

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica
Área de Concentração: Fisiologia

Ivan Lobo de Sousa Marques

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CARBENDAZIM NAS PROPRIEDADES
ELETROCONTRÁTEIS EM RATOS WISTAR MACHOS**

Belo Horizonte

2025

Ivan Lobo de Sousa Marques

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CARBENDAZIM NAS PROPRIEDADES
ELETROCONTRÁTEIS EM RATOS WISTAR MACHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Biofísica

Orientador: Prof. Dr. Artur Santos
Miranda

Belo Horizonte

2025

043

Marques, Ivan Lobo de Sousa.

Efeito da administração de carbendazim nas propriedades eletrocontráteis em ratos Wistar machos [manuscrito] / Ivan Lobo de Sousa Marques. – 2025. 69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Artur Santos Miranda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Praguicidas. 3. Cardiotoxicidade. 4. Benzimidazóis. I. Miranda, Artur Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 611 DE IVAN LOBO DE SOUSA MARQUES

Às 14:00 horas do dia 10 do mês de outubro de 2025, no Transmiteda através da Plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Ivan Lobo de Sousa Marques**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Artur Santos Miranda**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Artur Santos Miranda**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Danilo Roman Campos**, UNIFESP e a **Profa. Dra. Ana Flávia Machado Botelho**, UFG. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CARBENDAZIM NAS PROPRIEDADES ELTROCONTRÁTEIS EM RATOS WISTAR MACHOS**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de outubro de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Roman Campos, Usuário Externo**, em 16/10/2025, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Flávia Machado Botelho, Usuário Externo**, em 16/10/2025, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Artur Santos Miranda, Professor do Magistério Superior**, em 20/10/2025, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4652819** e o código CRC **F931169D**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

"EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CARBENDAZIM NAS PROPRIEDADES ELTROCONTRÁTEIS EM RATOS WISTAR MACHOS"

IVAN LOBO DE SOUSA MARQUES
ORIENTADOR: ARTUR SANTOS MIRANDA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **10 de outubro de 2025**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. DANILO ROMAN CAMPOS - UNIFESP
PROFA. DRA. ANA FLÁVIA MACHADO BOTELHO - UFG
PROF. DR. ARTUR SANTOS MIRANDA – **ORIENTADOR** - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 10 de outubro de 2025



Documento assinado eletronicamente por **Daniilo Roman Campos, Usuário Externo**, em 16/10/2025, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Flávia Machado Botelho, Usuário Externo**, em 16/10/2025, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Artur Santos Miranda, Professor do Magistério Superior**, em 20/10/2025, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4652822** e o código CRC **7AD38DE2**.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Artur Santos Miranda, pela orientação e oportunidade de desenvolver esse trabalho, segurança e confiança. Obrigado por todos os ensinamentos e valiosas contribuições para minha formação acadêmica. Em especial, agradeço a Dra. Julliane Vasconcelos Joviano dos Santos pelas técnicas ensinadas e a colaboração, além de todo carinho.

Aos meus pais, Ângela Paulina de Sousa Marques e Ronan Lobo Marques, que são minha inspiração e alicerce. Obrigado por se dedicarem tanto a minha formação e apoiarem as minhas escolhas, sem vocês nada disso seria possível. A minha irmã, Mariana, por me dar suporte quando precisei.

Agradeço aos meus familiares, por todo apoio a minha pesquisa e trabalho.

Aos meus antigos orientadores, Rafael Pinto Vieira e Jader dos Santos Cruz, obrigado por me descobrirem e mostrarem a ciência.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Clara, Alessandra, Douglas, Gabriel, Luís Fernando, Victor, Maycon pelos conhecimentos compartilhados, os momentos de descontração que deixaram o processo de construção deste trabalho mais leve. Estendendo meus agradecimentos ao Laboratório de membranas excitáveis (Lamex), Júlia, Pedro, Bruna, Sofia, Raquel que também fizeram todo o processo mais tranquilo.

As minhas amigas do laboratório de fisiologia vascular (LVF) por me proporcionarem o suporte emocional quando precisei e os vários conselhos. Dani, Jaqueline, Naiara, Marina e Richard, obrigado por estarem disponíveis para me ajudar.

Aos meus amigos, pelos anos de amizade, apoio emocional, por acreditarem em mim e se fazerem tão presentes. E por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Serrapilheira, assim como o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Venenos e Antivenenos (INCT Inovatox) pelo apoio financeiro para execução dos experimentos, capacitação pessoal e divulgação dos dados obtidos em eventos científicos.

RESUMO:

Carbendazim (CAR) é um fungicida da classe dos benzimidazóis, inibidor da polimerização de β -tubulina, com histórico de ampla utilização no Brasil, porém banido pela ANVISA devido ao seu perfil toxicológico. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos cardiotoxicos da exposição crônica a este pesticida. Ratos Wistar machos foram tratados via gavagem, durante 28 dias, com a dose de 0,02 mg/kg/dia, correspondente à Ingestão Diária Aceitável (IDA), estabelecida antes do banimento de sua utilização. A metodologia incluiu avaliações *in vivo*, *ex vivo* (Langendorff) e *in vitro* (eletrofisiologia e contratilidade celular). Os resultados demonstraram que, embora a função sistólica e a histologia cardíaca tenham permanecido preservadas, os animais apresentaram disfunção diastólica e um atraso significativo na repolarização do potencial de ação ventricular. Além disso, o grupo exposto evidenciou maior vulnerabilidade ao estresse, com pior recuperação funcional e maior área de necrose após protocolo de isquemia e reperfusão. Concluiu-se que o CAR, mesmo em dose subclínica, induz cardiotoxicidade funcional e elétrica silenciosa, comprometendo a reserva fisiológica do miocárdio frente a eventos isquêmicos.

Palavras-chave: Pesticidas; Remodelamento; Cardiotoxicidade; Benzimidazóis; Carbendazim

ABSTRACT

Carbendazim (CAR) is a fungicide of the benzimidazole class, an inhibitor of β -tubulin polymerization, broadly used in Brazil over the past years, but banned by ANVISA due to its toxicological profile. The present study aimed to investigate the cardiotoxic effects of chronic exposure to this pesticide. Male Wistar rats were treated via gavage for 28 days at a dose of 0.02 mg/kg/day, corresponding to the former Acceptable Daily Intake (ADI). The methodology included *in vivo*, *ex vivo* (Langendorff), and *in vitro* (electrophysiology and cell contractility) evaluations. The results demonstrated that, although systolic function and cardiac histology remained preserved, the animals presented diastolic dysfunction and a significant delay in ventricular action potential repolarization. Furthermore, the exposed group evidenced greater vulnerability to stress, with worse functional recovery and a larger area of necrosis following an ischemia and reperfusion protocol. It is concluded that CAR, even at a subclinical dose, induces silent functional and electrical cardiotoxicity, compromising the myocardial physiological reserve against ischemic events.

Keywords: Pesticides; Cardiotoxicity; Benzimidazoles; Remodeling; Carbendazim.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Uso global de pesticida entre 1990-2022	13
Figura 2: Lucro das empresas do Norte global ao longo das décadas	13
Figura 3: Uso de pesticidas por país em 2022	14
Figura 4: Venda e registro de pesticidas no Brasil entre 2000-2022.	15
Figura 5: Estrutura química de alguns fungicidas benzimidazóis	17
Figura 6:Fórmula estrutural do Carbendazim.....	18
Figura 7: Toneladas de produtos formulados à base de Carbendazim (CAR) comercializadas entre os anos de 2010 e 2019	19
Figura 8: Via de degradação em solo e cultura microbiana.....	20
Figura 9:Vias de transporte ambiental do CAR	21
Figura 10: Via de degradação do Carbendazim	23
Figura 11: Rota de metabolitos do CAR em ratos.	26
Figura 12: Protocolo experimental	29
Figura 13: Fluxograma de métodos que foram empregados	29
Figura 14: Resultados do eletrocardiograma	37
Figura 15: Técnica do coração isolado por Lagendorff com protocolo de isquemia	39
Figura 16: Coloração do tecido para avaliação de área isquêmica.	40
Figura 17: Parâmetros histológicos do coração.	41
Figura 18:Parâmetros histológicos do fígado.	42
Figura 19: Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos dos ventrículos..	43
Figura 20: Propriedades contráteis dos cardiomiócitos.....	44
Figura 21: Propriedades contráteis dos cardiomiócitos em 3 Hz.....	45
Figura 22: Manejo do cálcio intracelular.....	46
Figura 23: Produção de óxido nítrico e produção global de espécies reativas de oxigênio.....	47

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 Pesticidas e seus impactos	12
1.2 Características do Carbendazim (CAR)	16
2. Justificativa	28
3. Objetivo	28
4. Desenho experimental	29
4.1 Fluxograma de experimentos	29
5. Métodos	29
5.1 Animais	29
5.2 Eletrocardiograma	30
5.3 Ecocardiograma	30
5.5 Técnica de Langendorff	31
5.5 Coloração por cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio	31
5.6 Histologia	32
5.7 Isolamento dos cardiomiócitos	32
5.8 Eletrofisiologia celular (<i>Patch-clamp</i>)	33
5.9 Contratilidade celular	34
5.10 Microscopia confocal	35
5.11 Microscopia de fluorescência	35
5.12 Análises estatísticas	36
6. Resultados	36
6.1 Eletrocardiograma	36
5.2 Ecocardiograma	37
5.3 Técnica de Langendorff	38
5.4 Coloração por cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio	39
5.5 Histologia	40
5.6 Eletrofisiologia celular (<i>Patch-clamp</i>)	42
5.7 Contratilidade celular	43
5.8 Manejo intracelular de cálcio	45
5.9 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	46
7. Discussão	47
7.1 Eletrocardiograma	47
6.2 Ecocardiograma	49
6.3 Langendorff e Coloração por cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio	50

6.4 Histologia	51
6.5 Potencial de ação e Manejo intracelular de cálcio	54
6.6 Contratilidade celular	56
6.7 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	57
8. Conclusões	58
9. Referências Bibliográficas	59

1. Introdução

1.1 Pesticidas e seus impactos

No período do pós-Segunda Guerra Mundial viu-se uma mudança profunda nas práticas agrícolas, devido aos processos de modernização do campo por meio da mecanização e utilização de insumos químicos, como fertilizantes e pesticidas, o que se tornou indispensável para o ganho de produtividade (Anakwue, 2019). Nos anos e décadas pós Guerra ocorreu um aumento populacional global, emergindo a necessidade de ampliação de consumo de alimentos. Conseqüentemente, a maior produção agrícola alavancou o desenvolvimento e comercialização de pesticidas. Como consequência, esses produtos se tornaram mais acessíveis em todo mundo, inclusive por meio de incentivo governamental no Brasil (Thalita Ferreira, 2019).

Na legislação brasileira, o conceito de agrotóxico passou a ser adotado com a promulgação da Lei Federal nº 7.802/1989, dada pelo Decreto nº 4.074/2002 (Ministério da Casa Civil, 2002). No qual, em seu artigo 1º define como agrotóxicos e afins como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

No Brasil, os termos pesticidas, agrotóxicos e agroquímicos são sinônimos (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). A maior parte da produção de pesticidas no mundo serve para atender a intensificação agropecuária, devido à crescente demanda pelo aumento da produção de alimentos, seja para defesa da lavoura, reduzir perdas ou aumentar a margem de ganhos econômicos. Também são usados contra vetores de doenças humanas (dengue, malária, esquistossomose) e ectoparasitas (pulgas, carrapatos, moscas) para animais de produção e companhia (Mostafalou; Abdollahi, 2017). Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025a*), (Figura 1). O total de ingrediente ativo relacionados a pesticidas produzido em 2022 foi 3,70 milhões de toneladas globalmente. O valor dobrou se comparado a década de 1990, sendo o aumento em 54% para fungicidas e bactericidas.

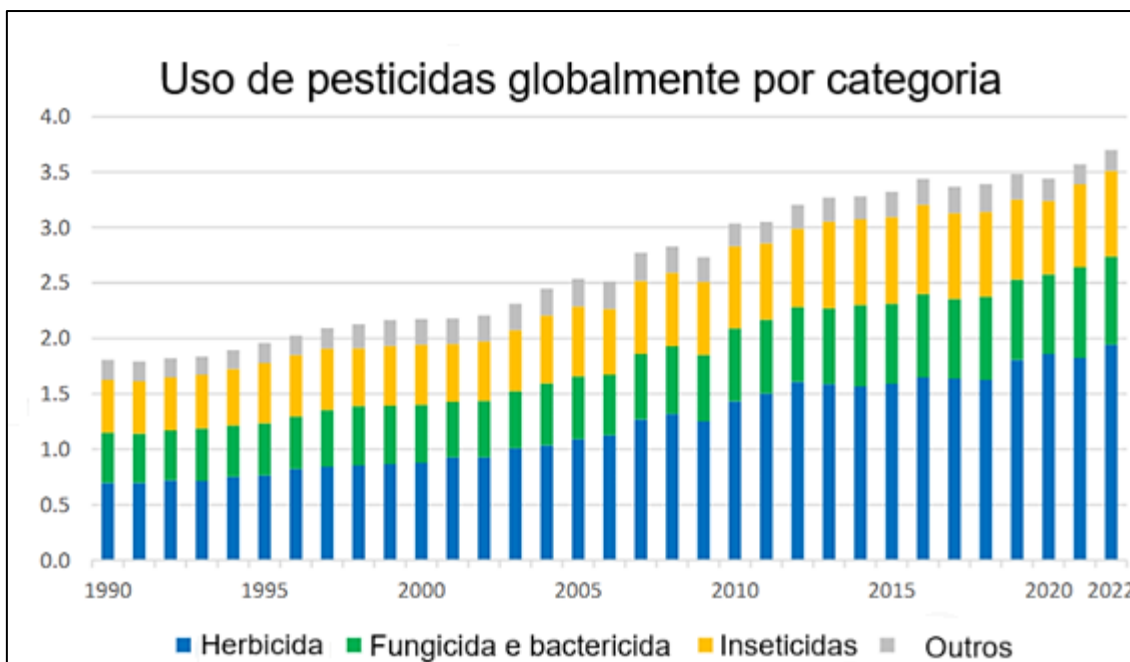


Figura 2: Uso global de pesticida entre 1990-2022. Fonte: FAO, 2024. FAOSTAT: Pesticides Use (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025a)

Além disso, segundo o Atlas dos Agrotóxicos de 2024 (Fundação Heinrich Böll, 2024), empresas do Norte Global, Europa e Estados Unidos, são detentoras da maior porcentagem do lucro sobre a venda dos ingredientes ativos para o mundo.

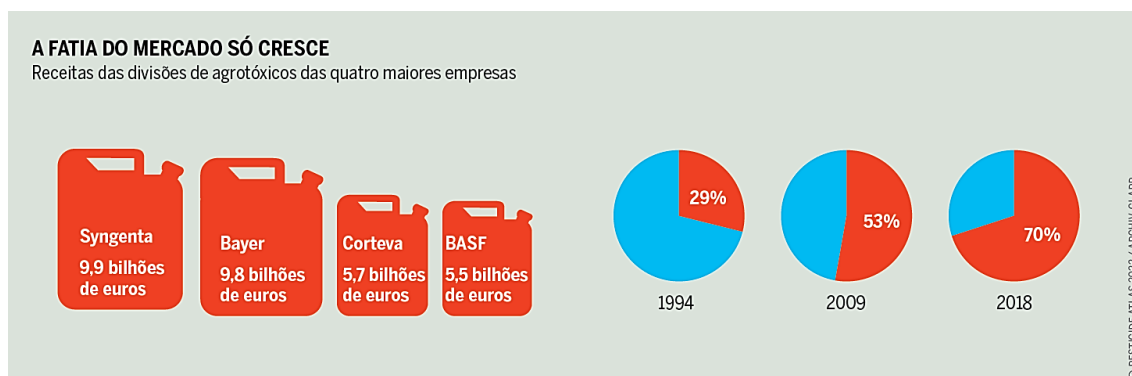


Figura 3: Lucro das empresas do Norte global ao longo das décadas. Fonte: (Fundação Heinrich Böll, 2024)

Desde meados dos anos 1990, o continente americano tem sido o principal consumidor desses insumos, correspondente a 1,2 milhões de toneladas no ano de 2022, equivalente a 10,8 bilhões de dólares americanos (food and agriculture organization, FAO). Conforme dados da FAO, na América do Sul, a taxa mínima do uso de pesticidas em áreas agricultáveis é de 6,5-60 kg/ha (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025). Mais de 90% dos agricultores brasileiros dependem do uso de agrotóxicos, de acordo com o censo agropecuário de 2006 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2012). Nesse cenário, o Brasil ocupa uma elevada posição no ranking mundial de consumo

de agrotóxicos e corresponde a 10% do consumo global, como demonstrado na figura 3. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025).

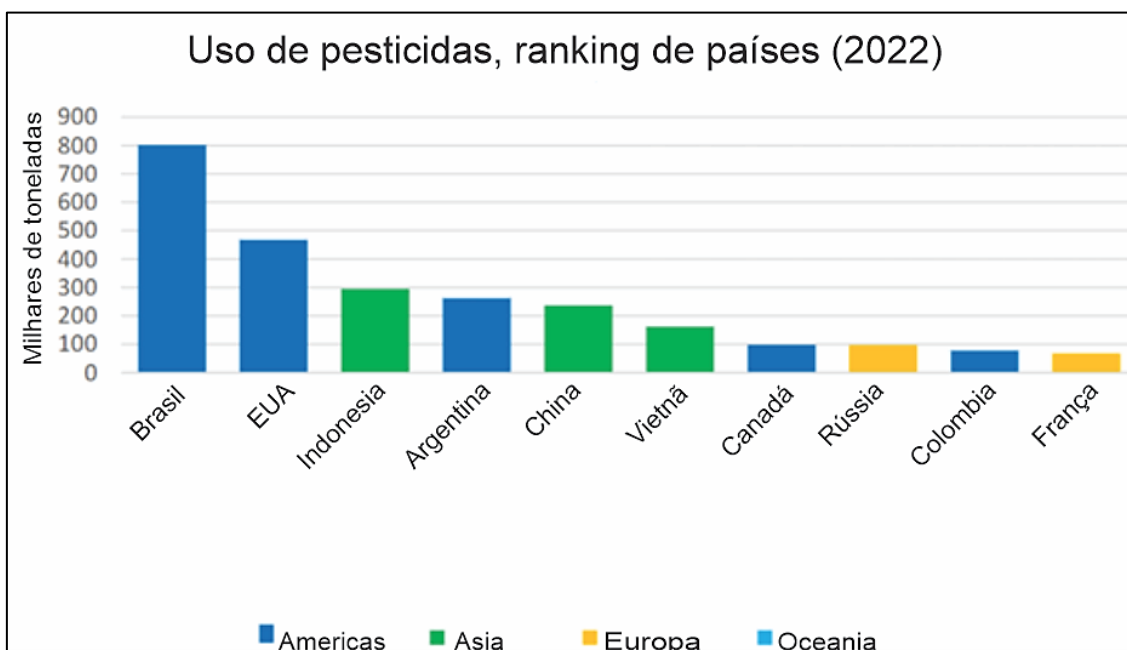


Figura 4: Uso de pesticidas por país em 2022. Fonte: (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025a)

Ao observarmos a produção e área, o Brasil possui cerca de 64 milhões de hectares para plantio de lavouras, isso corresponde aproximadamente a 7% do território do país (Tubiello et al., 2023). Como exemplo da crescente expansão da fronteira agrícola, observa-se a safra 2023/2024 de grãos, estimada em 317,5 milhões de toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), 2023). No que tange aos registros dos pesticidas no Brasil, observa-se um aumento no número de registros e quantidade vendida desde o início dos anos 2000 segundo o Atlas dos Agrotóxicos de 2024. O país vivencia uma escalada no número de agrotóxicos liberados, em concordância com o crescente número de vendas e novos registros apresentados na figura 4. Por exemplo, em 2016 foram liberados 277 agrotóxicos no país, em 2017 o número subiu para 404 e 2018 mais 449, em 2019 o número foi de 474 e em 2020 mais 493, até a maior marca da história em 2021 com 550 novos agrotóxicos liberados no Brasil (Bohrer, 2022). Uma possível causa para esse aumento seria os incentivos financeiros dados pelo governo. Em 2020 a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (Abrasco) indicou que o valor de benefícios fiscais chega a 10 bilhões de reais em 2017 (Vilhena, 2021).

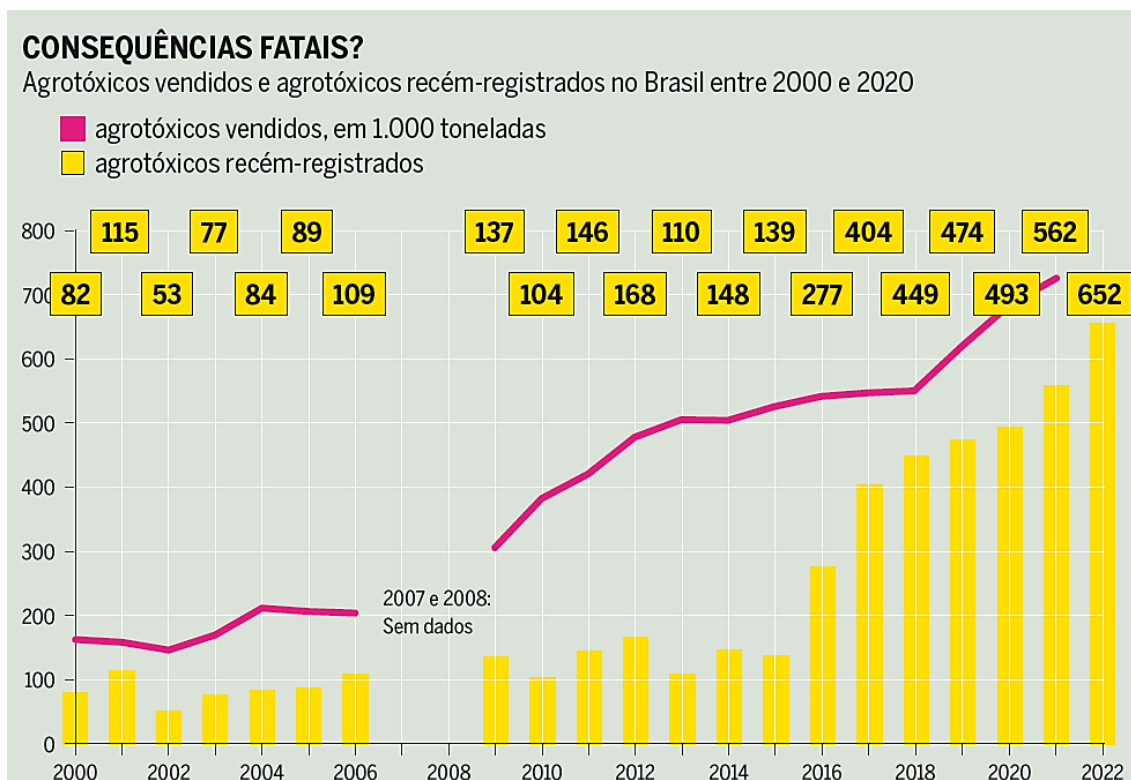


Figura 5: Venda e registro de pesticidas no Brasil entre 2000-2022. Fonte: Atlas dos Agrotóxicos 2024.

Os órgãos que normatizam e estabelecem padrões do uso e manejo de pesticidas principalmente são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), disciplinando sobre os padrões permitidos. Nesse sentido, destaca-se a importante Resolução do CONAMA nº 430 de 2011, que estabelece os níveis máximos desse produto a serem encontrados nos recursos hídricos (Brasil, 2011). Ademais, o Decreto nº 4.074/2002 distribui outras competências entre ministérios do governo, visando trazer regras para registro, uso e manipulação, produção e exportação (Brasil, 2002). Esse mesmo decreto estabelece que a renovação de pesticidas precisa ocorrer somente em caso de verificação de algum dano causado.

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com seu alvo de manejo, podendo ser subdivididos em mais de cinco classes, das quais destacam-se como as principais os herbicidas, inseticidas ou fungicidas. Esta última pode ser subdividida em fungicidas de sítio único ou múltiplos sítios. Fungicidas de sítio único atuam interrompendo ou inibindo um único caminho no metabolismo do fungo, seja a síntese de ergosterol, proteínas ou respiração mitocondrial. Em contraste, os fungicidas de sítios múltiplos podem atuar em vários processos metabólicos do fungo (Farm Progress, 2020).

Além disso, diferentes pesticidas englobam moléculas orgânicas e inorgânicas, de forma que a presença de algumas funções ou estruturas químicas define classes

funcionais desses compostos. Benzimidazóis, inibem a polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016).

Por fim, Devido à sua estrutura e características físico-químicas, cada agrotóxico possui um perfil característico de estabilidade ambiental. Isso implica diferentes rotas de degradação, seja biótica, abiótica ou ambas. Rotas bióticas incluem microrganismo presentes no solo, principalmente ação bacteriana e absorção dos pesticidas pelas raízes (Alexander, 1981). Rotas abióticas incluem, degradação pela radiação luminosa, volatilização e a própria meia-vida da molécula. Além dos processos climáticos, como escoamento e lixiviação. Esse perfil de estabilidade e rotas de degradação impactam significativamente o risco potencial de contaminação humana para um dado agrotóxico, em conjunto com o momento de sua utilização ao longo da cadeia produtiva, desde o plantio até à manutenção do produto para comercialização.

1.2 Características do Carbendazim (CAR)

Os pesticidas da classe dos benzoimidazólicos atuam como fungicidas sistêmicos amplamente utilizados na agricultura devido à sua eficácia contra fungos fitopatogênicos (Silva et al., 1999). Na figura 5 estão representados alguns exemplos de benzoimidazóis. Entre os compostos mais representativos dessa classe destacam-se o Benomil (metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolilcarbamato), seu metabólito, o carbendazim, metil-2-benzimidazolilcarbamato (MBC) e tiofanato-metil. Benomil e tiofanato-metil são convertidos em carbendazim (CAR) nas plantas (Liu et al., 2021). A β -tubulina é uma proteína essencial para a formação dos microtúbulos, que são componentes do citoesqueleto responsáveis por diversas funções celulares, incluindo o transporte intracelular e a manutenção da forma da célula. Ao se ligar à β -tubulina, o CAR impede a polimerização da tubulina e, conseqüentemente, a formação dos microtúbulos funcionais. Isso interrompe processos vitais como a divisão celular, o que leva à morte do fungo (Davidse, 1986; Silva et al., 1999).

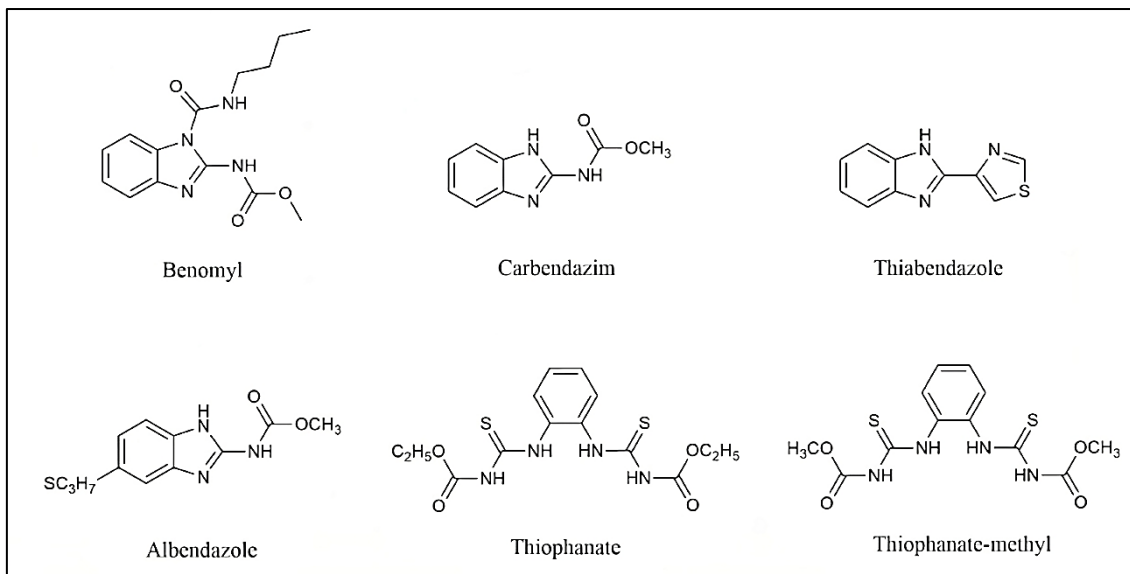


Figura 6: Estrutura química de alguns fungicidas benzimidazóis. Fonte: (Bai et al., 2024)

Benzamidazólicos também podem atuar como bactericidas, antiparasitários e antitumorais (Lugomer et al., 2017; Tzatzarakis et al., 2020). Além do seu mecanismo primário, há discussão sobre outras propriedades atuantes, nas quais podem atuar como substituto de ácido nucleico, afetando a sua síntese. Essa classe de pesticidas se mostrou bastante utilizada pela baixa toxicidade para as culturas, porém, devido à sua especificidade, é recomendada a mistura ou rotação com outras classes de fungicidas para evitar linhagens resistentes. Apesar dos efeitos adversos do CAR, que serão demonstrados adiante no texto, o uso de benzimidazóis vem sendo estudado para tratamento de distúrbios metabólicos e neurológicos, obesidade e inibição da ferroportina em casos patológicos (Law; Yeong, 2021). Isso ressalta a necessidade de compreender os efeitos biológicos dessa classe nos diferentes sistemas fisiológicos.

O CAR também pode ser classificado como carbamato. Essa classe é derivada do ácido carbâmico e se caracteriza pela presença de uma ligação éster carbamato como grupo funcional (ligada a um núcleo aromático ou a um grupo oxímico). Esses compostos atuam como inibidores reversíveis da enzima acetilcolinesterase (AChE) do sistema nervoso. Apresentam atividade de amplo espectro contra insetos, nematoides, moluscos e aracnídeos. Além disso, funcionam como herbicidas ao inibir a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese e como fungicidas ao se ligarem aos microtúbulos do fuso mitótico, bloqueando a divisão nuclear. Adicionados à sua ação anticolinesterase, carbamatos e seus metabólitos atuam como desreguladores endócrinos ao antagonizar a atividade de hormônios esteroidais. Ao mimetizar esses hormônios, o pesticida ou seus metabólitos, se

ligam ao receptor, conseqüentemente, afetando a resposta do gene (Klotz et al., 1997; Malhotra; Kaur; Phale, 2021).

Após descrevermos os mecanismos de ação previstos e observados para o CAR em função de sua estrutura química, é importante analisar suas propriedades físico-químicas, que influenciam seu comportamento no ambiente. O CAR possui propriedades químicas estáveis, e o produto técnico pode ser armazenado por um período de 2 a 3 anos em local fresco e seco. A substância pura apresenta-se como um pó de coloração cinza-claro ou bege, com ponto de fusão entre 302 e 307 °C. A 24 °C, sua solubilidade é de 0,008 g/L em água, 5 g/L em dimetilformamida, 0,3 g/L em acetona, 0,3 g/L em etanol, 0,1 g/L em clorofórmio e 0,135 g/L em acetato de etila. Em meio alcalino, sofre hidrólise lenta, enquanto em meio ácido permanece estável, sendo capaz de formar sais (Bai et al., 2024). Essas propriedades de baixa solubilidade em água e estabilidade em meio ácido contribuem para a persistência do carbendazim no ambiente, o que será discutido posteriormente.

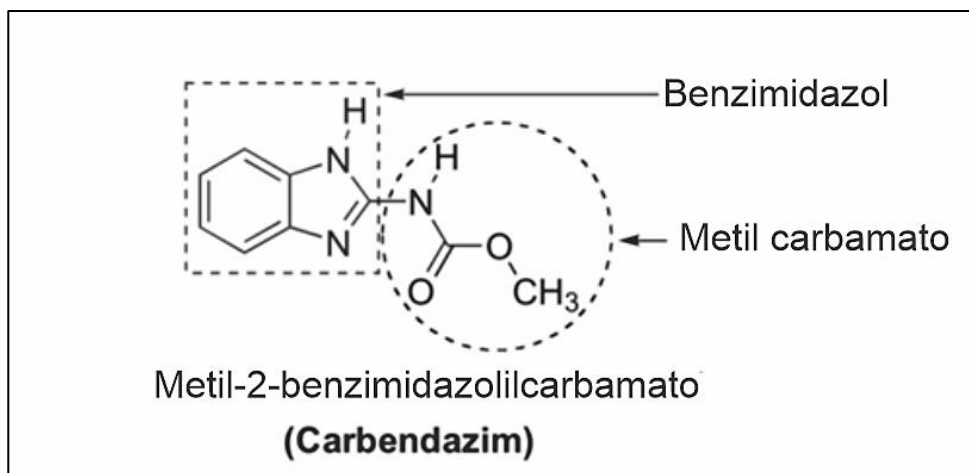


Figura 7: Fórmula estrutural do Carbendazim. Fonte: pubchen

Na década de 1960, houve a introdução do uso de benzimidazóis, com o pico de uso na década de 70, em especial com sua ação anti-helmíntica (Carrijo 2014, p.10; Equipe Técnica-FPA, 2022). O CAR possui um valor de mercado global superior a 200 milhões de dólares no nível do consumidor, o que corresponde a mais de 12.000 toneladas em termos de ingrediente ativo (Panda; Kanjilal; Das, 2018). Na Índia, o CAR apresenta ampla aplicação, com uma produção anual de aproximadamente 1.000 toneladas e um consumo anual de cerca de 700 toneladas. Em 2020, a China produziu 2.071,4 toneladas de CAR, das quais 1.051,6 toneladas foram destinadas ao mercado interno. Com um uso anual de 1.992 toneladas métricas, o CAR está entre os cinco principais pesticidas utilizados na Índia (Panda; Kanjilal; Das, 2018; Sharma et al., 2022).

De acordo com os dados do Agrofit existem 41 produtos formulados e 33 produtos técnicos à base de CAR com registro ativo no Brasil e um total de 25 empresas detentoras de registros de produtos formulados e técnicos (Ministério da Agricultura, [S.d.]

O CAR, nos anos de 2010 a 2019 foi bastante comercializado no Brasil, sendo o o 16º pesticida mais comercializado no ano de 2019.

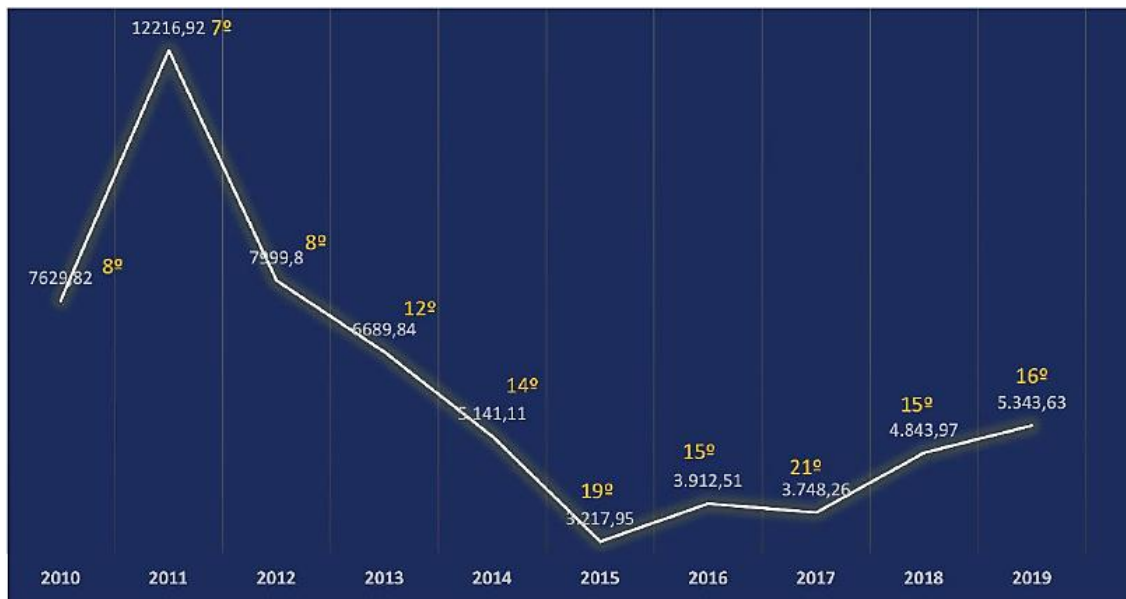


Figura 8: Toneladas de produtos formulados à base de Carbendazim (CAR) comercializadas entre os anos de 2010 e 2019, em branco. Posição no ranking de toneladas comercializadas, em amarelo. Fonte: Ibama – Relatório de comercialização de agrotóxicos

De acordo com a Nota técnica da ANVISA nº29/2022 as utilizações do CAR são para uso foliar, principalmente nas culturas de algodão, trigo, soja, milho, cana-de açúcar, cevada, citros, feijão e maçã. Para tratamento de sementes de arroz, algodão, milho, feijão e soja. Além do uso industrial para preservar madeira. Ainda de acordo com a nota, sua modalidade de aplicação pode ser dividida em três. Primeiramente, pulverização foliar, principalmente por aviões dispersores, durante o ciclo da cultura como medida curativa ou protetiva; para as sementes, tratamento antes do plantio, visando proteção contra patógenos no solo e doenças iniciais e para uso industrial, por atuação como conservante.

O CAR pode ser absorvido pelas plantas após a aplicação, ao ser incorporado pelos estômatos; já no solo pode ser absorvido pelas raízes (Singh et al., 2016). Ele também pode ser volatilizado e fotodegradado em meio aquoso dependente do pH (Boudina et al., 2003). No caso da fotodegradação, íons carbonato (CO_3^{2-}) são formados quando radicais hidroxila, gerados pela fotólise UV do H_2O_2 , são neutralizados por íons hidrogenocarbonato e carbonato, promovendo a degradação do CAR. Estudos demonstraram que os radicais carbonato reagem de maneira eficiente com moléculas que contêm regiões ricas em elétrons, como átomos de nitrogênio ou enxofre (Mazellier et al., 2003).

Diante do uso do CAR, Woodcock, 1978 observou uma redução na diversidade de fungos no solo tratados com benomil e carbendazim. Outro resultado visto foi a perda de benomil e CAR acentuada em solo previamente tratado com esses compostos (Silva et al., 1999). Seguindo essa observação, (Rajagopal, 1984) propôs uma rota de degradação para

o benomil e CAR no solo, cuja ação de microrganismos tem papel fundamental para a redução da concentração de CAR no solo. Na degradação microbiana, o CAR é inicialmente transformado em 2-aminobenzimidazol, seguido pela formação de 2-hidroxibenzimidazol, 1,2-diaminobenzeno, catecol e, por fim, convertido em dióxido de carbono pela ação da bactéria *Pseudomonas* (Fang et al., 2010).

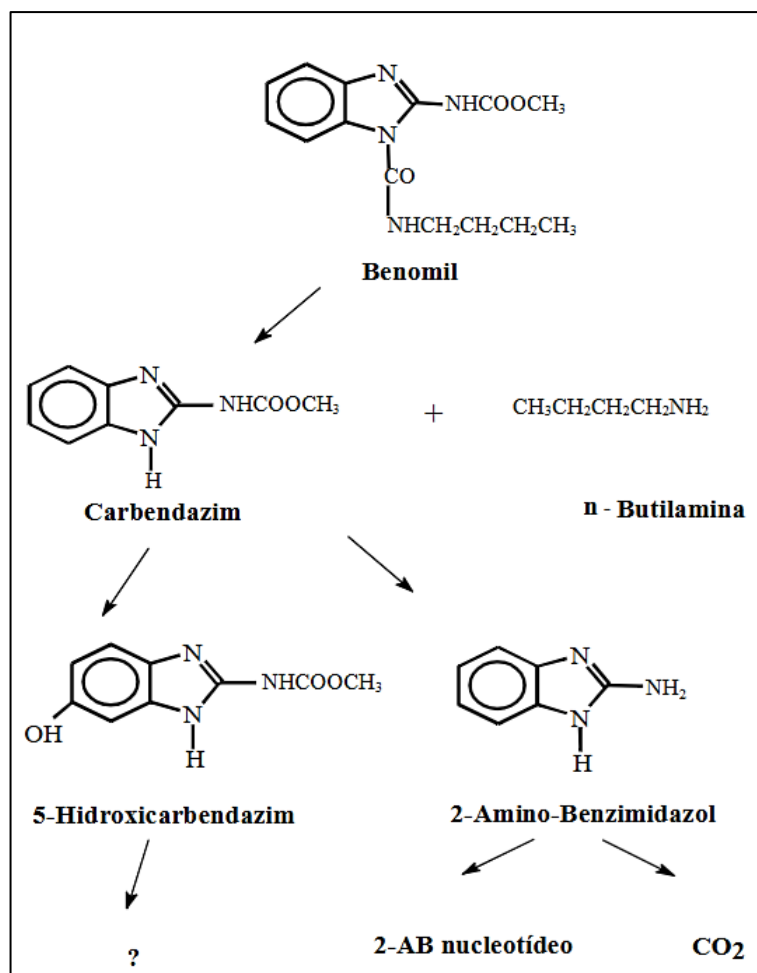


Figura 9: Via de degradação em solo e cultura microbiana proposto por Rajagopal et al. (1984)

Acerca da persistência no solo, CAR e seus produtos foram encontrados por dois ou três meses, sendo possível encontrar no solo até mesmo quatro anos após aplicação (“Lewandowska 2010- CAR e solo”, [S.d.]; Sassman et al., 2004). Ademais, apresenta elevada estabilidade, com uma meia-vida prolongada que varia entre 3 e 6 meses para sua decomposição em solo com vegetação (como gramados), aproximadamente de 6 a 12 meses em solo nu, e podendo alcançar até 25 meses em ambientes aquáticos, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. Sua resistência à degradação se deve principalmente à presença do anel benzimidazólico estável, o que confere ao composto uma notável persistência ambiental (YU et al., 2009). Em uma avaliação espacial e temporal de solos da República Tcheca encontrou CAR mesmo um ano após sua última aplicação e seu banimento em 2014 (Kosubová et al., 2020). Estudos anteriores demonstram que o CAR

adsorve no solo com alto teor de matéria orgânica e solos argilosos; isso propicia sua retenção (Nemeth-Konda et al., 2002). O principal fator relacionado à adsorção do CAR ao solo é o pH, no qual, em valores baixos, a forma protonada do pesticida é predominante. Isso permite maior atração eletrostática e as partículas do solo, consequentemente, aumentando sua persistência no solo (Arya et al., 2015; Nemeth-Konda et al., 2002; Paszko, 2012). Análise de solos brasileiros demonstrou alta correlação da sorção de CAR com o carbono orgânico (Carbo et al., 2007).

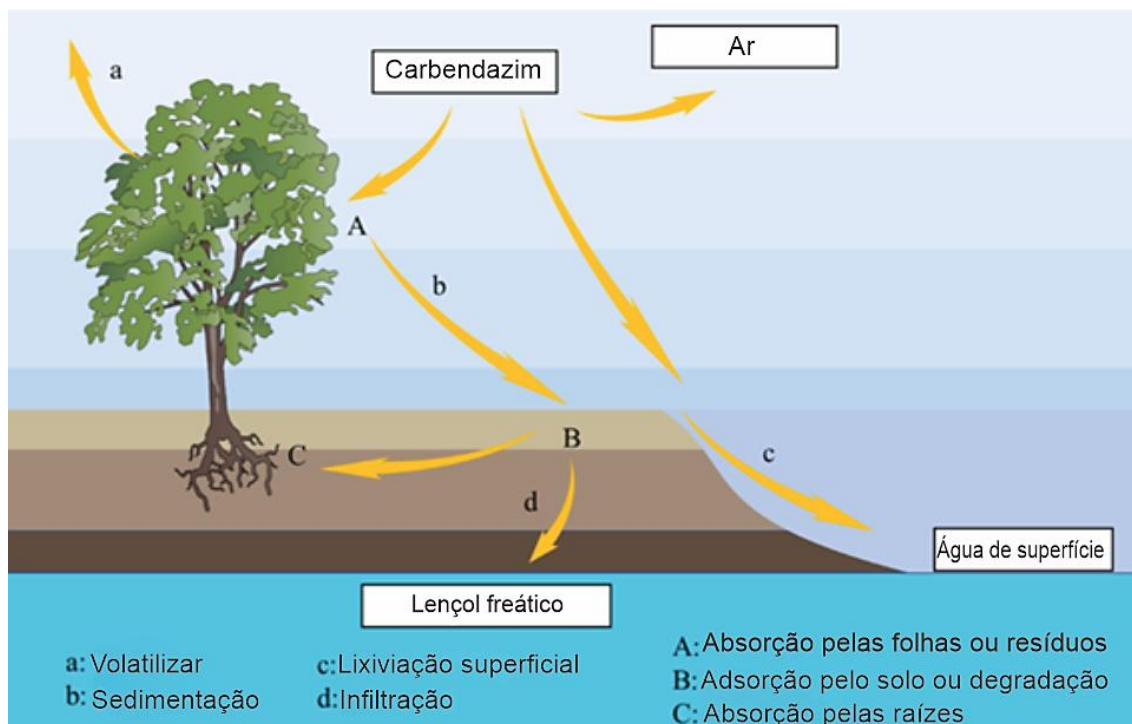


Figura 10: Vias de transporte ambiental do CAR. Fonte: (Ma et al., 2023)

No Reino Unido, CAR foi detectado em maçãs e derivados, em concentrações variadas, ultrapassando o valor de ingestão diária máxima (IDM) estabelecido de 0,02 mg/por peso corporal/dia (Holmes et al., 2008). Em outro estudo, foram testados mais 80 pesticidas diferentes no pólen e mel de abelhas, no qual foram encontrados resíduos de CAR (Fawole; Aluko; Olowonih, 2011). Na população bacteriana, efeitos deletérios foram encontrados nas espécies fixadoras de nitrogênio quando o solo foi tratado com uma mistura de carbendazim-mancozeb (Fawole; Aluko; Olowonih, 2011).

Resíduos de CAR exercem efeitos não-alvo em animais residentes no solo. Houve comportamento de evitação e reprodução de minhocas (*Eisenia andrei*) no solo contaminado com CAR (Chelinho et al., 2014). (Van Wijngaarden et al., 1998) investigaram a toxicidade em invertebrados aquáticos, nos quais a espécie mais sensível foi o platelminto *Dugesia lugubris*. Outros táxons sensíveis incluíram oligoquetas (*Stylaria lacustris*), anfípodes (*Gammarus pulex*) e cladóceros (*Daphnia magna*).

Após a aplicação do agrotóxico, diversos mecanismos de degradação e transporte podem ocorrer (Acayaba et al., 2021). No que tange a contaminação na água, nota-se que isso é dependente de alguns fatores, como inclinação do solo propiciando maior ou menor intensidade de escoamento, quantidade de chuva na região e estação do ano, além de propriedades físico-químicas do pesticida (Lwakuma et al., 1993). Resíduos de CAR foram encontrados na bacia do rio Traiguen no Chile, observando que efeitos adversos podem ocorrer e que há necessidade de redução do uso do agrotóxico (Palma et al., 2004). Amostras em águas superficiais em áreas de nascentes no Rio São Lourenço no Mato-Grosso apresentaram contaminação por fungicidas, epoxiconazol e CAR. Apesar do CAR apresentar como propriedade físico-química atributos que permitem que ele seja predominantemente encontrado em matrizes sedimentares, o seu elevado tempo de meia vida na água (350 dias) contribui para ser transportado via irrigação, chuva ou escoamento superficial do solo (Acayaba et al., 2021).

Em estudos brasileiros recentes, CAR foi detectado em 93% das amostras de água superficial de região de cana-de-açúcar (São Paulo), com pico de $\sim 1,1 \mu\text{g/L}$, apresentando risco para a vida aquática. Além disso, a mistura de diversos pesticidas, como atrazina, tebuconazol, diuron e CAR foi proposta como maior risco ao ecossistema aquático (Acayaba et al., 2021). Nos Estados Unidos, CAR é proibido devido a associação com tumores de fígado em animais. Contudo, resíduos de CAR foram encontrados em remessas de suco de laranja exportadas para os EUA, mesmo a concentração obedecer à legislação brasileira (Soraia Yoshida, 2012). Na Grécia, o resíduo com maior prevalência de detecção foi CAR em maçãs (Tzatzarakis et al., 2020).

O Ministério da Saúde, por meio da Portaria 2914/2011 incluiu o CAR e benomil como substância obrigatória a ser monitorada em água potável com o valor máximo permitido (VMP) $120 \mu\text{g L}^{-1}$. Para o critério de Ingestão Diária Aceitável (IDA) da Anvisa, anterior ao seu banimento, foi estipulado o valor de $0,02 \text{ mg/kg}$ de peso corpóreo/dia por ser considerada segura em relação a hepatotoxicidade, foi aplicado um fator de segurança de 1.000 vezes em relação ao LOAEL (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2022; Barbosa; Solano; Umbuzeiro, 2015; BRASIL. Ministério da Saúde, 2011).

A classificação de ingrediente ativo de agrotóxicos definida na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa, publicada em 2019 estabelece o CAR na Categoria 1, toxicidade para órgãos-alvo específicos, já para a Categoria 2 quanto à toxicidade a órgão-alvo por exposição repetida (BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária., 2019). O CAR se encaixa nessa determinação, em específico a categoria 1 e 2, devido a toxicidade em exposição única e repetida. Na Categoria 1, se encaixa no parâmetro

1B, em relação a seu potencial carcinogênico, mutagênico e toxicidade reprodutiva (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2021).

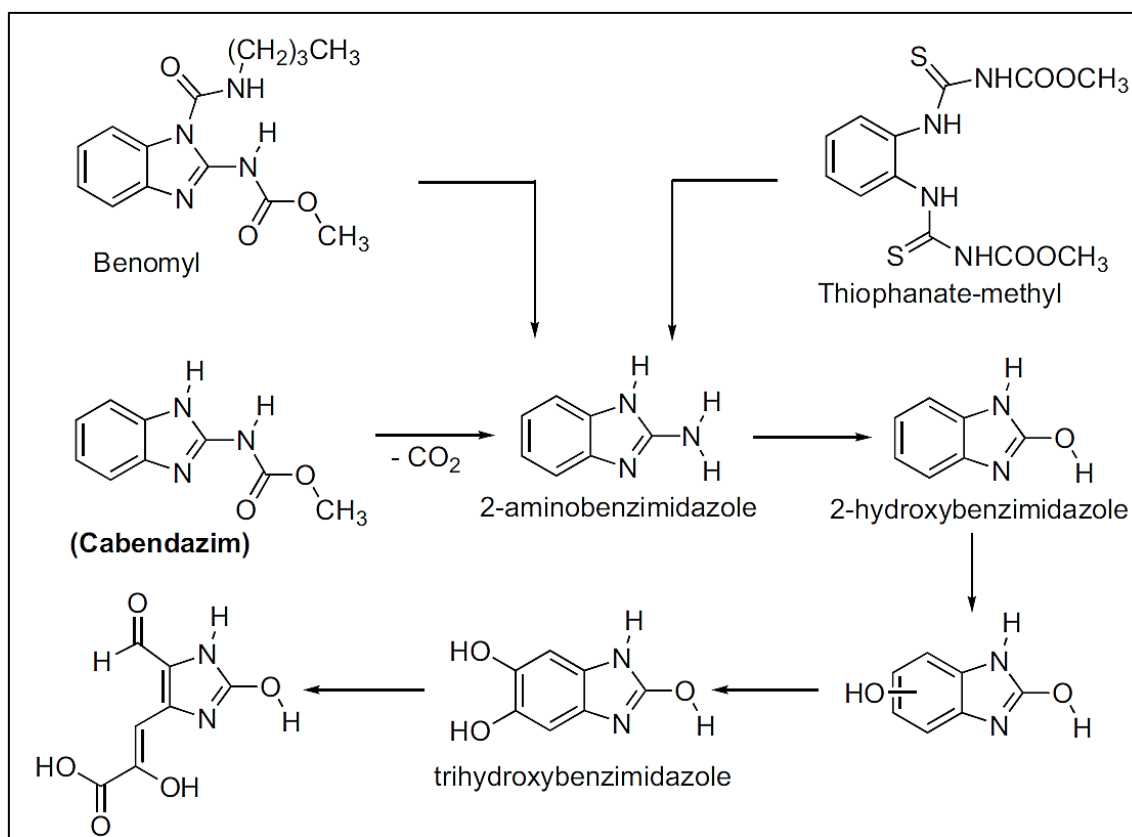


Figura 11: Via de degradação do Carbendazim. Fonte: (Arya et al., 2015)

Diante do supracitado, o CAR pode entrar em contato com o ser humano de diversas formas. Como apresentado na nota técnica, a forma predominante de uso agrícola do CAR no Brasil, anterior ao banimento, era por pulverização foliar a tratamento de sementes, ambos os métodos envolvem riscos diretos de exposição dérmica, inalatória e, secundariamente, oral. Para a população exposta de forma não ocupacional, o CAR já foi encontrado em alimentos (“relatorio-para-2017-2018-final”, [S.d.]; Soraia Yoshida, 2012). Segundo o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), o CAR foi um dos pesticidas com maior índice de detecção e em alimentos amplamente consumidos, como abacaxi, mamão, feijão e maçã, com níveis de resíduos variando amplamente. Em algumas amostras, os resíduos ultrapassaram o Limite Máximo de Resíduo (LMR), o que indica risco agudo de exposição. Além dos alimentos, é possível encontrar resíduos na água, como foi observado pelo relatório do Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua), que mostram a presença de CAR em 15,45% das amostras analisadas entre 2014 e 2019, com concentrações que variaram de 0,01 µg/L até 662 µg/L (Barbosa; Solano; Umbuzeiro, 2015). Por fim, a alta estabilidade

ambiental aumenta a chance de exposição ambiental difusa devido à possibilidade de biomagnificação (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Estudos têm investigado os potenciais efeitos toxicológicos do CAR, incluindo a possibilidade de efeitos endócrinos e reprodutivos (Mostafalou; Abdollahi, 2017). Desse modo, é preciso investigar os danos a celulares e teciduais desse pesticida.

Em consonância com a preocupação sobre os potenciais danos celulares decorrentes da exposição ao CAR, estudos *in vitro* têm sido conduzidos para elucidar os efeitos desse composto em diferentes linhagens celulares. Apesar da toxicidade do CAR ser conhecida desde a década de 1980, recentemente se tornou um tópico de alerta devido à crescente preocupação como um desregulador endócrino (Li et al., 2020b).

Embriões de zebrafish (*Danio rerio*) apresentaram efeitos adversos significativos, como mal formações, edema cardíaco e letalidade embrionária em doses a partir de 0,79 mg/L nos tempos medidos de 24,48,72 e 96 horas (Fan et al., 2021). Em um estudo de sinergia entre pesticidas, foi observado que CAR isoladamente já induz lesão em larvas de zebrafish (Hu et al., 2022). Em zebrafish na fase adulta, análise metabolômica mostrou desregulação do metabolismo de lipídeos hepáticos e desbalanço endócrino (Costa et al., 2023). No caso de neurotoxicidade, houve indução de inibição da acetilcolinesterase (AChE) e estresse oxidativo no cérebro do bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Ezeoyili et al., 2019). Embriões expostos ao Benomil, rapidamente transformado em CAR, causou nas primeiras 72 horas após a eclosão, toxicidade aguda na Concentração Letal de 50% (LC50) de 1,454 mg/L. Houve redução da frequência cardíaca, edema pericárdico, redução das câmaras cardíacas e desarranjo da morfologia do coração (Luo et al., 2023).

Em células de ovário de hamster chinês (CHO CRM795) expostas a 6 µg/mL, concentração próxima de 1,81 µM de CAR foi relatado mais de 95% das células apresentaram fusos mitóticos anormais, com polimerizações multipolares, ausência de anáfase e telófase e desorganização cromossômica (WARR; FLANAGAN; ANDERSON, 1982). Em linfócitos humanos, se encontrou poliploidia, presença de múltiplos conjuntos de cromossomos em uma célula ou organismo, como também se encontrou presença anormal do número de cromossomos em uma célula. Células placentárias humanas tiveram viabilidade e ciclo celular alterados e desregulando o sistema de proteases pelo Benomil e CAR (Zhou et al., 2015). As células germinativas masculinas também foram afetadas com a exposição ao CAR, o que causou um aumento significativo de espermatozoides diploides (Adler; Schmid; Baumgartner, 2002).

Em relação à absorção dérmica do CAR, em relatórios de autoridades responsáveis na Austrália, EUA e União Europeia relataram baixo risco. O CAR apresenta baixa absorção dérmica, não é irritante, mas pode causar sensibilização cutânea. A

exposição pela pele é considerada de baixo risco sistêmico, e a toxicidade observada em outras vias (oral e reprodutiva) não se manifesta por via dérmica. A toxicidade dérmica aguda é muito baixa ($LD_{50} > 2000$ mg/kg), e o risco ocupacional pode ser controlado com uso de luvas e vestimenta protetora (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA), 2008; European Food Safety Authority (EFSA), 2010; U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2014).

A rota metabólica do CAR foi estudada em diversos animais, destaca-se aqui o modelo murino, por ser bastante utilizado. De acordo com *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues* (JMPR) de 2005, a dose letal para 50% da população (LD_{50}), administrada oralmente é >10000 mg/kg em ratos. Entre 80 a 85% do pesticida administrado oralmente é absorvido (Ken Matthews AO et al., 2021). Segundo Silva; Barros; Pavão, 2014 a principal transformação da molécula é a hidroxilação hepática, resultando nos metabólitos: 5-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato (5-HBC) encontrado na urina e fezes de ratos machos; o 2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-(sulfatos de hidrogênio) (5-HBC-S); e o 5,6-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato-N-óxido (5,6-HOBC-N-óxido) encontrado nas excretas de ratos fêmeas, principalmente na forma glucuronizada. Como metabólitos secundários temos o 5,6-dihidroxibenzimidazol-2-il-carbamato (5,6-DHCB) que pode se metabolizar a 6-hidroxi-2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-5-(sulfato de hidrogênio) (5,6-DHCB-S) e 6-hidroxi-2-metoxicarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-b-D-ácido glucopiranosidurônico (5,6-DHCB-G).

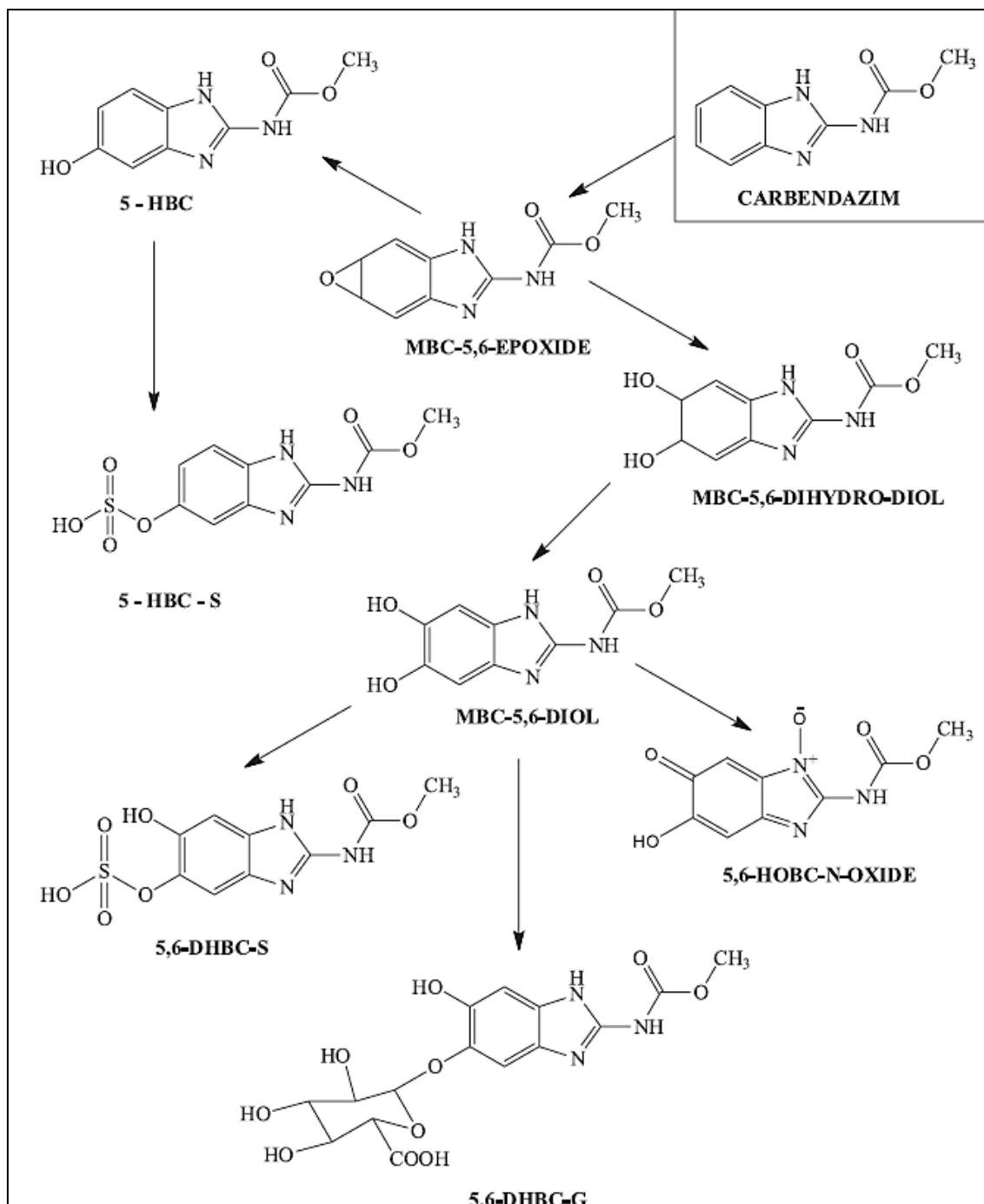


Figura 12: Rota de metabolitos do CAR em ratos. Fonte: Silva et al. 2014

Os autores Pisani et al., 2016 usaram modelo *ex vivo* de túbulos seminíferos para mensurar a toxicidade do CAR e Iprodiona, concentrações variando entre 50-500 nM. Houve alteração na fragmentação do complexo sinaptonêmico, alterações meióticas e transcricionais. Para as fêmeas, camundongos receberam CAR via gavagem nas doses de 0, 150, 300 e 600 mg/kg/dia do 6^o ao 15^o de gestação. Na dosagem de 150 mg houve redução de implementação. A partir de 300 mg/kg/dia houve aumento dos níveis maternos de colesterol, triglicerídeos, glicose, creatinina, progesterona e estradiol (Farag et al., 2011). Na dose de 50 mg/kg foi observada redução na motilidade dos espermatozoides e seu

número no testículo (Salihu et al., 2017). Em camundongos as doses de, 0,1-10 mg/kg, administrada oralmente durante 5 semanas induziu danos nos gametas masculinos (Li et al., 2020a).

Para o perfil lipídico, houve aumento dos estoques de gordura pelos adipócitos após 14 semanas de tratamento, além de alteração na microbiota intestinal dos animais e aumento do peso da porção lipídica do fígado (Jin et al., 2018). Fêmeas tratadas com CAR por 15 dias na dose de 200 mg/kg tiveram alterações após o fim do tratamento e 15 dias após o fim do protocolo. Essas alterações foram no peso corporal e no fígado, alterações no hemograma, estresse oxidativo e lesões hepáticas histológicas (Dikić et al., 2012; Hashem; Mohamed; Attia, 2018). Danos histopatológicos no fígado e no rim são descritos em diversos protocolos de tratamento com CAR. Uso de extratos de plantas foram utilizados na tentativa de mitigar os efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos (Abdel-Rahman et al., 2022; Seif et al., 2023). Prejuízos hepáticos são relatados em humanos por outra classe de pesticidas no Brasil (Freire; Koifman; Koifman, 2015).

No que se trata da nefrotoxicidade do CAR, ratos que receberam oralmente doses entre 300-600 mg/kg por 28 dias, apresentaram danos histopatológicos, como degeneração tubular, fibrose, atrofia glomerular (Mo et al., 2022a). Alterações de biomarcadores, como creatinina e ureia, além de enzimas relacionadas ao quadro de estresse oxidativo também foi observado (Mo et al., 2022b; Selmanoğlu et al., 2001) Em outro estudo, ratos tratados com baixo consumo de proteína e CAR obteve resultados similares tratando os animais por apenas 14 dias em uma dose de 200 mg/kg (Nwozo; Ozegbe; Olasehinde, 2017). Danos hepáticos e renais foram observados em estudo com a mistura do pesticida organofosforado, Clorpirifós, porém com uma dose de CAR de 50 mg/kg por 7 dias (Abolaji et al., 2017).

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 739, publicada em 2022, estabelece a proibição do ingrediente ativo CAR em agrotóxicos no Brasil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022). A norma atualiza a classificação do CAR, considerando-o presumidamente capaz de induzir mutações em células germinativas humanas (Mutagenicidade Categoria 1B), de causar toxicidade reprodutiva (Toxicidade Reprodutiva Categoria 1B) e com potencial carcinogênico (Carcinogenicidade Categoria 1B). Em seu Art. 4º, a resolução determina que a proibição da importação, produção, comercialização e uso de produtos à base de CAR ocorra de forma gradual e contínua, proibindo a importação de produtos técnicos e formulados imediatamente após a vigência.

2. Justificativa

Pesticidas têm seu uso extensivo, isso apresenta implicações significativas para o ecossistema e a Saúde Única. Em virtude da ampla utilização e das repetidas aplicações, os resíduos de fungicidas, incluindo o Carbendazim (CAR), estão presentes no amplo espectro de pesticidas encontrados na água e nos alimentos consumidos pela população brasileira. Ademais, CAR foi um dos pesticidas mais utilizados no Brasil entre os anos de 2016 e 2019, contudo, esse pesticida não apresentou limites seguros relacionados à mutagenicidade, desse modo, a agência regulatória do Brasil deferiu o seu banimento. CAR é um fungicida de amplo espectro, da classe dos benzimidazois, cuja ação decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular no fungo. Essa classe de compostos possui importância na terapêutica devido ao potencial antitumoral e desenvolvimento de fármacos. As propriedades físico-químicas do CAR conferem à molécula alta estabilidade ao ambiente, possibilitando sua ação em organismos não-alvo. Nesse cenário, o coração é um órgão que pode ser afetado, haja vista que possui alta celularidade, elevada taxa metabólica, assim como perfusão. Algo agravante no tecido cardíaco é sua baixa plasticidade e capacidade de recuperação de lesões. Por fim, sabe-se que a exposição em mamíferos altera a fisiologia do sistema reprodutor, danos renais e hepáticos. Aliado a necessidade de compreender os efeitos dessa molécula no organismo de mamíferos, e a importância do sistema cardíaco na fisiologia é preciso compreender o potencial cardiotoxico do CAR.

3. Objetivo

O presente estudo tem como objetivo geral investigar os efeitos cardiotoxicos do CAR administrado de forma crônica, pela via oral, na dosagem máxima de ingestão diária. Para isso, foram estudados: (1) O remodelamento estrutural do tecido cardíaco, por meio de análises morfométricas e histopatológicas do coração; (2) Avaliação funcional do coração, por medida elétrica e contrátil do órgão, isto é avaliação do eletrocardiograma, não invasivo, e pela análise em coração isolado pela técnica de Langendorff. (3) Remodelamento eletrocontrátil dos cardiomiócitos isolados, pela técnica de patch-clamp e da detecção da contração celular; (4) Investigar o papel da dinâmica de cálcio intracelular nas alterações eletrocontráteis induzidas pelo CAR.

4. Desenho experimental

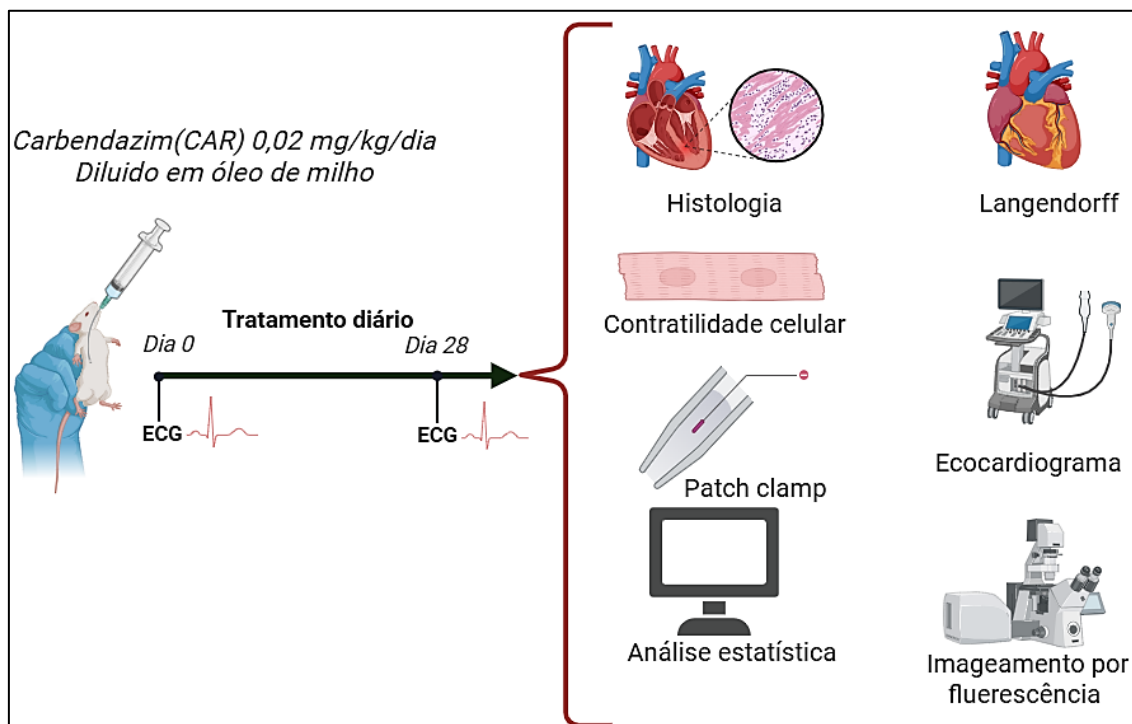


Figura 13: Protocolo experimental. Fonte: Autor, 2025

4.1 Fluxograma de experimentos

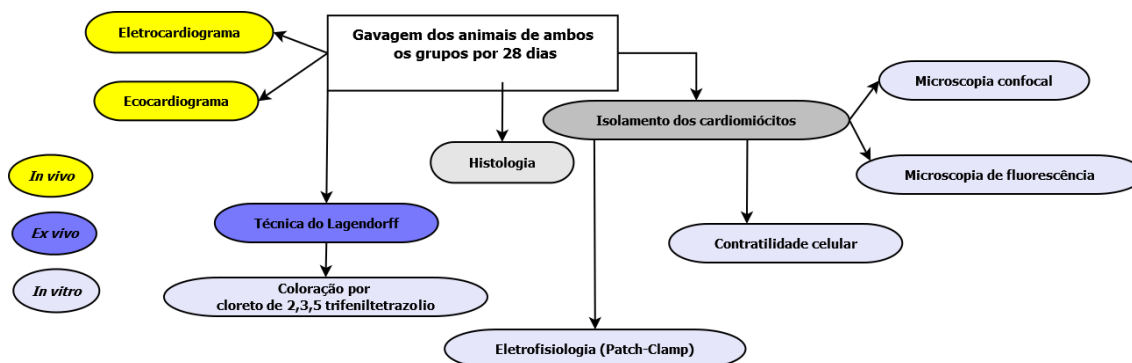


Figura 14: Fluxograma de métodos que foram empregados. Fonte: Autor, 2025

5. Métodos

5.1 Animais

Foram utilizados animais Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) entre 200-300 gramas (2 meses). Os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram acondicionados em biotério apropriado com controle de temperatura e luminosidade. Os animais receberam tratamento por gavagem por 28 dias e serão aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais: 1) grupo controle (CTR) recebeu veículo (óleo de milho - 0,15

mL/kg) por 28 dias consecutivos; 2) Grupo no qual foi administrado Carbendazim (CAR), 0,02 mg/kg/dia diluído em óleo de milho de forma que o volume final fosse, também, 0,15 mL/kg. Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) número 289/2022.

5.2 Eletrocardiograma

Os registros eletrocardiográficos (ECG) foram realizados com o eletrocardiógrafo INcardio X, da empresa Inpulse Animal Health® (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). O eletrodo amarelo foi posicionado no membro torácico esquerdo e o eletrodo verde, no membro pélvico esquerdo. Em decúbito dorsal, do lado direito, o eletrodo vermelho foi colocado no membro torácico e o eletrodo preto, no membro pélvico. Dessa maneira, o ECG pôde ser estudado em seis derivações: D1, D2, D3, aVR, aVL e AVF. Os registros foram gravados durante cinco minutos na velocidade 50mm/s e sensibilidade N. Para análise foi mensurados 5 eventos de cada animal, sempre durante a porção mais estável do registro. Durante o procedimento, as derivações periféricas foram registradas. Os animais foram sedados com 1,5% de isoflurano saturado com oxigênio. Por meio da leitura do ECG na derivação II foram avaliados o ritmo (em ms), frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm), eixo do QRS (em graus). O intervalo QT foi corrigido (QTc) pela fórmula de Hodges, que é descrita como:

$$QTc = QT + 1,75 * (FC - 60)$$

No qual, QTc é o intervalo QT corrigido (em ms); O QT é o intervalo QT medido no ECG (em ms); FC é a frequência cardíaca (em batimentos por minuto)

5.3 Ecocardiograma

Realizou-se a ecocardiografia com todos animais anestesiados com 1,5% de isoflurano saturado com oxigênio ao final do 28º dia. Foi utilizado um transdutor de alta frequência, 13 MHz. O ecocardiograma bidimensional e em modo M e ecocardi Dopplergrafia pulsátil e contínua. Ainda com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia nos hemitórax direito e esquerdo e aplicado gel aderente para melhorar a condução das ondas de ultrassom. Com o animal em decúbito lateral direito, posicionando-se o transdutor na janela ecocardiográfica paraesternal direita, localizada entre o 3º e 6º espaços intercostais (EIC) direitos, entre o esterno e a articulação costo-condral, foram obtidas as imagens do eixo-longo e do eixo-curto e realizadas as medidas ecocardiográficas. A partir do eixo-longo foram obtidas as visões quatro-câmaras e trato de saída do ventrículo esquerdo, e, quando no eixo-curto, foram observados os cortes nos níveis apical, papilar, cordal, mitral e aórtico.

As imagens foram inicialmente obtidas em modo-B, avaliando-se as relações anatômicas entre as estruturas, a contratilidade, os aspectos morfo-funcionais valvares, a presença de jatos de regurgitação com o Doppler colorido e o gradiente de pressão da valva pulmonar. O eixo curto serviu de orientação para a obtenção das imagens em modo-M, com exposição simultânea do modo bidimensional na tela. Foram medidos o átrio esquerdo e a aorta e calculada a relação átrio esquerdo/aorta (AE /Ao). Com a linha do cursor sobre o nível das cordas tendíneas, obteve-se as medidas do diâmetro ventricular esquerdo em diástole (DVED) e sístole (DVES). A partir dessas medidas obteve-se a fração de ejeção (Fej) e a fração de encurtamento (FE). Além de avaliar a distância da válvula septal mitral ao septo interventricular. Pela janela paraesternal caudal esquerda (apical), em modo bidimensional, foram observadas as relações anatômicas entre as estruturas cardíacas, os aspectos morfofuncionais valvares e a contratilidade miocárdica. Avaliou-se ainda na ecocardiografia o fluxo da valva pulmonar, fluxo da valva aórtica e a relação onda E/A da valva mitral. Todas essas e as outras medidas foram realizadas em triplicadas e realizado a média aritmética entre elas.

5.5 Técnica de Langendorff

Para avaliar a função cardíaca *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com fluxo constante (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Os animais foram eutanasiados por decapitação, os corações foram excisados e colocados em solução de Krebs-Ringer (K-R) fria (4°C), contendo, em mM: 113 NaCl, 4,7 KCl, 1,1 KH₂PO₄, 1,1 MgCl₂, 22 NaHCO₃, 11,0 glicose, 1,35 CaCl₂, pH tamponado em 7,4 com carbogênio (5% CO₂ e 95% O₂). A aorta ascendente foi canulada permitindo a perfusão retrógrada a um fluxo constante (10 ml/min). O tampão K-R será perfundido a 36,5°C. Um balão conectado a um transdutor de pressão e a um amplificador (AVS projetos, SP-Brasil) foi introduzido na câmara do ventrículo esquerdo (VE) e preenchido com H₂O para ajustar a pressão diastólica final do VE para 5 mmHg em ambos os grupos. A pressão desenvolvida pelo VE (PDVE) foi calculada subtraindo a pressão sistólica do VE pela pressão diastólica final do VE. Os corações passaram por uma hora de estabilização e análise, em seguida os corações foram submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão, no qual por 30 minutos foi realizada a isquemia global seguidos de um período de reperfusão de uma hora.

5.5 Coloração por cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio

Após o protocolo da técnica Langendorff descrito acima, os corações de ambos os grupos foram retirados do aparato. Os corações foram cortados, de modo a excluir os átrios e os ventrículos foram seccionados em 3 segmentos transversais com cerca de 10-15

milímetros cada. Nessas secções ventriculares, foi aplicado a solução com cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC), por um período aproximado de 4 minutos. O corante TTC indica viabilidade celular. Os cortes passam por um tecido absorvente, de modo a retirar o excesso de solução. Em seguida essas fatias foram fotografadas com uma lupa. As regiões das fatias dos ventrículos que tinham a cor branca ou esbranquiçada indicam ausência da coloração, por consequência, tecido isquêmico. Já as áreas das secções ventriculares com coloração rósea indicam tecido viável. As áreas isquêmicas foram demarcadas e quantificadas usando o *software* ImageJ.

5.6 Histologia

Para a análise histológica, corações e fígados foram coletados. Os tecidos foram fixados em paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, foram desidratados em banhos sequenciais de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clarificados em xilol e incluídos em parafina. Cortes transversais de 5 µm foram obtidos com um micrótomo (modelo HM335E; Microm, Inc.®, Minneapolis, MN, EUA) e corados com hematoxilina-eosina para análise morfológica. Três cortes por animal foram analisados em microscópio (Zeiss Axiovert 100M)® e avaliados utilizando o *software* ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, EUA), conforme metodologia previamente descrita (Santos-Miranda et al., 2020). A análise morfológica foi realizada com uma grade padronizada e ferramenta de contagem celular, considerando 500 pontos de interseção distribuídos em 5 imagens distintas por animal. Parâmetros quantificados – coração: cardiomiócitos, matriz extracelular, infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e artefatos. Os diâmetros dos núcleos e dos cardiomiócitos também foram mensurados.

Os parâmetros quantificados foram para o fígado: hepatócitos normais, hepatócitos anormais, infiltrado inflamatório, células ductais, vasos sanguíneos, outras células e artefatos. Os hepatócitos normais foram caracterizados por morfologia poligonal, citoplasma eosinofílico homogêneo e núcleo central com cromatina fina. Já os hepatócitos anormais apresentaram balonização, vacuolização citoplasmática, alterações nucleares (picnose, cariólise ou cariorrexe) e aumento da eosinofilia, indicando degeneração celular. Os resultados foram expressos em porcentagem.

5.7 Isolamento dos cardiomiócitos

Os experimentos apresentados neste projeto foram realizados a partir de cardiomiócitos oriundos de ambos os ventrículos, isolados de acordo com o método descrito por (Shioya, 2007), com pequenas alterações. Nesse processo, os ratos foram eutanaziados

por decapitação 10 min após serem heparinizados (100u, i.p.) e tiveram o esterno retirado para a rápida remoção do coração. Os corações removidos foram então mantidos em solução de CIB (do inglês, *cell isolation buffer*, contendo, em mM: 130 NaCl; 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂; 0,33 NaH₂PO₄; 22 glicose; 25 HEPES) isenta de cálcio pela adição de EGTA (0,4 mM), onde fez-se a limpeza dos fragmentos de pulmão, tecidos vascular e adiposo, deixando intacto apenas o tronco aórtico, através do qual os corações foram canulados e montados em um sistema de Langendorff de pressão de perfusão constante (~73 mmHg), mantidos à temperatura de 37 °C. Os corações foram então perfundidos de maneira retrógrada com CIB+EGTA por 2-5 min para a que o sangue presente no sistema das coronárias e câmaras cardíacas fosse eliminado. Após isso, o coração foi perfundido por 4-5 min com a solução CIB (sem EGTA) acrescida dos seguintes componentes: 0,3 mM de CaCl₂; 1,4 mg/mL e colagenase do tipo II; 0,09 mg/mL de proteinase tipo XXIII e 0,09 mg/mL de tripsina. Após essa etapa inicial de digestão enzimática, os corações foram seccionados, separando-se apenas os ventrículos, que foi transferido para uma segunda solução de CIB (sem EGTA), com a mesma quantidade de enzimas citadas acima, porém contendo 0,7 mM de CaCl₂, durante 7 min, mantida aquecida à 37 °C. Após leve agitação mecânica utilizando-se pipeta de transferência, o sobrenadante foi filtrado em malha de 200 µm e centrifugado a 1000 rpm por 20 segundos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em solução CIB contendo 1,3 mM de CaCl₂ e 2 mg/mL de albumina sérica bovina. Após 10 min em repouso a solução foi novamente centrifugada e o pellet foi ressuspenso em solução de Tyrode (contendo, em mM: 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5 MgCl₂; 0,33 NaH₂PO₄; 11 glicose; 5 HEPES e 1,8 CaCl₂), onde as células foram mantidas por até 5 h a temperatura ambiente, para realização dos experimentos.

5.8 Eletrofisiologia celular (*Patch-clamp*)

Cardiomiócitos provenientes dos ventrículos recém isolados também foram plaqueados e banhadas com solução de Tyrode. A placa contendo as células foi acoplada a um microscópio invertido (Axiovert 100 M, Zeiss, Alemanha). Foi utilizado um amplificador EPC 9.2 (HEKA Instruments, Germany) para a medida de correntes iônicas e potenciais transmembrana nos cardiomiócitos isolados, tendo como referência um eletrodo imerso na placa contendo as células isoladas, o qual foi conectado ao amplificador via headstage. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se as configurações *whole-cell current-clamp*, para medir potenciais de ação. As pipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 1-2 MΩ. Todas as correntes foram filtradas por meio de um filtro Bessel, passa-baixa com frequência de corte de 2.9 kHz. Células com resistência em série superiores a 8 MΩ não foram utilizadas durante as análises. Os potenciais adquiridos foram digitalizados por meio de um conversor de sinal analógico-digital e armazenadas em computador. Durante a

análise dos experimentos, os registros foram exportados em formato de texto (Igor) e convertidos para a extensão “.abf”, para então serem analisados usando-se o software Clampfit 10 (Molecular Devices, EUA). As pipetas de vidro contendo o eletrodo de estimulação foram preenchidas com solução interna contendo, em mM: 20 KCl; 130 K-aspartato; 130 KOH; 10 HEPES; 2 MgCl₂; 5 NaCl, 5 EGTA, ajustado para pH 7.2 com KOH (solução interna)

Os PAs foram obtidos a partir de um potencial de membrana livre e não clampeado (equivalente ao potencial de repouso da própria célula após a diálise da solução de pipeta com o meio intracelular), utilizando frequência de estimulação de 1 Hz e 3 Hz. Os primeiros PAs foram gravados para verificar a estabilização da forma de onda do PA, e a média dos 30 PAs consecutivos foi utilizada na análise para cada célula. A média dos desvios padrão obtidos para cada conjunto de 30 potenciais analisados foi utilizada como medida da amplitude da alternância da duração do PA. O protocolo para os potenciais foi deflagrado por meio de pulsos quadrados com amplitude de 1 nA e duração variável entre 3-5 ms. A frequência de aquisição do sinal digital foi de 10 kHz.

5.9 Contratilidade celular

Miócitos cardíacos provenientes dos ventrículos recém-isolados foram utilizados nos ensaios de contratilidade celular por detecção de bordas. Para a análise da contratilidade celular, as células foram plaqueadas em uma lamínula acoplada à uma câmara contendo um par de eletrodos paralelos, por meio dos quais foi feita a estimulação de campo para evocar a contração celular. A estimulação foi feita utilizando-se um estimulador elétrico, através de pulsos com duração de 4 ms e intensidade de 80 V bifásico com frequência de estimulação de 1 e 3 Hz. Durante os experimentos de contratilidade, as células foram mantidas em uma solução de Tyrode e em temperatura ambiente (25-30 °C). A câmara contém as células plaqueadas foi montada em um microscópio invertido (Eclipse, TS 100, Nikon, Japão), e as imagens foram visualizadas em um computador utilizando uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, USA). Estas imagens foram utilizadas para mensurar o encurtamento celular em resposta a um estímulo elétrico usando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA) previamente calibrado para a objetiva utilizada. As variáveis envolvendo a contração e relaxamento da célula foram calculados baseando-se no sinal digitalizado obtido pelo sistema de detecção de bordas do conversor analógico-digital IonWizard A/D (Ionoptix, Milton, MA, USA). Entre 5-10 contrações consecutivas foram utilizadas para realizar a média de contração de uma determinada célula.

5.10 Microscopia confocal

Para imagear os transientes de $[Ca^{2+}]_i$, cardiomiócitos foram carregados com Fluo-4 acetoximetil (AM) por 30 minutos (20–25 °C) a 5 μ M em solução de Tyrode. Após o carregamento, as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução de Tyrode. As imagens dos transientes de cálcio foram adquiridas utilizando um microscópio confocal LSM 880 ZEISS (Carl Zeiss, Alemanha) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI - ICB - UFMG). Durante os registros, os cardiomiócitos foram estimulados no campo a 1 Hz, com pulsos bifásicos de 4 ms de duração e 60 V. A excitação do fluoróforo foi realizada por um laser de argônio (488 nm). A luz emitida foi filtrada por um filtro de passagem longa (505 nm) e coletada por um tubo fotomultiplicador. A linha de varredura (ajustada para 512 pixels) foi posicionada ao longo do eixo transversal, evitando regiões nucleares. A resolução espacial variou de 0,1 a 0,3 μ m por pixel, e a resolução temporal utilizada foi de 1,62 ms por linha. Os transientes de Ca^{2+} foram analisados pela média do sinal de Fluo-4 ao longo de toda a largura da célula, e são apresentados como fluorescência normalizada com subtração de fundo (F/F_0). O atraso da liberação de Ca^{2+} e outros parâmetros de sinalização de Ca^{2+} ao longo do eixo transversal do cardiomiócito foram avaliados utilizando um script em Python desenvolvido sob medida, quantificando o tempo até a fluorescência máxima pela metade (TTF50) para cada pixel.

5.11 Microscopia de fluorescência

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são importantes sinalizadores intracelulares. Dessa forma, cardiomiócitos recém-isolados foram carregados com as sondas correspondentes: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato para avaliação da produção de óxido nítrico (DAF-FM 5 μ M, incubados por 25 minutos à temperatura ambiente). DAF-FM é essencialmente não fluorescente até que reaja com óxido nítrico (NO) para formar um benzotriazol fluorescente, sua emissão é na faixa de 495 nm e a emissão no 515 nm, sendo representado na cor verde. Já o dihidroetídio (DHE) foi usado para avaliação da produção total de ânions superóxido (5 μ M, incubado por 25 minutos a 37 °C). O DHE é capaz de penetrar livremente nas células e, na presença do O_2 , sofre oxidação a etídio, composto que, ao intercalar-se ao DNA das células, pode emitir fluorescência. O DHE foi excitado a um comprimento de onda de 535 nm e apresentou um espectro de emissão em 610 nm, sendo sua fluorescência visualizada, em microscopia, na cor vermelha. Todos os carregamentos foram realizados protegidos da luz e sob agitação suave. Após o carregamento, as células foram centrifugadas (1000 rpm por 30 segundos) e banhadas em solução de Tyrode. As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti que utiliza filtros tanto de excitação, utilizando o sistema de

iluminação Lambda DG-4 (Sutter Instrument, USA), quanto de emissão utilizando o sistema Lambda 10-B (Sutter Instrument, USA). Todas as imagens registradas foram analisadas no software ImageJ. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente.

5.12 Análises estatísticas

Resultados produzidos foram analisados através dos métodos estatísticos do Teste T de Student ou teste de Mann-Whitney, para amostras paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Para análises de múltiplos parâmetros, foi usado o teste *two-way* ANOVA. Para análise de normalidade foi usado o teste de Shapiro-Wilk. Para análises de imagens foi utilizado o software aberto ImageJ para análise das imagens, Clampfit para a análise eletrofisiológica, Graph Pad Prism 8.0.1 para confecção dos gráficos e para os ajustes das curvas. Dados apresentados com média \pm desvio padrão da média. A diferença foi considerada significativa quando a comparação resultou em um valor de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Eletrocardiograma

Os animais expostos ao pesticida e sua contraparte que consumiu apenas o veículo tiveram realizaram o eletrocardiograma. Realizamos o exame após 28 dias de tratamento oral por gavagem dos animais. Nos exames analisados, em ambos os grupos, não foram observadas arritmias ou bloqueios de condução visíveis. Além disso, o ritmo encontrado foi sinusal associado com traçados atrioventriculares.

Na figura 14 observamos o registro representativo do ECG. Em relação à duração (ms) das ondas no eletrocardiograma, não houve alterações significativas na Onda P (gráfico A) dos animais CTR ($31,19 \pm 6,729$) e CAR ($36,45 \pm 5,361$), com o valor de p igual a 0,0673. Assim como para o complexo QRS (gráfico B) dos CTR ($36,91 \pm 5,372$) e CAR ($37,97 \pm 3,077$), com valor de p igual a 0,6028.

Sobre a frequência cardíaca, FC (gráfico C), também não houve diferença estatística significativa, entre o grupo CTR ($386,7 \pm 77,35$) e o CAR ($392,1 \pm 29,20$), com valor de p igual a 0,8751. Ao corrigir o valor do intervalo QT pela fórmula de Hodges, temos o intervalo QTc (gráfico D) do grupo CTR ($626,8 \pm 135,0$) e do CAR ($642,0 \pm 52,56$), com valor de p igual a 0,8039. Em sequência, analisamos o intervalo PR (gráfico E), não houve alteração entre os grupos CTR ($43,36 \pm 4,437$) e o grupo CAR ($44,29 \pm 3,731$), com valor de p igual a 0,5912.

Por fim, ao observar o eixo do complexo QRS (gráfico F) apresentando o grupo CTR ($22,33\pm 43,47$) e CAR ($40,38\pm 36,60$), com valor de p igual a 0,2949. Assim, nota-se que a exposição ao CAR apresentou uma alteração branda no exame de ECG.

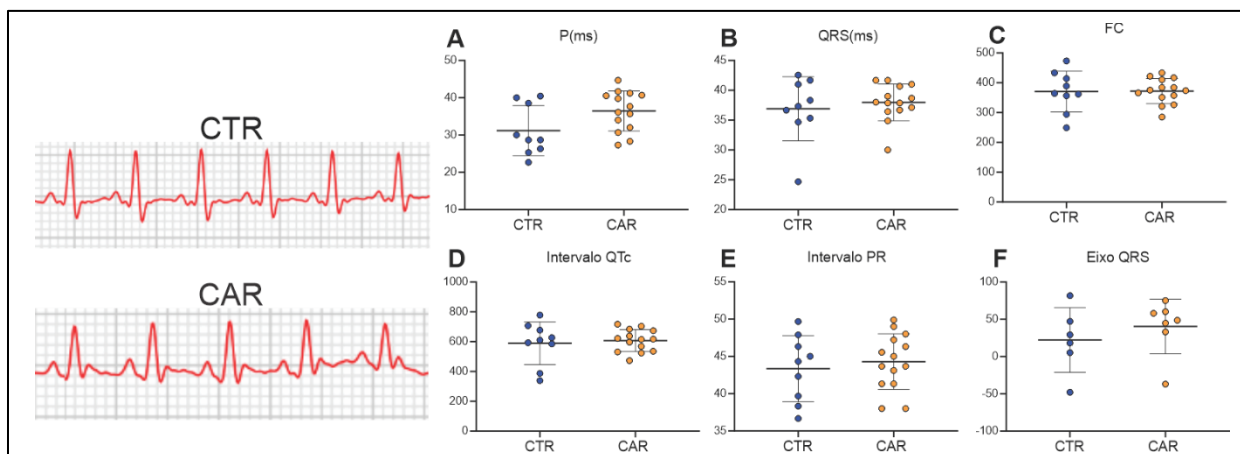


Figura14: Resultados do eletrocardiograma. Cada ponto foi extraído de medidas lidas na derivação II, sendo a média de 5 eventos de cada animal, seja controle (pontos azuis) e tratados na dose de 0,02 mg/kg de peso corporal/ dia com carbendazim por 28 dias (pontos laranjas). (A) Onda P em ms, $p=0,0673$; (B) Complexo QRS em ms, $p=0,6028$; (C) Frequência cardíaca, em batimentos por minuto (bpm), $p=0,8751$; (D) Intervalo QTc, corrigido pela fórmula de Hodges, $p=0,8039$; (E) Intervalo PR, em ms, $p=0,5912$; (F) Eixo QRS, em graus, $p=0,2949$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR, valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

5.2 Ecocardiograma

Além do ECG, outro exame que fornece informações rápidas e precisas sobre o quadro de funcionamento hemodinâmico é o ecocardiograma, como visto na figura 15. Nesse contexto, os parâmetros funcionais do órgão como fração de encurtamento e fração de ejeção foram avaliados, no qual não houveram diferenças estatísticas. Seja para a fração de encurtamento (gráfico A) do grupo CTR ($37,40\pm 0,8944$) e o grupo CAR ($36,71\pm 1,380$), com valor de p igual a 0,4823. Assim como a fração de ejeção (gráfico B) do CTR ($73,80\pm 1,095$) e o CAR ($72,00\pm 2,000$), com valor de p igual a 0,1376. Em relação à atividade de ejeção, foi observado o fluxo pulmonar (gráfico C), sem alteração entre CTR ($0,7140\pm 0,04278$) e o CAR ($0,7100\pm 0,02828$), com valor de p igual a 0,8608. Também não foi observada alteração no fluxo aórtico (gráfico D) entre CTR ($0,8760\pm 0,02702$) e o CAR ($0,8457\pm 0,01813$).

Outro fator de atividade cardíaca é a estimativa de enchimento do ventrículo esquerdo. O parâmetro usado foi fluxo transmitral, ou seja, a razão entre a velocidade de enchimento precoce atrial E, e a velocidade de enchimento tardio, contração atrial, A. Houve aumento na Onda E (gráfico E) mitral no grupo tratado CAR ($0,9314\pm 0,01864$) em relação ao CTR ($0,5960\pm 0,03050$). Assim como houve aumento na Onda A (gráfico F) mitral do grupo CAR ($1,069\pm 0,03388$) em relação ao CTR ($0,4760\pm 0,02302$). Em ambos os

parâmetros o valor de p foi $<0,0001$. Ao avaliar a relação Onda E/A (gráfico G), nota-se redução no grupo tratado CAR ($0,8679 \pm 0,03264$) e CTR ($1,250 \pm 0,1168$), com valor de p igual a $0,0025$.

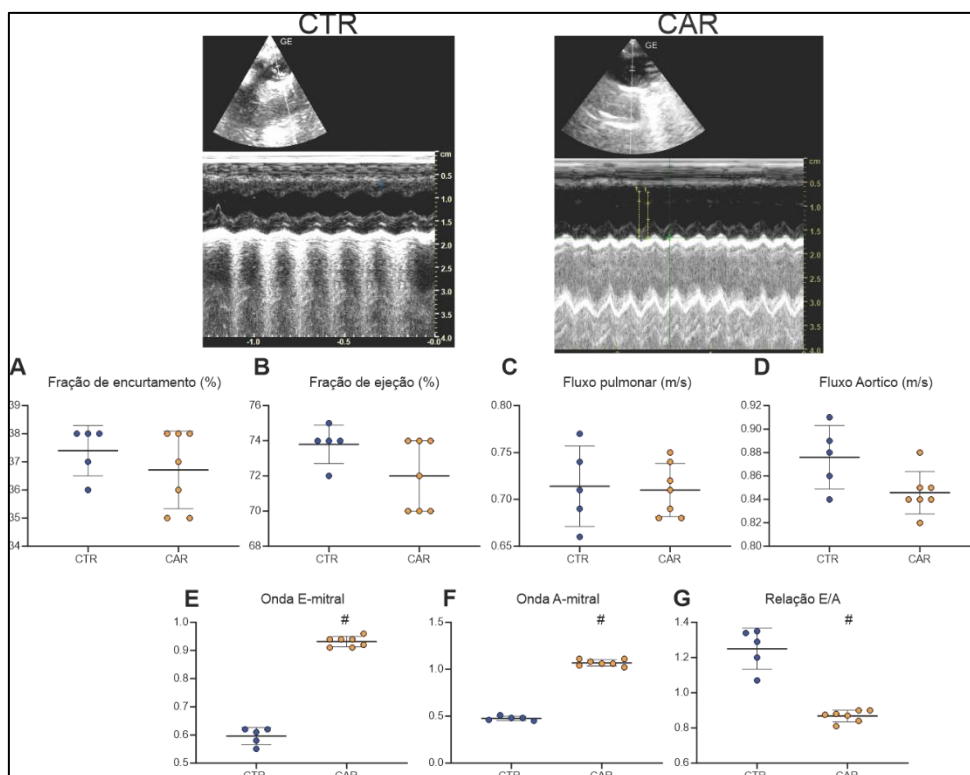


Figura 15: Parâmetros ecocardiográficos dos animais. Cada ponto foi extraído de um animal. (A) Fração de encurtamento (%), $p=0,4823$; (B) Fração de ejeção (%), $p=0,1376$; (C) Fluxo pulmonar (m/s), $p=0,8608$; (D) Fluxo aórtico (m/s), $p=0,0683$; (E) Onda E-Mitral (a.u), $p<0,0001$; (F) Onda-A-Mitral (a.u), $p<0,0001$; (G) Relação Onda E/A (a.u), $p= 0,0025$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

5.3 Técnica de Langendorff

A técnica do coração isolado permite avaliação da função contrátil do órgão sem o estímulo do sistema autônomo. O protocolo para esse experimento tem uma hora de tempo de estabilização, parada de meia hora da perfusão de solução nutritiva, mimetizando uma isquemia global, seguida de uma hora de reperfusão. Na figura 16, observa-se que há uma diferença na pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP, *em inglês*), em que há queda na reperfusão após a isquemia induzida no grupo CAR ($24,14 \pm 17,22$) e o CTR ($28,55 \pm 18,84$). No que tange a dP/dt_{max} (mmHg/s), representa a contratilidade do órgão, o resultado segue o mesmo padrão, queda no grupo CAR ($284,2 \pm 290,6$) em relação ao CTR ($380,5 \pm 314,1$), assim como na dP/dt_{min} (mmHg/s), na qual reflete o relaxamento do coração,

em que há menor relaxamento após isquemia do grupo CAR (-217,3±219,5) e o CTR (-275,2±242,6).

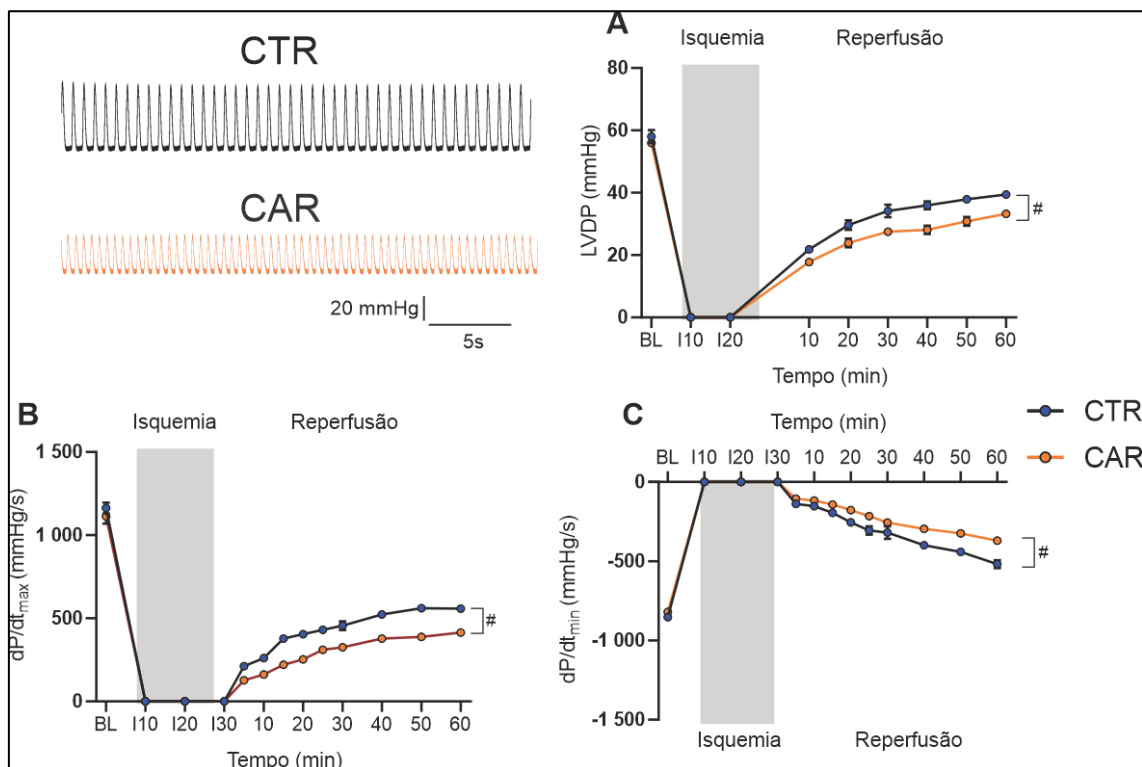


Figura 16: Técnica do coração isolado por Langendorff com protocolo de isquemia global. Imagens representativas do Langendorff após a isquemia. Cada ponto foi extraído de corações do grupo CTR (n=4) e CAR (n=6) ao longo do tempo descrito. (A) LVDP (mmHg), $p < 0,0001$; (B) dP/dt_{max} (mmHg/s), $p < 0,0001$; (C) dP/dt_{min} (mmHg/s), $p < 0,0001$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR, valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$, 2way ANOVA

5.4 Coloração por cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio

Após os experimentos de Langendorff os corações foram coletados e fatiados, devidamente corados e a área de isquemia quantificada. A área que sofreu danos após o evento induzido indica modulação na sensibilidade de cada grupo ao evento isquêmico. Na figura 17, observe-se que há maior porcentagem de área infartada no grupo CAR (21,17±1,721) em relação ao CTR (15,74±2,097).

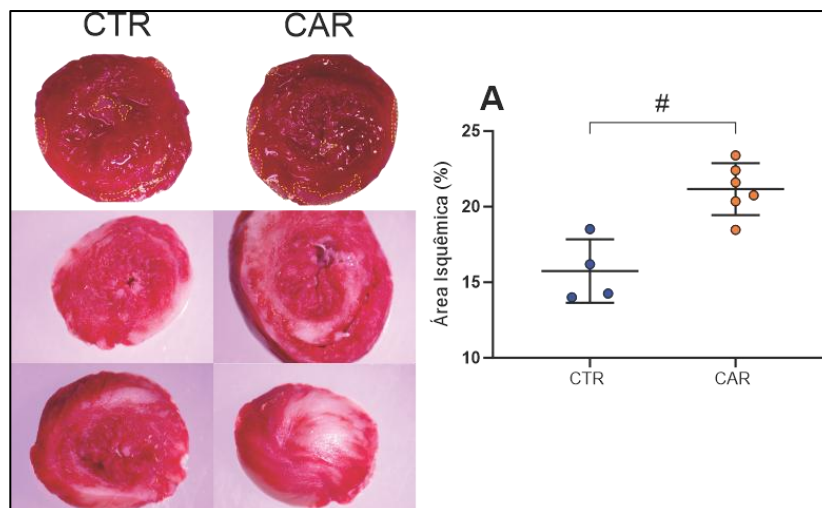


Figura 17: Coloração do tecido para avaliação de área isquêmica. Cada ponto foi extraído de um animal. (4a) fotos representativas de fatias do coração após método Langendorff. (A) Área isquêmica (%), $p=0,0059$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR, valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test

5.5 Histologia

Após o ECG, outro método bastante utilizado é a histologia para avaliar parâmetros morfológicos e alterações transitórias, como infiltrado inflamatório. Assim, o tecido foi coletado, fixado, fatiado e corado. No que tange a esses parâmetros, na figura 18, nota-se que não houve diferença entre os grupos. Na porcentagem de ocupância de cardiomiócitos (gráfico A), nos quadrantes medidos, não foi observada alteração entre os CTR ($97,70 \pm 1,435$) e o grupo CAR ($95,05 \pm 2,069$). Em relação à vascularização do tecido (gráfico B), também não houve diferença estatística entre eles, CTR ($0,5563 \pm 0,3649$), assim como diâmetro do núcleo (gráfico C), CTR ($3,500 \pm 0,3504$) e o CAR ($3,586 \pm 0,4164$). Também não houve alteração na matriz extracelular (gráfico D), CTR ($1,509 \pm 1,221$) e o CAR ($3,712 \pm 1,405$), assim como o infiltrado inflamatório (gráfico F), CTR ($0,07937 \pm 0,1375$) e o CAR ($0,09569 \pm 0,2140$), e o diâmetro do cardiomiócito (gráfico E), CTR ($6,432 \pm 0,8625$) e o CAR ($6,016 \pm 1,708$).

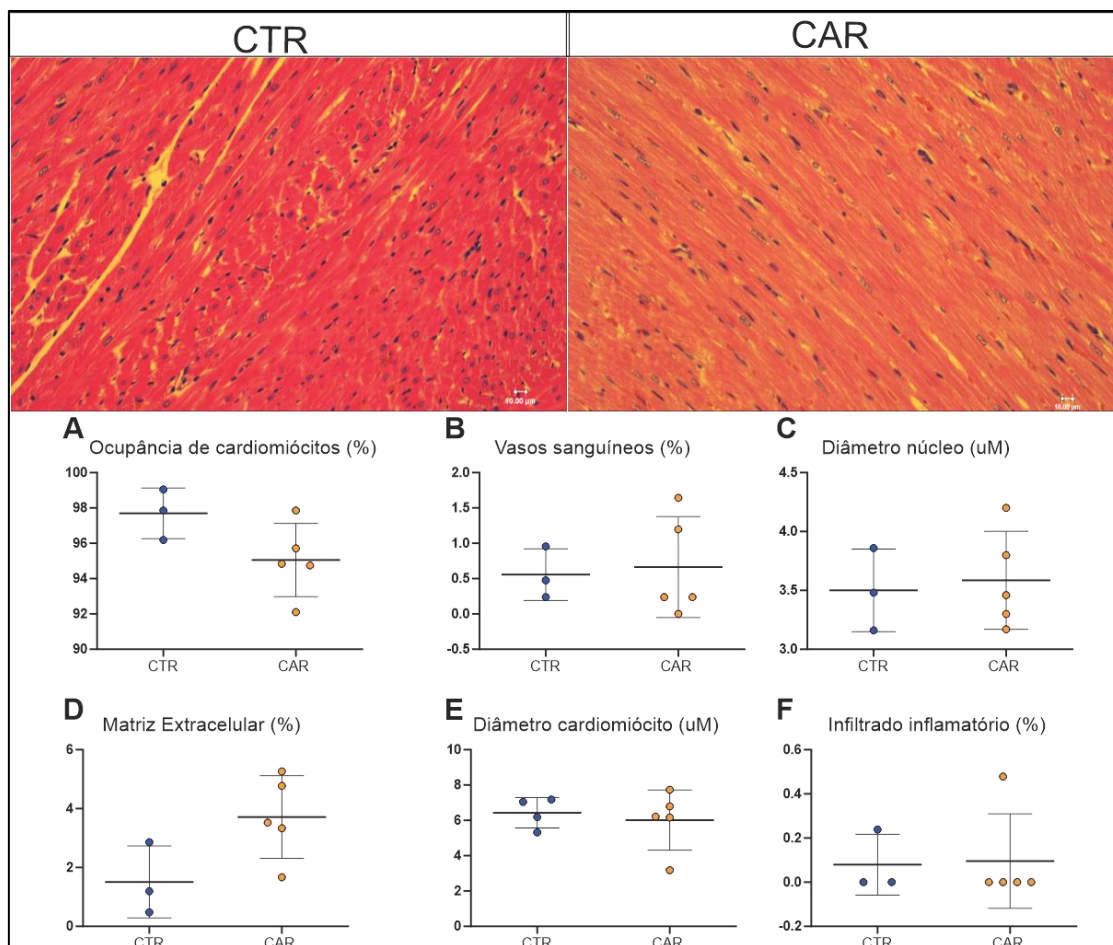


Figura 15: Parâmetros histológicos do coração. O tecido cardíaco do grupo CTR não apresenta alterações histopatológicas aparentes à microscopia óptica. No grupo CAR, não são observados sinais de infiltração inflamatória. Cada ponto foi extraído de um animal. (A) Imagens representativas das lâminas dos corações dos grupos experimentais coradas com hematoxilina-eosina; (B) Ocupância de cardiomiócitos (%), $p= 0,0799$; (C) Vasos sanguíneos (%), $p= 0,7895$; (C) Diâmetro do núcleo (uM), $p= 0,7670$; (D) Matrix extracelular (%), $p= 0,0682$; (E) Diâmetro dos cardiomiócitos (uM), $p= 0,6520$; (F) Infiltrado Inflamatório (%), $p= 0,8999$. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

Danos no fígado são um dos desafios para a saúde. Vários fatores causam danos ao tecido, como álcool, poluentes químicos e drogas. Ao considerar a importância desse tecido para a metabolização de xebióticos foi analisado sua estruturação histológica.

Na imagem 19, análise morfométrica foi feita, primeiramente a quantidade de hepatócitos normais (gráfico A), na qual não foi observada diferença entre o grupo CTR ($93,66 \pm 4,349$) e o grupo CAR ($86,76 \pm 3,310$). Assim como a porcentagem de hepatócitos degradados (gráfico B) entre o CTR ($3,379 \pm 5,244$) e o CAR ($5,627 \pm 4,708$) não apresentaram alteração. Assim como no coração, avaliar o infiltrado inflamatório (Gráfico C) é algo de suma importância para averiguar a integridade do tecido. Observa-se que houve diferença significativa entre o grupo CTR ($0,06667 \pm 0,1155$) e o CAR ($1,857 \pm 0,5010$). Assim como as células ductais (gráfico D), no qual o grupo CAR ($1,865 \pm 1,091$) apresentou maior

porcentagem em relação ao grupo CTR ($0,3194 \pm 0,2766$). Aliado a isso, houve vascularização (gráfico E) no grupo CAR ($1,871 \pm 0,1204$) em relação ao CTR ($0,5632 \pm 0,1398$). Outros agrupamentos celulares (gráfico F) não tiveram alteração em frente ao tratamento, CTR ($1,760 \pm 0,4936$) e CAR ($3,396 \pm 1,354$).

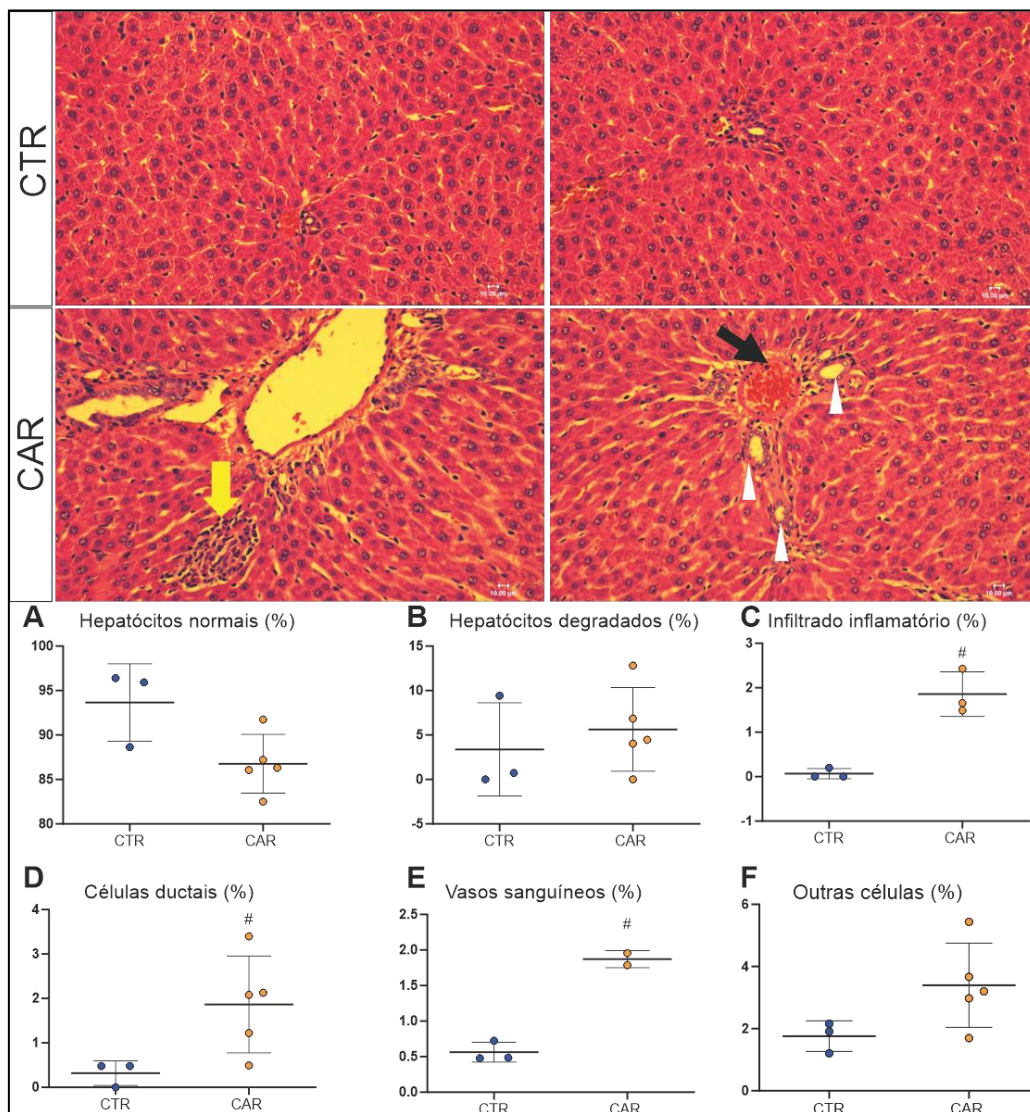


Figura 16: Parâmetros histológicos do fígado. O tecido hepático do grupo CTR não apresenta alterações histopatológicas aparentes ao microscópio óptico. No grupo CAR, observa-se infiltração inflamatória por células mononucleares (setas amarelas) e proliferação de células ductais (setas com cabeça branca). Também é evidente a congestão vascular (setas pretas), acompanhada por fibroblastos perivascularares. Cada ponto foi extraído de um animal. (6a) Imagem representativa de cortes histológicos do fígado de animais do grupo CTR e CAR; (6b) Hepatócitos degradados (%), $p = 0,5755$; (6c) Outros tipos celulares (%), $p = 0,0543$; (6d) Hepatócitos normais (%), $p = 0,0881$; (6e) Células ductais (%), $p = 0,0357$; (6f) Infiltrado Inflamatório (%), $p = 0,0207$; (6g) Vasos sanguíneos (%), $p = 0,0030$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

5.6 Eletrofisiologia celular (*Patch-clamp*)

O exame de ECG demonstrou normalidade nos parâmetros, porém, alterações sutis poderiam ser ignoradas por não serem detectáveis. Diante disso, buscamos investigar a participação elétrica a nível celular dos cardiomiócitos dos animais. Avaliamos o potencial de ação (PA) de cardiomiócitos do ventrículo isolados, já que ele representa o somatório dos componentes iônicos responsáveis pelo controle da excitabilidade dessa célula.

Na figura 20 observamos os traçados representativos do PA, em azul o traçado do grupo controle e laranja o traçado do grupo CAR. Observamos que em relação à amplitude (gráfico A) do PA o grupo CTR ($118,3 \pm 2,283$) e o CAR ($118,8 \pm 3,739$) não tiveram diferença. Assim como a máxima taxa de despolarização (gráfico B), no qual o CTR ($172,4 \pm 58,72$) e o CAR ($201,9 \pm 50,21$). Outra medida em que não houve alteração é o potencial de repouso da membrana em mV (gráfico C), o CTR ($-64,42 \pm 2,687$) e o CAR ($-63,12 \pm 3,372$). Em contrapartida, o PA apresentou atraso na repolarização, nas porções média e final, 50% e 90%, respectivamente. Para 50% da repolarização (gráfico D) em ms, o CTR ($13,57 \pm 7,883$) e o CAR ($23,30 \pm 11,37$). Para 90% de repolarização (gráfico E) em ms, o grupo CTR ($50,85 \pm 30,62$) e CAR ($133,4 \pm 64,35$).

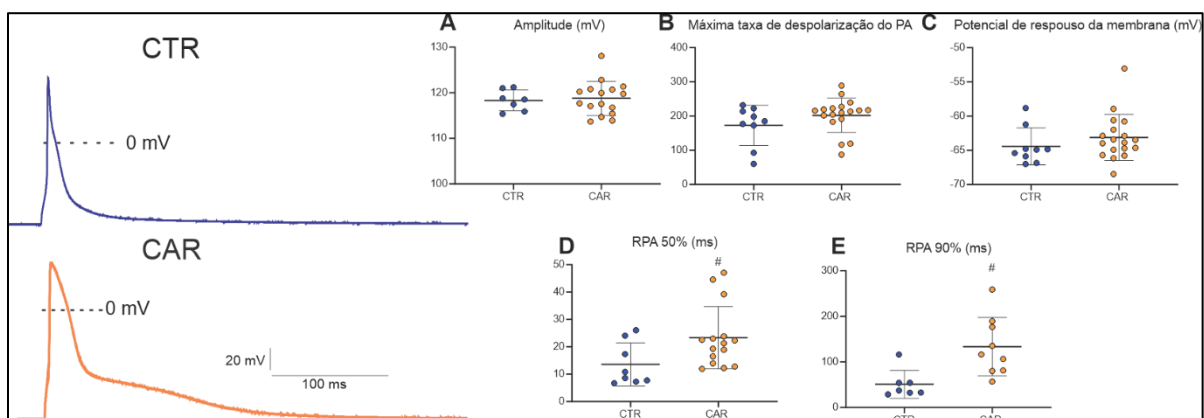


Figura 17: Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos dos ventrículos. Cada ponto foi extraído de uma célula isolada. (A) Amplitude do PA, em mV, $p=0,9740$; (B) Máxima taxa de despolarização do PA, em mV/s, $p=0,1763$; (C) Potencial de repouso da membrana, em mV, $p=0,1763$; (D) Repolarização do PA em 50%, em ms, $p=0,0473$; (E) Repolarização do PA em 90%, em ms, $p=0,0021$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

5.7 Contratilidade celular

Intoxicações e doenças cardíacas podem progredir para a insuficiência cardíaca, quadro intimamente ligado às propriedades mecânicas dos cardiomiócitos. Assim, ao

analisar a contratilidade celular em 1 Hz (figura 21), mimetizando a frequência de 60 batimentos por minuto (bpm), constatamos uma preservação da fração de encurtamento (gráfico A) no grupo CAR ($9,350 \pm 3,140$) em relação ao grupo CTR ($10,45 \pm 3,245$). Assim como não foi observada diferença no tempo para 50% da contração (figura 21, gráfico B), no qual o grupo CTR ($42,92 \pm 9,729$) e o CAR ($45,70 \pm 9,967$), e tempo para 50% do relaxamento (figura 21, gráfico C) em que o grupo CTR ($305,6 \pm 67,73$) e o CAR ($279,2 \pm 73,58$).

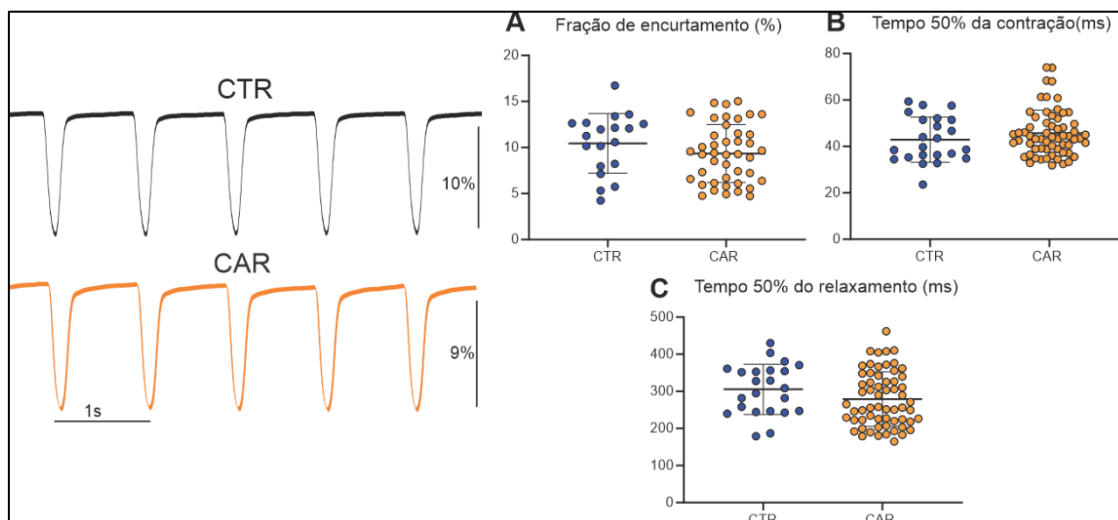


Figura 18: Propriedades contráteis dos cardiomiócitos. Cada ponto foi extraído de uma célula isolada. Traçados representativos de uma sequência de 5 eventos de contração celular em animais do grupo CTR e CAR na frequência de 1 Hz. (A) fração de encurtamento celular, em porcentagem, $p=0,2234$; (B) Tempo para 50% da contração, em ms, $p=0,3225$; (C) Tempo para 50% do relaxamento, em ms, $p=0,1230$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

Outro fator que contribui para disfunções cardiovasculares é a frequência cardíaca. Aumento da frequência de batimentos permite averiguar o papel do sistema adrenérgico e possíveis complicações que só aparecem em situações de estresse. Logo, avaliamos a contratilidade dos cardiomiócitos em 3 Hz, mimetizando uma taquicardia ventricular de 180 bpm. Assim como em 1 Hz, observamos a preservação da fração de encurtamento (gráfico A, %) no grupo CAR ($8,822 \pm 2,708$) em relação ao CTR ($9,696 \pm 2,592$). Como foi preservado o tempo para 50% da contração (gráfico B) no grupo CAR ($31,81 \pm 7,807$) em relação ao CTR ($32,54 \pm 8,028$), assim como, também, o tempo para 50% do relaxamento (gráfico C) foi preservado no grupo CAR ($215,7 \pm 36,54$) em relação ao CTR ($224,6 \pm 34,90$).

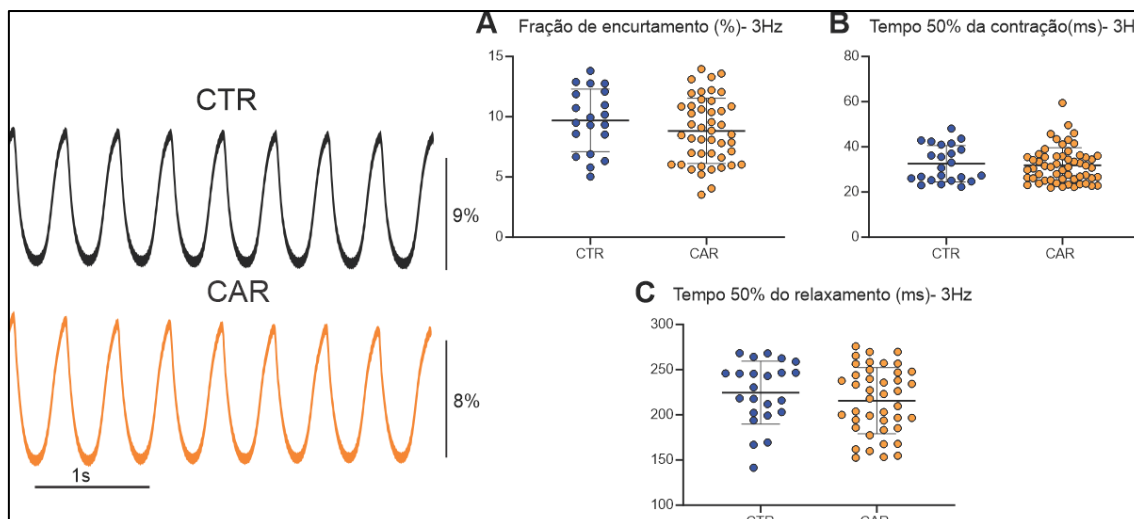


Figura 19: Propriedades contráteis dos cardiomiócitos em 3 Hz. Cada ponto foi extraído de uma célula isolada. Traçados representativos de uma sequência de 8 eventos de contração celular em animais do grupo CTR e CAR na frequência de 3 Hz. (A) fração de encurtamento celular, em porcentagem, $p=0,2235$; (B) Tempo para 50% da contração, em ms, $p=0,6867$; (C) Tempo para 50% do relaxamento, em ms, $p=0,3225$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

5.8 Manejo intracelular de cálcio

O manejo intracelular de cálcio é de extrema importância para o funcionamento do aparato contrátil do órgão e célula, uma vez que esse íon participa do acoplamento entre a excitação celular e sua contração. Desse modo, na figura 23, nota-se que a dinâmica intracelular não foi alterada pelo CAR; além disso, não foram observadas *sparks* de cálcio nas imagens obtidas. Na figura 23 a amplitude de fluorescência, F/F_0 (gráfico A), unidade arbitrária, o grupo CTR ($4,124 \pm 2,559$) não teve diferença estatística com o grupo CAR ($4,474 \pm 1,567$). Outro aspecto no manejo de cálcio intracelular é o tempo para liberação de cálcio dos estoques, associado ao acoplamento dos canais de rianodina e sua abertura sincronizada. Uma medida indireta é pelo tempo, em ms, de 10%-90% de elevação do transiente (gráfico B). Como observado, não houve alteração entre o grupo CTR ($24,02 \pm 10,74$) e o CAR ($19,06 \pm 2,835$). Um componente fundamental para a extrusão de cálcio citoplasmático é Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA), sua atividade pode ser indiretamente medida pelo tempo para 50% do decaimento (gráfico C), em ms. Também não houve alteração entre o grupo CTR ($145,7 \pm 47,78$) e o grupo CAR ($156,2 \pm 59,28$).

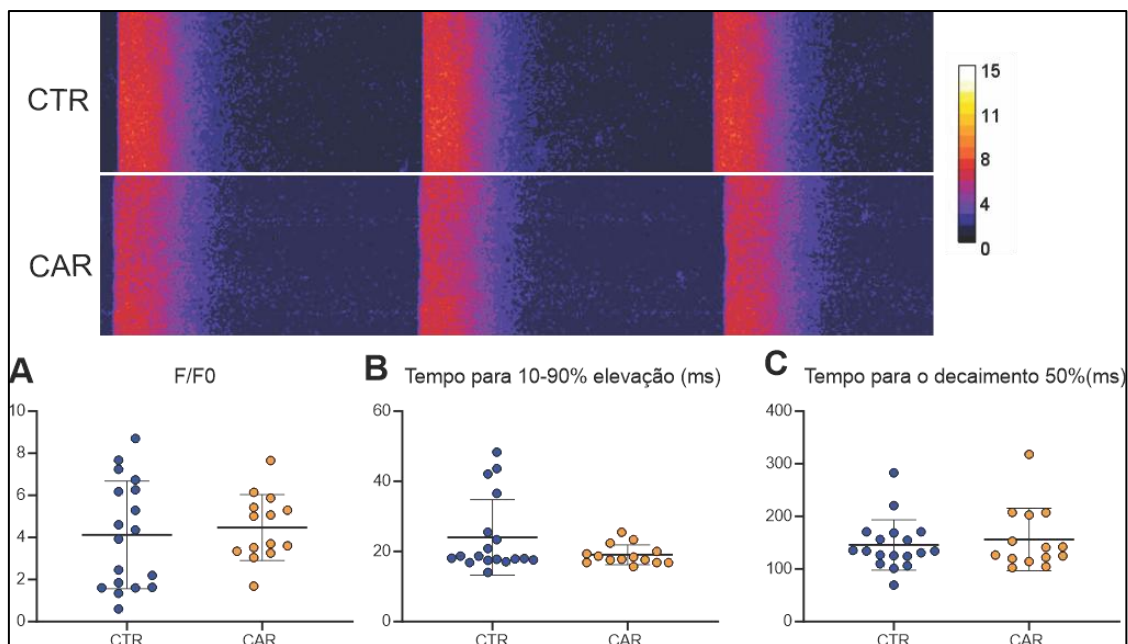


Figura 20: Manejo do cálcio intracelular. Cada ponto foi extraído de uma célula isolada. Registros representativos de uma sequência de 3 eventos de transiente de cálcio. (A) Amplitude de fluorescência(F/F₀), unidade arbitrária, $p=0,6372$; (B) Tempo para 10%-90% elevação, em ms, $p=0,3227$; (C) Tempo para o decaimento de 50%, em ms, $p=0,9999$. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média (SD). # comparando CAR com o grupo CTR. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras paramétricas foi utilizado o teste Welch's t test, para não paramétricas Mann-Whitey.

5.9 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Além da dinâmica intracelular de cálcio, avaliou-se a produção basal de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Essas moléculas possuem papel na sinalização contrátil dos cardiomiócitos assim como sinalizador da saúde metabólica celular. Diante disso, cardiomiócitos isolados foram incubados com sondas fluorescentes para espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, DHE e DAF, respectivamente. Ao averiguar, como observado na figura 24, nota-se que não há diferença estatística entre o grupo CTR ($940,8 \pm 322,7$) e CAR (1671 ± 1017) para a marcação DAF (gráfico A). Para a marcação de DHE (gráfico B) não houve diferença entre grupos, no qual o grupo CTR (1851 ± 1092) e o CAR ($1437 \pm 718,7$).

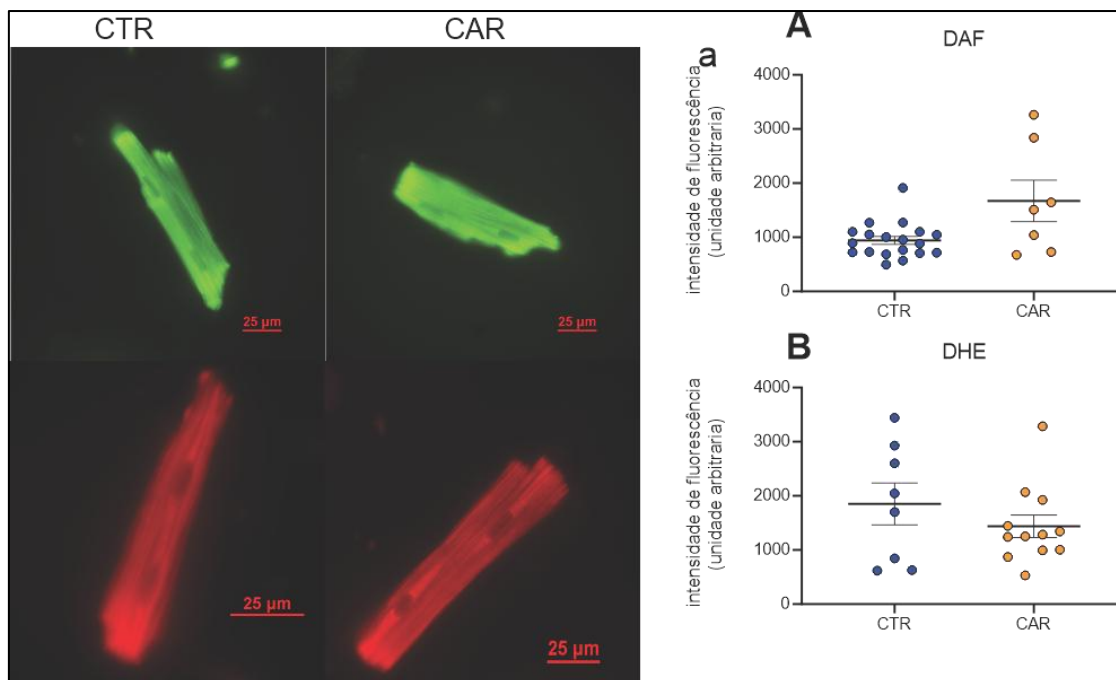


Figura 21: Produção de óxido nítrico e produção global de espécies reativas de oxigênio. Cada ponto foi extraído de uma célula isolada. Figura representativa de cardiomiócitos isolados marcados com a sonda fluorescente. (A) Média da intensidade de fluorescência DAF (unidade arbitrária), $p=0,1204$. (B) Média da intensidade de fluorescência DHE (unidade arbitrária), $p=0,5714$. Valores considerados significativos caso valor de $p < 0,05$. Teste de normalidade usado foi Shapiro-Wilk, para amostras não paramétricas foi utilizado o teste Mann-Whitey.

7. Discussão

O presente estudo investigou os efeitos do fungicida carbendazim no coração, após administração oral e crônica em ratos Wistar machos. Os resultados demonstram alterações discretas dos parâmetros analisados, tanto da função cardíaca *in vivo*, como também elétricas a nível celular no cardiomiócito isolado. Nesse sentido, os animais apresentaram disfunção diastólica inicial confirmada com o ecocardiograma. O exame de ECG é, na média, bastante semelhante entre os grupos experimentais. A nível celular, as medidas de contratilidade, transiente de cálcio e espécies reativas são similares entre os grupos, ainda que o tratamento com o CAR induza um atraso na repolarização do PA ventricular.

7.1 Eletrocardiograma

O exame de ECG é barato, de fácil acesso e não invasivo, que possibilita avaliar de forma rápida e segura a saúde cardíaca, particularmente em relação à atividade elétrica. O ritmo fisiológico de contração do coração, quando sinusal, foi determinado no ECG pelas Ondas P positivas nas derivações D1, D2 e aVF, e negativa em aVR (Samesima et al., 2022). Como foi observado, o CAR não alterou a duração da onda. Não obstante, o formato da

onda P não varia significativamente entre batimentos de um mesmo animal, sugerindo uma mesma origem (ausência de marcapasso migratório). Assim como outros parâmetros de importante avaliação clínica não foram alterados, o intervalo PR e segmento PR. Esses parâmetros representam a propagação da despolarização atrial, atraso fisiológico na junção atrioventricular e no sistema de feixes de His e fibras de Purkinje, para os ventrículos, indicando possíveis bloqueios. Dado que em todos os animais observou-se a associação completa entre as ondas P e complexos QRS, sem alterações do intervalo PR e segmento PR, destacamos que, em nosso modelo de exposição na dose subclínica por via oral durante 28 dias, o CAR não induz bloqueios de condução atrioventriculares.

No plano frontal, os limites normais do eixo elétrico situam-se entre -30° e $+90^\circ$ (Samesima et al., 2022). Em relação à sua forma, mono ou polimórficas, não foram observadas mudanças ao longo do exame, assim como eventos arrítmicos ventriculares ou extrassístoles ventriculares. Alterações de eixo elétrico médio do complexo QRS podem indicar tanto alterações elétricas, como os bloqueios de condução no sistema de condução ventricular, como também podem indicar alterações estruturais/hemodinâmicas cardíacas, como hipertrofias ventriculares. Na ausência de achados significativos dessas alterações no ecocardiograma, podemos concluir que o tratamento com o CAR em nosso modelo não provoca alterações no sistema de condução ventricular. Esse dado é corroborado pela duração do complexo QRS, comparável entre os grupos, bem como pelo fato de não haver mudanças na amplitude do complexo.

Para a onda T, é importante ressaltar que alterações podem ocorrer em decorrência de situações diversas, muitas vezes sem repercussões clínicas significativas. Por exemplo, a onda T apiculada e com aumento de amplitude são indicativos de hipercalemia. Em nosso modelo não foram observadas patologias da onda T. Associado a isso, a literatura carece de estudos que demonstrem pesticidas da classe dos benzimidazóis ou carbamatos alteram o balanço hidroeletrólítico em animais.

O intervalo QT, do início da despolarização ao final da repolarização ventricular atua como uma visão total da duração da atividade elétrica. Em ratos, geralmente medido no começo da onda R, devido à dificuldade de medir a onda Q (Konopelski; Ufnal, 2016). Devido ao fato de que sua duração é fortemente influenciada pela frequência cardíaca, usualmente são aplicadas correções matemáticas obtidas de dados de correlação entre a duração do intervalo medida e a frequência cardíaca. Diversas estratégias de correção são melhores ou piores empregadas para corrigir o QT, a depender da espécie, das condições patológicas associadas, da idade, etc. O intervalo QT corrigido (QTc) foi obtido pela fórmula de Hodges (Botelho et al., 2019). Assim como a onda T, diversos fatores podem causar alteração de sua duração, incluindo distúrbios hidroeletrólíticos, alterações da função de canais iônicos e

coronariopatas podem alterar o intervalo QT. Fisiologicamente já é bem estabelecido que esse intervalo é modulado pela frequência cardíaca, desse modo é preciso corrigi-lo. Diversas drogas e pesticidas já foram relatados com a capacidade de alterar o QTc, alterando a atividade ventricular (Król et al., 2016; Siu et al., 2000; Taira; Aoyama; Kawamata, 2006). No modelo de exposição crônica ao CAR não houve mudança, isso indica que a propagação de sinal elétrico no órgão não foi comprometida pelo pesticida.

Para avaliação de arritmias, o exame de ECG apresenta uma limitação, pois tem um tempo de duração. Diante disso, para observar possíveis arritmias, o exame ideal seria o Holter 24 horas. No caso desse trabalho, a inviabilidade do número de animais e a disponibilidade de equipamento o experimento com Holter 24 horas não foi realizado.

Os resultados apresentarem ondas P, intervalos PR, segmento PR, eixos elétricos e complexos QRS dentro dos parâmetros esperados para ratos Wistar, evidenciando que o sistema de condução atrioventricular e ventricular não foi comprometido. Embora balanço hidroeletrólítico altere a morfologia das ondas, não foi encontrado na literatura demonstrações da exposição ao CAR alterando essa medida.

6.2 Ecocardiograma

O ecocardiograma constitui uma ferramenta diagnóstica não invasiva amplamente utilizada na avaliação funcional e estrutural do coração, sendo essencial na caracterização da função ventricular, análise hemodinâmica e identificação de alterações morfofuncionais decorrentes de processos fisiopatológicos, oferecendo suporte quantitativo à interpretação dos efeitos de intervenções farmacológicas ou tóxicas sobre a função cardíaca.

A análise da fração de encurtamento é um método para avaliar a mudança no diâmetro do ventrículo esquerdo durante a sístole. Em conjunto com a medida da fração de ejeção ventricular, formam um indicador de cardiotoxicidade clínica em humanos. Em nosso modelo ambos os parâmetros não foram alterados de forma significativa, sugerindo a preservação da função sistólica ventricular após exposição ao CAR.

A exposição ao CAR não comprometeu de forma significativa os fluxos aórtico e pulmonar em nosso modelo de estudo. A medida dessas variáveis fornece uma importante interpretação sobre a função ventricular em conjunto com o perfil hemodinâmico cardiopulmonar, no caso do fluxo pulmonar, e sistêmico, no caso do fluxo aórtico. Uma vez que a função sistólica ventricular se encontra preservada. Diante disso, observamos que a exposição ao CAR não alterou de forma significativa a função do VD. Após exposição ao CAR, a manutenção do fluxo aórtico e pulmonar sugere que não há alterações substanciais da pós-carga atribuídas aos ventrículos, seja o VD ou o esquerdo (VE), respectivamente.

Para o exame da função diastólica do coração, o fluxo mitral foi avaliado, sendo que a onda E representa a velocidade máxima alcançada pelo sangue no início da diástole, já a onda A representa a velocidade máxima alcançada no final da diástole (Gaspar; Azevedo; Roncon-Albuquerque, 2018). Contudo, ressalta-se a relação entre elas, uma medida da contribuição relativa do preenchimento passivo e ativo ventricular, e é uma medida indireta da complacência miocárdica. Em nosso modelo, há redução significativa no valor da relação E/A, valores abaixo de 1, que está associado a alteração do relaxamento ventricular, em que a pressão diastólica está anormalmente elevada (Gelape et al., 2005). Essa inversão de E/A, no qual a contração atrial tem maior atuação no enchimento do VE, é vista em quadros como envelhecimento, hipertensão (Mitter; Shah; Thomas, 2018).

Em modelos de intoxicação por doxorubicina, uma antraciclina utilizada como antitumoral, a fração de encurtamento e de ejeção são comprometidas por, primariamente, apoptose dos cardiomiócitos (Takemura; Fujiwara, 2007). Contudo, a prolongada exposição a doses baixas de doxorubicina por longos períodos progressivamente agrava a disfunção cardíaca. Isso demonstra que o fator tempo tem contribuição para o agravamento de disfunções sistólicas e diastólicas (Migrino et al., 2008). Essa percepção é crucial, considerando que o coração tem uma baixa taxa de regeneração, e, portanto, alterações cardíacas tendem a ser progressivas. A extrapolação desse raciocínio é fundamental no entendimento da toxicidade a longo prazo dos pesticidas, como estudado neste projeto. É, pois, necessário deixar claro que nosso modelo de estudo evidencia ausência de disfunção sistólica após 28 dias de exposição, mas não se pode descartar que exposições por tempos superiores não promovam prejuízos desta ou de outros aspectos da função cardíaca.

6.3 Langendorff e Coloração por cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio

A avaliação da contratilidade e do relaxamento cardíaco pode ser realizada *ex vivo* por meio da técnica do coração isolado. Essa abordagem, além de permitir a aplicação de protocolos diversos, como o de isquemia e reperfusão (I/R), elimina interferências de modulações compensatórias do sistema nervoso autônomo e de fatores humorais. Neste estudo, utilizamos o aparato de Langendorff para investigar se a exposição ao pesticida CAR afeta diretamente a função cardíaca intrínseca, tanto em condições normóxicas quanto após lesão por I/R.

Os dados obtidos indicam que, sob condições fisiológicas, os parâmetros de contração e relaxamento no grupo exposto ao CAR foram semelhantes aos do grupo CTR, sugerindo preservação da função miocárdica basal, mesmo diante de indícios de disfunção diastólica observada no ecocardiograma. No entanto, após a isquemia, a recuperação da pressão desenvolvida e dos parâmetros contráteis foi inferior no grupo CAR.

Pela natureza da exposição ao CAR ser de forma difusa, ou seja, afetar sistemicamente todas as áreas do coração, é razoável acreditar que pequenas lesões multifocais ocorram. Entretanto, isso não impacta a condução do sinal elétrico como visto no ECG e também não atuam função contrátil do órgão no exame de ECO e a contratilidade basal na contração *ex vivo*. Contudo, são o suficiente para afetar o relaxamento, independente do cardiomiócito como será discutido na seção de contratilidade celular. Esses danos causados ao coração, após evento patológico, protocolo de isquemia, os parâmetros funcionais são prejudicados. A coloração com TTC fornece suporte a essa hipótese, considerando maior área de tecido isquêmico no grupo exposto ao CAR, sugerindo possível contribuição de outros tipos celulares do miocárdio.

Apesar da piora funcional observada após o evento de I/R, a histologia indicou preservação da arquitetura tecidual, o que pode justificar a função miocárdica aparentemente normal em condições basais. Contudo, essa análise histológica não permite avaliação adequada da composição da matriz extracelular (MEC), a qual exerce papel central na manutenção da integridade e da mecano-sinalização cardíaca. A MEC é composta por glicoproteínas e diferentes tipos de colágeno, sendo este último o principal componente estrutural do tecido cardíaco (Frangogiannis, 2017). Além da função de sustentação, esses elementos participam ativamente da transdução de sinais mecânicos e químicos relacionados à contratilidade.

Além de atuar como sustentação, sua função se estende à transdução de sinais químicos e mecânicos de contração e relaxamento. Diante disso, a matriz se torna um componente importante para ser observado, porém a análise histológica não engloba esse quesito.

As células imunes também desempenham papel relevante na remodelação da matriz, uma vez que liberam mediadores que ativam fibroblastos, promovendo substituição da matriz por tecido fibrótico (Dobaczewski; Gonzalez-Quesada; Frangogiannis, 2010). Embora não tenhamos identificado infiltrado inflamatório significativo no modelo, os achados funcionais indicam que a exposição ao CAR pode favorecer um remodelamento cardíaco subclínico, tornando o miocárdio mais suscetível a eventos isquêmicos.

6.4 Histologia

Já é amplamente relatada a toxicidade da exposição ao CAR no fígado, testículo e rins (Abolaji et al., 2017; Dikić et al., 2012; Hashem; Mohamed; Attia, 2018). No tecido hepático, é relatado desorganização de ductos, infiltrado inflamatório, congestão de vasos sanguíneos. Nos trabalhos anteriores, o método de administração é, em sua maioria, gavagem, assim como o nosso. Contudo, a dose escolhida para o nosso trabalho é 0,02 mg/kg de peso corporal/dia em consonância com a Nota técnica da ANVISA, de modo a

diferir das doses dos trabalhos anteriores, nos quais variam entre 50-400 mg/kg. Por exemplo, Abolaji et al. (, 2017) utilizaram uma dose de 50 mg/kg em uma exposição de apenas 7 dias. Como foi apresentado, nosso resultado demonstra pela primeira vez danos hepáticos após exposição a doses baixas, consideradas seguras pela agência regulatória brasileira. Em um cenário global esse resultado reforça a necessidade de reavaliação desse princípio ativo para o uso agrícola.

Danos devido a substâncias exógenas ao organismo acarretam morte ou modificação dos tipos celulares no tecido hepático, principalmente em modelos de exposição oral, nos quais o efeito de primeira passagem é prevalente. O sistema de vasos da artéria hepática e a irrigação dos lóbulos são altamente organizados, maximizando sua eficiência para que as substâncias sejam metabolizadas de forma célere (Lorente; Hautefeuille; Sanchez-Cedillo, 2020). Esses eventos são capazes de reestruturar o sistema de ductos biliares, por exemplo (Kamimoto et al., 2020). Células progenitoras hepáticas são capazes de se diferenciar em células epiteliais ductais, no qual frente a danos essas células são ativadas e aumentam a rede de ductos (Sato et al., 2019). Em patologias hepáticas alcoólicas ou não alcoólicas, a inibição do processo fibrótico reduziu a proliferação de ductos, demonstrando íntima relação entre fibroblastos residentes e as células hepáticas progenitoras (Sato et al., 2019).

Estudos utilizando doses elevadas, acima de 100 mg/kg, de CAR reportam desorganização do tecido hepático, necrose e vacuolização (Bao et al., 2023; Zhang et al., 2024). Ademais, nesses protocolos foram apresentadas diversas alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos (Zhang et al., 2024). Interessantemente, Ma et al., (2023) utilizou doses similares ao do nosso trabalho, 0,03 mg/kg de peso por 28 dias, simulando a dose permitida na China. Ao contrário do nosso estudo, o CAR não apresentou nenhuma lesão hepática. Isso demonstra que há possível relação com a sensibilidade do próprio organismo para o pesticida. Isso pode ser particularmente relevante considerando que o grupo citado utilizou camundongos CD-1 como modelo experimental, enquanto neste trabalho foram utilizados ratos Wistar. Isso indica possível sensibilidade diferenciada entre espécies ao CAR.

É, também, pela primeira vez que a histologia do tecido cardíaco é estudada após a administração de CAR de forma crônica. É possível notar que não houve alteração ou dano, ao contrário do tecido hepático. O CAR não foi capaz de causar apoptose dos cardiomiócitos ou provocar a presença de infiltrado celular. Outro fator indicativo de remodelamento de cardiomiócitos é a sua hipertrofia, em corações infartados há remodelamento da matriz e do cardiomiócito (Grandi et al., 2023). Dessa maneira, foi observado o diâmetro do cardiomiócito ou aumento do núcleo. Esses parâmetros de medida

de tamanho celular refletem a ausência de hipertrofia no tecido exposto ao CAR, presumivelmente o tratamento de 28 dias na dose usada não foi capaz de modificar o tamanho da célula. Porém, um importante componente que interfere com a função cardíaca global, é a matriz extracelular. Além de atuar como ancoragem para as células, a matriz tem papel na transmissão de sinais metabólicos e na sístole e diástole (Pinto et al., 2016). Diversas patologias estão envolvidas com alterações na composição da matriz, cujos componentes principais envolvem colágeno, tipo I e II, elastinas, laminina e glicoproteínas (Del Monte-Nieto et al., 2020). Por exemplo, após o infarto, a matriz é remodelada para permitir a atuação de células imunes e, em seguida, a formação de tecido fibrótico para formação de cicatriz (Dobaczewski; Gonzalez-Quesada; Frangogiannis, 2010). Num outro exemplo, patologias valvares e outras condições que impõem sobrecarga de volume ao coração promovem remodelamento da matriz extracelular, com ativação de fibroblastos e consequente aumento na deposição de colágeno, reduzindo a complacência ventricular (Xia et al., 2009). O processo de sinalização que promove remodelamento de matriz após lesão, cicatrização, revascularização e repovoamento celular no local é fundamental para a função cardíaca, seja no infarto, infecções, ou qualquer doença cardíaca que desencadeie reestruturação tecidual.

Em nosso presente estudo, a caracterização da natureza e função da matriz não foi realizada. Entretanto, essa discussão se faz importante: ainda que não tenhamos observado alterações estruturais evidentes nas fibras cardíacas pela análise histológica convencional, dados obtidos no modelo de coração isolado, especialmente pela marcação com TTC, revelaram áreas multifocais de lesão isquêmica nos animais expostos ao CAR. Em conjunto, o exame do eco confirmou uma disfunção diastólica inicial, sem repercussão na função contrátil celular em si. Pela natureza das lesões difusas pós-isquemia e da alteração diastólica cardíaca, aqui, hipotetizamos que alterações na sinalização cardíaca para remodelamento de matriz determinam é um importante alvo para o potencial cardioprotetor do CAR, e necessita ser investigado com mais rigor em trabalhos futuros.

Até então, a soma dos nossos achados sugere que a exposição ao pesticida, isoladamente, não é suficiente para desencadear alterações histopatológicas de grande magnitude, mas pode tornar o tecido cardíaco mais vulnerável a danos por condições adicionais, como a isquemia aguda. Assim, o CAR, bem como possivelmente outros contaminantes ambientais, pode atuar como uma comorbidade silenciosa, exacerbando lesões em contextos patológicos preexistentes. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que aponta que a exposição a doses subclínicas de um pesticida, até então consideradas seguras, pode atuar como uma comorbidade para risco cardiovascular.

6.5 Potencial de ação e Manejo intracelular de cálcio

Os resultados apresentados até então sugerem que em nosso modelo, a exposição ao CAR não altera de forma significativa o perfil eletrocardiográfico, e logo a sinalização elétrica do coração. Entretanto, alterações a nível celular em geral precedem as alterações sistêmicas, que são, em muito compensadas por regulações intrínsecas e extrínsecas, como do sistema nervoso autonômico, renais, imune, endócrino. Dessa forma, decidimos avaliar as propriedades elétricas de cardiomiócitos isolados de ambos os grupos experimentais, como forma de estudar se a exposição a doses baixas de CAR pode modular componentes essenciais envolvidos no controle da excitabilidade da célula muscular cardíaca (Bers, 2002).

O PA pode ser didaticamente entendido em duas fases, despolarização e repolarização. A despolarização em células ventriculares é determinada primariamente pela corrente de sódio (I_{Na}). Diversos pesticidas de diferentes classes modulam canais para sódio (Da Silva et al., 2022). Por exemplo, Santos-Miranda et al., (2022) demonstraram que o fungicida tebuconazol altera as propriedades elétricas de cardiomiócitos, atuando como bloqueador multi-iônico de diversas correntes, ainda que seu mecanismo clássico de utilização pesticida seja a inibição da produção de ergosterol no fungo (Noh; Lee; Kyung, 2025). Particularmente, Marques et al., 2023 mostrou que o TEB provoca redução da corrente de sódio gerada pelo canal Nav1.5 humano, isoforma dominante no coração. Outros pesticidas, como os piretróides, tem seu mecanismo clássico como principal mecanismo o retardo da inativação dos canais para sódio (Marques et al., 2022).

Em nosso trabalho, não observamos alteração nos parâmetros relacionados à despolarização do PA, tanto em sua amplitude quanto na taxa máxima de despolarização. Isso sugere que, pelo menos na concentração e forma de administração utilizadas, não há modulação significativa da corrente de sódio. A manutenção do funcionamento da corrente de sódio pelos parâmetros medidos é refletida na ausência de modificação do ECG. Tendo em vista a contribuição dessa corrente para a geração do PA e a velocidade de condução do sinal elétrico (Pérez-Riera et al., 2016).

Sabe-se que o CAR é capaz de danificar o tecido reprodutor, em machos há redução células germinativas, motilidade, quantidade de espermatozoides e redução na produção de testosterona (Rajeswary et al., 2007; Rama et al., 2014). Como dito anteriormente, sabidamente existe um componente endócrino na modulação da I_{Na} cardíaca. Desse modo, em nosso trabalho, possivelmente a dose não foi capaz de alterar a densidade e cinética dos canais, seja atuando diretamente no miócito ou vias endócrinas.

Outras correntes macroscópicas são fundamentais para repolarização do PA, em geral a corrente para cálcio e para potássio. Presumivelmente a corrente para cálcio I_{Ca}

não tenha se alterado devido a presença do CAR nessa dose, os motivos serão detalhados posteriormente. Porém, acreditamos que as correntes de potássio possam ser moduladas pelo CAR.

As correntes macroscópicas para potássio são essenciais para a repolarização do PA. A primeira fase da repolarização é governada pela corrente para potássio transitória de efluxo, I_{to} (Nerbonne; Kass, 2005). Enquanto fases subsequentes da repolarização possuem importante contribuição de outras entidades moleculares, que determinam as correntes de potássio retificadoras. O prolongamento do PA a 50 e 90% da repolarização completa sugere modulação das correntes retificadoras de potássio (Wu; Larsson, 2020)

Uma patologia que está intimamente associada a disfunção das I_{ks} é a síndrome do QT longo. Sendo uma das características o prolongamento do PA, propiciando eventos arritmogênicos (Varró et al., 2021). Pesticidas de outras classes já demonstraram alterar o intervalo QT em humanos intoxicados (Siu et al., 2000; Taira; Aoyama; Kawamata, 2006). Diante disso, observa-se que a exposição ao CAR é capaz de modular esses canais, embora em nosso modelo essas repercussões não foram refletidas no ECG. Dessa forma, concluímos que o CAR induz alterações discretas no PA, subclínicas, que não são suficientes para induzir um prolongamento significativo do intervalo QT.

A I_{Ca} , nas células ventriculares é formada predominantemente pelo canal de cálcio sensível a voltagem do tipo-L (LTCC, em inglês). Em algumas situações patológicas, incluindo na insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (HFrEF, em inglês) tipicamente se observa redução da expressão de canais, aumento da distância entre os LTCC e receptores de rianodina (RyR), que são canais para cálcio localizados na membrana do retículo sarcoplasmático. Isso resulta na redução do transiente global de cálcio medido, com conseqüente redução da contração miocárdica, algo não observado na de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (HFpEF).

Em modelos animais de quadros de hipertensão, obesidade e diabetes tipo 1, observa-se sinais clínicos de HFpEF (Noll; Lal; Merryman, 2020). A principal diferença entre esses quadros patológicos é a disfunção sistólica acometida na HFrEF, mas não na HFpEF, contudo é observado uma disfunção diastólica (Louch, 2020). Assim como nosso trabalho, encontramos um perfil de resposta similar ao que tange a preservação dos parâmetros contráteis, porém um prejuízo em relação ao relaxamento. Uma adaptação comum no quadro de HFpEF é o aumento da I_{Ca} e a concentração diastólica desse íon, conseqüentemente prejudicando o relaxamento muscular (Khalid et al., 2025). Diante disso, alterações do transiente global de cálcio intracelular sugerem, de forma indireta, modulações da corrente de I_{Ca} . No entanto, em nosso trabalho não observamos alteração na amplitude na razão de fluorescência (F/F_0) entre os grupos. Outros possíveis métodos para medir o

conteúdo de cálcio intracelular são através de eletrodos sensíveis ao íon, ou a fluorescência com sonda de dupla emissão, no qual é seria mensurado o cálcio livre e sistólico (Lopez et al., 2022; Zanin et al., 2019). Outro resultado que indica não haver modulação na entrada de cálcio ou no mecanismo de cálcio induz a liberação de cálcio (*C/CR*, em inglês) é a tempo para 10-90% da elevação de fluorescência, em que está relacionado a ativação dos canais de RyR. Desse modo, observa-se que a díade túbulos T com canais de RyR estão associados e estruturados de maneira funcional. O tempo para 50% de decaimento do transiente de cálcio é associado, majoritariamente, com a recaptação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático através da SERCA, canal para cálcio na membrana do retículo sarcoplasmático. Em nosso modelo também não observamos alterações relacionadas a esse parâmetro. Desse modo, a dinâmica intracelular de cálcio é preservada nessa dose exposta do CAR.

6.6 Contratilidade celular

Diante das alterações observadas na relação E/A, e das propriedades elétricas e da sinalização de cálcio discutidas acima, decidimos investigar se essas alterações poderiam estar associadas a mudanças intrínsecas na contratilidade dos cardiomiócitos. Para isso, analisamos três parâmetros clássicos em miócitos isolados: fração de encurtamento, tempo para 50% da contração e tempo para 50% do relaxamento em 1 e 3 Hz.

A força de contração celular pode ser definida como a tensão gerada pela célula em resposta a um estímulo, processo altamente dependente da dinâmica intracelular de cálcio (Bers, 2002). Alterações na homeostase do cálcio intracelular, como redução do influxo por canais L-type, podem resultar em diminuição da fração de encurtamento celular e contribuir para disfunções contráteis e remodelamento cardíaco, incluindo hipertrofia (Goonasekera et al., 2012).

Entretanto, em nosso modelo, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de contratilidade entre os grupos, coerente com a sinalização de cálcio preservada e a função contrátil no ecocardiograma e Lagendorff. Estes achados sugerem que a exposição oral ao CAR, ao menos nas condições e tempo avaliados, não compromete diretamente a função contrátil basal dos cardiomiócitos.

Considerando o perfil de ação do CAR como possível desregulador endócrino, também investigamos a literatura sobre o papel de hormônios sexuais na contratilidade miocárdica. Estudos demonstram que a ovariectomia pode preservar parâmetros contráteis em fases iniciais, mas comprometer a força contrátil em estágios mais avançados (Paigel et al., 2011), enquanto a orquiectomia reduz a tensão máxima desenvolvida pelos cardiomiócitos (Vutthasathien & Wattanapermpool, 2015). Assim, embora o CAR seja um

potencial desregulador endócrino, nossos resultados não indicam repercussão direta na contratilidade celular, pelo menos não via mecanismos hormonais clássicos, nas condições testadas.

Na contratilidade, um fator chave para a performance do órgão é a frequência cardíaca. O aumento da frequência eleva a função sistólica em condições fisiológicas. Essa relação positiva entre força de contração e frequência está associada a entrada de cálcio, a sensibilidade e integridade do aparato contrátil (Davies et al., 1995; Lamberts et al., 2007). Em nosso modelo, não observamos evidências de alterações no aparato contrátil dependente de frequência, tendo em vista o protocolo de contratilidade a 3 Hz não haver alteração nos parâmetros analisados. Assim, associado a preservação das medidas de contratilidade celular, transiente de cálcio intracelular, ECO e lagendorff indicam que a disfunção diastólica relacionada a pequenas lesões multifocais que prejudicam o funcionamento do coração.

6.7 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

No coração, a produção de espécies reativas, seja oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS), constitui um fenômeno intrinsecamente relacionado à atividade metabólica elevada dos cardiomiócitos. Mitocôndrias, NADPH oxidases e enzimas do metabolismo do óxido nítrico representam fontes-chave de ROS e RNS cuja produção é finamente regulada (Burgoyne et al., 2012). Essas moléculas exercem funções fisiológicas, ao ativar vias de hipertrofia na adaptação ao exercício físico, biogênese mitocondrial e aumento de defesa antioxidante. Contudo, seu acúmulo excessivo leva ao estresse oxidativo, associado a disfunção mitocondrial, morte celular, inflamação e fibrose (Bernardo et al., 2018). Considerando o duplo papel das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na fisiologia cardíaca, atuando tanto como sinalizadores celulares quanto como agentes citotóxicos, o presente estudo buscou investigar sua produção em cardiomiócitos isolados, utilizando as sondas fluorescentes DHE (para ROS) e DAF (para óxido nítrico).

No presente estudo, observamos que a fluorescência não diferiu significativamente entre os grupos CTR e CAR, sugerindo que a exposição crônica em dose baixa do pesticida não alterou a disponibilidade global intracelular dessas espécies reativas. Esses achados são corroborados pela preservação da função contrátil celular, bem como do transiente global de cálcio. Sabidamente, a maquinaria celular envolvida com a dinâmica de cálcio pode sofrer modulação pela oxidação. O RYR, por exemplo pode sofrer com oxidação, o que desestrutura parte do canal e favorece vazamentos de cálcio (*Ca leak*, em inglês) (Burgoyne et al., 2012). Como visto, a homeostase de cálcio em nosso modelo não foi alterada, além de não haver faíscas de cálcio no transiente.

Em termos fisiológicos, Prosser; Ward; Jonathan Lederer, (2013) demonstraram a importância para a sinalização celular no cardiomiócito, da formação de espécies reativas por mecanismos mecanossensíveis. A formação de ROS e RNS auxilia na pré-carga e sustentação da frequência cardíaca. Em nosso modelo, observamos que a contratilidade, assim como a disponibilidade das espécies, não foi alterada, o que sugere que o mecanismo fisiológico de formação de ROS e RNS no citoplasma não foi afetado pela exposição ao CAR.

Por fim, é importante neste ponto ressaltar uma particularidade do tecido cardíaco, que é a baixa taxa de regeneração (Pasumarthi; Field, 2002). Essa característica é crucial para o entendimento da etiologia e progressão das doenças cardíacas, particularmente em resposta à perda de células contráteis. Neste sentido, danos ao DNA são um fator determinante para a morte celular. Essa genotoxicidade já foi descrita em outros tipos celulares quando expostos a diferentes concentrações do CAR, por exemplo, *in vitro* células germinativas e linfócitos tiveram indução de aneuploidia, formação de micronúcleos (Pfeil; Dellarco, 2005). Diante dessas observações, acreditamos que avaliação do possível dano ao material genético do cardiomiócito possa ser explorado em outros trabalhos para uma completa descrição dos mecanismos de cardiotoxicidade e sua extensão induzidas pelo CAR.

8. Conclusões

Em síntese, os achados deste estudo demonstram que a exposição crônica ao CAR, em dose subclínica e por via oral, produz um conjunto de alterações discretas que sustentam a hipótese de um efeito cardiotoxico subclínico e predominantemente diastólico. Embora a função elétrica global, avaliada pelo ECG, se mantenha preservada, observou-se no cardiomiócito isolado um atraso na repolarização, sugerindo modulação sutil de correntes de potássio, ainda que insuficiente para gerar repercussão eletrocardiográfica detectável. O ECO confirmou que a contratilidade sistólica permanece preservada, ao passo que a inversão da relação E/A revela prejuízo do relaxamento ventricular, compatível com um padrão funcional semelhante ao observado em condições iniciais de disfunção diastólica. Em paralelo, o coração isolado evidenciou que, apesar da função basal estar preservada, após protocolo de isquemia no grupo exposto ao CAR há piora nos parâmetros, acompanhada por maiores áreas de tecido isquêmico identificadas pelo TTC, reforçando o conceito de maior vulnerabilidade tecidual. A ausência de alterações estruturais evidentes na histologia cardíaca, contrastando com as lesões hepáticas observadas mesmo em dose subclínica, indica que o miocárdio não sofre dano celular direto marcante, mas possivelmente apresenta remodelamento subclínico não captado pela histologia,

possivelmente envolvendo alterações da matriz extracelular. Assim, os resultados convergem para a hipótese de que o CAR não desencadeia cardiotoxicidade manifestada isoladamente, mas reduz a reserva funcional do coração, atuando como fator de risco silencioso capaz de amplificar danos sob desafios adicionais e exigindo, portanto, investigação aprofundada dos mecanismos celulares e matriciais associados a esse fenótipo.

9. Referências Bibliográficas

ABDEL-RAHMAN, Gomaa N. *et al.* Control of carbendazim toxicity using banana peel powder in rats. **Biotechnology Reports**, v. 36, 1 dez. 2022.

ABOLAJI, A. O. *et al.* Insecticide chlorpyrifos and fungicide carbendazim, common food contaminants mixture, induce hepatic, renal, and splenic oxidative damage in female rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 483–493, 1 maio 2017.

ACAYABA, Raphael D'Anna *et al.* Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9824–9835, 6 fev. 2021.

ADLER, I. D.; SCHMID, T. E.; BAUMGARTNER, A. **Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base** *Mutation Research*. [S.l.: S.n.].

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Carbendazim em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de mitigação de riscos.** Diário Oficial da União Brasil https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/RDC_739_2022_.pdf, , 8 ago. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Índice Monográfico – C24: Carbendazim.** Brasília, DF: [S.n.].

ALEXANDER, Martin. Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern. **Science**, v. 211, n. 4478, p. 132–138, 9 jan. 1981.

ANAKWUE, Raphael. **Cardiotoxicity of Pesticides: Are Africans at Risk?** *Cardiovascular Toxicology* Humana Press Inc., , 15 abr. 2019.

ARYA, R. *et al.* **Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae** **Biodegradation Aspects of Carbendazim and Sulfosulfuron: Trends, Scope and Relevance** *Current Medicinal Chemistry*. [S.l.: S.n.].

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY (APVMA). **Carbendazim Preliminary Review Findings Report – Volume Two: Human Health Risk Assessment**. Canberra, Australia: [S.n.].

BAI, Song *et al.* **Research Progress on Benzimidazole Fungicides: A Review**. **Molecules** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2024.

BAO, Zhiwei *et al.* Insights into enhanced toxic effects by the binary mixture of carbendazim and procymidone on hepatic lipid metabolism in mice. **Science of the Total Environment**, v. 882, 15 jul. 2023.

BARBOSA, Auria M. C.; SOLANO, Marize de L. M.; UMBUZEIRO, Gisela de A. Pesticides in Drinking Water – The Brazilian Monitoring Program. **Frontiers in Public Health**, v. 3, 4 nov. 2015.

BERNARDO, Bianca C. *et al.* UNDERSTANDING KEY MECHANISMS OF EXERCISE-INDUCED CARDIAC PROTECTION TO MITIGATE DISEASE: CURRENT KNOWLEDGE AND EMERGING CONCEPTS. **Physiol Rev**, v. 98, p. 419–475, 2018.

BERS, Donald M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, jan. 2002.

BOHRER, Larissa. Governo Bolsonaro bate próprio recorde e libera uso de 550 novos agrotóxicos em 2021. <https://www.brasildefato.com.br/2022/01/12/governo-bolsonaro-bate-proprio-recorde-e-libera-uso-de-550-novos-agrotoxicos-em-2021>, 25 maio 2022.

BOTELHO, Ana F. M. *et al.* Non-invasive ECG recording and QT interval correction assessment in anesthetized rats and mice. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 6, p. 409–415, jun. 2019.

BOUDINA, A. *et al.* **Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chemosphere>.

BRASIL. Decreto nº 4.074. . 25 maio 2002.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430. . 25 maio 2011.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Parecer nº 10/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**. Brasília, DF: [S.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. . dez. 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA-RDC Nº 296, DE 29 DE JULHO DE 2019. . 29 jul. 2019.

BURGOYNE, Joseph R. *et al.* **Redox signaling in cardiac physiology and pathology**. **Circulation Research**, set. 2012.

CARBO, Leandro *et al.* Acetamiprid, carbendazim, diuron and thiamethoxam sorption in two Brazilian tropical soils. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 42, n. 5, p. 499–507, jun. 2007.

CHELINHO, Sonia *et al.* Toxicity of phenmedipham and carbendazim to *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in Mediterranean soils. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 3, p. 584–599, 1 mar. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2023/24 – 1º levantamento, outubro 2023.** www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos Brasília, DF Conab, , 25 maio 2023.

COSTA, Raíssa M. *et al.* Untargeted Metabolomics Reveals Lipid Impairment in the Liver of Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Carbendazim. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 437–448, 1 fev. 2023.

DA SILVA, Maria Vitoria *et al.* The insecticide β -Cyfluthrin induces acute arrhythmic cardiotoxicity through interaction with NaV1.5 and ranolazine reverses the phenotype. **Clinical Science**, v. 136, n. 5, p. 329–343, 18 mar. 2022.

Daniela Resende Carrijo Engenheira Agrônoma Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxaproxade, isolado e em mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja Piracicaba 2014. . [S.l.: S.n.]

DAVIDSE, Leen C. **BENZIMIDAZOLE FUNGICIDES: MECHANISM OF ACTION AND BIOLOGICAL IMP ACT.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

DEL MONTE-NIETO, Gonzalo *et al.* **Basic Biology of Extracellular Matrix in the Cardiovascular System, Part 1/4: JACC Focus Seminar.** **Journal of the American College of Cardiology** Elsevier USA, , 5 maio 2020.

DIKIĆ, Domagoj *et al.* Carbendazim Impends Hepatic Necrosis when Combined with Imazalil or Cypermethrin. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 110, n. 5, p. 433–440, maio 2012.

DOBACZEWSKI, Marcin; GONZALEZ-QUESADA, Carlos; FRANGOGIANNIS, Nikolaos G. **The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction.** **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, mar. 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. **EFSA Journal**, v. 8, n. 5, p. 1598, maio 2010.

EZEOYILI, Ifeanyi Christian *et al.* Changes in Brain Acetylcholinesterase and Oxidative Stress Biomarkers in African Catfish Exposed to Carbendazim. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 31, n. 4, p. 371–379, 1 dez. 2019.

FAN, Ruiqi *et al.* Antagonistic Effects of Enrofloxacin on Carbendazim-Induced Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos. 2021.

FANG, Hua *et al.* Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. **Biodegradation**, v. 21, n. 6, p. 939–946, nov. 2010.

FARAG, Amina *et al.* Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 122–130, abr. 2011.

FARM PROGRESS. **The importance of multi-site fungicides.**

FAWOLE, OB; ALUKO, M.; OLOWONIHI, TE. Effects of a Carbendazim-Mancozeb Fungicidal Mixture on Soil Microbial Populations and Some Enzyme Activities in Soil. **Agrosearch**, v. 10, n. 1–2, 27 set. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT – Resource Domain.**

FRANGOIANNIS, Nikolaos G. **The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling.** **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, , 1 maio 2017.

FREIRE, Carmen; KOIFMAN, Rosalina Jorge; KOIFMAN, Sergio. Hematological and hepatic alterations in brazilian population heavily exposed to organochlorine pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 78, n. 8, p. 534–548, 18 abr. 2015.

FUNDAÇÃO HEINRICH BÖLL. Atlas dos agrotóxicos: fatos e dados do uso dessas substâncias na agricultura – 2. edição brasileira. <https://br.boell.org/pt-br/atlasdosagrototoxicos2024>, p. 1–64, 25 maio 2024.

GASPAR, António; AZEVEDO, Pedro; RONCON-ALBUQUERQUE, Roberto. **Non-invasive hemodynamic evaluation by Doppler echocardiography.** **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** Associação de Medicina Intensiva Brasileira - AMIB, , 2018.

GELAPE, Cláudio Léo *et al.* Análise ecocardiográfica da função diastólica do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 20, n. 1, mar. 2005.

GRANDI, Eleonora *et al.* The Journal of Physiology Diversity of cells and signals in the cardiovascular system. **J Physiol**, v. 601, p. 2547–2592, 2023.

HASHEM, Mohamed A.; MOHAMED, Wafaa A. M.; ATTIA, Engy S. M. Assessment of protective potential of *Nigella sativa* oil against carbendazim- and/or mancozeb-induced

hematotoxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 2, p. 1270–1282, 1 jan. 2018.

HOLMES, Mel *et al.* Assessing the Risk to U.K. Children from Carbendazim Residues in Apple Products. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 14, n. 2, p. 86–93, 19 abr. 2008.

HU, Guixian *et al.* Combined toxicities of cadmium and five agrochemicals to the larval zebrafish (*Danio rerio*). **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo agropecuário 2006: Brasil, grandes regiões e unidades da federação – segunda apuração**. Rio de Janeiro: [S.n.].

ISOLAMENTO DE FUNGOS DEGRADADORES DE CARBENDAZIM 1 CÉLIA MARIA MAGANHOTTO DE SOUZA SILVA 2 , ITAMAR SOARES DE MELO 3 , ALINE DE HOLANDA NUNES MAIA 4 e ROSANGELA BLOTTA ABAKERLI 5 . [S.l.: S.n.].

JIN, Cuiyuan *et al.* Insights into a possible mechanism underlying the connection of carbendazim-induced lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis in mice. **Toxicological Sciences**, v. 166, n. 2, p. 382–393, 1 dez. 2018.

KAMIMOTO, Kenji *et al.* Multidimensional imaging of liver injury repair in mice reveals fundamental role of the ductular reaction. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, 1 dez. 2020.

KEN MATTHEWS AO *et al.* **Final Report of the Independent Review of the Pesticides and Veterinary Medicines Regulatory System in Australia Prepared by the Independent Review Panel**. Canberra: [S.n.].

KHALID, Arbab *et al.* **Molecular Mechanisms of L-Type Calcium Channel Dysregulation in Heart Failure**. **International Journal of Molecular Sciences** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jun. 2025.

KLOTZ', Diane M.; AMOLD'~Z3~4, Steven F.; MCLACHLAN'****', John A. **INHIBITION OF 17 BETA-ESTRADIOL AND PROGESTERONE ACTIVITY IN HUMAN BREAST AND ENDOMETRIAL CANCER CELLS BY CARBAMATE INSECTICIDES** *five ~itncts*. [S.l.: S.n.].

KONOPELSKI, P.; UFNAL, M. **Electrocardiography in rats: A comparison to human**. **Physiological Research** Czech Academy of Sciences, , 2016.

KOSUBOVÁ, P. *et al.* Spatial and temporal distribution of the currently-used and recently-banned pesticides in arable soils of the Czech Republic. **Chemosphere**, v. 254, 1 set. 2020.

KRÓL, Marek *et al.* Characterization of Disopyramide derivative ADD424042 as a non-cardiotoxic neuronal sodium channel blocker with broad-spectrum anticonvulsant activity in rodent seizure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 42–51, 1 jan. 2016.

LAW, Christine S. W.; YEONG, Keng Y. Benzimidazoles in Drug Discovery: A Patent Review. **ChemMedChem**, v. 16, n. 12, p. 1861–1877, 17 jun. 2021.

Lewandowska 2010- CAR e solo. [S.d.].

LI, Huatao *et al.* Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse spermatogenesis through epigenetic pathways. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, 30 jan. 2020a.

LI, Jie *et al.* The Effects of Carbendazim on Acute Toxicity, Development, and Reproduction in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Food Quality**, v. 2020, 2020b.

LIU, Zhengyi *et al.* Determination, dissipation dynamics, terminal residues and dietary risk assessment of thiophanate-methyl and its metabolite carbendazim in cowpeas collected from different locations in China under field conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 13, p. 5498–5507, 1 out. 2021.

LOPEZ, Jose R. *et al.* The Role of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in Aberrant Intracellular Ca²⁺ in Cardiomyocytes of Chagas-Infected Rodents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 7 jul. 2022.

LORENTE, Sylvie; HAUTEFEUILLE, Mathieu; SANCHEZ-CEDILLO, Aczel. The liver, a functionalized vascular structure. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

LOUCH, William E. **A horse of a different colour: distinct mechanisms of HFpEF and HFrEF**. **Journal of Physiology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2020.

LUGOMER, Marija Denžić *et al.* Određivanje ostataka benzimidazola i njihovih metabolita u sirovom mlijeku u Hrvatskoj primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda. **Mljekarstvo**, v. 67, n. 3, p. 231–238, 1 jun. 2017.

LUO, Qiang *et al.* Benomyl-induced development and cardiac toxicity in zebrafish embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 12, p. 33090–33100, 1 mar. 2023.

LWAKUMA, Toshio *et al.* **RUNOFF PROPERTIES AND CHANGE IN CONCENTRATIONS OF AGRICULTURAL PESTICIDES IN A RIVER SYSTEM DURING A RICE CULTIVATION PERIOD** *Chemosphere*. [S.l.: S.n.].

MA, Xiaoran *et al.* Low Dose of Carbendazim and Tebuconazole: Accumulation in Tissues and Effects on Hepatic Oxidative Stress in Mice. **Toxics**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2023.

MALHOTRA, Harshit; KAUR, Sukhjeet; PHALE, Prashant S. **Conserved Metabolic and Evolutionary Themes in Microbial Degradation of Carbamate Pesticides**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 7 jul. 2021.

MARQUES, Leisiane P. *et al.* Cardiotoxicity of pyrethroids: molecular mechanisms and therapeutic options for acute and long-term toxicity. **Biochemical Society Transactions**, v. 50, n. 6, p. 1737–1751, 16 dez. 2022.

- MARQUES, Leisiane Pereira *et al.* The fungicide tebuconazole modulates the sodium current of human NaV1.5 channels expressed in HEK293 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 180, 1 out. 2023.
- MAZELLIER, P. *et al.* Degradation of carbendazim by UV/H₂O₂ investigated by kinetic modelling. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. 68–72, 2003.
- MIGRINO, Raymond Q. *et al.* Early Detection of Doxorubicin Cardiomyopathy Using Two-Dimensional Strain Echocardiography. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 34, n. 2, p. 208–214, fev. 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.**
- MINISTÉRIO DA CASA CIVIL. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. . 2002.
- MITTER, Sumeet S.; SHAH, Sanjiv J.; THOMAS, James D. **A Test in Context E/A and E/e 0 to Assess Diastolic Dysfunction and LV Filling Pressure.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.acc.org/jacc-journals-cme>>.
- MO, Elshazly *et al.* Newly synthesized chitosan-nanoparticles attenuate carbendazim hepatorenal toxicity in rats via activation of Nrf2/HO1 signalling pathway. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022a.
- MO, Elshazly *et al.* Newly synthesized chitosan-nanoparticles attenuate carbendazim hepatorenal toxicity in rats via activation of Nrf2/HO1 signalling pathway. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022b.
- MOSTAFALOU, Sara; ABDOLLAHI, Mohammad. **Pesticides: an update of human exposure and toxicity.** **Archives of Toxicology** Springer Verlag, , 1 fev. 2017.
- NEMETH-KONDA, L. *et al.* **Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/chemosphere>.
- NERBONNE, Jeanne M.; KASS, Robert S. **Molecular Physiology of Cardiac Repolarization.** 2005.
- NICOLOPOULOU-STAMATI, Polyxeni *et al.* **Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture.** **Frontiers in Public Health** Frontiers Media S.A., , 18 jul. 2016.

- NOH, Hyun Ho; LEE, Jae Yun; KYUNG, Kee Sung. Whole-body dosimetry and risk analysis of tebuconazole exposure in vineyard workers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 491, 5 jul. 2025.
- NOLL, Natalie A.; LAL, Hind; MERRYMAN, W. David. Mouse Models of Heart Failure with Preserved or Reduced Ejection Fraction. **The American Journal of Pathology**, v. 190, n. 8, p. 1596–1608, ago. 2020.
- NWOZO, Sarah O.; OZEGBE, Peter C.; OLASEHINDE, Olusanya. Carbendazim alters kidney morphology, kidney function tests, tissue markers of oxidative stress and serum micro-elements in rats fed protein-energy malnourished diet. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1046, 5 out. 2017.
- PALMA, Graciela *et al.* Pesticide levels in surface waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 763–770, nov. 2004.
- PANDA, Jigisha; KANJILAL, Tiyasha; DAS, Sumona. Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide Carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 45–57, jan. 2018.
- PASUMARTHI, Kishore B. S.; FIELD, Loren J. **Cardiomyocyte cell cycle regulation. Circulation Research**, 31 maio 2002.
- PASZKO, Tadeusz. Effect of pH on the adsorption of carbendazim in Polish mineral soils. **Science of the Total Environment**, v. 435–436, p. 222–229, 1 out. 2012.
- PÉREZ-RIERA, Andrés Ricardo *et al.* Cardiac sodium channel, its mutations and their spectrum of arrhythmia phenotypes. **Journal of Human Growth and Development**, v. 26, n. 3, p. 281, 28 nov. 2016.
- PFEIL, Rudolf; DELLARCO, Vicki. **CARBENDAZIM (addendum)**. [S.l.: S.n.].
- PINTO, Alexander R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. **Circulation Research**, v. 118, n. 3, p. 400–409, 5 fev. 2016.
- PISANI, Cédric *et al.* Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture. **Altex**, v. 33, n. 4, p. 393–413, 2016.
- PROSSER, Benjamin L.; WARD, Christopher W.; JONATHAN LEDERER, W. X-ROS signalling is enhanced and graded by cyclic cardiomyocyte stretch. **Cardiovascular Research**, v. 98, n. 2, p. 307–314, 1 maio 2013.
- RAJESWARY, Sivasankaran *et al.* Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 3–4, p. 371–380, nov. 2007.
- RAMA, Elkiane Macedo *et al.* Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 476–486, 2014.
- relatorio-para-2017-2018-final. [S.d.]

- SALIHU, M. *et al.* 6-Gingerol-rich fraction prevents disruption of histomorphometry and marker enzymes of testicular function in carbendazim-treated rats. **Andrologia**, v. 49, n. 10, 1 dez. 2017.
- SAMESIMA, Nelson *et al.* Brazilian Society of Cardiology Guidelines on the Analysis and Issuance of Electrocardiographic Reports-2022. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 119, n. 4, p. 638–680, 2022.
- SANTOS-MIRANDA, Artur *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide imbalances lead to in vivo and in vitro arrhythmogenic phenotype in acute phase of experimental Chagas disease. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 3, p. e1008379, 11 mar. 2020.
- SANTOS-MIRANDA, Artur *et al.* The fungicide Tebuconazole induces electromechanical cardiotoxicity in murine heart and human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. **Toxicology Letters**, v. 359, p. 96–105, abr. 2022.
- SASSMAN, Stephen A. *et al.* Assessing N,N'-Dibutylurea (DBU) Formation in Soils after Application of n-Butylisocyanate and Benlate Fungicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 747–754, 17 fev. 2004.
- SATO, Keisaku *et al.* **Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances**. **Hepatology** John Wiley and Sons Inc., , 1 jan. 2019.
- SEIF, Mohamed *et al.* Mitigation of Hepatotoxicity via Boosting Antioxidants and Reducing Oxidative Stress and Inflammation in Carbendazim-Treated Rats Using Adiantum Capillus-Veneris L. Extract. **Molecules**, v. 28, n. 12, 1 jun. 2023.
- SELMANOĞLU, G. *et al.* Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 625–630, 1 dez. 2001.
- SHARMA, Monika *et al.* **Carbendazim toxicity in different cell lines and mammalian tissues**. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology** John Wiley and Sons Inc, , 1 dez. 2022.
- SHIOYA, Takao. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. **Journal of Physiological Sciences**, v. 57, n. 6, p. 327–335, dez. 2007.
- SILVA, Renato C.; BARROS, Karina A.; PAVÃO, Antonio C. CARCINOGENICITY OF CARBENDAZIM AND ITS METABOLITES. **Química Nova**, 2014.
- SINGH, Simranjeet *et al.* **Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim**. **Environmental Chemistry Letters** Springer Verlag, , 1 set. 2016.
- SIU, Ayc *et al.* **QT prolongation due to organophosphate poisoning** **Hong Kong j.emerg.med.** [S.l.: S.n.].

- SKRZYPIEC-SPRING, Monika *et al.* Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 55, n. 2, p. 113–126, mar. 2007.
- SORAIA YOSHIDA. EUA encontram fungicida proibido em suco de laranja brasileiro. **Associtrus**, 12 jan. 2012.
- TAIRA, Kumiko; AOYAMA, Yoshiko; KAWAMATA, Miwako. Long QT and ST-T change associated with organophosphate exposure by aerial spray. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 40–45, jul. 2006.
- TAKEMURA, Genzou; FUJIWARA, Hisayoshi. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 49, n. 5, p. 330–352, mar. 2007.
- THALITA FERREIRA. **O USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL, RISCOS E TUTELA JURÍDICA**. ANÁPOLIS: UNIEVANGÉLICA, 2019.
- TIAN, Yong *et al.* Atrazine exposure improves the proliferation of H22 cells: In vitro and in vivo. **RSC Advances**, v. 8, n. 39, p. 21759–21767, 2018.
- TUBIELLO, Francesco N. *et al.* A new cropland area database by country circa 2020. **Earth System Science Data**, v. 15, n. 11, p. 4997–5015, 15 nov. 2023.
- TZATZARAKIS, Manolis *et al.* Multiresidue analysis of insecticides and fungicides in apples from the Greek market. Applying an alternative approach for risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 140, 1 jun. 2020.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Carbendazim: Human Health Risk Assessment**. Washington, D.C.: [S.n.].
- Uso agrícola do Carbendazim no Brasil Equipe Técnica-FPA | Uso agrícola do Carbendazim no Brasil**. . [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.agrofit.agricultura.gov.br>.
- VARRÓ, Andrés *et al.* **CARDIAC TRANSMEMBRANE ION CHANNELS AND ACTION POTENTIALS: CELLULAR PHYSIOLOGY AND ARRHYTHMOGENIC BEHAVIOR**. **Physiological Reviews**American Physiological Society, , 1 jul. 2021.
- VILHENA, Andréa. Nova lei de licenciamento ambiental – flexibilização, retrocessos e riscos à saúde. <https://cee.fiocruz.br/?q=nova-lei-de-licenciamento-ambiental-flexibilizacao-retrocessos-e-riscos-a-saude>, 25 maio 2021.
- WARR, J.; FLANAGAN, D.; ANDERSON, M. Mutants of Chinese hamster ovary cells with altered sensitivity to taxol and benzimidazole carbamates. **Cell Biology International Reports**, v. 6, n. 5, p. 455–460, maio 1982.
- XIA, Ying *et al.* Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 131, n. 4, p. 471–481, abr. 2009.

YILMAZ, Bayram *et al.* **Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders** Springer, , 1 mar. 2020.

YU, Yunlong *et al.* Effects of repeated applications of fungicide carbendazim on its persistence and microbial community in soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 2, p. 179–185, 2009.

ZANIN, Sofia *et al.* Methods to Measure Intracellular Ca²⁺ Concentration Using Ca²⁺-Sensitive Dyes. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 43–58.

ZHANG, Shuwen *et al.* Toxicologic effect and transcriptome analysis for sub-chronic exposure to carbendazim, prochloraz, and their combination on the liver of mice. **Environmental science and pollution research international**, v. 31, n. 4, p. 5500–5512, 1 jan. 2024.

ZHOU, Jinghua *et al.* Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. **Reproductive Toxicology**, v. 51, p. 64–71, 1 jan. 2015.