, B e C). Entretanto, o conteúdo de GSH diminuiu no grupo nGER em relação aos demais ($p = 0,04$) em 24h e, em 96h, esta diminuição foi notada apenas em GER comparado ao CTR ($p < 0,01$) (Fig. 31D).

No fígado, após 24h a atividade da SOD foi maior em nGER, comparado ao CTR e NANO ($p = 0,04$; $<0,01$), e em GER, comparado a NANO ($p < 0,01$). Em 96h, o aumento na atividade da SOD de nGER em relação à NANO foi mantido ($p < 0,01$) (Fig. 32A). A atividade da CAT, após 24h, aumentou de forma transitória em NANO, comparada ao CTR ($p = 0,01$). Entretanto, após 96h, nenhuma alteração quanto a atividade da CAT foi observada neste tecido (Fig. 32B). A atividade hepática da GST não foi alterada após 24h de exposição, mas em 96h verificou-se uma atividade significativamente menor desta enzima em nGER comparado ao CTR e NANO ($p = 0,04$; $0,03$) e em GER comparado a NANO ($p = 0,03$) (Fig. 32C). A concentração de GSH no fígado em 24h não foi alterada por nenhum tratamento. Entretanto, em 96 h houve aumento de GSH em GER e nGER comparados aos demais grupos ($p < 0,01$) (Fig. 32D).

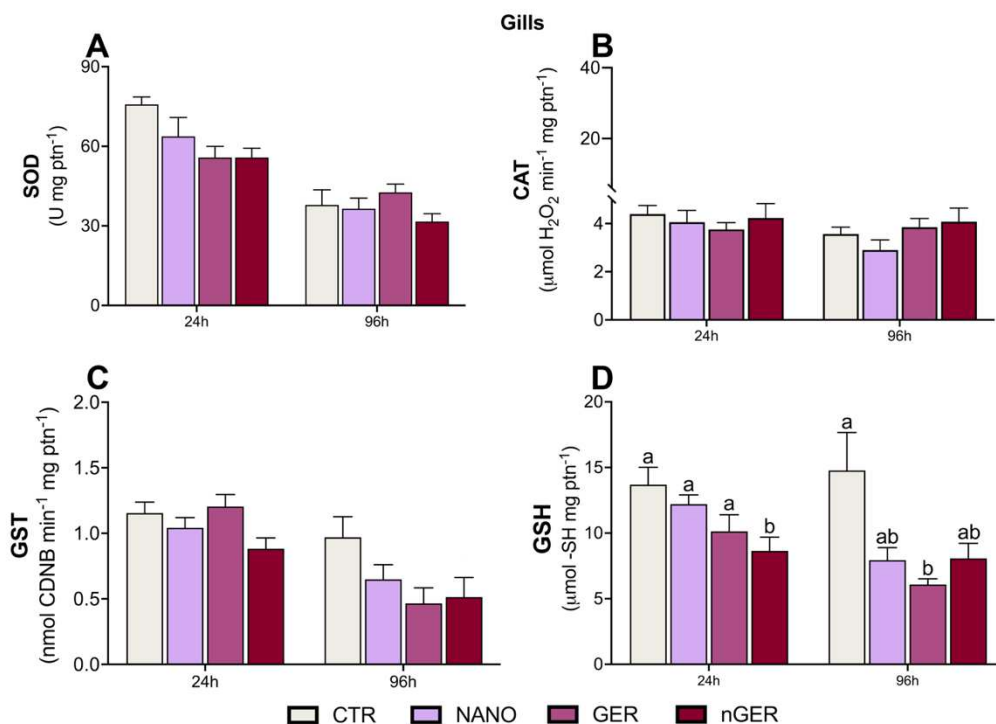


Figura 31. Defesas antioxidantes nas brânquias de girinos *Aquarana catesbeiana* em diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) após exposições agudas (24 e 96h). A: atividade da superóxido dismutase (SOD); B: atividade da catalase (CAT); C: atividade da glutathiona-S-transferase (GST); D: concentração de glutathiona reduzida (GSH). Média ± E.P. (n=8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo tempo experimental.

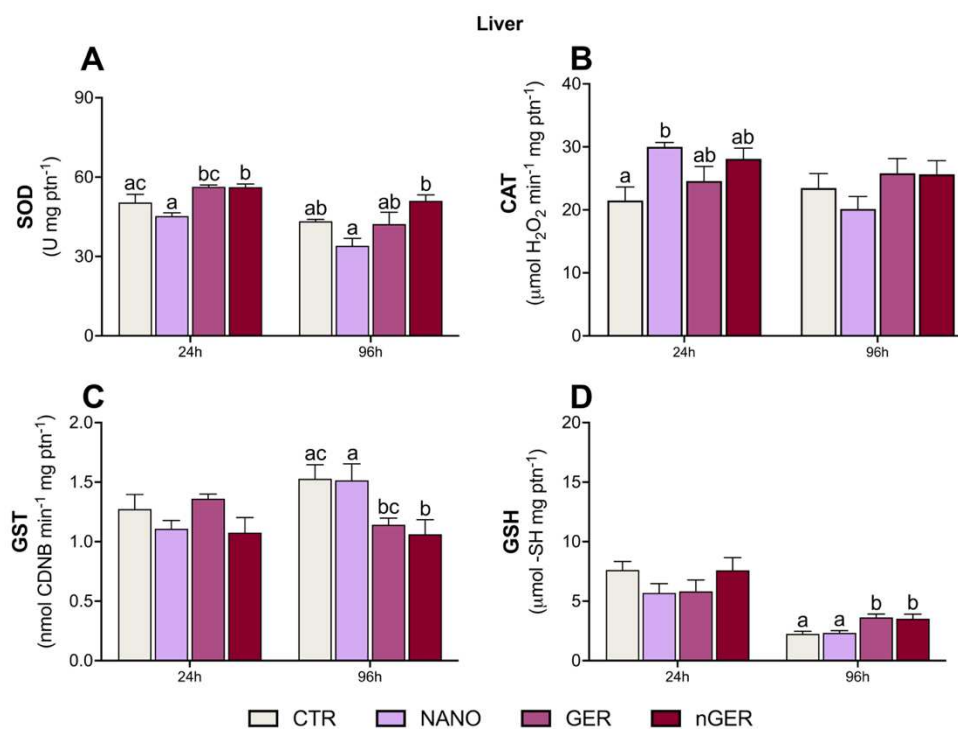


Figura 32. Defesas antioxidantes no fígado de girinos *Aquarana catesbeiana* em diferentes tratamentos (CTR, NANO, GER e nGER) após exposições agudas (24 e 96h). A: atividade da superóxido dismutase (SOD); B: atividade da catalase (CAT); C: atividade da glutathiona-S-transferase (GST); D: concentração de glutathiona reduzida (GSH). Média ± E.P. (n=8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos do mesmo tempo experimental.

4.3.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA mostrou que 58,2% da variabilidade dos dados pode ser explicada pela primeira (PC1 = 31,9%) e segunda (PC2 = 26,3%) componentes, demonstrando uma clara separação dos grupos contendo geraniol (GER e nGER) dos grupos que não tinham (CTR e NANO), correlacionando GER e NANO com a PC2, enquanto nGER e CTR apresentaram biomarcadores influenciados por ambas as componentes (Fig. 33).

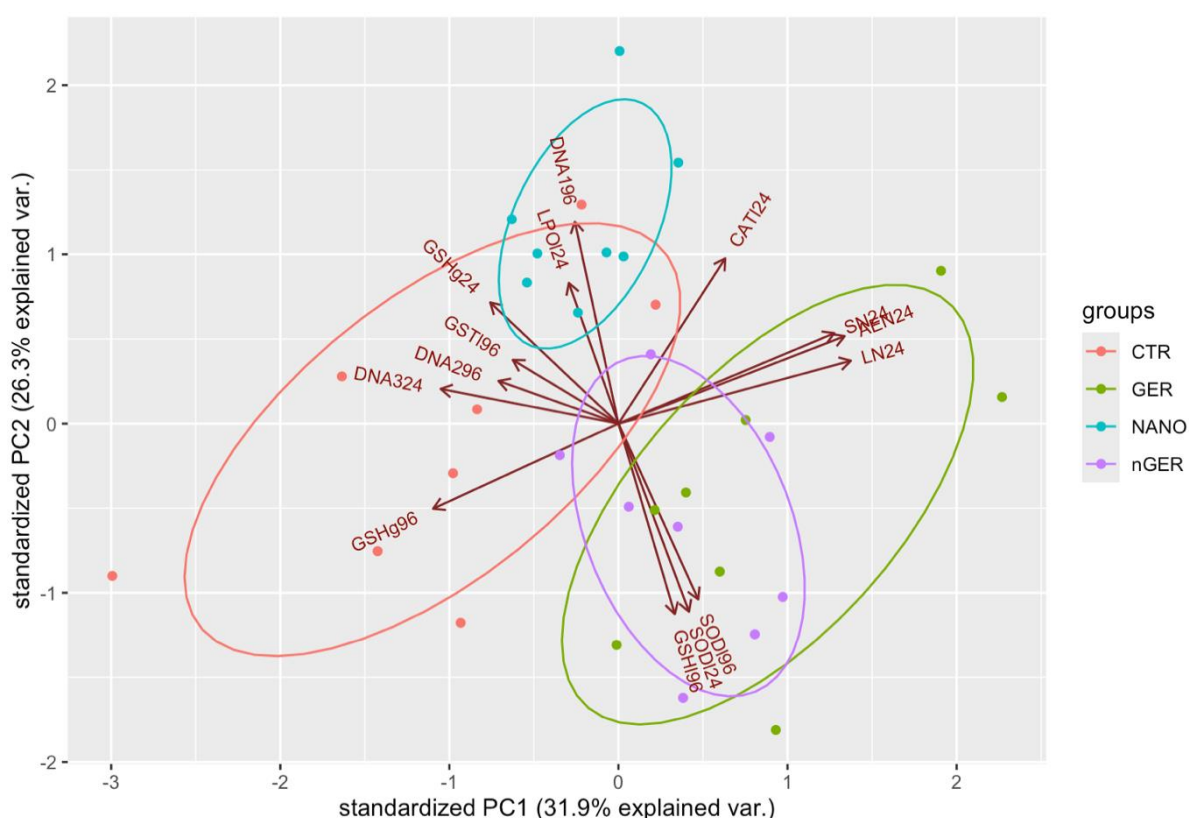


Figura 33. Análise de componentes principais (PCA) dos biomarcadores de *A. catesbeiana* expostos a NANO, GER e nGER durante 24 e 96h. Os vetores representam os biomarcadores analisados que apresentaram diferenças significativas em cada tecido. Eles são apresentados pelas abreviações dos biomarcadores + abreviações dos tecidos + tempo de exposição. Biomarcadores: DNA1 (danos ao DNA de classe 0); DNA2 (danos ao DNA de classe 2); DNA3 (danos ao DNA de classe 3); AEN (alterações nucleares eritrocíticas); LN (núcleo lobulado); SN (núcleo segmentado); SOD (atividade da superóxido dismutase); CAT (atividade da catalase); GST (atividade da glutathione-S-transferase); GSH (concentração de glutathione reduzida); LPO (lipoperoxidação). Tecidos: brânquias (g); fígado (l), sangue (sem código). Tempos experimentais: 24 (24h); 96 (96h). Separação dos grupos por cores: CTR (vermelho); NANO (azul); GER (verde) e nGER (roxo).

4.3.4 Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR)

A frequência das diferentes classes de danos ao DNA e a contagem diferencial de ENAs não foram incluídas para o cálculo do IBRv2 porque em alguns

grupos, os valores eram iguais a zero, impossibilitando a aplicação do cálculo. De maneira geral, menores valores de IBR foram verificados após 24h (NANO: 23,22; nGER: 26,26; GER: 28,4) de exposição aos xenobióticos que em 96h (NANO: 29,2; nGER: 33,64; GER: 37,13) (Fig. 20). Entretanto, a mesma tendência entre os diferentes grupos foi observada nos dois tempos experimentais: GER > nGER > NANO. Todos os tratamentos, em ambos os grupos experimentais, induziram alterações nucleares eritrocíticas (ENA).

Em 24h, NANO induziu CAT e LPO no fígado, enquanto inibiu as demais defesas antioxidantes tanto nas brânquias quanto no fígado. Os grupos GER e nGER apresentaram uma mistura de inibições e induções das defesas antioxidantes, mesmo assim não apresentaram indução de LPO. Em 96h, foi notada uma leve indução das enzimas antioxidantes no fígado dos animais GER e nGER, com redução de LPO.

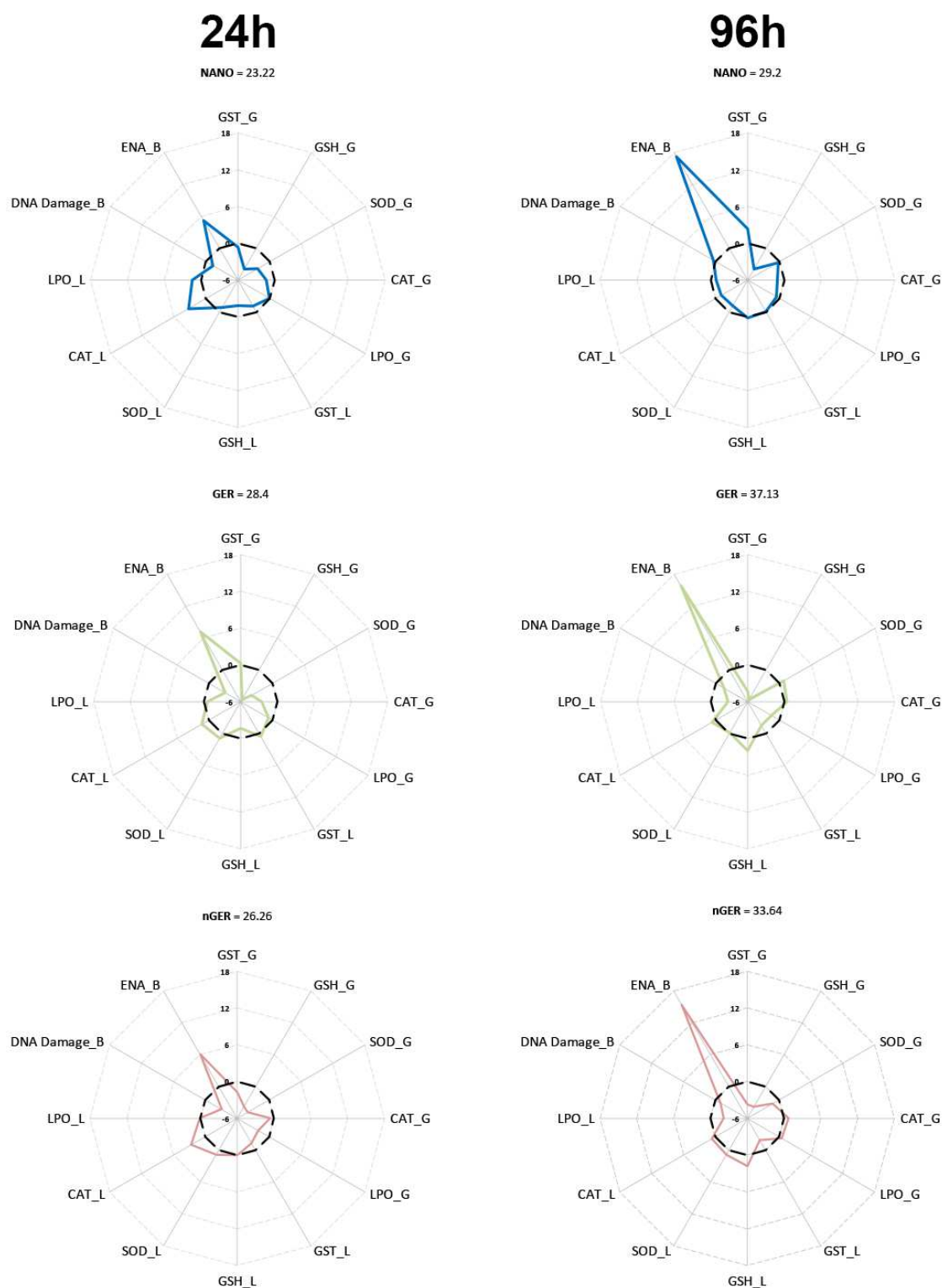


Figura 34. Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos seguintes biomarcadores: glutiona-S-transferase (GST), glutiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA (DNA_Damage), alterações nucleares eritrocíticas (ENA) em diferentes tecidos (G = brânquia, L = fígado e B = sangue) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), GER (radar verde) e nGER (radar vermelho) por 24h (esquerda) e 96h (direita). Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador.

4.4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos das exposições agudas (24 e 96h) ao geraniol nanoencapsulado e seus componentes (ingrediente ativo livre e nanocápsulas de zeína) sobre a genotoxicidade e estresse oxidativo de girinos *A. catesbeiana*. Os resultados mostram que a maioria dos efeitos observados em GER também foram observados em nGER. Os efeitos de NANO parecem estar mais parecidos aos do CTR. O Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) revela que, embora não tenham sido notados danos ao DNA através do ensaio do cometa, os xenobióticos se mostraram genotóxicos ao induzirem ENAs em ambos os tempos experimentais. Além disso, os efeitos causados em nGER parecem estar mais atrelados às propriedades do geraniol, visto que o IBR de GER foi maior que de NANO e, nGER, mostrou um valor intermediário entre os grupos.

Pelo ensaio do cometa não foram observadas diferenças significativas quanto a ocorrência de danos ao DNA dos eritrócitos de *A. catesbeiana* causados pela exposição a nenhum dos três xenobióticos avaliados. A tendência de diminuição em 24h nos grupos GER e nGER pode estar atrelada a menor ocorrência de danos de classe 3 encontrada nesses animais. Após 96h, a menor ocorrência de danos de classe 0 em GER e nGER e de classe 2 em GER, pode ter contribuído para a não observação de diferenças no score de danos ao DNA desses animais.

Em contraste, após 24h, todos os xenobióticos induziram aumento de ENAs totais comparados ao CTR, sendo que este aumento está associado com uma maior ocorrência de LN e SN. Embora não foram detectadas diferenças significativas em 96h, pode-se perceber a indução das ENAs também em 96h, que pode estar envolvido com a menor observação de nucleoides sem danos neste mesmo tempo experimental. O IBR reforça estes achados. O mecanismo de formação de ENAs ainda não é bem compreendido. Entretanto elas podem ter origem pela indução de ERO ou através de alterações no maquinário de síntese e multiplicação do DNA (Canedo et al. 2022).

A genotoxicidade de NPs depende de suas propriedades físicas, químicas, biológicas, mecânicas e elétricas (Canedo et al. 2022). Por exemplo, adultos do peixe *Danio rerio* expostos à NPs de prata durante 96h, acumularam essas partículas entre o núcleo e a membrana plasmática, o que induziu a produção de ERO e alterou a expressão de enzimas antioxidantes. Os autores observaram a formação

de SN e LN (Krishnaraj et al., 2016), as mesmas alterações induzidas no presente estudo. Além disso, NPs de óxido de zinco induziram a formação de MN e células anucleadas em girinos *A. catesbeiana* expostos por 7 dias. Os autores relacionaram com efeitos físicos da NPs ou pela instauração de estresse oxidativo (Motta et al., 2020). Como as NANO do presente estudo não tiveram efeitos evidentes sobre o estresse oxidativo nos tecidos analisados, é provável que sua mutagenicidade esteja relacionada com ações físicas. A genotoxicidade de nGER também pode estar relacionada com as características físicas da NP, visto que foi notada diminuição de LPO e indução de defesas antioxidantes no fígado dos animais deste grupo, o que exclui a possibilidade de genotoxicidade por danos oxidativos.

A literatura acerca da genotoxicidade causada pelo geraniol é variável. Alguns estudos apontam o potencial genotóxico do geraniol (Gateva et al., 2019; Mamur, 2022; Singulani et al., 2018), enquanto outros o tomam como seguro em termos de genotoxicidade (Crespo et al., 2020; Doppalapudi et al., 2007; Sinha et al., 2014). O mecanismo de ação do geraniol que causa genotoxicidade ainda não é conhecido. Porém, os efeitos de atenuação da genotoxicidade podem ser atribuídos à indução de defesas antioxidantes (Gateva et al. 2019).

O tecido branquial, em animais aquáticos, é responsável pela respiração e osmorregulação. Uma fina camada de epitélio separa o meio interno do meio externo, permitindo as trocas gasosas e iônicas nestes organismos. Nos girinos de *A. catesbeiana*, essas estruturas sofrem grandes mudanças morfológicas no decorrer dos estágios de desenvolvimento, enquanto a respiração pulmonar e a osmorregulação cutânea e renal vão se desenvolvendo (Gosner, 1960). Tecidos que passam por alterações morfológicas severas nos girinos apresentam células em constantes processos de proliferação e apoptose (Freitas, 2024). Esses processos podem ser mediados, durante a metamorfose, por instauração de estresse oxidativo através da diminuição da atividade da CAT e concentração de GSH, como observado por Menon & Rozman (2007) em girinos de diferentes estágios de desenvolvimento.

No presente estudo, a diminuição na concentração de GSH das brânquias de animais expostos ao GER e nGER pode ser devido ao fato de que as células deste tecido estão em constante mudanças programadas. De fato, exposições de células HepG2 e A549 confirmam a diminuição de GSH provocada pela exposição a diferentes concentrações do geraniol (Crespo et al. 2020). Isto sugere que esta molécula é capaz de induzir estresse oxidativo em tecidos com alta atividade celular.

O tecido hepático é responsável por metabolizar xenobióticos nos organismos, apresentando enzimas que promovem mudanças estruturais em moléculas exógenas a fim de facilitar sua excreção. Por conta disto, o fígado apresenta alta sensibilidade a ação de xenobióticos e, também, dos seus metabólitos. Visto que alguns metabólitos podem ser mais tóxicos que as moléculas das quais foram derivados (Pavan et al., 2018). Neste estudo, a indução das defesas antioxidantes com concomitante redução da LPO no fígado dos animais expostos aos grupos com geraniol (GER e nGER) é uma resposta frequentemente reportada em estudos *in vitro* e *in vivo* com mamíferos e peixes (Farokhcheh et al., 2021; Madji et al., 2019; Pavan et al., 2018; Younis et al., 2021). Desta maneira, os autores atribuem um efeito antioxidante à molécula de geraniol.

A menor ocorrência de LPO nos grupos GER e nGER também pode explicar a menor atividade da GST nestes grupos, visto que esta enzima está envolvida com a metabolização dos produtos da LPO (Carriquiriborde, 2021). Ainda, a indução da atividade da CAT no fígado dos animais NANO 24h pode ter impedido a observação de LPO. Diferentes tipos de NPs são capazes de induzir estresse oxidativo em animais aquáticos, notoriamente em peixes (Andrade et al., 2019; Ferroni et al., 2022; Tesser et al., 2020), mas também em girinos (Lajmanovich et al., 2018; Svartz et al., 2020). A toxicidade das NPs está relacionada com efeitos físicos, por conta do tamanho diminuto da partícula e alta área de superfície, o que aumenta sua adsorção e absorção nos organismos (Freitas, 2024). Entretanto, as NPs de zeína parecem não induzir estresse oxidativo em *A. catesbeiana*.

Por fim, a Análise de Componentes Principais (PCA) revela que os efeitos observados em NANO e alguns dos efeitos de nGER têm mais relação com o CTR, separando os efeitos observados em GER do CTR e NANO. Isso vai de encontro com o observado no IBR, visto que GER pareceu induzir mais alterações que nGER e NANO. A PCA ainda mostrou que a exposição ao GER está mais relacionada com indução de defesas antioxidantes no fígado em ambos os tempos experimentais. A indução de defesas antioxidantes pode estar relacionada com um aumento de ERO no organismo, a fim de neutralizá-las. Entretanto, essa indução pode não ter sido suficiente no sangue, visto que foi observado aumento de ENAs neste grupo, ao passo que essas alterações também podem ser formadas por danos oxidativos (Seriani et al., 2011). Finalmente, a PCA indicou que as nanocápsulas de zeína parecem ser seguras para *A. catesbeiana*, pois esse grupo estava mais próximo ao CTR.

4.5 CONCLUSÃO

O presente estudo comparou os efeitos do geraniol livre, nanoencapsulado e das nanocápsulas de zeína para girinos de *Aquarana catesbeiana* através de biomarcadores de genotoxicidade e estresse oxidativo. Através do Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) e da Análise de Componentes Principais (PCA), pode-se observar que o geraniol livre causou maiores alterações nos biomarcadores e está relacionado com indução de defesas antioxidantes no fígado e alterações nucleares eritrocíticas no sangue. Ainda, o geraniol nanoencapsulado exibiu efeitos intermediários entre sua forma livre e as nanocápsulas de zeína, que parecem ser seguras para esta espécie.

4.6 AGRADECIMENTO

Este trabalho faz parte da dissertação de Mestrado de W. P. Santos, que foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). O trabalho faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanotecnologia para Agricultura Sustentável (INCT-NanoAgro) e foi parcialmente financiado pela Fundação de Apoio ao Pesquisador do Estado de São Paulo (FAPESP Processo: 2017/21004-5) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). C. B. R. Martinez é uma pesquisadora associada ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alvim, T. T., & Martinez, C. B. dos R. (2019). Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2018.11.011>
- Andrade, L. L. de, do Espírito Santo Pereira, A., Fernandes Fraceto, L., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2019). Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. *Science of the Total Environment*, 663, 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.380>
- Beutler, E. (1975). A manual of biochemical methods. In *Red Cell Metabolism* (3rd ed., pp. 11–12). Grune and Stratton.
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882–888.
- Borges, R. E., de Souza Santos, L. R., Assis, R. A., Benvindo-Souza, M., Franco-Belussi, L., & de Oliveira, C. (2019). Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2623–2634. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3779-z>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Canedo, A., de Jesus, L. W. O., Bailão, E. F. L. C., & Rocha, T. L. (2021). Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution*, 290, 118019. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118019>
- Carrasco, G. H., de Souza, M. B., & Santos, L. R. S. (2021). Effect of multiple stressors and population decline of frogs. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(42), 59519–59527. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-16247-6/FIGURES/5>
- Carriquiriborde, P. (2021). Biodisponibilidad, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes. In P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (1st ed., Vol. 1, pp. 62–92). Editorial de La UNLP.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249/METRICS>
- Crespo, R., Rodenak-Kladniew, B. E., Castro, M. A., Soberón, M. V., & Lavarías, S. M. L. (2020). Induction of oxidative stress as a possible mechanism by which geraniol affects the proliferation of human A549 and HepG2 tumor cells. *Chemico-Biological Interactions*, 320, 109029. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2020.109029>
- De Marco, I. (2022). Zein Microparticles and Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Polymers*, 14(11), 2172. <https://doi.org/10.3390/POLYM14112172>
- de Oliveira, M. M., Morato, R. G., Jorge, R. S. P., & de Paula, R. C. (2021). Agricultural activities and threat to fauna in Brazil: an analysis of the Red Book of Endangered Brazilian Fauna. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 61, e20216193.

- <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2021.61.93>
- Doppalapudi, R. S., Riccio, E. S., Rausch, L. L., Shimon, J. A., Lee, P. S., Mortelmans, K. E., Kapetanovic, I. M., Crowell, J. A., & Mirsalis, J. C. (2007). Evaluation of chemopreventive agents for genotoxic activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629(2), 148–160. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2007.02.004>
- Farokhchah, M., Hejazian, L., Akbarnejad, Z., Pourabdohossein, F., Hosseini, S. M., Mehraei, T. M., & Soltanpour, N. (2021). Geraniol improved memory impairment and neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles in male wistar rats through its antioxidant effect. *Life Sciences*, 282, 119823. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119823>
- Ferrante, L., Baccaro, F. B., Ferreira, E. B., Sampaio, M. F. de O., Santos, T., Justino, R. C., & Angulo, A. (2017). The matrix effect: how agricultural matrices shape forest fragment structure and amphibian composition. *Journal of Biogeography*, 44(8), 1911–1922. <https://doi.org/10.1111/jbi.12951>
- Ferroni, H. I., Bezerra, V., Risso, W. E., Martinez, C. B. dos R., & Simonato, J. D. (2022). Sublethal Effects of Biogenic Silver Nanoparticles and Silver Nitrate in the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*: Is the Nanoform Really Less Toxic? *Water, Air, and Soil Pollution*, 233(3), 1–21. <https://doi.org/10.1007/S11270-022-05547-3/FIGURES/8>
- Freitas, J. S. (2024). Pollutants and Oxidative Stress in Tadpoles. In E. A. de Almeida & J. S. Freitas (Eds.), *Toxicology of Amphibian Tadpoles* (1st ed., Vol. 1, pp. 111–132). CRC Press.
- Gagné, F. (2014). Xenobiotic Biotransformation. In F. Gagné (Ed.), *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods* (pp. 117–129). Academic Press.
- Gateva, S., Jovtchev, G., Stankov, A., Georgieva, A., Dobрева, A., & Mileva, M. (2019). The potential of geraniol to reduce cytotoxic and genotoxic effects of MNNG in plant and human lymphocyte test-systems. *South African Journal of Botany*, 123, 170–179. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.03.005>
- Germano-Costa, T., Bilesky-José, N., Guilger-Casagrande, M., Pasquoto-Stigliani, T., Rogério, C. B., Abrantes, D. C., Maruyama, C. R., Oliveira, J. L., Fraceto, L. F., & Lima, R. (2022). Use of 2D and co-culture cell models to assess the toxicity of zein nanoparticles loading insect repellents icaridin and geraniol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112564>
- Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190. <https://www.jstor.org/stable/3890061>
- Hassan, E. A., Hathout, R. M., Gad, H. A., & Sammour, O. A. (2022). A holistic review on zein nanoparticles and their use in phytochemicals delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 73, 103460. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103460>
- Hu, K., & McClements, D. J. (2014). Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. *Food Research International*, 64, 329–335. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.07.004>
- Jäger, T., Bäcker, S., Brodbeck, T., Leibold, E., & Bader, M. (2020). Quantitative determination of urinary metabolites of geraniol by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Analytical Methods*, 12, 5718. <https://doi.org/10.1039/d0ay01582b>
- Krishnaraj, C., Harper, S. L., & Yun, S. Il. (2016). In Vivo toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*).

- Journal of Hazardous Materials*, 301, 480–491.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.09.022>
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., Colussi, C. L., & Bassó, A. (2018). Acute Toxicity of Colloidal Silicon Dioxide Nanoparticles on Amphibian Larvae: Emerging Environmental Concern. *International Journal of Environmental Research*, 12(3), 269–278. <https://doi.org/10.1007/S41742-018-0089-8/METRICS>
- Madji, A., Hosseini, S. H., Roozbeh, M., & Mohammadi, A. (2019). Antidepressant and Anxiolytic Effects of Geraniol in Mice: The Possible Role of Oxidative Stress and Apoptosis. *Iran Red Crescent Med J*, 21(6), 91593. <https://doi.org/10.5812/ircmj.91593>
- Mamur, S. (2022). Geraniol, a natural monoterpene, identifications of cytotoxic and genotoxic effects in vitro. *Journal of Essential Oil Research*, 34(1), 54–64. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1974581>
- Mccords, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6065.
- Menon, J., & Rozman, R. (2007). Oxidative stress, tissue remodeling and regression during amphibian metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(4), 625–631. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2007.02.011>
- Motta, A. G. C., do Amaral, D. F., Benvindo-Souza, M., Rocha, T. L., & de Melo e Silva, D. (2020). Genotoxic and mutagenic effects of zinc oxide nanoparticles and zinc chloride on tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae). *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 14, 100356. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2020.100356>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Pavan, B., Dalpiaz, A., Marani, L., Beggiato, S., Ferraro, L., Canistro, D., Paolini, M., Vivarelli, F., Valerii, M. C., Comparone, A., & De Fazio, L. (2018). Geraniol Pharmacokinetics, Bioavailability and Its Multiple Effects on the Liver Antioxidant and Xenobiotic-Metabolizing Enzymes. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00018>
- Pluym, N., Stöckelhuber, M., Scherer, G., Scherer, M., & Kolossa-Gehring, M. (2022). Time trend of the exposure to geraniol in 24-h urine samples derived from the German Environmental Specimen Bank from 2004 to 2018. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 239, 113880. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113880>
- Proença, P. L. de F., Campos, E. V. R., Costa, T. G., de Lima, R., Preisler, A. C., de Oliveira, H. C., da Rocha, C. M., de Andrade, D. J., Goncalves, K. C., Polanczyk, R. A., & Fraceto, L. F. (2024). Curcumin and carvacrol co-loaded zein nanoparticles: Comprehensive preparation and assessment of biological activities in pest control. *Plant Nano Biology*, 8, 100067. <https://doi.org/10.1016/J.PLANA.2024.100067>
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J. M. (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/S11356-012-1359-1/TABLES/2>
- Seriani, R., Ranzani-Paiva, M. J. T., Silva-Souza, Â. T., & Napoleão, S. R. (2011).

- Hematological characteristics, frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in peripheral of fish from São Francisco river Basin, Minas Gerais State, Brazil. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 33(1), 107–112. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v33i1.7117>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Singulani, J. L., Pedroso, R. S., Ribeiro, A. B., Nicolella, H. D., Freitas, K. S., Damasceno, J. L., Vieira, T. M., Crotti, A. E. M., Tavares, D. C., Martins, C. H. G., Mendes-Giannini, M. J. S., & Pires, R. H. (2018). Geraniol and Linalool Anticandidal Activity, Genotoxic Potential and Embryotoxic Effect on Zebrafish. *Future Microbiology*, 13(15), 1637–1646. <https://doi.org/10.2217/FMB-2018-0200>
- Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., & Mukherjee, A. (2014). Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 71–77. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2014.02.036>
- Svartz, G., Aronzon, C., Pérez Catán, S., Soloneski, S., & Pérez Coll, C. (2020). Oxidative stress and genotoxicity in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles after acute exposure to Ni-Al nanoceramics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103508. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2020.103508>
- Tang, X., Shao, Y. L., Tang, Y. J., & Zhou, W. W. (2018). Antifungal Activity of Essential Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules*, 23(9), 2108. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092108>
- Tesser, M. E., Alves De Paula, A., Risso, E., Monteiro, R. A., Do Espirito, A., Pereira, S., Fernandes Fraceto, L., Bueno, C., Martinez, R., & Bueno, C. (2020). Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. *Science of the Total Environment*, 704, 135332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135332>
- Tilman, D., & Clark, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, 515(7528), 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature13959>
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., & Sofuni, T. (1992). A Preliminary Study of the Micronucleus Test by Acridine Orange Fluorescent Staining Compared with Chromosomal Aberration Test Using Fish Erythropoietic and Embryonic Cells. *Water Science and Technology*, 25(11), 235–240. <https://doi.org/10.2166/WST.1992.0297>
- Venzon, L., Mariano, L. N. B., Somensi, L. B., Boeing, T., de Souza, P., Wagner, T. M., Andrade, S. F. de, Nesello, L. A. N., & da Silva, L. M. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.12.020>
- Wang, D., Saleh, N. B., Byro, A., Zepp, R., Sahle-Demessie, E., Luxton, T. P., Ho, K. T., Burgess, R. M., Flury, M., White, J. C., & Su, C. (2022). Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. *Nature Nanotechnology*, 17(4), 347–360. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01082-8>
- Younis, N. S., Elsewedy, H. S., Soliman, W. E., Shehata, T. M., & Mohamed, M. E. (2021). Geraniol isolated from lemon grass to mitigate doxorubicin-induced cardiotoxicity through Nrf2 and NF-κB signaling. *Chemico-Biological Interactions*, 347, 109599. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2021.109599>

Zhang, Y., & Goss, G. G. (2022). Nanotechnology in agriculture: Comparison of the toxicity between conventional and nano-based agrochemicals on non-target aquatic species. *Journal of Hazardous Materials*, 439. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129559>

5 CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho fornece informações relevantes sobre os efeitos causados pelas exposições agudas (24 e 96h) ao nanobiopesticida geraniol (nGER) e seus constituintes, nanocápsulas de zeína (NANO) e geraniol (GER) sobre diferentes biomarcadores de girinos de *Aquarana catesbeiana*. Em cada manuscrito, os resultados foram discutidos de forma individual para cada classe de biomarcadores e a integração destes resultados em um Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR), para cada xenobiótico e tempo experimental (Fig. 35 e 36), permite as seguintes conclusões:

- 1) A hipótese deste trabalho, de que nGER induziria menos alterações que sua formulação livre (GER) foi atendida.
- 2) GER provocou o maior número de alterações nos biomarcadores, seguido de nGER que, por sua vez, gerou maiores alterações que NANO. Segundo o IBR de ambos os tempos experimentais: GER > nGER > NANO.
- 3) Embora as nanocápsulas de zeína tenham sido eficazes em diminuir os efeitos do geraniol em *A. catesbeiana* (conforme indicado pelos valores do IBR), nGER ainda apresentou efeitos sobre os diferentes biomarcadores analisados, em ambos os tempos experimentais.
- 4) Os três tratamentos (NANO, GER e nGER) mostraram potencial genotóxico, ao induzirem alterações nucleares eritrocíticas, em ambos os tempos experimentais.
- 5) NANO teve mais influência sobre a homeostase iônica dos girinos de *A. catesbeiana* em 24h. Porém, em 96h essa influência desaparece, demonstrando um efeito pontual e transitório.
- 6) GER e nGER interferiram com o metabolismo energético de *A. catesbeiana* em 24h. Porém, o metabolismo energético dos animais expostos ao GER continuou desbalanceado em 96h, mostrando um efeito mais prolongado.
- 7) GER e nGER provocaram maiores efeitos sobre o estresse oxidativo no fígado dos animais, em ambos os tempos experimentais. Esses efeitos estão atrelados ao aumento de defesas antioxidantes.

- 8) GER diminuiu a atividade da enzima de biotransformação glutationa-S-transferase no fígado de *A. catesbeiana* em 96h.
- 9) As brânquias dos girinos *A. catesbeiana* foram o tecido menos sensível aos tratamentos, em ambos os tempos experimentais.

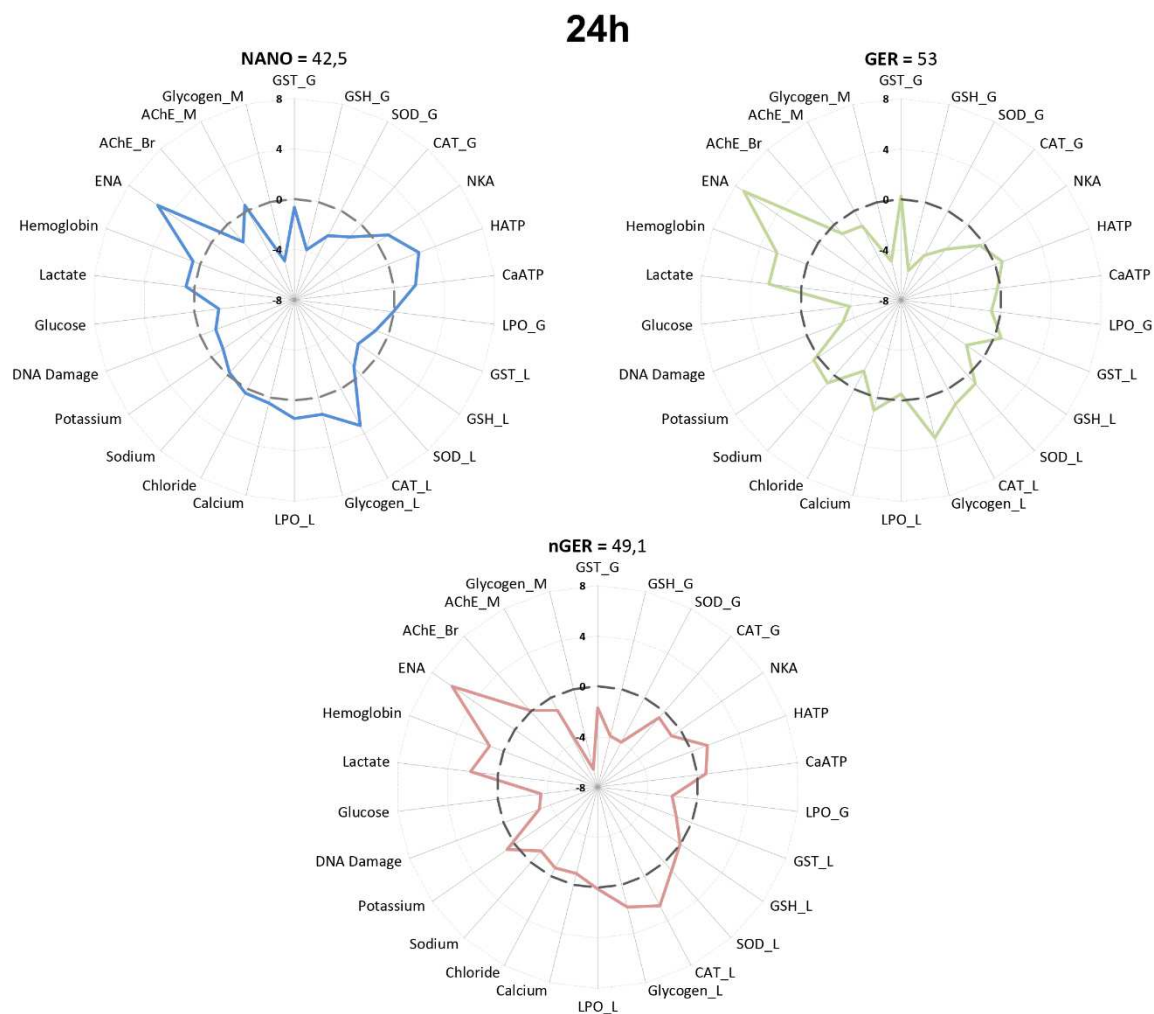


Figura 35. Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos seguintes biomarcadores: Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HATP), Ca^{2+} -ATPase (CaATP), Glicogênio (Glycogen), Ca^{2+} (Calcium), Cl^- (Chloride), Na^+ (Sodium), K^+ (Potassium), Glucose (Glucose), Lactato (Lactate), Hemoglobina (Hemoglobin), glutationa-S-transferase (GST), glutationa reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA (DNA_Damage), alterações nucleares eritrocíticas (ENA) e acetilcolinesterase (AChE) em diferentes tecidos (G = brânquias; L = fígado; Br = cérebro e M = músculo) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), GER (radar verde) e nGER (radar vermelho) por 24h. Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador.

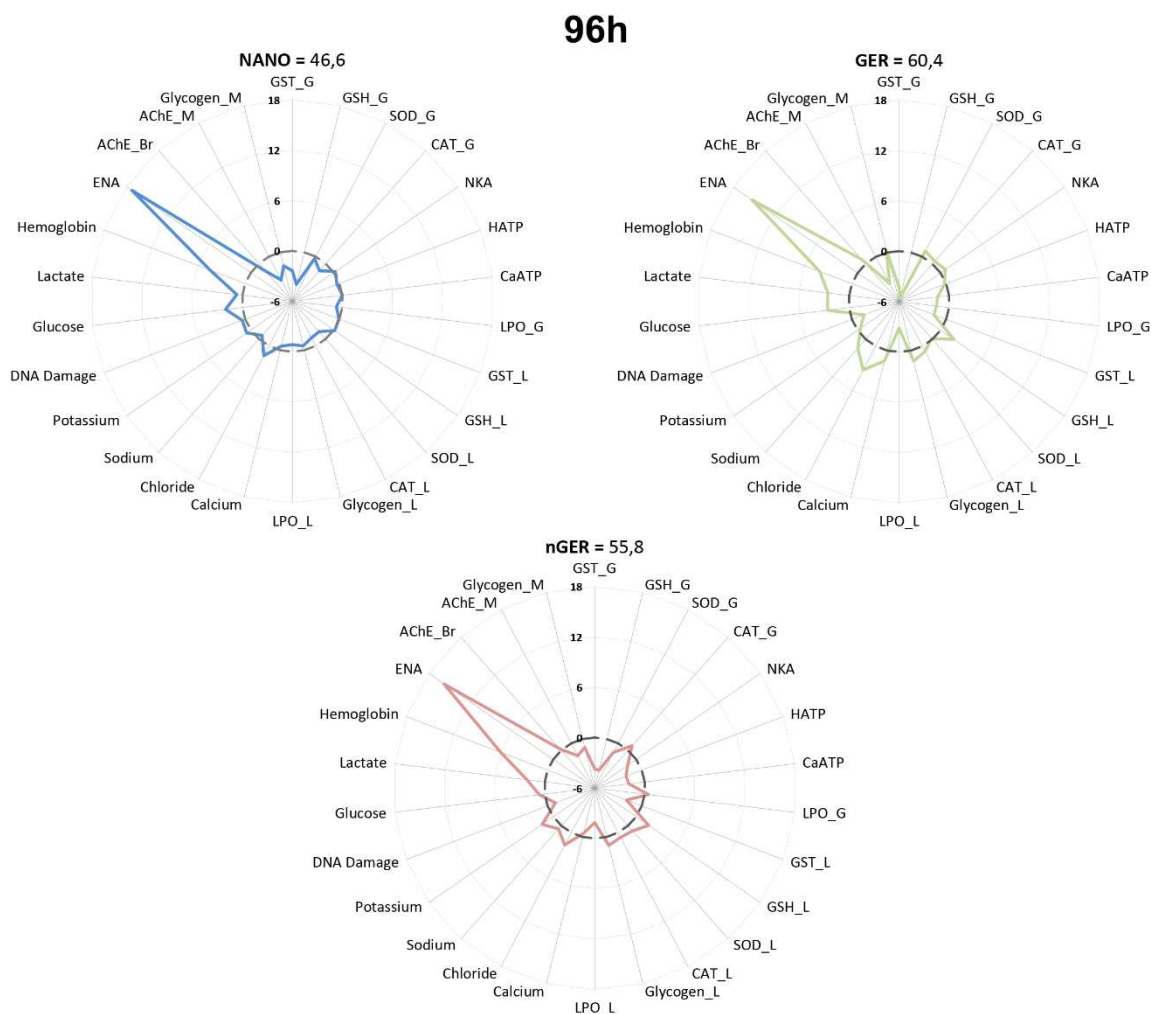


Figura 36. Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) baseado nos seguintes biomarcadores: Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HATP), Ca^{2+} -ATPase (CaATP), Glicogênio (Glycogen), Ca^{2+} (Calcium), Cl^- (Chloride), Na^+ (Sodium), K^+ (Potassium), Glucose (Glucose), Lactato (Lactate), Hemoglobina (Hemoglobin), glutatona-S-transferase (GST), glutatona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA (DNA_Damage), alterações nucleares eritrocíticas (ENA) e acetilcolinesterase (AChE) em diferentes tecidos (G = brânquias; L = fígado; Br = cérebro e M = músculo) de *A. catesbeiana* expostos a NANO (radar azul), GER (radar verde) e nGER (radar vermelho) por 96h. Os resultados dos biomarcadores são representados em relação ao grupo basal (CTR; linha preta tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador.

Portanto, o nanoencapsulamento do geraniol apresenta-se como uma alternativa promissora para uma agricultura mais sustentável devido ao seu impacto reduzido, em comparação com o geraniol livre, nos girinos *A. catesbeiana*. No entanto, ainda apresenta riscos, particularmente no que diz respeito ao seu potencial genotóxico e aos efeitos no metabolismo energético e no estresse oxidativo.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 040/2023

Londrina, 14 de abril de 2023.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: **“Geraniol nanoencapsulado como alternativa para uma agricultura sustentável: avaliação ecotoxicológica em girinos de *Aquarana catesbeiana*”** protocolo CEUA nº 009.2023 sob a responsabilidade de **Cláudia Bueno dos Reis Martinez** 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), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) em **13/04/2023**.

Este projeto tem por objetivo avaliar e comparar os efeitos do geraniol convencional e nanoencapsulado sobre os biomarcadores genotóxicos, bioquímicos, fisiológicos e histológicos em girinos de *Aquarana catesbeiana* e apontar um conjunto de biomarcadores como ferramenta para ensaios ecotoxicológicos com girinos. **Grau de invasividade: G2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/05/2023 a 01/05/2025
Espécie/ linhagem/ raça	Anfíbio / <i>Aquarana catesbeiana</i>
Nº de animais	242
Peso/ Idade	Girinos 3g / 5-10 dias
Sexo	Machos ou fêmeas
Origem	Ranário no município de Nova Fátima (PR)
Amostras a serem coletadas	Sangue, fígado, cérebro, brânquia e músculo

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Profª Drª Patricia Chimini Perandini
Coordenadora da CEUA/Uel

Imo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB