



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAÍS SOARES MEDINA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS
CONTENDO BIOPESTICIDA A BASE DE NIM EM
*PROCHILODUS LINEATUS***

Londrina
2020

LAÍS SOARES MEDINA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS
CONTENDO BIOPESTICIDA A BASE DE NIM EM
*PROCHILODUS LINEATUS***

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2020

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

Medina, Laís Soares.

Avaliação dos efeitos de nanopartículas contendo biopesticida a base de nim em *Prochilodus lineatus* / Laís Soares Medina. - Londrina, 2020.
74 f.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Acetilcolinesterase - Tese. 2. Azadiractina - Tese. 3. Defesas antioxidantes - Tese. 4. Resposta de estresse - Tese. I. Martinez, Claudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

LAÍS SOARES MEDINA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS
CONTENDO BIOPESTICIDA A BASE DE NIM EM
*PROCHILODUS LINEATUS***

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos
Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto
Universidade Estadual Paulista – Unesp

Londrina, 18 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à força divina por ter me proporcionado força e coragem, até quando eu mesmo duvidei que tivesse. As vitórias e os progressos, ainda que pequenos, fortaleceram diariamente a minha resiliência e auto-confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) e à Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora Profa. Dra. Claudia Martinez por ter me aceitado como aluna de Iniciação Científica há alguns anos e ter confiado em mim o desenvolvimento de projetos de pesquisa, mesmo com a minha inexperiência. Agradeço pelos ensinamentos, pelas correções e contribuições, assim como pela paciência, compreensão e profissionalismo que sempre teve comigo durante todos esses anos. Enfim, por toda competência, que a torna uma das pessoas mais inspiradoras que já tive o prazer de conhecer.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Halley Oliveira e Prof. Dr. Leonardo Fraceto pela disponibilidade em contribuir com o nosso trabalho.

Agradecimentos especiais à Dra. Mônica Pascoli e ao seu orientador Prof. Dr. Leonardo Fraceto do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da UNESP de Sorocaba, responsáveis pela síntese, caracterização e fornecimento das formulações utilizadas nesse trabalho. Além disso, agradeço à Mônica também por nunca ter medido esforços para me ensinar, explicar e auxiliar. Enfim, por toda paciência envolvida.

Agradeço também os membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Halley Oliveira e Profa. Dra. Mariana Lauer pela disponibilidade, observações e contribuições ao trabalho, muitas das quais poderiam passar despercebidas aos nossos olhos.

À Piscicultura Venites e à Piscicultura Schneider pelo fornecimento dos peixes.

Ao técnico do laboratório Dr. Wagner Risso não só pela realização e ajuda nas análises iônicas e amostragens, mas também por todo apoio, conversas e piadas durante esses anos.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) por toda ajuda manual e cognitiva, indispensáveis para a finalização deste trabalho. Mas especialmente a Duda, ao Jheimison e a Carol que compartilharam comigo muito mais que horas de trabalho.

Agradecimento especial também aos meus pais pelas oportunidades concedidas, pelo apoio financeiro e emocional, sem os quais seria incapaz de chegar tão longe. Gratidão pelo privilégio que sempre tive em me preocupar “apenas” com meus estudos. Agradeço por acreditarem em mim em todos os momentos, mesmo quando nem eu acredito. Para eles, eu já venci. À minha mãe por ser a exata definição de força e perseverança para mim, espero um dia ser tão forte quanto ela. À vida da minha irmã, Lisa Maria, o real motivo pelo qual tento diariamente ser uma pessoa melhor.

À minha família, minhas primas, minhas tias e minhas avós, mulheres fortes que exercem influências diretas na minha vida, embora nem sempre estejam próximas fisicamente ou mesmo nesse plano, infelizmente. Aos meus avôs, paterno por não ter tido tempo de me ver formada e materno por ter me ensinado que existem desesperos maiores que a vida científica.

Gratidão eterna por todos colegas e amigos que cultivei nesse período de UEL, pessoas valiosas que tive o privilégio de conhecer, conviver e amar. Especialmente aos amigos do meu grupinho; Kenny, Amanda, Lenora, Beatriz, Beijinho, Heloísa, Giovanna, Jéssica, Vitor, Bruna, Brigadeiro e Hellen que tiveram participação significativa na manutenção da minha sanidade mental e física durante todos esses anos de estudo. Estarão para sempre na minha nostálgica memória.

Ao meu querido amigo boi por todos momentos de descontração, chamado carinhosamente por nós de ‘pós-expediente’.

Aos guardinhas da guarita em frente ao laboratório, motivo da minha tranquilidade todas vezes que saia tarde do laboratório.

À teacher Jaque Campos por toda paciência, sabedoria e

comprometimento na hora de me ensinar, mesmo com toda a minha dificuldade no idioma. A aprovação no exame de proficiência é nossa!

Enfim, meus mais sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma participaram desse trabalho, direta ou indiretamente. Com certeza essa e outras vitórias da minha vida só foram possíveis devido a todas interações que vivi.

MEDINA, Laís Soares. **Avaliação dos efeitos de nanopartículas contendo biopesticida a base de nim em *Prochilodus lineatus***. 2020. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Os biopesticidas são considerados mais sustentáveis no controle de organismos-alvos, pois são biodegradáveis e pouco persistentes no ambiente. Dentre esses compostos, destaca-se o óleo de nim, extraído da árvore *Azadirachta indica* Juss., cujo princípio ativo mais importante em termos de ação biológica é a azadiractina. A aplicação da nanotecnologia na agricultura tem possibilitado novas perspectivas, já que o nanoencapsulamento confere maior estabilidade e eficiência ao composto ativo. Assim, esse estudo propôs investigar os efeitos do óleo de nim nanoencapsulado no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, bem como comparar aos efeitos do óleo de nim convencional e das nanocápsulas sem o biopesticida. Para isso, juvenis de *P. lineatus* foram expostos, por 24 e 96 h, à água com nanocápsulas de zeína contendo óleo de nim (nÓLEO), nas concentrações de 60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ de azadiractina, com o óleo de nim (ÓLEO) ou com as nanocápsulas (NANO), nas concentrações correspondentes, ou ainda apenas à água (CTR). Após o período experimental, os peixes foram amostrados e os órgãos utilizados na determinação dos diferentes biomarcadores. Todos os tratamentos promoveram a redução do cálcio plasmático; entretanto, a hipocalcemia foi mais acentuada nos peixes expostos ao óleo de nim nanoencapsulado. Além disto, a exposição ao nÓLEO promoveu hiperglicemia, acompanhada pela redução glicogênio hepático e muscular, indicando possivelmente a ativação de resposta de estresse e uma redução na atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral, indicando uma ação neurotóxica. Por outro lado, o nim comercial provocou efeitos mais amenos. Os efeitos mais relevantes atribuídos ao nano-biopesticida devem estar associados à sua maior resistência à fotodegradação devido à nanocápsula.

Palavras-chave: acetilcolinesterase; azadiractina; defesas antioxidantes; íons plasmáticos; peixe; resposta de estresse.

MEDINA, Laís Soares. **Evaluation of the effects of nanoparticles containing a neem-based biopesticide in *Prochilodus lineatus***. 2020. 74 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) - State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Biopesticides represent more sustainable alternative for the agricultural sector, as they are biodegradable and not persistent in the environment. Among them, neem oil stands out, extracted from the tree *Azadirachta indica* Juss., of which azadirachtin is the most important active ingredient in terms of biological action. However, due to its limited durability, the use of neem in the field is restricted. In this context, nanocapsules containing biopesticides are promising for more sustainable agriculture, as they make the active ingredient more stable and effective. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of nanoencapsulated neem oil on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, as well as to compare the effects of conventional neem oil and nanocapsules without the active ingredient. For this purpose, juveniles of *P. lineatus* were exposed for 24 and 96 h to water containing zein nanocapsules with neem oil (nOIL) at concentrations of 60 and 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ of azadirachtin, neem oil (OIL), or nanocapsules without the active ingredient (NANO), in the corresponding concentrations, or just water (CTR). After the exposures, the fish were sampled for analysis of physiological and biochemical biomarkers. All treatments caused a reduction in plasma calcium; however, hypocalcemia was more accentuated in fish exposed to nOIL. In addition, exposure to nOIL promoted hyperglycemia, accompanied by a reduction in liver and muscle glycogen, possibly indicating the activation of a stress response, and a reduction in the activity of muscle and brain acetylcholinesterase, indicating a neurotoxic action. On the other hand, the exposure to conventional neem oil caused milder effects. The most relevant effects attributed to the nano-biopesticide should be associated with their greater resistance to photodegradation, provided by the nanocapsule.

Key-words: acetylcholinesterase; azadirachtin; antioxidant defenses; plasma ions; fish; stress response.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
1.1	BIOPESTICIDA NIM.....	6
1.1.1	Toxicidade do Nim em Peixes	10
1.2	NANOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA.....	11
1.3	ZEÍNA.....	14
1.3.1	Nanocápsulas de Zeína Contendo Óleo de Nim	15
1.4	MODELO BIOLÓGICO	17
2.	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA CONTENDO BIOPESTICIDA À BASE DE NIM	21
3.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS	22
3.3	MANUTENÇÃO DOS PEIXES	23
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
3.5	AMOSTRAGEM.....	26
3.6	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	26
3.6.1	Análises Sanguíneas.....	26
3.6.2	Análises Iônicas.....	26
3.6.3	Análises Metabólicas.....	27
3.7	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	27
3.7.1	Defesa Antioxidante – Glutathiona (GSH)	27
3.7.2	Dano Oxidativo – Peroxidação Lipídica (LPO)	28
3.7.3	Biotransformação de Xenobióticos – Atividade da Glutathiona S- transferase (GST).....	28
3.7.4	Neurotoxicidade – Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).....	28
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28

4.	RESULTADOS	29
4.1	CARACTERÍSTICAS DOS MEIOS EXPERIMENTAIS	29
4.1.1	Parâmetros Físicos e Químicos da Água	29
4.1.2	Caracterização Físico-Química das Nanocápsulas	30
4.2	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	31
4.2.1	Análises Sanguíneas	31
4.2.2	Análises Iônicas	32
4.2.3	Análises Metabólicas	35
4.3	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	37
4.3.1	Defesa Antioxidante – Glutathione (GSH)	37
4.3.2	Dano Oxidativo – Peroxidação Lipídica (LPO)	39
4.3.3	Biotransformação de Xenobióticos – Atividade da Glutathione S-transferase (GST)	41
4.3.4	Neurotoxicidade – Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	43
4.4	ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)	44
5.	DISCUSSÃO	46
	<i>Características dos meios experimentais</i>	49
	<i>Parâmetros fisiológicos</i>	50
	<i>Parâmetros bioquímicos</i>	55
6.	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	74
	ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOPESTICIDA NIM

O acelerado crescimento populacional registrado desde o fim da revolução industrial impressiona. Estima-se que até 2100 a população mundial será de 10,9 bilhões de pessoas (United Nations, 2019), o que resultaria em um aumento de 50% na demanda por alimento (FAO, 2017). Diante dessa problemática, nos últimos anos tem ocorrido uma intensificação das práticas agrícolas, já que apenas aumentar proporcionalmente a área agricultável é insustentável (Kumar, 2013). Dentre as técnicas utilizadas, o uso indiscriminado de agrotóxicos preocupa, pois ameaça os organismos não-alvos e os ecossistemas (Kumar et al., 2010, Vieira et al., 2016). Além disso, a preocupação com os ambientes aquáticos é ainda maior devido a falta de legislação eficiente no Brasil (Grillo et al., 2012). Considerando isso, há atualmente um interesse considerável em desenvolver estratégias mais seguras ao setor agrícola (Grillo et al., 2016, Campos et al., 2019).

Os biopesticidas ou agrotóxicos botânicos são misturas complexas de compostos derivados do metabolismo secundário das plantas. Alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos são três dos principais grupos de metabólitos que podem ser extraídos dos tecidos vegetais através de múltiplas técnicas (Benelli e Pavela, 2018, Pascoli et al., 2019). Esses compostos biologicamente ativos atuam na defesa contra estresses abióticos, herbivoria e patógenos, desempenhando assim função crucial no ciclo de vida das plantas (Campos et al., 2019). Além disso, geralmente os biopesticidas são considerados menos tóxicos aos organismos não-alvos quando comparado aos agrotóxicos convencionais.

Embora a utilização de fitoquímicos como biopesticidas seja relatada há milhares de anos para diversos fins (Biswas et al., 2002, Mossini e Kimmelmeier, 2005), apenas recentemente esses produtos naturais despertaram interesse e receberam a devida atenção da comunidade científica (Isman e Grieneisen, 2014). Devido às inúmeras propriedades pesticidas e por serem considerados mais seguros que os compostos convencionais (Isman, 2006), já que são biodegradáveis e pouco persistentes no ambiente, os

biopesticidas representam uma alternativa viável e mais sustentável para a agricultura (Brahmachari, 2004, Kumar, 2013, Benelli e Pavela, 2018, de Oliveira et al., 2014, 2018b).

A árvore indiana *Azadirachta indica* Juss (Meliaceae) é conhecida desde a antiguidade como uma importante fonte de fitoquímicos com diversas aplicações na saúde e no setor agrícola (Biswas et al., 2002, Brahmachari, 2004, Morgan et al., 2009, Campos et al., 2016). O óleo de nim pode ser extraído de todas as partes dessa planta, mas principalmente a partir das sementes.

O nim é constituído por cerca de 300 compostos biologicamente ativos, sendo a azadiractina, um triterpenóide da classe dos limonoides, o princípio ativo mais importante em termos de ação biológica, responsável por até 90% do efeito observado (Figura 1) (Brahmachari, 2004, El-Wakeil, 2013, Campos et al., 2016). Meliantriol, nimbin, nimbinin, salannin e ácidos graxos (oleico, esteárico e palmítico) também são alguns dos constituintes desse biopesticida (Biswas et al., 2002, El-Wakeil, 2013, Campos et al., 2016, Chandramohan et al., 2016). Considerando essa alta quantidade de compostos, autores sugerem que efeitos aditivos, sinérgicos, de potencialização ou antagônicos podem ocorrer entre os diferentes compostos ativos determinando assim, a eficácia e toxicidade do produto (Koul et al., 2013, Benelli e Pavela, 2018).

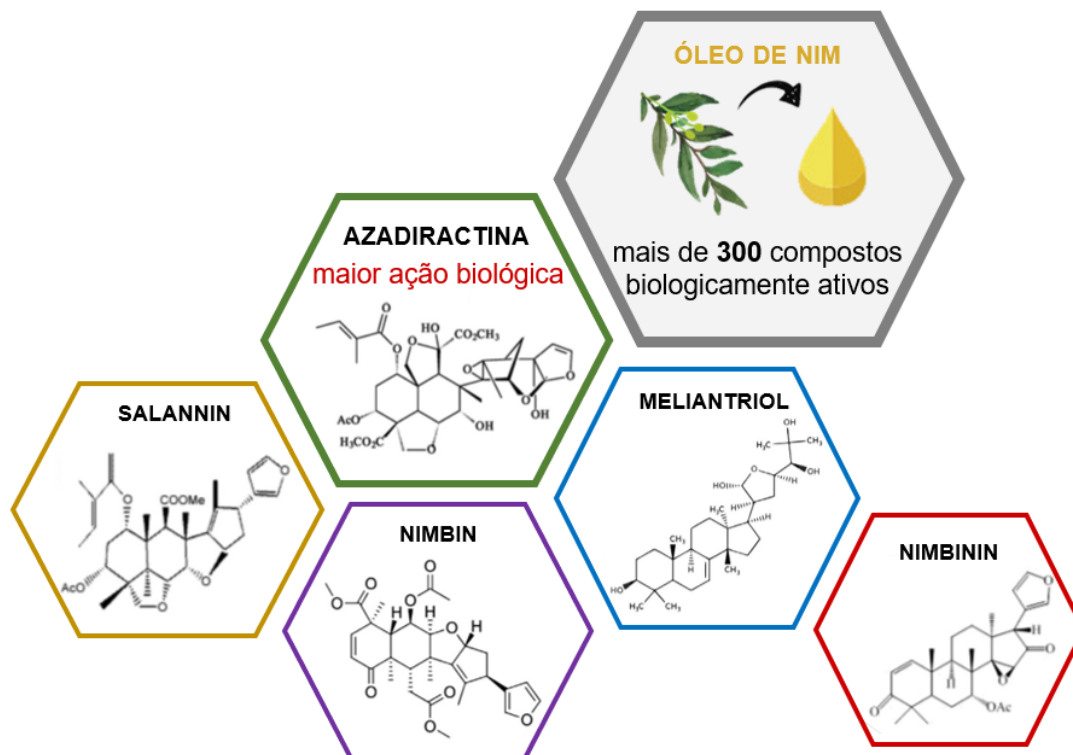


Figura 1 – Estrutura química dos principais compostos do óleo de nim (Baseado em Pascoli et al., 2019).

Devido ao reconhecimento de suas propriedades, existem atualmente diversos produtos à base de nim comercialmente disponíveis (Brahmachari, 2004, Campos et al., 2019). Entretanto, como consequência das diferentes técnicas de extração e produção, os produtos comerciais podem variar em relação à concentração de ingredientes ativos e características químicas, resultando em atividades biológicas distintas (Campos et al., 2016). Mondal et al. (2007) demonstraram isso através da determinação da CL_{50} (96 h) de dois biopesticidas à base de nim para alevinos do teleosteo asiático *Lepidocephalichthys guntea*. Os valores encontrados foram de $0,0135 \text{ mg L}^{-1}$ para Nimbicidine™ (0,03% de azadiractina), $0,0525 \text{ mg L}^{-1}$ para NeemGold (0,15% de azadiractina) e $0,0396 \text{ mg L}^{-1}$ para mistura dos dois. O produto comercial Nimbicidine™ foi mais tóxico que o NeemGold e a combinação dos dois, possivelmente devido à formação de uma camada oleosa sobre a água capaz de reduzir o oxigênio dissolvido.

Devido à presença de múltiplos compostos com diferentes atividades biológicas (Brahmachari, 2004, Morgan et al., 2009), estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos

organismos-alvo aos agrotóxicos à base de nim seja improvável. Feng e Isman (1995) verificaram que pulgões (*Myzus persicae*) tratados com azadiractina purificada desenvolveram resistência rapidamente, enquanto que os indivíduos expostos ao extrato de nim não demonstraram qualquer sinal de resistência, mesmo após 40 gerações. Nesse contexto, a combinação dos diferentes fitoquímicos e, conseqüentemente, das ações biológicas, tornam os biopesticidas a base de nim potencialmente capazes de induzir uma resposta sistêmica eficaz contra uma ampla variedade de organismos-alvos (Campos et al., 2016, Pascoli et al., 2019).

Dentre os principais efeitos do nim em insetos, a interferência na síntese de ecdisona, hormônio envolvido no processo de muda, destaca-se. Assim como, o prejuízo no movimento e atividade de voo, provavelmente devido a atividade colinérgica comprometida. A supressão da fertilidade e fecundidade também são algumas das respostas desencadeadas por esse biopesticida (Brahmachari, 2004, El-Wakeil, 2013, Campos et al., 2016, Chandramohan et al., 2016). Além disso, constituintes do nim exibiram uma ação anti-forrageio capaz de prejudicar o ganho de peso corporal de duas larvas de mariposas (*Helicoverpa armigera* e *Spodoptera litura*) (Koul et al., 2004). Ação larvicida contra *Chironomus* spp. (Adakole e Ogwu, 2012) e *Anopheles* sp. (Kumar et al., 2011, Chandramohan et al., 2016) também foi atribuída ao nim. Adicionalmente, Silva et al. (2019) verificaram que a azadiractina é capaz de atuar no sistema imunológico do percevejo *Podisus nigrispinus*, diminuindo o número de hemócitos, efeito semelhante ao causado pelo inseticida sintético deltametrina.

A contribuição do óleo de nim à agricultura mais sustentável deve-se também a sua aplicação como biofertilizante. Os resíduos da extração do óleo melhoram a qualidade do solo, uma vez que fornecem macronutrientes essenciais para a produção agrícola (Brahmachari, 2004, Pascoli et al., 2019). O uso do nim como biofertilizante é considerado seguro, já que sua aplicação no solo não promoveu alterações nos genes envolvidos no ciclo do nitrogênio da microbiota, processo fundamental para a manutenção da fertilidade do solo (Pascoli et al., 2019). Além disso, a utilização do óleo de nim, assim como de outros biopesticidas, é permitida na agricultura orgânica no controle dos organismos-alvos (Weintraub et al., 2017).

1.1.1 Toxicidade do Nim em Peixes

Com o intuito de reduzir os prejuízos causados por patógenos na produtividade de peixes, o óleo de nim é amplamente utilizado em pisciculturas como uma alternativa mais segura, comparado aos agrotóxicos convencionais (Winkaler et al., 2007, Tavechio et al., 2009). Exemplo dessa aplicação foi evidenciado no estudo de Harikrishnan et al. (2003), no qual indivíduos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) tratados com o extrato aquoso das folhas de *A. indica* exibiram redução no diâmetro das lesões dérmicas provocadas por uma infecção bacteriana (*Aeromonas hydrophila*). Portanto, a entrada do nim e seus compostos nos ambientes aquáticos não ocorre somente através do escoamento de áreas agrícolas, mas também a partir do seu uso direto nos corpos d'água, representando um risco aos organismos aquáticos.

Nesse contexto, considera-se importante a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos que esse biopesticida pode causar à biota local (Winkaler et al., 2007). Dhara et al. (2016) determinaram a toxicidade aguda do extrato foliar de nim nos diferentes estágios de vida da tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*). Os valores de concentração letal média (CL₅₀) em 24 h de exposição foram 3,28, 4,96 e 7,58 g L⁻¹ para alevinos, juvenis e adultos, respectivamente. Após 96 h, os valores de CL₅₀ para as três etapas foram 1,67, 2,27 e 5,83 g L⁻¹. Valores semelhantes de CL₅₀ (24 h) do extrato aquoso da planta foram encontrados para juvenis de curimba (*Prochilodus lineatus*) (4,8 g L⁻¹) (Winkaler et al., 2007) e alevinos de carpa rohu (*Labeo rohita*) (1,035 g L⁻¹) (Saravanan et al., 2010).

Em relação à azadiractina purificada, a CL₅₀ (96 h) foi determinada em 52,35 mg L⁻¹ para o bagre asiático (*Heteropneustes fossilis*) (Kumar et al., 2012) e 55,76 mg L⁻¹ para o peixe panga (*Pangasius hypophthalmus*) (Suresh et al., 2013), indicando uma maior toxicidade do produto isolado em relação ao extrato aquoso. Considerando o extrato do óleo de nim, Hassanein e Okail (2008) determinaram a CL₅₀ (96 h) para a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) em 112 mg L⁻¹. Em contrapartida, Murussi et al. (2016b) e Ahmad et al. (2011) verificaram valores de concentração letal média ainda menores para produtos comerciais à base de nim. A CL₅₀ (96 h) do Neenmax™ para carpa comum (*C. carpio*) foi determinada em torno de 80 µL L⁻¹

¹ (Murussi et al., 2016b), já para embriões de *Danio rerio* a CL₅₀ (96 h) o valor foi 0,46 µg L⁻¹ de NeemGold (Ahmad et al., 2011).

Hassanein e Okail (2008) relataram aumento da ventilação opercular, natação irregular e dificuldade respiratória no peixe *C. idella* tratado com concentrações letais de extrato do óleo de nim, comportamento verificado também no teleósteo asiático *Lepidocephalichthys guntea* submetido a formulações de nim (Mondal et al., 2007). Portanto, sugere-se que a morte induzida pelo nim ocorre em decorrência da fadiga muscular e da toxicidade direta do composto (Hassanein e Okail, 2008).

Desse modo, além de a CL₅₀ variar de forma espécie-específica, a concentração dos ingredientes ativos, bem como a natureza do produto podem também influenciar a toxicidade do nim e seus compostos. Além disso, estudos já demonstraram a capacidade do nim de promover alterações em parâmetros metabólicos, bioquímicos e histológicos de peixes após exposição a concentrações sub-letais (Harikrishnan et al., 2003, Winkaler et al., 2007, Kumar et al., 2010, 2012, 2013, 2014, Murussi et al., 2016a, 2016b, Plhalova et al., 2017, Alak et al., 2017, 2018). Embora estudos envolvendo o nim representem uma fração considerável do total de trabalhos sobre biopesticidas dos últimos 20 anos (Isman e Grieneisen, 2014), dados sobre seus efeitos em biomarcadores de peixes, principalmente nativos da América do Sul, ainda são escassos na literatura.

1.2 NANOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA

Estima-se que grande parte dos agrotóxicos aplicados nas áreas agrícolas sofrem escoamento e chegam aos corpos d'água antes mesmo de atingir os seus alvos, representando uma técnica dispendiosa à agricultura. Entretanto, apesar do desperdício considerável, o uso desses produtos ainda é uma das práticas mais utilizadas no controle de organismos indesejados no setor agrícola (Grillo et al., 2012). Devido a sua rápida dispersão, os agrotóxicos são frequentemente aplicados em curtos intervalos de tempo, a fim de garantir sua eficiência (Grillo et al., 2012).

Diferentemente dos produtos convencionais, o nim, assim como outros biopesticidas, é biodegradável e apresenta baixa persistência no

ambiente devido à sua alta fotosensibilidade. Johnson et al. (2003) verificaram uma degradação progressiva da azadiractina quando sob a luz solar, atingindo a meia vida em torno de 96 horas. Corroborando esses resultados, Kwankua et al. (2010) demonstraram que a exposição a luz solar reduziu o potencial genotóxico e citotóxico do extrato de nim para *Allium cepa* e *Eucrosia bicolor*. Considerando isso, o uso do nim no campo é limitado devido à sua curta durabilidade (Pascoli et al., 2019).

A nanotecnologia baseia-se no desenvolvimento de partículas em dimensões reduzidas (< 1000 nm), muito utilizadas atualmente nos setores farmacêutico e agrícola (Grillo et al., 2012). As nanocápsulas têm possibilitado novas perspectivas à agricultura, já que funcionam como sistemas de liberação controlada de agrotóxicos (Oliveira et al., 2015, Campos et al., 2016). O nanoencapsulamento com diferentes polímeros é capaz de conferir ao composto ativo maior estabilidade e resistência à degradação precoce. (Campos et al., 2014, Grillo et al., 2014, de Oliveira et al., 2014, Oliveira et al., 2015, Pascoli et al., 2019). Como evidenciado em um estudo no qual nanocápsulas de quitosana/goma arábica reduziram a fotosensibilidade do geraniol a radiação UV (de Oliveira et al., 2018a).

Devido a essas contribuições, a nanotecnologia aplicada à agricultura possibilita minimizar os impactos dos agrotóxicos aos organismos não-alvos e ecossistemas, já que os nanosistemas podem aumentar a eficiência do produto (Oliveira et al., 2018a, Andrade et al., 2019, Campos et al., 2019). Requerendo potencialmente uma menor frequência de aplicação em concentrações otimizadas, já que o ingrediente ativo permanece por mais tempo na zona ativa (Figura 2A) (Campos et al., 2014, Pascoli et al., 2019).

Inúmeros estudos têm demonstrado o potencial das matrizes naturais e sintéticas de serem utilizadas no desenvolvimento de sistemas nanocarreadores de pesticidas botânicos (Figura 2B) (Campos et al., 2014, 2019, de Oliveira et al., 2018b, Pascoli et al., 2018, 2019, Andrade et al., 2019). Contudo, ainda há poucos trabalhos disponíveis na literatura sobre os efeitos dos biopesticidas nanoencapsulados nos organismos (Campos et al., 2019).

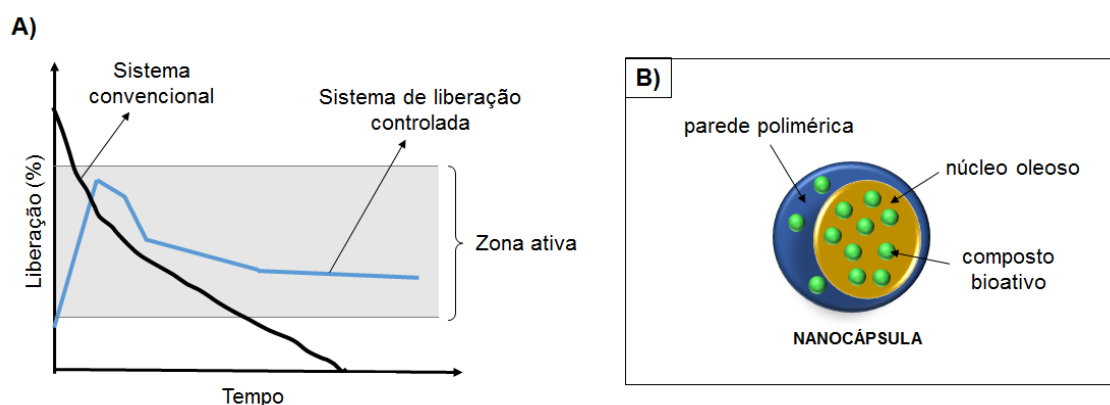


Figura 2 – Representação esquemática A) de um sistema convencional e de um sistema de liberação controlada (nanopartículas) para aplicação na agricultura e B) um corte transversal de uma nanocápsula polimérica (Baseado em Campos et al., 2014 e Grillo et al., 2012).

Além de serem considerados mais seguros aos organismos não-alvos, os agrotóxicos nanoencapsulados parecem também ser mais eficazes contra os organismos-alvo quando comparado aos produtos convencionais (Grillo et al., 2014, Oliveira et al., 2015). Shang et al. (2012) verificaram que a nanoencapsulação do inseticida benzoato de emamectina promoveu um aumento na mortalidade da lagarta *Helicoverpa armigera*. As nanocápsulas de poliacrilato foram capazes também de reduzir a taxa de fotodegradação do inseticida.

Resultados promissores foram também descritos para os nanoherbicidas. Exemplares de *Brassica* sp. (planta-alvo) tratados com atrazina nanoencapsulada exibiram uma menor taxa de germinação quando comparado aos indivíduos expostos ao herbicida convencional (Pereira et al., 2014). Em contrapartida, mudas de milho (*Zea mays* – planta não-alvo) apresentaram crescimento normal após exposição a ambos os tratamentos. Além disso, Sousa et al. (2018) constataram que a redução na taxa de crescimento relativo da raiz e parte aérea de duas plantas-alvos (*Bidens pilosa* e *Amaranthus viridis*) tratadas com nanocápsulas de atrazina (200 g ha^{-1}) foi a mesma que aquela observada para o herbicida convencional em uma concentração 10 vezes maior (2000 g ha^{-1}).

Os possíveis efeitos tóxicos dos nanoagrotóxicos devem também ser avaliados em animais aquáticos, uma vez que esses organismos

são continuamente atingidos por contaminantes de origem agrícola, devido ao uso intensivo destes (Vieira et al., 2016). Nesse contexto, um recente trabalho mostrou uma menor toxicidade da atrazina nanoencapsulada ao peixe *P. lineatus* quando comparado à sua formulação convencional (Andrade et al., 2019). Embora resultados favoráveis tenham sido atingidos, a exposição ao nanoherbicida provocou danos no DNA dos peixes. Andrade et al. (2019) atribuíram esse efeito genotóxico às nanocápsulas, preparadas com o polímero sintético poli(ϵ -caprolactona) (PCL), já que esses resultados foram constatados também em animais tratados apenas com as nanocápsulas sem o ativo.

Além disso, as nanocápsulas de PCL sem o ingrediente ativo foram capazes de reduzir o índice de germinação de indivíduos de *Brassica* sp. (planta-alvo) (Pereira et al., 2014). Em contrapartida, Pasquoto-Stigliani et al. (2017) constataram um potencial fitóxico apenas nas nanocápsulas de PCL contendo óleo de nim e ácido oleico em diferentes proporções. As plantas de milho expostas as nanoformulações de PCL sem o composto não apresentaram alterações na assimilação de CO₂ e condutância estomática, assim como os indivíduos tratados com as nanocápsulas contendo apenas óleo de nim. Esses resultados indicam que o uso do ácido oleico na síntese de nanocápsulas contendo nim não é indicado.

Com base no exposto, o polímero utilizado na síntese, assim como outras propriedades físicas das nanocápsulas, devem ser consideradas na avaliação do potencial efeito tóxico desses nanomateriais (Grillo et al., 2012, Andrade et al., 2019).

1.3 ZEÍNA

A zeína é o principal conteúdo proteico do milho (*Zea mays* L.) e pertence à classe das prolaminas, proteínas características que ocorrem nos cereais (Shukla e Cheryan, 2001). Resíduos de aminoácidos lipofílicos, como a leucina, prolina, alanina e fenilalanina compõem grande parte da estrutura (Elzoghby et al., 2012, da Rosa et al., 2015). A presença desses aminoácidos confere à zeína solubilidade em solventes orgânicos, como o etanol (Shukla e Cheryan, 2001, Lai e Guo, 2011, Podaralla e Perumal, 2012, Paliwal e Palakurthi, 2014).

Nos grãos de milho, a zeína corresponde à cerca de metade do total de proteínas presentes, sendo a α -zeína o grupo mais abundante, dentre as quatro subclasses (α , β , γ e δ -zeína) do vegetal (Podaralla e Perumal, 2012, Paliwal e Palakurthi, 2014, Papalia e Londero, 2015, de Oliveira et al., 2018b, Pascoli et al., 2018). Por ser considerada nutricionalmente pobre em nitrogênio, devido à deficiência dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano, e pela insolubilidade em água, a zeína não é utilizada diretamente no consumo humano (Shukla e Cheryan, 2001, Paliwal e Palakurthi, 2014, Pascoli et al., 2018). A zeína é extraída a partir da farinha de milho, obtida da moagem seca do grão, um subproduto das indústrias de bioetanol (Shukla e Cheryan, 2001, Papalia e Londero, 2015).

Além disso, graças à sua característica apolar, a zeína tem sido apontada como um biopolímero favorável no desenvolvimento de estruturas nanocarreadoras (Paliwal e Palakurthi, 2014, Pascoli et al., 2019), devido à sua facilidade e rapidez em ser convertida em sistemas de revestimento biopoliméricos (Patel et al., 2010, Pascoli et al., 2019). Dentre as suas propriedades, destacam-se a biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo e fácil polimerização. Além disso, a zeína é considerada uma substância GRAS (geralmente reconhecida como segura) pela FDA (Food and Drug Administration) (Elzoghby et al., 2012). Essas características permitem à zeína uma ampla variedade de aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia, como sistemas de entrega de medicamentos e embalagens mais resistentes a fatores abióticos (Lai e Guo, 2011, Paliwal e Palakurthi, 2014, Papalia e Londero, 2015, Pascoli et al., 2018). Muitos trabalhos têm demonstrado o potencial promissor da zeína como material de revestimento de nanocápsulas contendo biocidas (Wu et al., 2012, da Rosa et al., 2015, de Oliveira et al., 2018b, Pascoli et al., 2019).

1.3.1 Nanocápsulas de Zeína Contendo Óleo de Nim

As nanocápsulas de zeína carregadas com óleo de nim atendem aos princípios da nanotecnologia ambientalmente amigável, já que essas nanocápsulas são preparadas com um solvente de baixa toxicidade (etanol), o qual evapora totalmente ao longo do processo de síntese das nanopartículas.

Além disso, pela zeína e o óleo de nim serem produtos de origem vegetal, e consequentemente, biodegradáveis, as possíveis preocupações em relação à permanência desses compostos no ambiente é reduzida (Campos et al., 2016, 2019, Pascoli et al., 2018, 2019, 2020).

Considerando a eficiência do encapsulamento do óleo de nim nas nanocápsulas de zeína, Pascoli et al. (2020) demonstraram que esses nanosistemas são promissores, uma vez que foi verificada uma eficiência em torno de $86 \pm 0,5\%$ após 5 dias de armazenamento. Houve uma diminuição gradual na eficiência até o 90º dia, atingindo cerca de $64 \pm 0,6\%$, a qual ainda foi considerada alta pelos autores. Esse decréscimo na eficiência observado ao longo do tempo, foi atribuído à liberação do ingrediente ativo das nanocápsulas.

Além disso, óleo de nim exibiu uma maior ação inseticida quando nanoencapsulado. A menor concentração do nanobiopesticida (1 mg mL^{-1}) promoveu um aumento na mortalidade da mosca branca (*Bemisia tabaci*) quando comparado ao composto convencional. Já nas maiores concentrações (5 e 15 mg mL^{-1}) o produto convencional foi mais eficaz (Pascoli et al., 2020). O mesmo ocorreu nos ensaios de toxicidade aguda com o coleóptera *Acanthoscelides obtectus*. A CL_{50} do óleo de nim para o inseto foi $11,22 \text{ mg}$ de azadiractina, já do óleo nanoencapsulado o valor caiu para $6,65 \text{ mg}$. Esses resultados indicam o potencial do nanobiopesticida ser utilizado em concentrações otimizadas, reduzindo os possíveis efeitos prejudiciais aos ecossistemas. Vale ressaltar também que o nanobiopesticida não exerceu qualquer ação fitotóxica no feijão (*Phaseolus vulgaris*), planta alvo do coleóptera (Pascoli et al., 2020).

Os efeitos das nanocápsulas de zeína carregadas com óleo de nim foram também avaliados em diferentes grupos de organismos não-alvos, por meio da quantificação de genes envolvidos no ciclo do nitrogênio da microbiota do solo, ensaio de genotoxicidade com *Allium cepa* e testes com o nematoide *Caenorhabditis elegans* (Pascoli et al., 2019). Dentre os resultados, a redução do dano genotóxico em *A. cepa* e a manutenção do bombeamento faríngeo em *C. elegans*, chamaram atenção. Esses resultados indicam a capacidade das nanocápsulas de reduzir o potencial tóxico do agrotóxico aos organismos não-alvos.

Contudo, a descrição dos efeitos desse nanobiopesticida em organismos aquáticos ainda não está disponível na literatura. Portanto, considerando o uso frequente do nim no controle de patógenos em pisciculturas (Winkaler et al., 2007, Tavechio et al., 2009) e as novas perspectivas de seu uso nanoformulado no setor agrícola, estudos na área da ecotoxicologia com organismos aquáticos não-alvo são necessários. Tendo como intuito a investigação dos potenciais efeitos tóxicos do nim, a fim de tornar seu uso mais seguro.

1.4 MODELO BIOLÓGICO

O uso de peixes em ensaios ecotoxicológicos é justificado por uma série de fatores, como: I) grande importância social e ecológica, II) sensibilidade a xenobióticos e III) sua posição na cadeia trófica, podendo funcionar como bioacumuladores de contaminantes e promover a transferência para níveis tróficos superiores. Além disso, muitas espécies já tem sua história de vida e fisiologia bem descrita, sendo assim bons indicadores da condição ecológica (Flotemersch et al., 2006, Andrade et al., 2019).

Neste trabalho foi utilizado como modelo biológico o teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como curimba ou curimbatá (Figura 3). *Prochilodus lineatus* Valenciennes (1836) apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Prochilodus lineatus

Essa espécie é amplamente distribuída na região Neotropical, na bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul, sendo abundante na bacia hidrográfica do rio Tibagi (Shibatta et al., 2002, Shibatta et al., 2007).



Figura 3 - Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*. Fonte: José Luís Olivan Birindelli (MZUEL).

A família Prochilodontidae, assim como Curimatidae, é uma conhecida família de peixes da região neotropical com espécies exclusivamente detritívoras (Silva, 2016). *Prochilodus lineatus* possui hábito alimentar especializado, alimentando-se preferencialmente de partículas finas dos sedimentos lodosos e algas, cujo hábito é denominado de iliofagia (Velludo, 2011). O movimento de raspagem do sedimento é possível graças a posição terminal da boca e à mobilidade dos lábios providos de dentículos (Moraes et al., 1997, Shibatta et al., 2002, Velludo, 2011). Além disso, Moraes et al. (1997)

descreveram que o arranjo anatômico dos rastros branquiais de *P. lineatus* possibilita uma maior eficiência na filtração dos detritos ingeridos, bem como a proteção dos filamentos branquiais do animal (Moraes et al., 1997, Velludo, 2011).

Devido ao seu modo de alimentação, *P. lineatus* está sujeito aos contaminantes presentes tanto na coluna d'água como no sedimento (Lombardi et al., 2010) e por isso, essa espécie vem sendo muito utilizada em estudos de toxicidade, mostrando-se bastante sensível a diferentes classes de contaminantes, como os agrotóxicos (Vieira et al., 2016, 2019, Alvim e Martinez, 2019, Andrade et al., 2019). Assim, a reconhecida sensibilidade a contaminantes, associada às suas demais características biológicas, justificam a escolha desta espécie como modelo biológico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se exposições agudas (24 e 96 h) ao óleo de nim nanoencapsulado promovem alterações em biomarcadores fisiológicos e bioquímicos do peixe neotropical *P. lineatus*; comparar esses resultados aos efeitos das nanocápsulas de zeína sem o composto ativo, bem como da formulação convencional do óleo de nim.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar se a exposição ao óleo de nim nanoencapsulado, ao óleo de nim comercial ou apenas às nanocápsulas promove alterações hematológicas, nas concentrações de íons plasmáticos e no metabolismo de carboidratos de *P. lineatus*;
- II. Verificar se estas exposições interferem em defesas antioxidantes e vias de biotransformação e causam danos oxidativos em diferentes tecidos de *P. lineatus*;
- III. Investigar os possíveis efeitos neurotóxicos do óleo de nim livre e nanoencapsulado, bem como das nanocápsulas de zeína, por meio da medida da atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de *P. lineatus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE ZEÍNA CONTENDO BIOPESTICIDA À BASE DE NIM

As nanocápsulas de zeína contendo óleo de nim foram preparadas através do método de precipitação antisolvente descrito por Hu e McClements (2014) e modificações de Pascoli et al. (2018). O princípio do método consiste basicamente em alterar a supersaturação do material devido à mistura da solução contendo o composto ativo com uma solução aquosa, esse processo induz a precipitação do polímero e conseqüentemente, a formação das nanopartículas (Figura 4) (Pascoli et al., 2018, 2019).

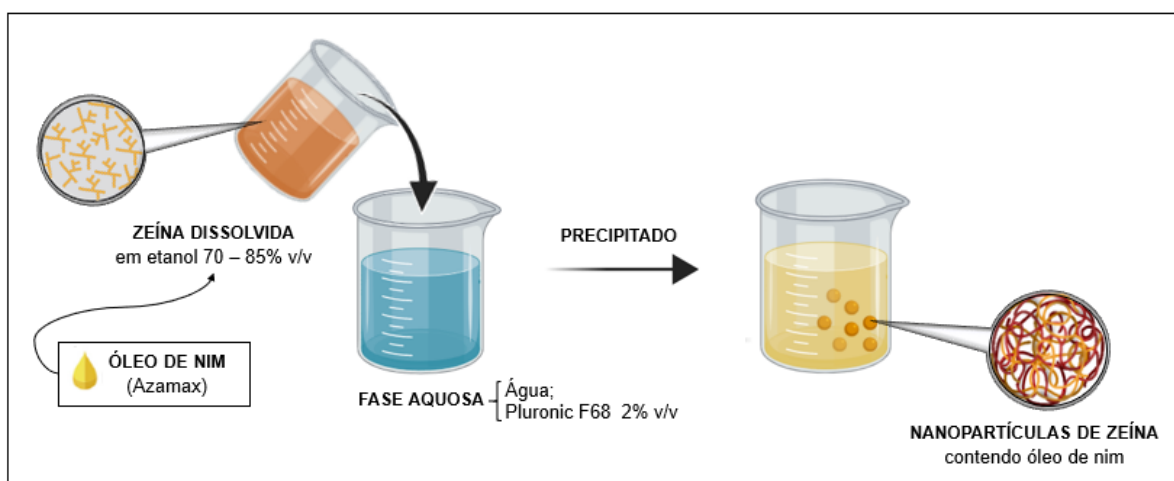


Figura 4 – Representação esquemática da síntese das nanocápsulas de zeína contendo óleo de nim por meio do método de precipitação antisolvente (Baseado em Pascoli et al., 2018).

Dessa forma, a zeína em pó (2% m/v) foi dissolvida em uma solução aquosa de etanol (85% v/v) e mantida sob agitação magnética noturna. Posteriormente, a solução de zeína (solução contendo o composto ativo) teve o pH ajustado para 5,8 (ponto isoelétrico da zeína é pH 6,2) e passou por um tratamento térmico (75 °C) durante 15 min para a desnaturação proteica, com o intuito de aumentar a estabilidade da formulação. Para remoção das partículas insolúveis, a solução foi submetida a centrifugação e filtração.

Na solução de zeína dissolvida, foi adicionado 100 mg de óleo de nim (Azamax) na forma de um concentrado emulsificável, contendo 12 g L⁻¹ de azadiractina. Com o intuito de reduzir a tensão superficial das nanopartículas e manter a sua estabilidade, uma solução aquosa do surfactante Pluronic F-68 (2% v/v) com pH 4 foi preparada. Com o auxílio de uma seringa, a suspensão contendo as nanocápsulas de zeína foi rapidamente injetada na solução aquosa. Para a completa evaporação do etanol, a mistura resultante foi mantida em agitação por 12 h à temperatura ambiente.

A concentração final de 5 mg mL⁻¹ de óleo de nim (0,06 mg mL⁻¹ de azadiractina) das nanoformulações, foi atingida através da adição de água (pH 4,0). Vale ressaltar que nanocápsulas de zeína sem a adição do óleo de nim foram preparadas da mesma forma e utilizadas nos testes de toxicidade como um segundo grupo controle (NANO).

O Azamax (12 g L⁻¹ de azadiractina), produto comercial a base de nim foi adquirido da UPL Brasil e utilizado na síntese das formulações. Segundo o fabricante, na agricultura o nim é utilizado em concentrações entre 4 e 6 mg mL⁻¹, justificando a escolha de 5 mg mL⁻¹ de óleo de nim da solução estoque utilizada nesse estudo. Esse agrotóxico botânico pertence à classe dos inseticidas tetranortriterpenóides e é classificado como medianamente tóxico (Classe III) e pouco perigoso ao meio ambiente (Classe IV) segundo a bula.

O processo de preparação, bem como, de caracterização e fornecimento das nanopartículas de zeína contendo o óleo de nim foram realizados no Laboratório de Nanotecnologia Ambiental do Departamento de Engenharia Ambiental da UNESP de Sorocaba (SP).

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

A distribuição de tamanho (nm) e a concentração de partículas (mL) das amostras foram determinadas por análise de rastreamento de nanopartículas (nanoparticle tracking analysis – NTA), utilizando o aparelho NanoSight LM 10. Uma câmera sCMOS e o software NanoSight v. 3.2 foram utilizados para coletar e processar as imagens, respectivamente (Grillo et al., 2014). Em cada amostra de água (sem diluição) foram realizadas cinco leituras.

Além disso, a homogeneidade das amostras em relação ao diâmetro médio das partículas foi calculada por meio do índice de Span, como descrito abaixo:

$$Span = \frac{(D90 - D10)}{D50}$$

*onde D10, D50 e D90 representam o diâmetro médio correspondente a 10, 50 e 90% da população de partículas, respectivamente (Pascoli et al., 2020).

3.3 MANUTENÇÃO DOS PEIXES

Juvenis de *P. lineatus* (média ± E.P.) foram adquiridos na Piscicultura Venites (n= 64; comprimento total 13,15 ± 0,17 cm; comprimento padrão 10,68 ± 0,20 cm; peso 22,33 ± 1,92 g) e na Piscicultura Schneider (n= 64; comprimento total 18,66 ± 0,22 cm; comprimento padrão 14,99 ± 0,04 cm; peso 66,59 ± 0,47 g), ambas localizadas em Toledo-PR (Brasil). Os peixes foram transportados até o laboratório de bioensaios e aclimatados, por no mínimo sete dias, em tanque de 500 L, contendo água limpa, desclorada e aerada continuamente, fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro e temperatura ambiente controlada (27 °C).

A alimentação com ração comercial (Pirá Mirim QS 1,7 mm, Guabi) foi fornecida a cada 48 h e suspensa 24 h antes do início dos experimentos. Os parâmetros físicos e químicos da água (média ± E.P.) como temperatura (26,7 ± 0,08 °C), pH (7,4 ± 0,26), condutividade (199 ± 3 µS cm⁻¹), turbidez (5,1 ± 1,82 NTU) e oxigênio dissolvido (6,0 ± 0,67 mg L⁻¹) foram monitorados com um medidor multiparâmetro (Horiba U-50) a cada 48 h e mantiveram-se constantes.

Os procedimentos realizados neste trabalho foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (protocolo nº 16105.2018.19) (Anexo A).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, os peixes foram submetidos aos ensaios estáticos de toxicidade, durante 24 e 96 h. Os animais foram expostos aos seguintes meios experimentais: i) apenas água desclorada (controle – CTR); ii) água contendo nanocápsulas de zeína (NANO); iii) água contendo óleo de nim (ÓLEO); e iv) água contendo nanocápsulas de zeína carregadas com óleo de nim (nÓLEO). Os peixes foram mantidos individualmente em aquários contendo 10 L de água, com aeração contínua, nas condições experimentais descritas acima, com oito animais expostos a cada tratamento (CTR, ÓLEO, NANO e nÓLEO), totalizado 32 animais ($n = 32$) para cada experimento (Figura 5).

Os peixes dos grupos ÓLEO e nÓLEO foram expostos a duas concentrações de azadiractina 60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que no grupo NANO a concentração de nanopartículas foi correspondente à concentração de nanopartículas do grupo nÓLEO. Para atingir a menor concentração testada (60 $\mu\text{g L}^{-1}$), adicionou-se 10 mL das formulações nos aquários contendo 10 L de água, já a concentração de 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi obtida através da adição de 15 mL dos compostos. Embora o composto convencional seja um óleo, este foi miscível em água e apresentou aspecto homogêneo e pouco viscoso, assim como informado pelo fabricante. Os aquários do grupo NANO mostraram uma considerável quantidade de espuma acima do nível da água, espuma possivelmente causada pelo surfactante utilizado na síntese das nanopartículas. Vale ressaltar também que os peixes foram alocados nos meios experimentais após 30 minutos da adição das formulações, para que ocorresse a completa dissolução dessas.

As concentrações de azadiractina utilizadas no presente estudo foram determinadas considerando trabalhos recentes, os quais avaliaram parâmetros antioxidantes, danos oxidativos e respostas neurofisiológicas em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta a duas concentrações (120 e 240 $\mu\text{g L}^{-1}$) de azadiractina por um período prolongado (21 dias) (Alak et al., 2017, 2018). Contudo, devido ao volume limitado das formulações utilizadas neste trabalho, as concentrações testadas foram ainda menores.

Os experimentos foram conduzidos de forma independente para os dois tempos (24 h e 96 h) e as duas concentrações (60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ de azadiractina), totalizando quatro experimentos ($n = 32$ por experimento/ n total=

128), nos quais os quatro tratamentos (CTR, NANO, ÓLEO e nÓLEO) corriam simultaneamente, como mostra a Figura 5. Não houve renovação das soluções-teste ao longo dos períodos de exposição. Além disso, é importante destacar que os dois tempos experimentais (24 h e 96 h) referentes a concentração de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de azadiractina foram conduzidos com o lote de peixes fornecidos pela Piscicultura Venites. Enquanto que os testes contendo a maior concentração de azadiractina testada ($90 \mu\text{g L}^{-1}$) foram feitos com os juvenis oriundos da Piscicultura Schneider, os quais possuíam maior tamanho corpóreo. A utilização de dois lotes de peixes de origens distintas foi necessária devido a limitação no número de indivíduos de cada piscicultura.

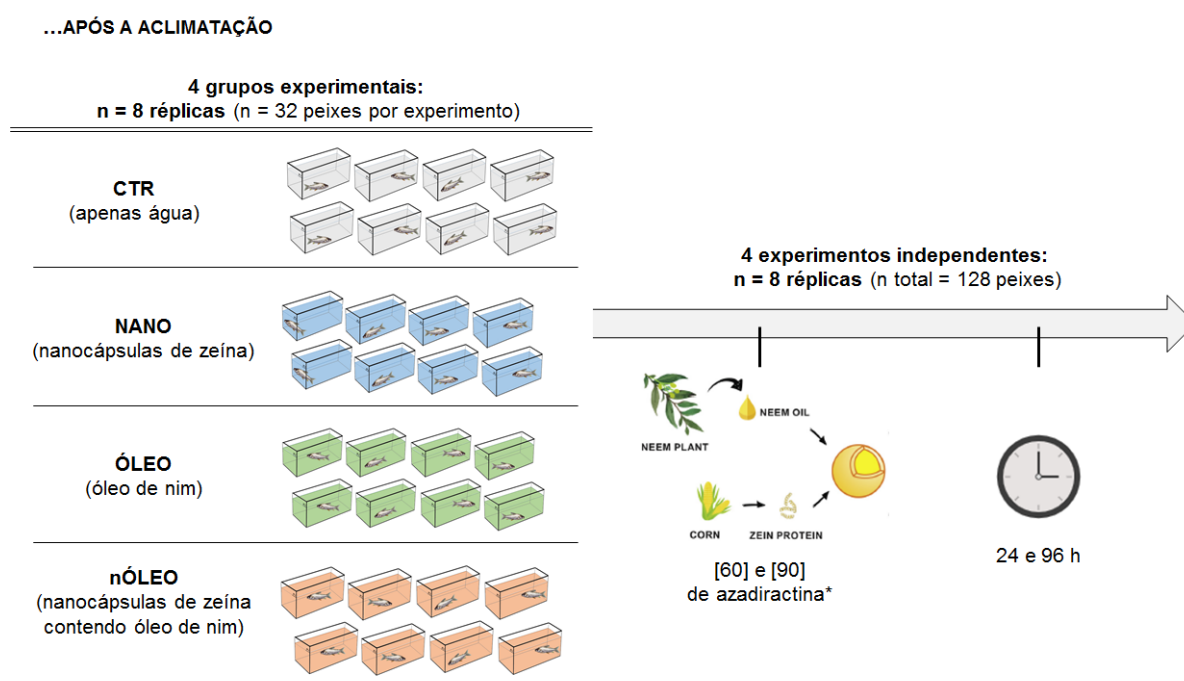


Figura 5 – Delineamento experimental. Juvenis de *P. lineatus* foram expostos aos tratamentos NANO, ÓLEO e nÓLEO em duas concentrações (60 e $90 \mu\text{g L}^{-1}$ de azadiractina) ou apenas à água (CTR) por 24 e 96 h. *no grupo NANO as concentrações de nanopartículas foram correspondentes àquelas do nÓLEO.

Ao longo das exposições, assim como durante o período de aclimação, os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados diariamente. Além disso, amostras de água de cada tratamento (NANO, ÓLEO e nÓLEO) foram coletadas após 30 minutos da adição dos compostos nos aquários e também a cada 24 h, a fim de realizar a caracterização das nanocápsulas.

3.5 AMOSTRAGEM

Após os ensaios de toxicidade, os animais foram anestesiados em benzocaína (0,1 g benzocaína L⁻¹ de água), pesados e medidos. Amostras de sangue retiradas através da veia caudal com auxílio de seringas heparinizadas foram utilizadas na determinação dos parâmetros fisiológicos. Em seguida, os peixes foram mortos por secção medular para remoção dos órgãos, (brânquia, fígado, cérebro e músculo), os quais foram mantidos congelados em ultrafreezer a -72 °C até o momento das análises bioquímicas.

3.6 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

3.6.1 Análises Sanguíneas

O hematócrito (Hct) foi quantificado por centrifugação sanguínea (1200 g, 7 min) em microcapilares de vidro heparinizados. A porcentagem de células vermelhas foi determinada em cartão padronizado. O conteúdo de hemoglobina (Hb) foi determinado através do método do cianeto de meta-hemoglobina, utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brazil) em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom). O número de eritrócitos por mm³ (RBC) foi quantificado em câmara de Neubauer sob microscópio de luz.

3.6.2 Análises Iônicas

O sangue total foi centrifugado (5000 g, 10 min, 25°C) para obtenção do plasma sanguíneo, utilizado na determinação dos parâmetros plasmáticos. As concentrações de sódio e potássio foram determinadas em fotômetro de chama (Digimed DM-62, Brazil). Cálcio e magnésio foram quantificados em espectrômetro de absorção atômica (Perkin Elmer Analyst 700, USA). A concentração de cloreto foi determinada utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brazil), através do método de tiocianato de mercúrio em espectrofotômetro de microplacas (Victor³, Perkin Elmer, USA) a 470 nm.

3.6.3 Análises Metabólicas

A concentração de glicose foi determinada através do método da glicose oxidase com o auxílio de um kit colorimétrico (Labtest Diagnóstica, Brazil), em espectrofotômetro de microplacas (Victor³, Perkin Elmer, USA) a 510nm. O glicogênio hepático e muscular ($\mu\text{moles de glicosil} \cdot \text{glicose mg de tecido}^{-1}$) foi quantificado segundo método descrito por Bidinotto et al. (1997). Para isto, amostras de fígado foram incubadas com KOH 6N (5 min, 100 °C). Após dissolução, foram adicionados etanol e K₂SO₄ (10%), as amostras foram centrifugadas e o precipitado foi ressuscitado em água destilada. A análise foi realizada quanto ao teor de açúcares redutores totais presente nas amostras pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom) a 480 nm.

3.7 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Amostras de brânquia, fígado, cérebro e músculo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugadas (13000 g, 20 min, 4° C), para realização das análises bioquímicas descritas abaixo. O teor de proteínas das amostras foi determinado com base em uma curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA) a 595 nm (Bradford, 1976).

3.7.1 Defesa Antioxidante – Glutathiona (GSH)

O conteúdo de tióis não proteicos (NPSH) (em $\mu\text{g SH mg ptn}^{-1}$) foi mensurado através da reação dos grupamentos sulfidril (-SH) com o reagente de cor DTNB (5,5'-ditiobis-ácido-nitrobenzóico). O tiolato foi quantificado em espectrofotômetro de microplaca a 412 nm (Beutler et al., 1963). A glutathiona (GSH) é o principal tiol não proteico da célula e, portanto, o principal composto quantificado nesse método. Vale ressaltar também que os grupamentos sulfidril de proteínas foram desnaturados com TCA 50%.

3.7.2 Dano Oxidativo – Peroxidação Lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica (LPO) (em nmol TBARS mg ptn⁻¹) foi avaliada de forma indireta, por meio da quantificação do malondialdeído (MDA), um dos seus produtos finais, com o ácido tiobarbitúrico (ensaio TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) em espectrofluorímetro (ex/em: 535/590nm) (Camejo et al., 1998).

3.7.3 Biotransformação de Xenobióticos – Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da glutathione S-transferase (GST) (em nmol CDNB min⁻¹ mg ptn⁻¹) foi monitorada através da conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), em espectrofotômetro a 340 nm por 10 minutos (Keen et al., 1976).

3.7.4 Neurotoxicidade – Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

As amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5, 1:10 p/v) e centrifugadas (13.000 g, 20 min, 4° C) para determinação da acetilcolinesterase (AChE) segundo Ellman et al. (1961) com modificações de Alves-Costa et al. (2007). A atividade da AChE (em nmol min⁻¹ mg ptn⁻¹) foi determinada através da reação da tiocolina, produto da degradação do iodeto de acetilcolina com o reagente de cor DTNB (5,5'-ditiobis-ácido-nitrobenzóico), o nitrobenzoato foi mensurado durante 6 minutos (t=0, t=3 e t=6) em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados de cada um dos parâmetros analisados foram comparados entre os diferentes grupos (CTR x NANO x ÓLEO x nÓLEO), para cada concentração (60 e 90 µg L⁻¹ de azadiractina) e tempo experimental (24 e 96h), por meio de análise de variância de uma via paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados

(normalidade e homogeneidade de variância). No caso de diferenças significativas, os valores de p, F (ANOVA) e H (Kruskal-Wallis) estão indicados no texto. Testes de comparações múltiplas Student Newman Keuls (SNK) (paramétrico) ou Dunn (não paramétrico) foram aplicados quando indicado. As análises estatísticas dos foram realizadas no software SigmaPlot 11.0. O nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$) foi considerado.

A partir dos resultados dos biomarcadores, calculou-se o Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) descrito por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificado por Sanchez et al. (2013). O índice baseia-se no princípio do desvio da referência entre o estado perturbado e não perturbado (Sanchez et al., 2013). Além disso, os cálculos foram realizados de acordo com Vieira et al. (2016), os quais foram feitos utilizando apenas os valores dos biomarcadores que apresentaram alterações significativas no parâmetro analisado. Para cada biomarcador, a razão entre o valor médio de cada grupo (NANO, ÓLEO e ÓLEO), em ambas concentrações e tempos, e o respectivo CTR (valor de referência) foi transformada em $\log_{10}(Y_i)$. Em seguida, a média geral (μ) e o desvio padrão (s) dos valores de Y_i foram calculados. A fórmula $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ foi utilizada para padronizar os valores de Y_i , e a diferença entre Z_i e Z_0 (referência) foi usada na determinação do índice de desvio do biomarcador (A). Por fim, os valores absolutos de A foram utilizados no cálculo do índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR) (Andrade et al., 2019).

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS MEIOS EXPERIMENTAIS

4.1.1 Parâmetros Físicos e Químicos da Água

Os parâmetros abióticos da água avaliados no decorrer dos testes de toxicidade mantiveram-se constantes, exceto a turbidez, que se mostrou aumentada visível e estatisticamente nos tratamentos ÓLEO e nÓLEO, quando comparado ao grupo CTR (Tabela 1). Em relação a condutividade, embora tenha sido verificada uma tendência reduzida nos grupos experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO), a variação não foi significativa ($p = 0,092$).

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água aferidos diariamente ao longo dos ensaios de toxicidade (24 h e 96 h).

Parâmetros da água	Grupos experimentais			
	CTR	NANO	ÓLEO	nÓLEO
Temperatura (°C)	24,33 ± 0,47	24,11 ± 0,48	24,34 ± 0,54	24,88 ± 0,49
pH	8,25 ± 0,07	8,15 ± 0,07	8,07 ± 0,11	8,19 ± 0,11
Condutividade (µS/cm)	145 ± 10	114 ± 4	116 ± 3	119 ± 4
Turbidez (NTU)	1,56 ± 0,41 ^a	7,45 ± 1,26 ^{a,b}	9,11 ± 1,13 ^b	18,07 ± 3,56 ^b
OD (mg L⁻¹)	6,47 ± 0,07	6,07 ± 0,20	6,05 ± 0,29	6,24 ± 0,19
Dureza (mg L⁻¹ CaCO₃)	30,95 ± 0,70	29,91 ± 0,39	31,34 ± 0,40	31,00 ± 0,73

Valores representados pela média ± EP. OD: oxigênio dissolvido. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos

4.1.2 Caracterização Físico-Química das Nanocápsulas

Em relação ao tamanho médio das nanopartículas e ao índice de polidispersão (Span), não foram observadas diferenças significativas do tempo inicial (t₀) para os tempos finais (t₂₄ e t₉₆), nos tratamentos NANO e nÓLEO, como mostra a Tabela 2. Contudo, observou-se que as concentrações de nanocápsulas em suspensão sem o ingrediente ativo (NANO) diminuíram do tempo inicial para os tempos finais (t₂₄ e t₉₆). O mesmo ocorreu para as nanocápsulas contendo o óleo de nim (nÓLEO), cujas concentrações encontradas inicialmente (t₀) foram maiores que aquelas ao final do experimento (t₂₄ e t₉₆).

Tabela 2 – Tamanho, concentração de nanopartículas e índice de dispersão (Span) obtidos pela análise NTA em amostras coletadas dos diferentes tratamentos experimentais (NANO e nÓLEO) nos tempos iniciais (t0) e finais (t24 e t96).

Grupos experimentais	Tempo (h)	Tamanho (nm)	nanopartículas (mL ⁻¹)	Span
NANO [60]	0	283,03 ± 7,75	4,80 ± 0,21 x 10 ⁸	0,967
	24	315,40 ± 8,21	1,62 ± 0,21 x 10 ^{8*}	0,995
	96	289,82 ± 21,73	2,30 ± 0,09 x 10 ^{8*}	1,369
NANO [90]	0	306,00 ± 10,86	4,01 ± 0,46 x 10 ⁸	1,198
	24	239,50 ± 14,72	2,59 ± 0,48 x 10 ^{8*}	1,067
	96	287,71 ± 30,94	1,41 ± 0,11 x 10 ^{8*}	1,237
nÓLEO [60]	0	195,05 ± 9,60	5,38 ± 0,46 x 10 ⁸	1,290
	24	274,75 ± 34,32	1,30 ± 0,33 x 10 ^{8*}	1,325
	96	283,64 ± 15,26	2,65 ± 0,37 x 10 ^{8*}	1,059
nÓLEO [90]	0	251,62 ± 8,93	16,4 ± 0,61 x 10 ⁸	1,379
	24	310,75 ± 8,6	12,4 ± 0,82 x 10 ^{8*}	1,202
	96	230,74 ± 10,4	9,16 ± 0,37 x 10 ^{8*}	1,036

*indica diferença significativa na concentração de nanopartículas após 24 h e 96 h em relação ao tempo inicial (0 h). Os valores são expressos em média ± EP.

4.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

4.2.1 Análises Sanguíneas

Em relação aos parâmetros hematológicos analisados (Figura 6), alterações significativas foram observadas apenas no número de eritrócitos (RBC). Após 96 h de exposição à menor concentração (60 µg L⁻¹) dos tratamentos (NANO, ÓLEO e nÓLEO), os peixes exibiram um aumento no número de células vermelhas circulantes (F= 9,366; p< 0,001) (Figura 6C). Os indivíduos submetidos ao NANO e nÓLEO tiveram um aumento em torno de 47%. Enquanto que no grupo ÓLEO, o RBC foi cerca de 98% maior que o verificado no CTR.

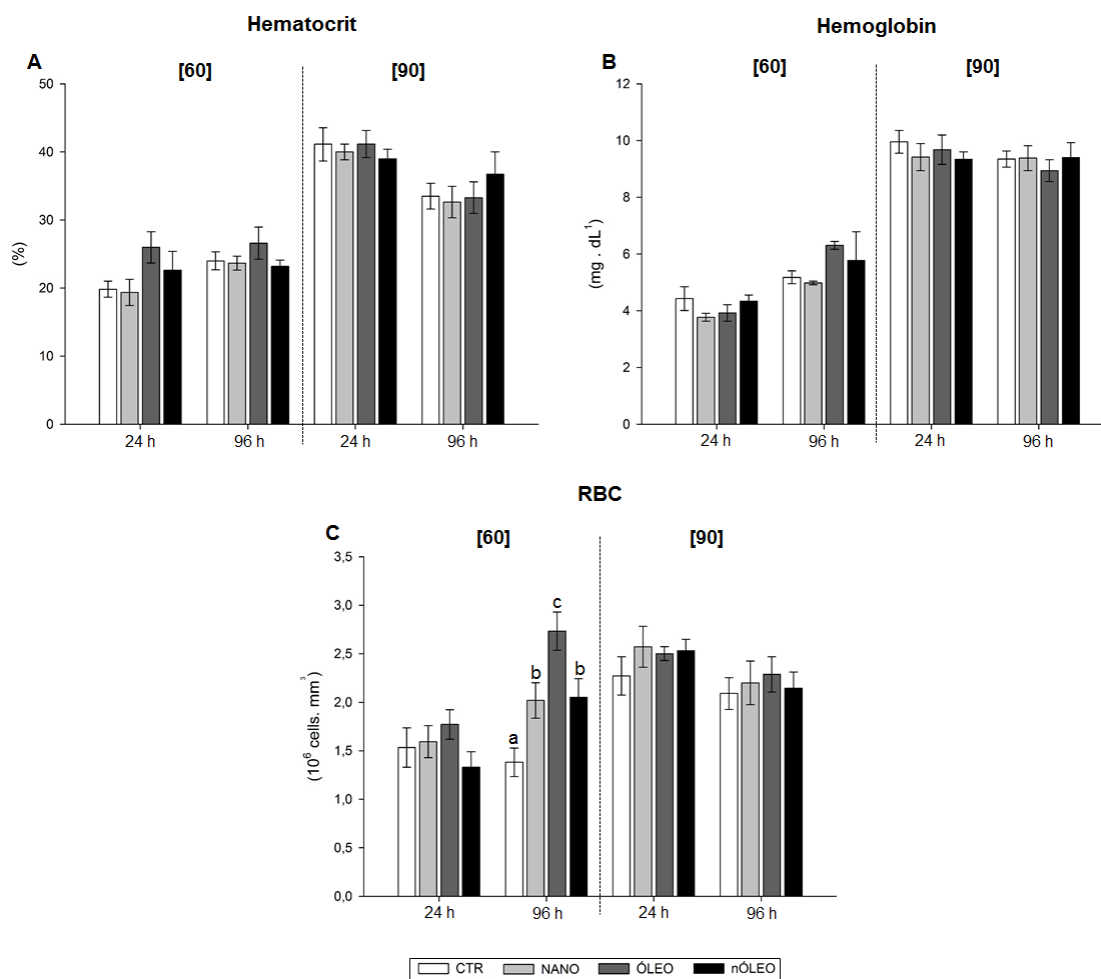


Figura 6 – Parâmetros sanguíneos: hematócrito (A), conteúdo de hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) de NANO, ÓLEO e nÓLEO ou apenas à água (CTR). Os resultados são expressos em média \pm EP (n= 5-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais para a mesma concentração e tempo ($p < 0,05$).

4.2.2 Análises Iônicas

Em relação aos parâmetros iônicos, foram verificadas alterações temporais nas concentrações de Cl^- e K^+ (Figura 7A e C). Houve uma redução média de 17% no Cl^- plasmático dos animais expostos por 24 h à maior concentração dos tratamentos experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO) ($F = 9,64$; $p < 0,001$) e um aumento de 65% nos níveis de K^+ dos peixes submetidos à menor concentração do nÓLEO durante 96 h ($F = 3,17$; $p = 0,04$) quando comparado ao CTR.

Além disso, um decréscimo bem definido na concentração de Ca^{2+} foi verificado nos três tratamentos (NANO, ÓLEO e nÓLEO), em dois

momentos diferentes; em 24 h de exposição à menor concentração ($F= 19,54$; $p < 0,001$) e após 96 h de exposição à maior concentração ($F= 27,74$; $p < 0,001$) (Figura 7D). O grupo nÓLEO foi o que desencadeou a maior redução nos níveis de Ca^{2+} , cerca de 51% (24 h $60 \mu g L^{-1}$) e 38% (96 h $90 \mu g L^{-1}$) em relação aos respectivos CTR.

Já o Mg^{2+} não variou significativamente (Figura 7E), embora tenha sido verificada uma tendência ($p = 0,059$) de redução nos peixes expostos por 24 h aos meios experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO). As concentrações plasmáticas de Na^+ também se mantiveram constantes em todas as condições avaliadas (Figura 7B).

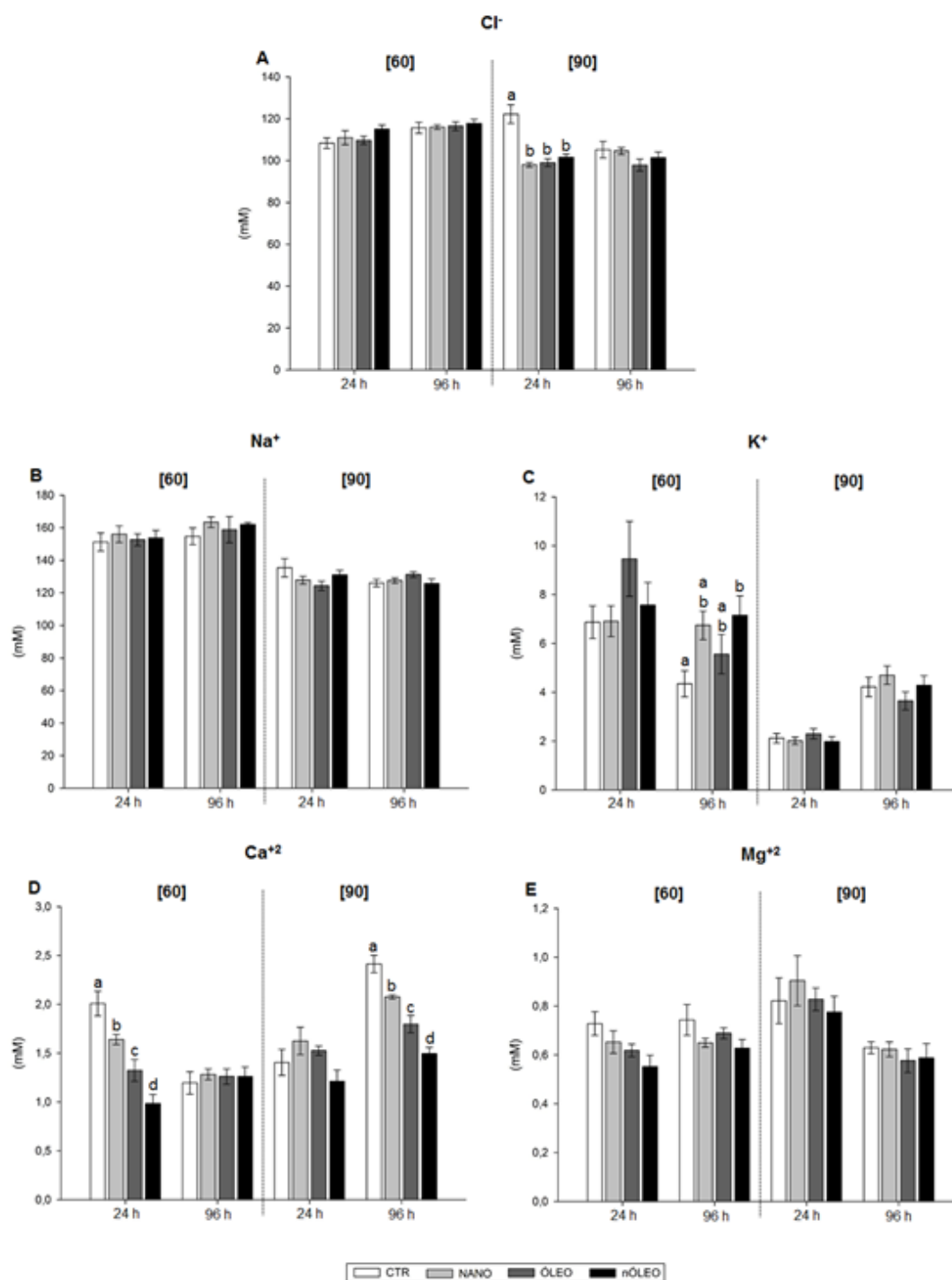


Figura 7 – Íons plasmáticos: concentrações de cloreto (A), sódio (B), pótassio (C), cálcio (D) e magnésio (E) no plasma de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) de NANO, ÓLEO e nÓLEO ou apenas à água (CTR). Os resultados são expressos em média \pm EP ($n= 6-8$ Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais para a mesma concentração e tempo ($p < 0,05$)).

4.2.3 Análises Metabólicas

Um aumento bem consistente na glicemia ($p < 0,001$) foi verificado nos peixes expostos ao nÓLEO em ambos os tempos e concentrações testadas: 24 e 96 h a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ($F = 73,70$ e $F = 52,15$, respectivamente) e 24 e 96 h a $90 \mu\text{g L}^{-1}$ ($F = 25,31$ e $H = 21,33$, respectivamente) (Figura 8A). Os níveis glicêmicos dos animais expostos à menor concentração do nÓLEO foram 47% (24 h) e 38% (96 h) maiores que CTR. Já os peixes submetidos a maior concentração do tratamento exibiram glicemia ainda mais elevada, em torno de 56% (24 h) e 80% (96 h) acima do respectivo grupo CTR.

Em relação aos estoques de glicogênio, níveis menores do polissacarídeo foram constatados nos peixes submetidos a menor concentração ($60 \mu\text{g L}^{-1}$) dos tratamentos (Figura 8B). Após o menor tempo de exposição, o glicogênio muscular no grupo nÓLEO foi reduzido em 28% ($F = 3,53$; $p = 0,028$). Já em 96 h todos os tratamentos experimentais promoveram o consumo dos estoques de carboidrato, tanto no fígado ($F = 6,548$; $p = 0,002$) como no músculo ($F = 3,53$; $p = 0,028$). Em contrapartida, outro padrão de resposta foi verificado nos peixes expostos durante 96 h a maior concentração ($90 \mu\text{g L}^{-1}$) de todos os tratamentos experimentais. Esses animais apresentaram níveis aumentados de glicogênio hepático ($F = 3,88$; $p = 0,02$), um acréscimo médio de 36% em relação ao seu CTR.

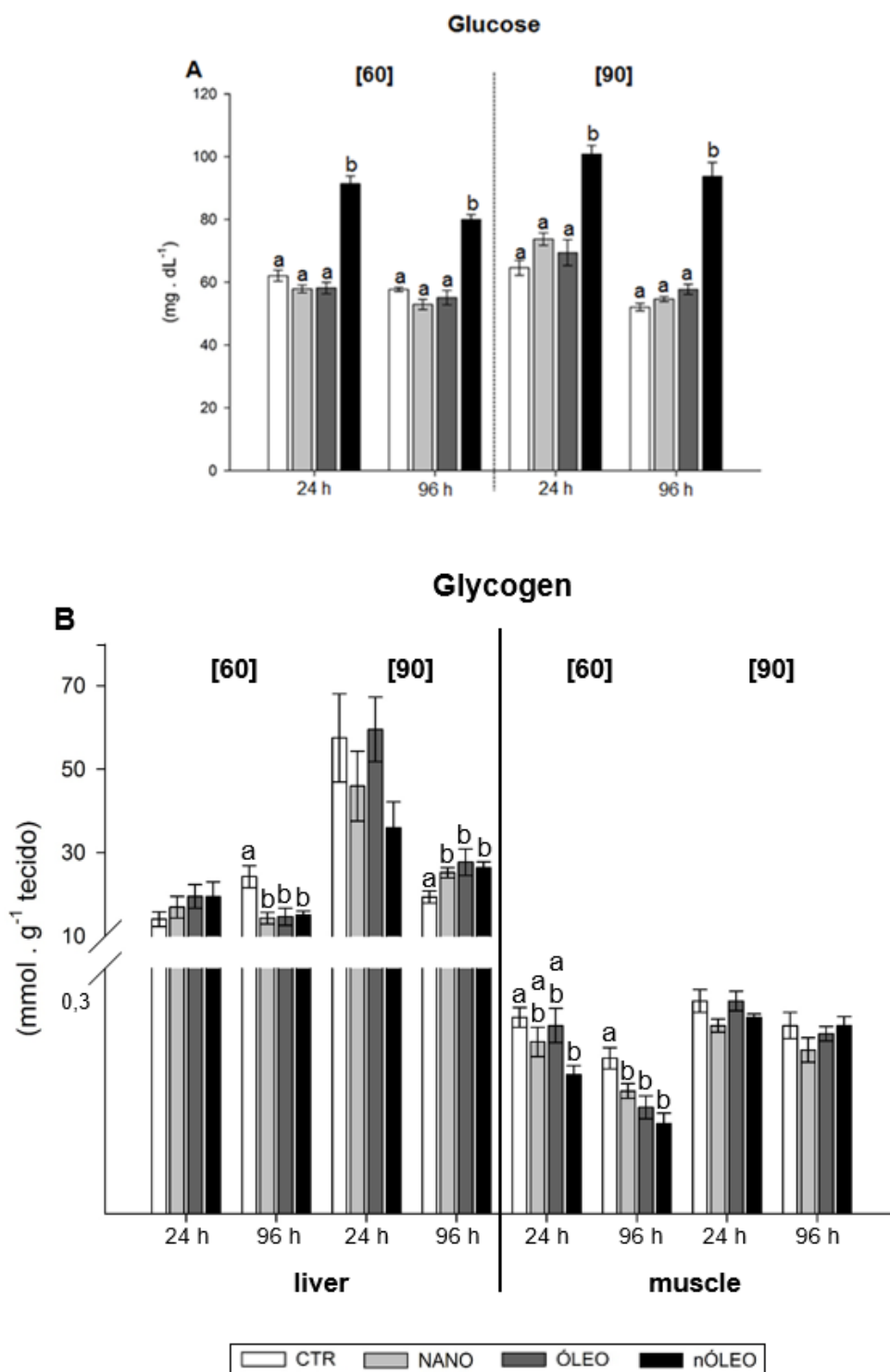


Figura 8 – Parâmetros metabólicos: conteúdo de glicose (A) e glicogênio em fígado e músculo (B) de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) de NANO, ÓLEO e nÓLEO ou apenas à água (CTR). Os resultados são expressos em média \pm EP (n= 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais para a mesma concentração e tempo ($p < 0,05$).

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.3.1 Defesa Antioxidante - Glutathiona (GSH)

Em relação ao conteúdo de GSH, após 96 h os animais submetidos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ dos tratamentos NANO e nÓLEO apresentaram uma redução desse antioxidante no tecido branquial ($F= 3,71$; $p= 0,023$). Comparado ao respectivo CTR, os grupos NANO e nÓLEO exibiram somente cerca de 43% do total dessa molécula (Figura 9A). Já nas amostras de fígado o conteúdo do tripeptídeo permaneceu inalterado nos tempos e concentrações avaliados.

Além disso, uma redução em torno de 20% do antioxidante foi observada no cérebro dos peixes expostos por 96 h à maior concentração de NANO ($F= 3,38$; $p= 0,033$). Por outro lado, no tecido muscular outro padrão de resposta foi constatado (Figura 9B); um aumento de GSH de 157% nos indivíduos expostos por 24 h a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de nÓLEO ($F= 4,07$; $p= 0,017$) e 117% naqueles expostos por 96 h a $90 \mu\text{g L}^{-1}$ de ÓLEO ($H= 25,92$; $p< 0,001$). Após o maior tempo de exposição a $90 \mu\text{g L}^{-1}$, foi verificada uma tendência diminuída dessa molécula no grupo NANO, assim como ocorreu no cérebro, contudo essa redução não foi significativa em relação ao CTR.

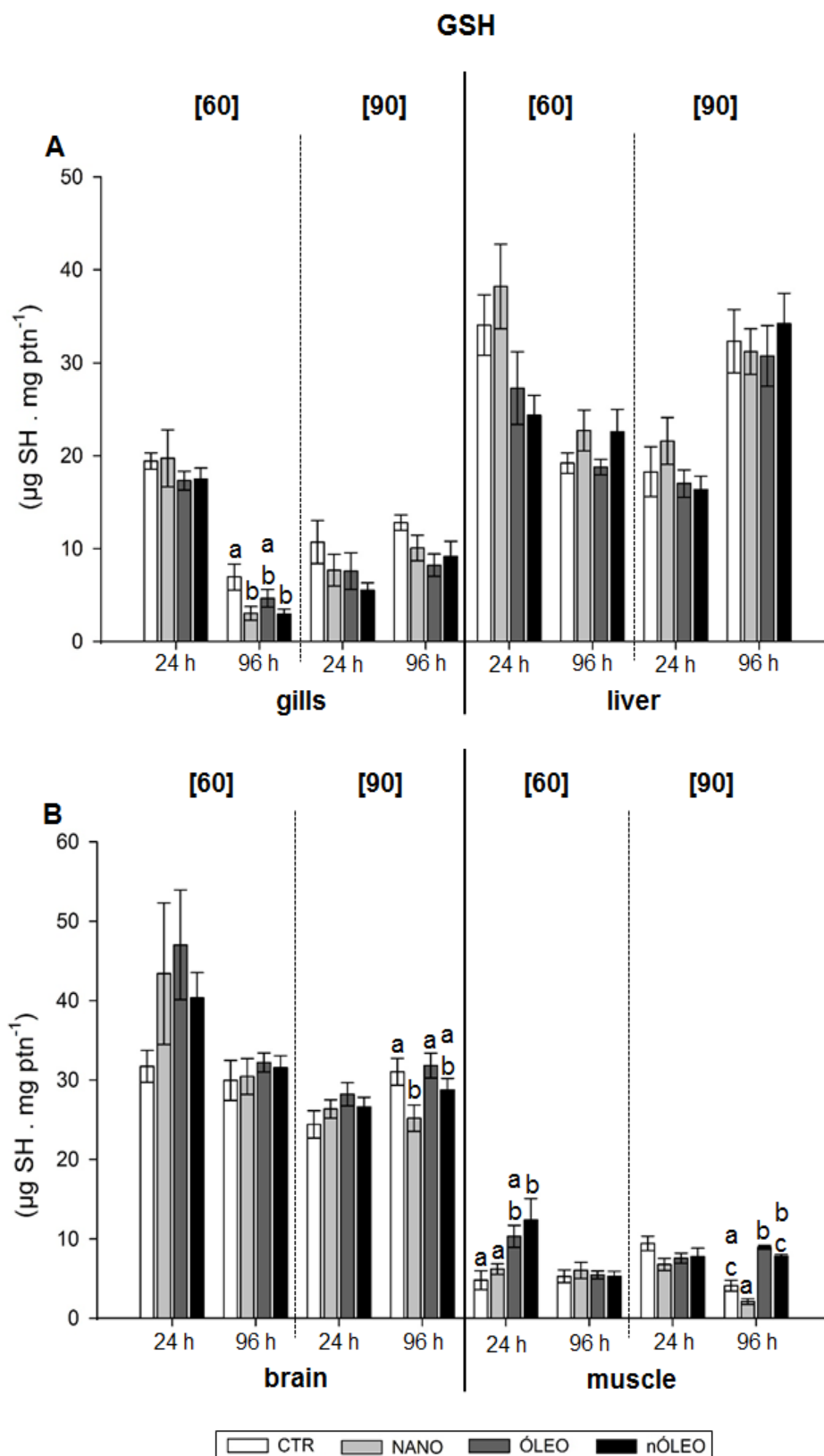


Figura 9 – Defesa antioxidante: concentração de GSH em brânquia e fígado (A) e cérebro e músculo (B) de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 µg L⁻¹) de NANO, ÓLEO e nÓLEO ou apenas à água (CTR). Os resultados são expressos em média ± EP (n= 7-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais para a mesma concentração e tempo (p < 0,05).

4.3.2 Dano Oxidativo - Peroxidação Lipídica (LPO)

Níveis reduzidos de MDA (subproduto da LPO) foram constatados na brânquia (Figura 10A) dos peixes tratados por 96 h com a menor concentração de ÓLEO ($F= 3,54$; $p= 0,028$), 45% menor que os valores do CTR. Já os indivíduos submetidos à maior concentração de NANO, durante o mesmo tempo, apresentaram aumento de 23% na LPO branquial quando comparado ao respectivo CTR ($H= 12,45$; $p= 0,006$).

Redução na peroxidação lipídica foi verificada também no tecido muscular dos animais expostos à menor concentração ($60 \mu\text{g L}^{-1}$) dos diferentes tratamentos. Após 24 h de exposição, todos tratamentos experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO) foram capazes de reduzir o dano lipídico ($F= 4,62$; $p= 0,01$) em cerca de 46%. Já em 96 h, a LPO foi menor apenas no grupo ÓLEO ($F= 4,30$; $p= 0,014$) (Figura 10B), correspondendo a cerca de 48% do total verificado no grupo CTR. Em relação as amostras de fígado e cérebro não foram observadas variações significativas no conteúdo de MDA.

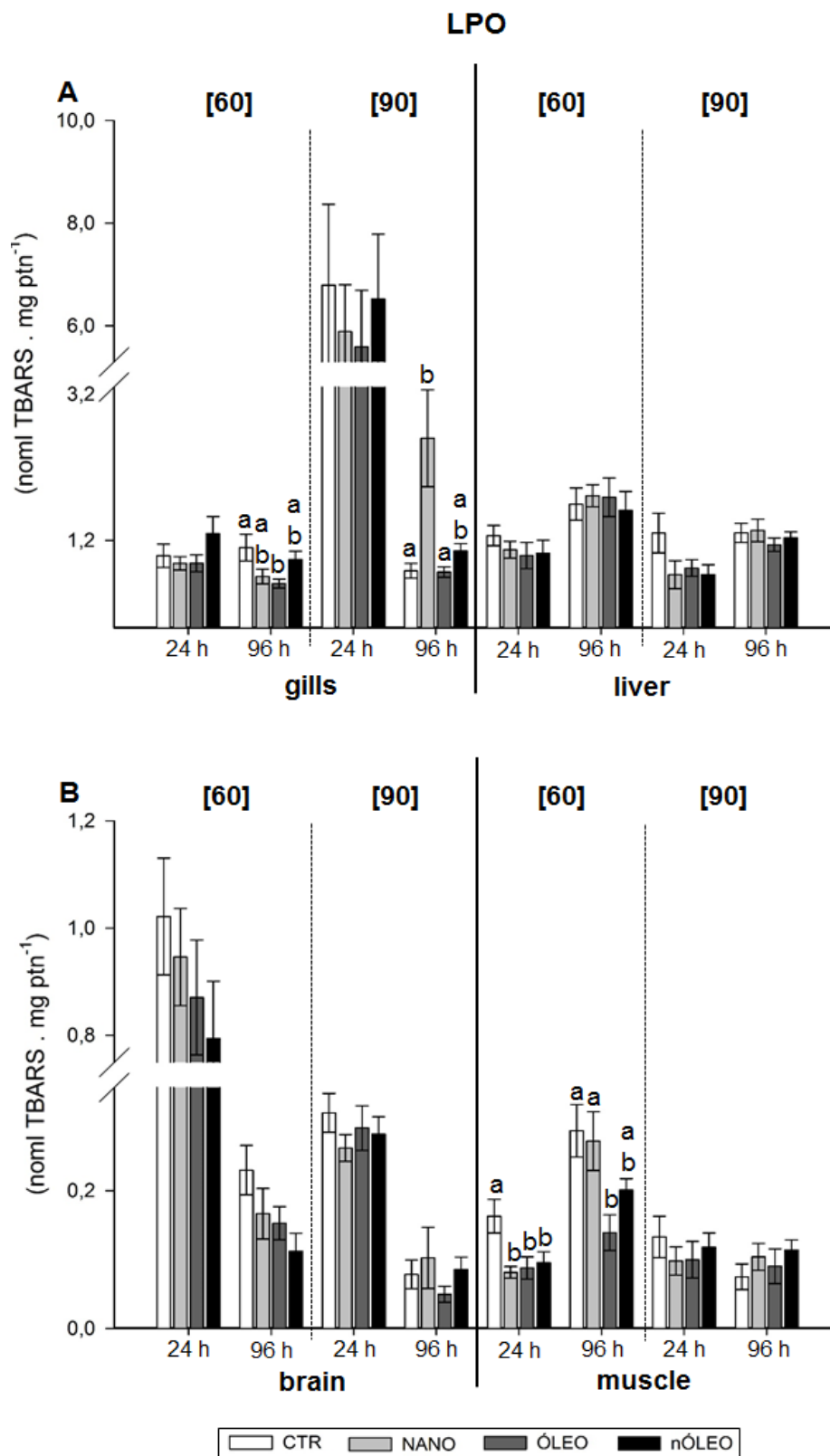


Figura 10 – Dano oxidativo: peroxidação lipídica em brânquia e fígado (A) e cérebro e músculo (B) de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 µg L⁻¹) de NANO, ÓLEO e nÓLEO ou apenas à água (CTR). Os resultados são expressos em média ± EP (n= 5-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais para a mesma concentração e tempo (p< 0,05).

4.3.3 Biotransformação de Xenobióticos – Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

Os peixes tratados durante 24 h com a menor concentração dos tratamentos experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO) exibiram uma redução média de 27% na atividade da GST branquial ($F= 5,08$; $p= 0,006$) quando comparado ao CTR. Já após 96 h, a redução enzimática (em torno 44%) foi verificada apenas no grupo exposto ao nÓLEO ($H= 16,24$; $p= 0,001$) (Figura 11A).

No tecido cerebral houve um aumento da GST nos animais expostos por 96 h a $90 \mu\text{g L}^{-1}$ do ÓLEO e nÓLEO ($H= 17,63$; $p< 0,001$). Em relação ao CTR, o grupo ÓLEO promoveu um aumento de 93% na atividade enzimática da GST, já nos peixes submetidos ao nÓLEO o acréscimo foi de 40% (Figura 11B). Nas amostras de fígado e músculo alterações na GST não foram verificadas.

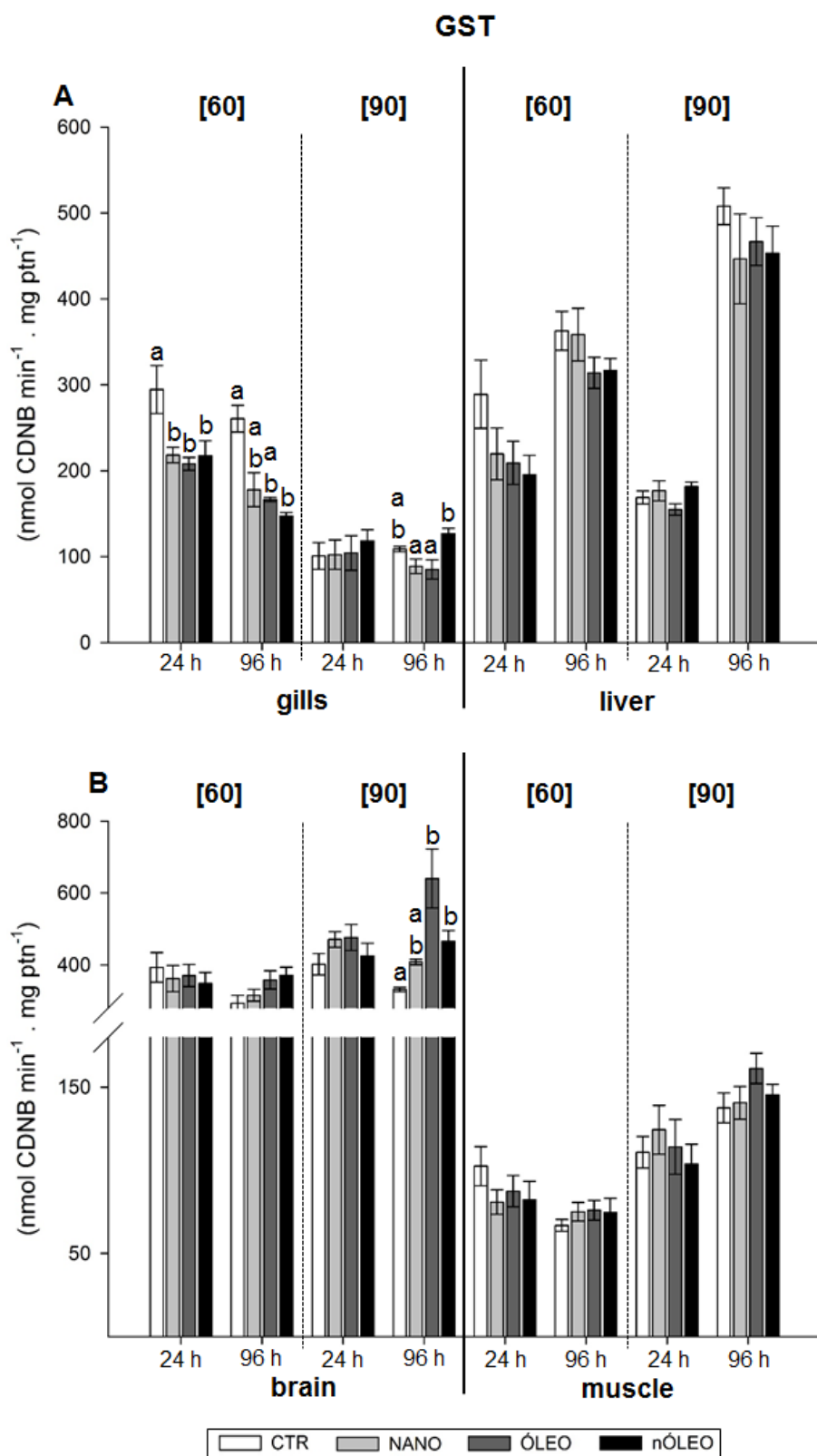


Figura 11 – Biotransformação de xenobióticos: atividade da GST em brânquia e fígado (A) e cérebro e músculo (B) de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) de NANO, ÓLEO e nÓLEO ou apenas à água (CTR). Os resultados são expressos em média \pm EP (n= 7-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais para a mesma concentração e tempo ($p < 0,05$).

4.3.4 Neurotoxicidade – Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

Reduções transitórias na atividade da AChE foram observadas no tecido cerebral ($F= 3,19$; $p= 0,04$) e muscular ($F= 5,59$; $p= 0,004$) dos peixes expostos por 24 h à menor concentração do nÓLEO (Figura 12). O decréscimo foi em torno de 26,3% no cérebro e 45,7% no músculo quando comparado ao respectivo CTR. Em contrapartida, após o maior tempo de exposição à maior concentração das formulações, outro padrão de resposta foi constatado no cérebro. Houve um aumento de 88% na atividade colinérgica dos animais expostos ao ÓLEO e 44% no grupo nÓLEO ($H= 16,18$; $p= 0,001$) em relação ao CTR.

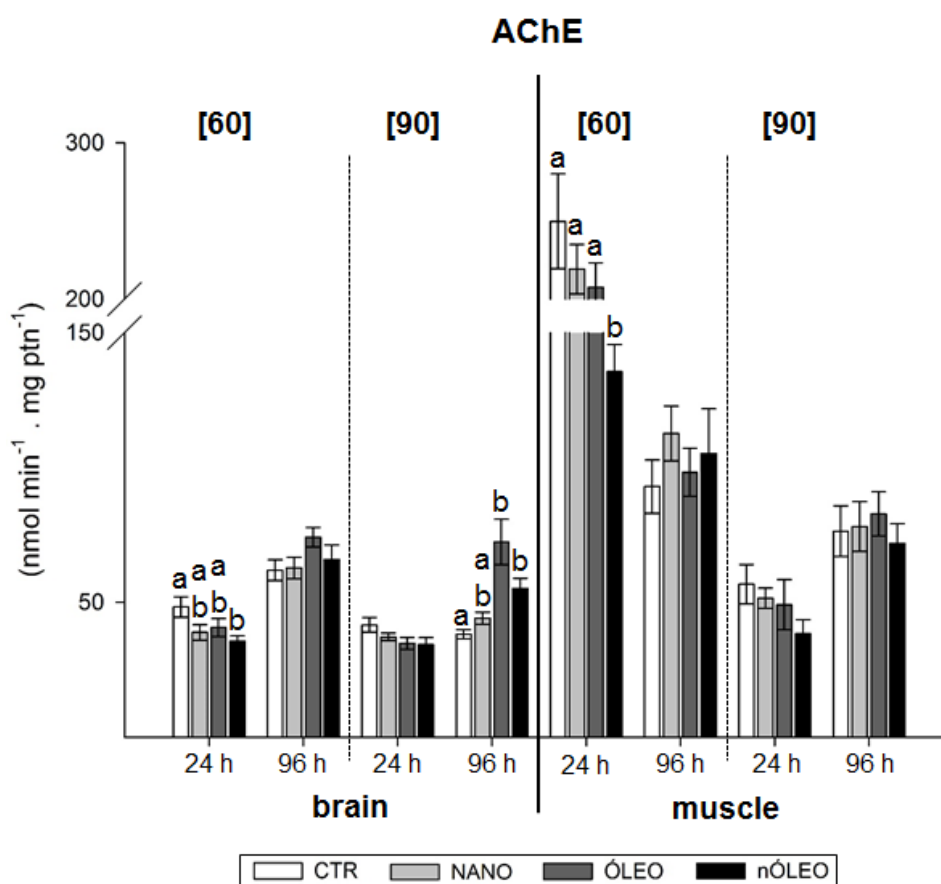


Figura 12 - Neurotoxicidade: atividade da AChE em cérebro e músculo de *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) de NANO, ÓLEO e nÓLEO ou apenas à água (CTR). Os resultados são expressos em média \pm EP ($n= 7-8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais para a mesma concentração e tempo ($p < 0,05$).

4.4. ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)

As médias dos biomarcadores RBC, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, glicose, glicogênio, GSH, LPO, GST e AChE foram utilizadas para o cálculo do IBR de cada tecido (brânquia, fígado, cérebro, músculo, sangue e plasma) e condição experimental avaliada. Os peixes submetidos ao nÓLEO apresentaram os maiores valores de IBR nos quatro experimentos, enquanto que aqueles expostos as nanocápsulas (NANO) mostraram os menores valores, principalmente na menor concentração testada (Figura 13A e B). Observou-se também que o maior tempo de exposição a 60 µg L⁻¹ dos tratamentos promoveu os mais altos desvios da referência. Em contrapartida, os menores valores do índice foram verificados nos animais expostos a maior concentração dos meios experimentais, principalmente por 24 h.

Quando os valores de IBR foram avaliados individualmente para cada tecido e condição experimental, verificou-se que a exposição por 24 h a menor concentração dos tratamentos promoveu altos desvios do padrão na brânquia e músculo, seguido por cérebro e plasma (Figura 13C). Após 96 h de exposição a ambas concentrações, o fígado foi o órgão que exibiu os mais altos valores de IBR. Já no menor tempo de exposição a 90 µg L⁻¹ das formulações, valores de desvio do biomarcador foram constatados apenas no plasma dos animais.

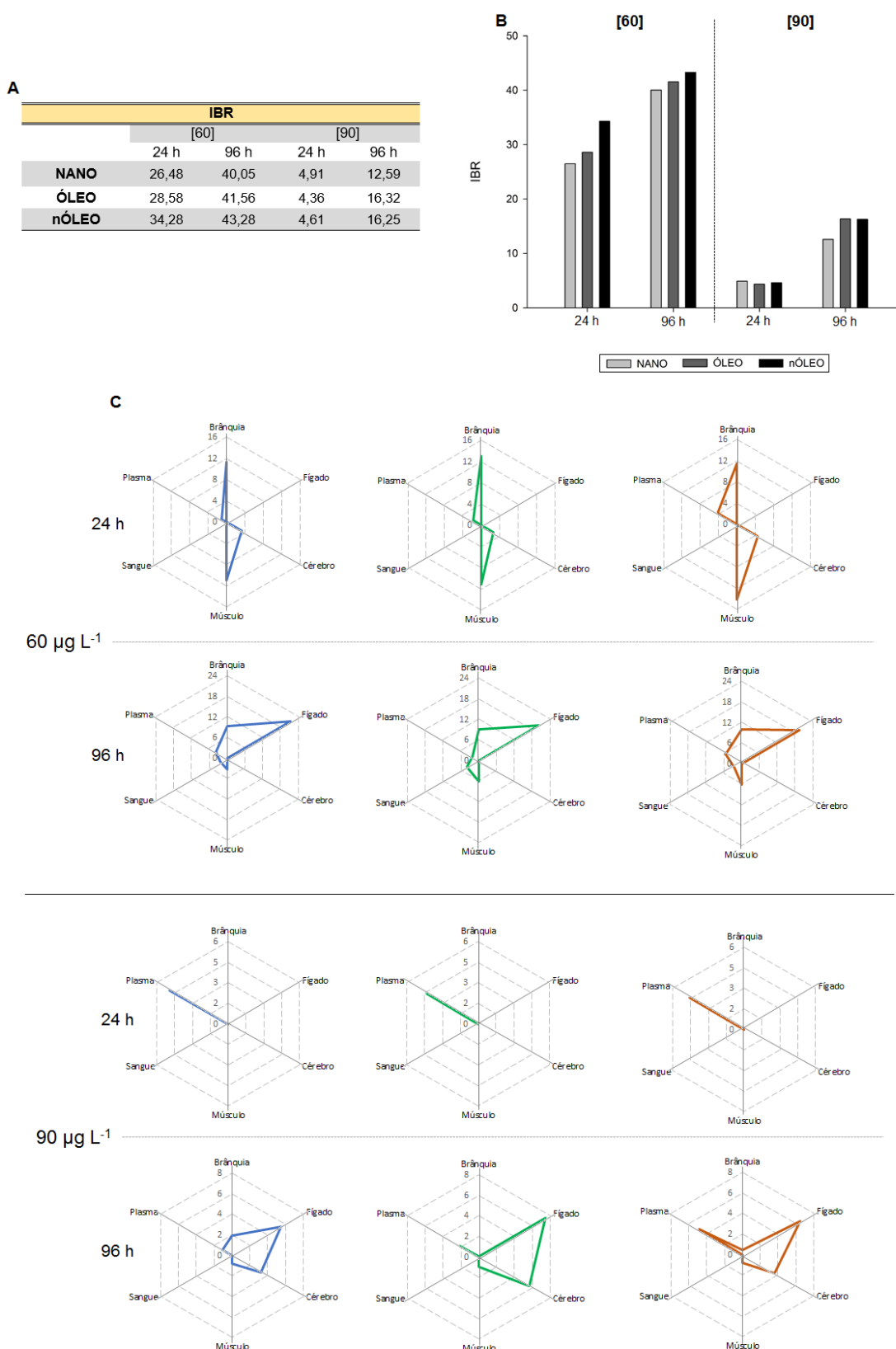


Figura 13 – Índice integrado de Resposta de Biomarcadores: valores de IBR calculados para *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h a duas concentrações (60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) de NANO, ÓLEO e nÓLEO, apresentados na forma de tabela (A) e gráfico de barras (B). Valores de desvio do biomarcador de cada tecido avaliado em cada condição experimental (C).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo propôs avaliar os efeitos do óleo de nim nanoencapsulado, como também as respostas induzidas pelo óleo comercial e pelas nanocápsulas de zeína sem o ingrediente ativo no peixe neotropical *P. lineatus*. Estudos sobre os efeitos subletais do óleo de nim convencional e nanoencapsulado em peixes neotropicais ainda não existem na literatura, justificando assim a relevância deste trabalho. A utilização de nanocápsulas como sistemas de liberação controlada de biopesticidas tem demonstrado ser promissora, devido à sua suposta segurança ambiental e maior eficiência. Contudo, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o óleo nanoencapsulado (nÓLEO) desencadeou alterações em parâmetros iônicos, metabólicos e neurotóxicos do peixe, efeitos que foram considerados mais relevantes que aqueles causados pelo composto convencional (ÓLEO).

Embora diferentes respostas tenham sido desencadeadas pelos tratamentos experimentais, sugere-se que o modo de ação das formulações foi semelhante, uma vez parte das alterações observadas nos biomarcadores foram comuns entre os tratamentos experimentais (Figura 13C). Inclusive, houve variações em alguns parâmetros que foram desencadeadas pelas nanocápsulas de zeína sem o princípio ativo (NANO).

Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade das nanopartículas de entrar nas células por diferentes vias de contato; como inalação, ingestão e penetração dérmica. Isso é possível devido à sua grande área superficial e tamanho reduzido (Hu e Gao, 2010). Considerando isso, Clemente et al. (2014) demonstraram que a toxicidade aguda (48 h) de um nanoherbicida foi maior que o herbicida convencional em *Daphnia similis*, provavelmente devido à entrada do herbicida no organismo facilitada pelo nanoencapsulamento. Além disso, embora a exposição a nanotubos de carbono não tenha provocado danos no peixe dulcícola *Oryzias latipes*, Sohn et al. (2015) verificaram sinais de ingestão e excreção desses nanomateriais pelos peixes. Dessa forma, esses estudos podem explicar a toxicidade das nanocápsulas observada no peixe *P. lineatus* nesse trabalho. Efeitos desencadeados não apenas pelo óleo nanoencapsulado, mas também pelas nanocápsulas de zeína sem o óleo de nim.

Na Tabela 3, estão resumidos os resultados de todos biomarcadores avaliados em *P. lineatus* após as exposições aos diferentes tratamentos experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO).

Tabela 3 – Resumo dos resultados dos diferentes biomarcadores de *P. lineatus* expostos aos tratamentos (NANO, ÓLEO, nÓLEO) em duas concentrações (60 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ de azadiractina) e tempos experimentais (24 e 96 h). Setas apontadas para cima indicam aumento significativo e setas para baixo apontam redução significativa do parâmetro avaliado. Os valores (%) indicam a variação em relação ao grupo CTR.

		Grupos experimentais											
		NANO				ÓLEO				nÓLEO			
		[60]		[90]		[60]		[90]		[60]		[90]	
		24h	96h	24h	96h	24h	96h	24h	96h	24h	96h	24h	96h
Hct													
RBC													
Hb			↑46%				↑98%				↑48%		
Na ⁺													
K ⁺											↑65%		
Cl ⁻				↓20%				↓19%				↓12%	
Mg ²⁺													
Ca ²⁺		↓18%			↓14%	↓34%			↓25%	↓51%			↓38%
Glicose										↑47%	↑38%	↑56%	↑80%
Glicogênio	fígado		↓40%		↑30%		↓40%		↑43%		↓38%		↑36%
	músculo		↓20%				↓29%			↓28%	↓41%		
GSH	brânquia		↓57%								↓57%		
	fígado												
	cérebro				↓19%								
	músculo								↑117%	↑157%			
LPO	brânquia				↑23%		↓45%						
	fígado												
	cérebro												
	músculo	↓50%				↓46%	↓52%			↓41%			
GST	brânquia	↓26%				↓30%				↓26%	↓44%		
	fígado												
	cérebro								↑93%				↑40%
	músculo												
AChE	músculo									↓46%			
	cérebro								↑88%	↓27%			↑44%

Características dos meios experimentais

Em relação aos parâmetros físicos-químicos da água foi verificado um aumento, inclusive visível, na turbidez dos aquários dos três tratamentos experimentais. Essa turbidez pode ser resultado das formulações utilizadas e até mesmo da produção de muco pelos peixes. Vale ressaltar que embora maior turbidez tenha sido constatada nos meios experimentais, os valores ainda estão dentro do limite recomendado pela resolução Conama (Brasil, 2005) para águas doces (< 40 NTU), indicando que seja pouco provável o comprometimento da saúde do peixe devido a um aumento nesse parâmetro.

As análises de NTA realizadas nas amostras de água indicaram uma redução na concentração de nanocápsulas dos tempos iniciais (t_0) para os finais (t_{24} e t_{96}), em ambas nanoformulações (NANO e nÓLEO) e concentrações testadas (Tabela 2). Andrade et al. (2019) também verificaram decréscimo na concentração tanto das nanopartículas contendo o herbicida como das nanocápsulas vazias. Esses autores sugerem, portanto, que possa ter ocorrido a incorporação desses nanomateriais pelos peixes. Além disso, Pascoli et al. (2020) demonstraram que as nanopartículas de ambas nanoformulações (NANO e nÓLEO) se aderiram ao exoesqueleto, principalmente região ventral, do coleóptero *A. obtectus* após 96 h de exposição. A redução na concentração das nanopartículas pode também ser devido à sua precipitação no fundo dos aquários, restando menos partículas dispersas na coluna d'água. Contudo, isso é pouco provável, uma vez que o tamanho das nanopartículas não aumentou, indicando que não houve agregação, efeito que facilitaria a sedimentação das partículas. Além disso, os autores identificaram também uma boa estabilidade físico-química no nanossistema de zeína contendo o óleo de nim (Pascoli et al. 2020).

Em relação ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, alterações consideráveis não foram constatadas, como já mencionado. O tamanho das nanopartículas dos tratamentos (NANO e nÓLEO), em ambas concentrações e tempos avaliados, permaneceu em torno de 200-300 nm. Conseqüentemente, os valores de Span apresentaram poucas oscilações, uma vez que esse índice é calculado baseado na amplitude de distribuição de tamanho das nanopartículas. Ou seja, por meio desse índice é avaliado se as nanocápsulas estão monodispersas (nanopartículas de um mesmo tamanho) ou

polidispersas (nanopartículas de vários tamanhos) nas amostras. Valores próximos de 1, como os encontrados nesse trabalho, indicam que a formulação está homogênea (monodispersa) e, portanto, estável. Corroborando esses resultados, até o 90º dia de armazenamento, Pascoli et al. (2020) verificaram um diâmetro médio de 198 ± 16 nm nas nanopartículas contendo o óleo de nim, já os valores de Span oscilaram entre valores menores que 1 durante o mesmo período de tempo.

Parâmetros fisiológicos

Em relação aos biomarcadores fisiológicos, os peixes expostos a ambas concentrações de nÓLEO por 24 h e 96 h demonstraram aumento nas concentrações de glicose plasmática, indicando possivelmente uma resposta de estresse (Moon, 2011). Durante situações desfavoráveis o mecanismo de estresse é ativado, sob a ação de hormônios. Ocorre a quebra e a mobilização de reservas de glicogênio (glicogenólise) e a produção de glicose a partir de precursores aglicanos ou não-açúcares (gliconeogênese), com o intuito de fornecer substrato energético suficiente para os órgãos e tecidos (principalmente cérebro e músculo) atuarem no combate ao agente estressor (Saravanan et al., 2011, Wendelaar Bonga, 2011). Sendo assim, esse efeito de aumento da glicemia concomitante ao consumo de glicogênio, frente à exposição a estressores químicos já foi descrito em vários trabalhos (de Aguiar et al., 2004, Saravanan et al., 2011), inclusive no presente estudo.

Os resultados do presente estudo corroboram os achados de Harikrishnan et al. (2003) os quais verificaram que carpas comum (*Cyprinus carpio*), contaminadas com *Aeromonas hydrophila*, apresentaram aumento da glicose plasmática após 10, 20 e 30 dias de tratamento com 1 g L^{-1} de extrato aquoso de folhas de nim (10 minutos/dia). Assim como Winkaler et al. (2007) que também constataram maiores níveis plasmáticos de glicose em *P. lineatus* após exposição à 5 g L^{-1} de extrato foliar de nim por 24 h. Aumento da glicemia foi observado também na camada de muco de *C. carpio* tratados com $60 \mu\text{L L}^{-1}$ de Neenmax (produto comercial contendo azadiractina) por 96 h (Murussi et al., 2016a). A dosagem de glicemia destaca-se dentre os biomarcadores por ser um parâmetro sensível, capaz de apontar perturbações ambientais (Van der Oost et al., 2003, Saravanan et al., 2011).

Esses resultados são contrastantes aos encontrados por Hassanein e Okail (2008) que constataram uma redução da glicemia em peixes expostos ao nim. Inclusive muitos trabalhos relataram uma ação hipoglicêmica do extrato aquoso foliar de *A. indica*, até mesmo em casos de diabetes induzida experimentalmente, sugerindo-o como um medicamento eficaz e seguro no tratamento de diabetes mellitus (Kar et al., 2003, Shailey e Basir, 2011, Akter et al., 2014). Autores têm atribuído esse efeito ao bloqueio da adrenalina (Chattopadhyay, 1996), induzido pelo nimbidin, um dos constituintes do nim (Biswas et al., 2002).

A redução no estoque de carboidratos, verificada em *P. lineatus* expostos a menor concentração dos meios experimentais, reforça a ideia de que nesse estudo houve a ativação da resposta de estresse, mediada pelo cortisol (Moon, 2011, Shiogiri et al., 2012), a fim de atender a alta taxa metabólica induzida pelos tratamentos (Saravanan et al., 2011). Os animais submetidos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ do óleo de nim nanoencapsulado por 24 h apresentaram uma diminuição no conteúdo de glicogênio apenas no tecido muscular, corroborando os resultados de aumento na glicemia plasmática observada nos mesmos animais. Da Fonseca et al. (2008) constataram também redução no glicogênio muscular do peixe dulcícola *Leporinus obtusidens* tratado com o herbicida 2,4-D por 96 h, sem qualquer alteração no glicogênio hepático, como nesse estudo. Da mesma forma, após exposições (24, 48, 96 e 192 h) ao herbicida Clomazone ($0,5$ e 1 mg L^{-1}) indivíduos de *Rhamdia quelen* apresentaram decréscimo do glicogênio apenas no músculo (Crestani et al., 2006). Esses resultados sugerem que o consumo dos estoques de açúcares do músculo é a resposta mais comum e talvez a primeira a ser ativada durante a exposição a agrotóxicos (Crestani et al., 2006), ideia bem consistente uma vez que autores já relataram que a fadiga muscular é uma das causas da morte induzida pelo nim e seus compostos (Mondal et al., 2007, Hassanein e Okail, 2008).

Já no maior tempo de exposição (96 h) a mesma concentração ($60 \mu\text{g L}^{-1}$), valores reduzidos de glicogênio muscular e hepático foram constatados nos animais expostos a todos tratamentos experimentais (NANO, ÓLEO, nÓLEO). Entretanto, a hiperglicemia foi observada apenas nos peixes expostos as nanocápsulas contendo óleo de nim (nÓLEO). Da mesma forma, o gastrópode *Bulimulus tenuissimus* submetido a moluscidas (natural e sintético)

exibiu menor conteúdo de glicogênio sem qualquer variação nos níveis de glicose da hemolinfa (Patrício et al., 2019). Assim como *L. obtusidens* submetido ao 2,4-D, não exibiu alteração na glicemia mesmo com a mobilização das reservas de glicogênio (da Fonseca et al., 2008).

Corroborando os resultados do presente estudo, trabalhos disponíveis na literatura relataram o decréscimo no conteúdo de glicogênio em peixes expostos a compostos sintéticos provenientes de atividades agrícolas (de Aguiar et al., 2004, Venkateswara Rao, 2006, da Fonseca et al., 2008, Saravanan et al., 2011, Shiohiri et al., 2012). Esse padrão de resposta no metabolismo dos carboidratos foi verificado também em peixes expostos a agrotóxicos botânicos (Singh e Singh, 2003, Tiwari e Singh, 2003, Hassanein e Okail, 2008). Indivíduos de *C. idella* submetidos a 1/2 (56 mg L⁻¹) e 1/10 (11,2 mg L⁻¹) da CL₅₀ de um biopesticida a base de nim também apresentaram diminuição nos estoques de glicogênio hepático após 2 e 10 dias de exposição, respectivamente (Hassanein e Okail, 2008). Sugere-se, portanto, que o aumento da demanda energética necessária ao processo de desintoxicação de xenobióticos agrícolas, seja o responsável pelo aumento no consumo das reservas de glicogênio (Hassanein e Okail, 2008, Saravanan et al., 2011). Além disso, o efeito glicogenolítico do nim e seus compostos também foi demonstrado em ratas Wistar tratadas oralmente por 60 dias (Shailey e Basir, 2011). Assim, esses dados demonstram, como já mencionado, que o nim e seus produtos, assim como outros agrotóxicos, também apresentam a capacidade de interferir no metabolismo de carboidratos.

Em contrapartida, o aumento do estoque de glicogênio hepático e da glicemia apresentado pelos peixes expostos ao nÓLEO (90 µg L⁻¹) por 96 h, embora controverso, devido à restrição alimentar, está de acordo com os resultados de alguns estudos da literatura. Por exemplo, jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição ao herbicida clomazone exibiram aumento de glicogênio no fígado e da glicose no plasma em todos os tempos (12, 24, 48 e 96 e 192 h) avaliados, sendo que a alimentação foi administrada apenas nos animais expostos durante 192 h (Crestani et al., 2006). Nestes casos, a hiperglicemia acompanhada de um aumento no glicogênio hepático sugere o possível envolvimento da via gliconeogênica.

Além da hiperglicemia, os hormônios de estresse (catecolaminas e cortisol) otimizam a função cardiorrespiratória, aumentando a afinidade da hemoglobina pelo O_2 , a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo na brânquia. Paralelamente a esses efeitos, com o intuito de suprir a alta demanda de oxigênio pelos tecidos, ocorre também o aumento das células vermelhas circulantes por meio da contração esplênica, induzida pelas catecolaminas (Wendelaar Bonga, 2011). Contudo, é pouco provável que esse seja o motivo do aumento do número de eritrócitos (RBC) nos peixes expostos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ dos tratamentos experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO) por 96 h, uma vez que o aumento da glicemia, característico da resposta de estresse, foi identificado apenas nos animais tratados com o óleo nanoencapsulado. Além disso, vale ressaltar que os tratamentos NANO e nÓLEO promoveram um aumento de cerca de 50% nas células circulantes, enquanto que os animais expostos ao ÓLEO apresentaram praticamente o dobro de RBC quando comparado ao CTR, indicando um maior efeito do grupo ÓLEO quando comparado aos demais tratamentos.

Sabe-se que a enzima Na^+/K^+ -ATPase mantém concentrações elevadas de K^+ dentro da célula e de Na^+ fora da célula, às custas de ATP (Hill et al., 2012, Baldisserotto et al., 2014). Dessa forma, os maiores níveis de K^+ no plasma, como observado nos peixes expostos à menor concentração de nÓLEO por 96 h, poderiam indicar hemólise em virtude da perda de K^+ intracelular; entretanto o que se observou foi um aumento no número de eritrócitos circulantes. Outra possibilidade para explicar este aumento do K^+ no plasma seria a inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase. A redução na atividade desta enzima foi constatada em brânquia de carpas (*C. carpio*) expostas a azadiractina (40 e $60 \mu\text{L L}^{-1}$) por 96 h (Murussi et al., 2016a), assim como em ratos tratados oralmente com biopesticida a base de nim (Rahman et al., 1999). Entretanto, esta hipótese também não se confirma, uma vez que não foram verificadas alterações no Na^+ plasmático. Alguns contaminantes podem aumentar a permeabilidade da membrana das hemácias ao potássio, como destacado por Laurén e McDonald (1985) os quais mostraram que a exposição ao cobre aumentou a permeabilidade da membrana celular das hemácias desencadeando um efluxo de potássio em *Salmo gairdneri*. Portanto, sugere-se que neste trabalho a exposição ao nÓLEO tenha promovido a difusão passiva de K^+ para

o meio extracelular, a qual foi aparente apenas quando o número de hemácias (RBC) aumentou.

Concentrações plasmáticas de Cl^- reduzidas foram observadas nos peixes submetidos à maior concentração de todos os tratamentos (NANO, ÓLEO e nÓLEO) após 24 h. Neste caso, é pouco provável que essa perda iônica tenha sido desencadeada pelo aumento da permeabilidade branquial causado pelas catecolaminas (Wendelaar Bonga, 2011), uma vez que essa redução foi temporal e as concentrações de Na^+ permaneceram constantes nos animais. É mais provável que os elevados valores de cloreto plasmático nos animais do grupo controle tenham resultados nestas diferenças.

Os níveis reduzidos de Ca^{2+} plasmático observados nos peixes expostos à menor concentração dos tratamentos por 24 h, assim como nos animais submetidos a $90 \mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h, podem ter ocorrido devido a um prejuízo na tomada desse íon do meio externo ou na sua reabsorção renal, possivelmente por um comprometimento nos transportadores envolvidos (Ca^{2+} -ATPase, $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e canais apicais). O óleo de nim livre (ÓLEO) se mostrou mais prejudicial que as nanocápsulas de zeína (NANO) na manutenção da homeostase de Ca^{2+} , enquanto que o óleo nanoencapsulado (nÓLEO) se mostrou ainda mais tóxico, levando a uma maior redução do Ca^{2+} plasmático. Corroborando os resultados desse estudo, Kumar et al. (2014) também constataram hipocalcemia em *H. fossilis* após exposições curtas (até 96 h) e longas (até 28 dias) ao extrato purificado de nim *Ozoneem Aza*.

Reforçando a ideia de que possivelmente os canais de Ca^{2+} tenham sofrido perturbações induzidas pelos tratamentos, Qiao et al. (2013) atribuíram a neurotoxicidade da azadiractina observada em *Drosophila melanogaster* à inibição parcial dos canais de cálcio. Adicionalmente, Rahman et al. (1999) verificaram uma inibição em torno de 20 a 50% na atividade da Ca^{2+} -ATPase cerebral de ratos submetidos a tratamentos crônicos (45 e 90 dias) com Vepacide, um agrotóxico a base de nim. Além disso, o órgão ultimobranquial, envolvido na regulação de Ca^{2+} em teleóseos, foi menos corado e apresentou um menor volume nuclear após tratamento agudo (96 h) e sub-crônico (21 e 28 dias) com nim (Kumar et al., 2014). Alterações neste órgão podem comprometer a síntese e secreção da calcitonina, hormônio que controla a captação e os níveis plasmáticos de Ca^{2+} (Wendelaar Bonga, 2011). A hipocalcemia plasmática

observada nos peixes pode ter ocorrido também pelo bloqueio físico dos canais apicais de cálcio, promovido pelas nanocápsulas e/ou muco secretado pelos animais, uma vez que a turbidez dos aquários dos tratamentos ÓLEO e nÓLEO foi maior em relação ao CTR (Tabela. 1).

Assim, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que todos os compostos testados foram capazes de promover desequilíbrios iônicos e metabólicos, entretanto, os maiores prejuízos foram desencadeados pelo óleo de nim nanoencapsulado (nÓLEO), principalmente no balanço de Ca^{2+} e no metabolismo de carboidratos.

Parâmetros bioquímicos

Vários compostos químicos podem promover o estresse oxidativo, que é instalado quando as espécies reativas de oxigênio superam as defesas antioxidantes. Esse desequilíbrio pró-oxidante ocorre devido ao comprometimento das defesas ou pela produção exacerbada de radicais livres. O estresse oxidativo pode promover a oxidação de biomoléculas, sendo a reação com os ácidos graxos das membranas celulares (LPO) um dos danos oxidativos mais estudados (Van der Oost et al., 2003). Dentre os antioxidantes, o tripeptídeo GSH destaca-se como o principal antioxidante não enzimático da célula, representando a defesa predominante dos organismos aeróbios. Exercendo assim, papel fundamental no controle das espécies reativas de oxigênio (Lushchak, 2016). No presente trabalho, verificou-se um aumento no consumo deste antioxidante na brânquia dos peixes dos tratamentos NANO e nÓLEO ($60 \mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h) e no cérebro dos animais expostos a maior concentração de NANO também por 96 h, os quais apresentaram menores concentrações de GSH em relação ao CTR. Nestes casos, apesar do consumo do antioxidante, não foi constatado aumento na LPO, indicando a provável atuação de outros antioxidantes na proteção contra danos oxidativos.

Por outro lado, no músculo foi observado um aumento na concentração de GSH nos peixes expostos ao nÓLEO ($60 \mu\text{g L}^{-1}$ por 24 h) e ao ÓLEO ($90 \mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h). Este aumento de GSH deve ter colaborado para a redução de LPO no músculo dos peixes do grupo nÓLEO. Entretanto, uma redução de LPO também foi verificada no músculo e brânquia dos peixes do tratamento ÓLEO ($60 \mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h), indicando possivelmente uma ação

antioxidante do óleo de nim. Diversos trabalhos já demonstraram a capacidade antioxidante do nim e seus compostos (Ghimeray et al., 2009, Rinaldi et al., 2017), possivelmente devido a presença de compostos fenólicos em sua composição (Duh et al., 1999). Em contrapartida, por meio da determinação de peróxido de hidrogênio e LPO, Pascoli et al. (2020) não constataram qualquer ação antioxidante e dano oxidativo em mudas de feijão (*P. vulgaris*) submetidas às formulações.

No presente estudo, a ocorrência de danos oxidativos foi constatada apenas na brânquia dos peixes expostos às nanocápsulas de zeína sem o composto ativo (NANO 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h), conforme indicado pelos valores mais altos de MDA.

Em relação a GST branquial, foi verificado um decréscimo na atividade enzimática dos peixes expostos à menor concentração dos tratamentos experimentais (NANO, ÓLEO e nÓLEO) durante 24 h. Já após 96 h, a redução foi observada apenas nos peixes expostos ao grupo nÓLEO. Pascoli et al. (2019) avaliaram a expressão de GST-4 (um dos genes envolvidos na codificação da enzima GST) em *C. elegans* e constataram uma expressão reduzida desse gene nos nematoides expostos a diferentes concentrações do óleo de nim. A GST é uma enzima envolvida na segunda fase de biotransformação de compostos, catalisando a reação de conjugação do xenobiótico ou seus metabólitos a uma molécula endógena (GSH). Essas reações da via de metabolização tornam o composto hidrossolúvel, e consequentemente, mais facilmente excretado (Van der Oost et al., 2003). Portanto, a redução funcional dessa via pode provocar danos oxidativos (Lindblom e Dodd, 2006, Vieira et al., 2018, Andrade et al., 2019).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a brânquia representa o órgão mais sensível, tanto ao óleo de nim convencional como ao nanoformulado (NANO e nÓLEO), uma vez que perturbações foram observadas já na menor concentração e tempo de exposição, enquanto que no fígado nenhum desvio do padrão normal foi constatado nas condições avaliadas. Resultados bem consistentes, já que a brânquia é o órgão que primeiro entra em contato com os xenobióticos e representa uma das principais vias de entrada desses compostos no organismo (Shiogiri et al., 2012).

Considerando isso, Kumar et al. (2010) constataram danos histopatológicos na brânquia de *H. fossilis* já em curtas exposições (até 96 h) à azadiractina. Após exposições sub-crônicas, as lesões observadas nos menores tempos tornaram-se mais severas. Murussi et al. (2016a) também constataram danos no epitélio branquial de carpas (*C. carpio*) expostas ao Neenmax™ (20 µL L⁻¹ por 96 h), que tiveram sua frequência e gravidade aumentada em concentrações maiores do composto (40 e 60 µL L⁻¹), indicando que o grau de comprometimento celular foi dependente do tempo e concentração do composto. Dentre os danos branquiais verificados por Kumar et al. (2010) e Murussi et al. (2016a), a hipertrofia das células mucosas chamou atenção, já que a deposição de muco sobre as lamelas branquiais pode desempenhar papel importante na proteção contra agentes químicos. Contudo, devido a camada de muco funcionar como uma barreira física, acaba acarretando também consequências desfavoráveis ao organismo, dentre essas, o prejuízo na tomada de íons do meio externo, como sugerido nesse trabalho em virtude da hipocalcemia observada.

A brânquia representa o principal sítio de trocas gasosas da maioria dos peixes e junto com o fígado consiste no órgão-alvo de muitos xenobióticos (Saravanan et al., 2011, Shiogiri et al., 2012). Além disso, a brânquia dos teleósteos exercem funções essenciais para a osmorregulação, o equilíbrio ácido-base e a excreção de compostos nitrogenados (Hill et al., 2012, Andrade et al., 2019), de modo que as alterações desencadeadas pelos tratamentos experimentais verificadas nesse trabalho podem promover prejuízos ao organismo, devido ao comprometimento das funções vitais desse órgão.

Assim como a brânquia, o fígado desempenha função importante na sobrevivência do animal, uma vez que atua no metabolismo e armazenamento de carboidratos e lipídeos. Além disso, é predominantemente no tecido hepático que ocorre o processo de detoxificação metabólica (Shiogiri et al., 2012). De encontro com os achados desse estudo, Kumar et al. (2013) e Plhalova et al. (2017) verificaram danos histopatológicos mais relevantes no fígado dos peixes submetidos a produtos a base de nim apenas após exposição subcrônica (28 dias). Portanto, com base no que foi discutido, os compostos contendo nim parecem ser mais seguros a esse órgão, quando comparado aos agrotóxicos convencionais que já foram descritos como capazes de desencadear

desordens na função hepática do peixe *P. lineatus* (Alvim e Martinez, 2019, Andrade et al., 2019, Vieira et al., 2019).

Em relação ao cérebro, os resultados obtidos indicam que tanto o óleo de nim convencional, como o nanoencapsulado, foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, uma vez que efeitos no tecido cerebral foram constatados (redução de GSH e aumento de GST). Estudos têm demonstrado que as nanopartículas em razão do seu tamanho reduzido podem atravessar a barreira hematoencefálica, sendo muitas vezes utilizadas como carreadores de medicamentos em pacientes com doenças neurodegenerativas (Hu e Gao, 2010). Enquanto que o óleo, devido à sua propriedade lipossolúvel, pode também ser facilmente conduzido através das membranas encefálicas.

Considerando o conteúdo de GSH, foi constatado decréscimo nos níveis do antioxidante apenas após o maior tempo de exposição à maior concentração de NANO. Efeitos atribuídos às nanocápsulas de zeína também já foram observados por Pascoli et al. (2019), os quais demonstraram a capacidade dessas nanopartículas em reduzir o índice mitótico relativo em ensaios com *Allium cepa*, um parâmetro capaz de avaliar o potencial genotóxico dos xenobióticos. O surfactante Pluronic, utilizado na síntese das nanoformulações, também promoveu a redução desse índice. Além disso, Pascoli et al. (2020) verificaram que o tratamento NANO induziu um aumento na taxa de mortalidade de *A. obtectus*. Vale ressaltar também que os peixes expostos a NANO exibiram dano lipídico na brânquia ($90 \mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h), efeito que não foi observado nos animais submetidos aos outros tratamentos experimentais.

Aumento na atividade da GST foi também verificado no tecido cerebral dos peixes submetidos por 96 h à maior concentração de ambas formulações a base de nim (ÓLEO e nÓLEO), indicando provavelmente a ativação da via de biotransformação do óleo de nim. Esses efeitos observados tardiamente no cérebro (só após 96 h) podem indicar uma proteção inicial exercida pela barreira hematoencefálica. Contudo após exposição a maior concentração por um maior período, essa proteção foi comprometida. Além disso, não foi constatado qualquer indício de estresse oxidativo induzido pelos diferentes tratamentos nesse órgão, demonstrando possivelmente que a defesa antioxidante (GSH) e a metabolização dos compostos via GST foram suficientes para proteger o tecido do desequilíbrio pró-oxidante. O aumento da atividade da

GST no cérebro reflete a importância desse órgão para a vida do animal, sendo assim manter o seu funcionamento normal é indispensável ao organismo.

Altas concentrações (g L^{-1}) do extrato aquoso foliar de nim também promoveram aumento na atividade da GST hepática de *P. lineatus* após 24 h de exposição (Winkaler et al., 2007). Corroborando esses resultados, Murussi et al. (2016a) constataram maior atividade enzimática da GST em brânquia de *C. carpio* tratada com $60 \mu\text{L L}^{-1}$ de azadiractina durante 96 h. Assim como juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) expostos por 28 dias a 3 e 10 mg L^{-1} de um bioinseticida a base de nim (contendo 1% de azadiractina), também apresentaram maior atividade de detoxificação metabólica via GST (Pihlova et al., 2017). Estes resultados, juntamente com os resultados do presente estudo, indicam que, devido a sua natureza apolar, tanto o óleo de nim comercial como o nanobiopesticida parecem passar pelo processo de biotransformação via GST.

Em relação aos efeitos neurotóxicos, o óleo de nim nanoencapsulado (nÓLEO) promoveu uma resposta semelhante no cérebro e músculo. Os peixes submetidos por 24 h à menor concentração de nÓLEO exibiram redução da AChE em ambos os tecidos, a qual foi considerada transitória, uma vez que após 96 h a atividade da AChE retornou aos valores basais, possivelmente devido a ativação dos mecanismos de detoxificação do organismo.

A AChE consiste em um importante biomarcador das funções neuromusculares dos peixes, uma vez que hidrolisa a acetilcolina (ACh) na fenda sináptica impedindo a propagação do impulso nervoso (Van der Oost et al., 2003). Com a redução da atividade dessa enzima, ocorre um acúmulo do seu substrato ACh nas terminações nervosas, podendo ocasionar hiperexcitação neuronal, hiperatividade e tetania no músculo, devido à hiperestimulação das fibras nervosas musculares (Venkateswara Rao, 2006). Considerando isso, Venkateswara Rao (2006) e Venkateswara Rao et al. (2007) atribuíram o baixo desempenho natatório da tilápia *O. mossambicus* e do crustáceo *Artemia salina* à atividade reduzida da AChE induzida por produtos agrícolas. Da mesma forma, além do decréscimo na atividade da AChE, Parveen et al. (2004) verificaram também o acúmulo do substrato ACh em indivíduos de *Tilapia mossambica* após exposição aguda (48 e 96 h) a um inseticida a base de nim (Neem2100).

Alak et al. (2018) também verificaram um decréscimo na AChE cerebral de truta arco-íris (*O. mykiss*) tratada por 21 dias com a maior concentração ($240 \mu\text{g L}^{-1}$) de azadiractina testada, redução enzimática comparável a observada nos animais expostos a menores concentrações ($0,25$ e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) do agrotóxico sintético deltametrina. Portanto, com base nos resultados obtidos no presente estudo corroborados com os da literatura, fica explícito que o nim tem o potencial de comprometer a neurofisiologia dos peixes. Entretanto, nesse estudo o comprometimento colinérgico foi verificado apenas nos animais expostos ao nÓLEO ($60 \mu\text{g L}^{-1}$ por 24 h), possivelmente devido a um efeito de potencialização desempenhado pela nanoencapsulação.

Em contrapartida, outro efeito foi verificado no cérebro dos animais submetidos por 96 h à maior concentração dos tratamentos ÓLEO e nÓLEO. Esse aumento na atividade colinérgica indica possivelmente que o modo de ação do nim comercial e nanoencapsulado no peixe *P. lineatus* é alterado de acordo com a concentração dos compostos e o tempo de exposição. Além disso, Rath e Misra (1981) relataram que os menores indivíduos de *T. mossambica* tiveram a atividade da AChE mais drasticamente afetada pelo inseticida dichlorvos, quando comparado aos peixes maiores, devido à alta taxa metabólica dos organismos menores. Isso pode explicar o padrão de resposta observado nos peixes submetidos a maior concentração dos tratamentos, já que esses animais possuíam maior tamanho corpóreo.

O IBR aplicado de modo a integrar os resultados dos biomarcadores, indicou que os peixes submetidos a menor concentração dos meios experimentais foram os mais atingidos, principalmente após o maior tempo de exposição. Já na concentração de $90 \mu\text{g L}^{-1}$, menores valores de IBR foram constatados, demonstrando o menor comprometimento das funções biológicas desses animais. Vale ressaltar que após 96 h foi constatado um maior desvio da referência (CTR), quando comparado ao menor período de exposição, assim como verificado na menor concentração. Além disso, o índice confirmou que o nÓLEO foi o tratamento que desencadeou alterações em um maior número de parâmetros. Por outro lado, embora as nanocápsulas sem o ativo tenham promovido alguns efeitos nos peixes, o NANO foi o meio experimental que menos causou prejuízos.

Corroborando o maior valor de IBR em $60 \mu\text{g L}^{-1}$ dos tratamentos, Pascoli et al. (2020) constataram também que a menor concentração do nanobiopesticida testada promoveu um aumento na taxa de mortalidade da mosca branca (*B. tabaci*). Nas menores concentrações, as nanopartículas estão dispersas e pouco agregadas, possibilitando um maior contato desses nanosistemas com o organismo, sugerem os autores.

Considerando o IBR calculado para cada tecido, verificou-se que após 24 h de exposição a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ dos tratamentos, a brânquia, o músculo e o cérebro foram os órgãos mais atingidos. O índice indicou que o plasma também foi alvo de perturbação, sendo o NÓLEO o grupo com o maior valor de IBR, assim como demonstrado em $90 \mu\text{g L}^{-1}$ por 96 h, evidenciando o comprometimento da função iônica desses animais, como já discutido. Em 96 h, foi identificada a participação do tecido hepático no mecanismo de defesa contra os compostos testados. O fígado exibiu os maiores valores de IBR em ambas concentrações experimentais nesse tempo, embora não tenha sido verificada qualquer alteração bioquímica no tecido.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o nanobiopesticida foi capaz de promover alterações relevantes no peixe *P. lineatus*, dentre essas, destacou-se (i) o acentuado efeito na redução dos níveis de Ca^{2+} . Uma vez que a hipocalcemia pode comprometer processos essenciais do organismo, como a sinalização celular. (ii) A hiperglicemia acompanhada do consumo das reservas de glicogênio hepático e muscular, indicando provavelmente a ativação do mecanismo de estresse. (iii) E o comprometimento colinérgico, efeito que não foi observado nos animais tratados com o óleo convencional (ÓLEO). Sugere-se que esse maior efeito atribuído ao nanobiopesticida seja devido à sua maior resistência à fotodegradação, já que nanocápsulas biopoliméricas já foram descritas como capazes de proteger derivados botânicos contra radiação luminosa (de Oliveira et al., 2018a).

A relevância deste estudo deve-se também às concentrações testadas, uma vez que na literatura a maioria dos trabalhos disponíveis trazem concentrações maiores de azadiractina. Os resultados obtidos demonstram o risco que os organismos aquáticos estão sujeitos, pois concentrações baixas já foram suficientes para provocar efeitos em *P. lineatus*.

6. CONCLUSÃO

As nanocápsulas de zeína contendo óleo de nim utilizadas nesse trabalho demonstraram boa estabilidade uma vez que seu tamanho não foi alterado ao longo dos períodos experimentais. Em relação aos ensaios de toxicidade, as nanocápsulas sem o composto ativo provocaram efeitos em alguns parâmetros avaliados no peixe *P. lineatus*. Além disso, verificou-se que o óleo nanoencapsulado foi capaz de desencadear resposta de estresse, promover desbalanço iônico e alterações na atividade colinérgica. Por outro lado, a exposição ao óleo de nim convencional promoveu efeitos mais amenos e resultou inclusive na redução de danos oxidativos na brânquia e músculo dos peixes. Além disso, considerando os parâmetros bioquímicos, a brânquia, o músculo e o cérebro mostraram ser mais sensíveis aos tratamentos. Embora o tecido hepático também tenha sofrido perturbações nos estoques de glicogênio. Entretanto, mais estudos incluindo uma maior gama de biomarcadores e maiores tempos de exposição são necessários para se avaliar a toxicidade do óleo de nim nanoencapsulado para peixes, de modo a definir a segurança de sua aplicação em áreas agrícolas e principalmente, próximo a corpos d'água.

REFERÊNCIAS

- Adakole, J. A., Ogwu, S. Ecotoxicity of leaf extracts of *Azadirachta indica* on chironomids larvae. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 5, p. 2515-2519, 2012.
- Ahmad, M. K., Sharma, D. K. Ansari, S., Ansari, B. A. Comparative Study of Synthetic Pyrethroid Lambda-cyhalothrin and Neem based Pesticide Neemgold on the Fingerlings of Zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). **Research Journal of Chemical Sciences**, v. 1, p. 91-94, 2011.
- Akter, F., Rahman, M. M., Mostofa, M., Chowdhury, E. H. Anti-diabetic Effect of Neem and Spirulina in Alloxan Induced Diabetic Mice. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 2, p. 124-134, 2014.
- Alak, G., Ucar, A., Parlak, V., Yeltekin, A. Ç., Tas, I. H., Ölmez, D., Kocaman, E. M., Yilgin, M., Atamanalp, M., Yanik, T. Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, gene expression and antioxidant enzyme activity on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissue exposed to biopesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 203, p. 51-58, 2017.
- Alak, G., Ucar, A., Yeltekin, A. Ç., Parlak, V., Nardemir, G., Kizilkaya, M., Tas, I. H., Yilgin, M., Atamanalp, M., Topal, A., Kocaman, E. M., Yanik, T. Neurophysiological responses in the brain tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with bio-pesticide. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 203-209, 2018.
- Alves-Costa, J. R. M., Mela, M., de Assis, H. C. D. S., Pelletier, É., Randi, M. A. F., de Oliveira, C. A. R. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.
- Alvim, T. T., Martinez, C. B. R. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental**, v. 842, p. 85-93, 2019.
- Andrade, L. L., Pereira, A. E. S., Fraceto, L. F., Martinez, C. B. R. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 663, p. 548-559, 2019.
- Baldisserotto, B., Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C. **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 2014.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 1316-1322, 2002.

Benelli, G., Pavela, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks – a systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47-54, 2018.

Beutler, E., Durom, O., Kelly, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963.

Bidinotto, P. M., Souza, R. H. S., Moraes, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinants of microsamples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53-60, 1997.

Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R. K., Bandyopadhyay, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, p. 1336-1345, 2002.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

Brahmachari, G. Neem – An Omnipotent Plant: A Retrospection. **ChemBioChem**, v. 5, p. 408-421, 2004.

Brasil. **Ministério do Meio Ambiente**. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: março 2020.

Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. *In*: Armstrong, D. **Free radical and antioxidant protocols**. Humana Press, 1998. p. 377-387.

Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., Fraceto, L. F. Applications of Controlled Release Systems for Fungicides, Herbicides, Acaricides, Nutrients, and Plant Growth Hormones: A Review. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 6, p. 373-387, 2014.

Campos, E. V. R., Proença, P. L. F., Pascoli, M., de Lima, R., Fraceto, L. F. Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1494, 2016.

Campos, E. V. R., Proença, P. L. F., de Oliveira, J. L., Bakshi, M., ABHILASH, P. C., Fraceto, L. F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 483-495, 2019.

Chandramohan, B., Murugan, K., Madhiyazhagan, P., Kovendan, K., Kumar, P. M., Panneerselvam, C., Dinesh, D., Subramaniam, J. Neem by-products in the fight against mosquito-borne diseases: Biototoxicity of neem cake fractions towards

the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6. p. 472-476, 2016.

Chattopadhyay, R. R. Possible Mechanism of Antihyperglycemic Effect of *Azadirachta indica* Leaf Extract. Part IV. **General Pharmacology**, v. 27, p. 431-434, 1996.

Clemente, Z., Grillo, R., Jonsson, M., Santos, N. Z. P., Feitosa, L. O., de Lima, R., Fraceto, L. F. Ecotoxicological Evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Containing Triazine Herbicides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 4911-4917, 2014.

Crestani, M., Menezes, C., Gluszcak, L., Miron, D. S., Lazzari, R., Duarte, M. F., Morsch, V. M., Pippi, A. L., Vieira, V. P. Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 48-55, 2006.

da Fonseca, M. B., Gluszcak, L., Moraes, B. S., Menezes, C. C. Pretto, A., Tierno, M. A., Zanella, R., Gonçalves, F. F., Loro, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 416-420, 2008.

da Rosa, C. G., Maciel, M. V. O. B., Carvalho, S. M., De Melo, A. P. Z., Jummes, B., Da Silva, T., Martelli, S. M., Villetti, M. A., Bertoldi, F. C., Barreto, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 337-344, 2015.

de Aguiar, L. H., Moraes, G., Avilez, I. M., Altran, A. E., Corrêa, C. F. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, v. 95, p. 224-230, 2004.

de Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Bakshi, M., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1550-1561, 2014.

de Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Pereira, A. E. S., Nunes, L. E. S., da Silva, C. C. L., Pasquoto, T., de Lima, R., Smaniotto, G., Polanczyk, R. A., Fraceto, L. F. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 5325-5334, 2018a.

de Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Pereira, A. E. S., Pasquoto, T., de Lima, R., Grillo, R., de Andrade, D. J., dos Santos, F. A., Fraceto, L. F. Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable

Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 1330-1340, 2018b.

Dhara, K., Biswas, S. J., Karmakar, S. R. Study on the toxicity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extracts as phytopiscicide on three life stages of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) with special reference to their ethological responses. **International Journal of Experimental Research and Review**, v. 3, p. 7-13, 2016.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-358, 1956.

Duh, P. D., Tu, Y. Y., Yen, G. C. Antioxidant Activity of Water Extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 32, p. 269-277, 1999.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

El-Wakeil, N. E. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, p. 125-149, 2013.

Elzoghby, A. O., Samy, W. M., Elgindy, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, 38-49, 2012.

Feng, R. Isman, M. B. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. **Birkhäuser Verlag Basel**, v. 51, p. 831-833, 1995.

Flotemersch, J. E., Stribling, J. B., Paul, M. J. **Concepts and Approaches for the Bioassessment of Non-wadeable Streams and Rivers**. Cincinnati, Ohio: US Environmental Protection Agency, 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2017. The future of food and agriculture - **Trend and challenges**. Disponível em: <fao.org/3/a-i6583e.pdf>. Acesso em: 30 março 2020.

Ghimeray, A. K., Jin, C. W., Ghimire, B. K., Cho, D. H. Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 3084-3091, 2009.

Grillo, R., Souza, P. M. S., Rosa, A. H., Fraceto, L. F. Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação para herbicidas. *In*: Graeff, C. **Nanotecnologia Ciência e Engenharia**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. p. 83-124.

Grillo, R., Pereira, A. E. S., Nishisaka, C. S., de Lima, R., Oehlke, K., Greiner, R., Fraceto, L. F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat

herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 163-171, 2014.

Grillo, R., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F. Nanotechnology Applied to Bio-Encapsulation of Pesticides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, p. 1231-1234, 2016.

Harikrishnan, R., Rani, M. N., Balasundaram, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v. 221, p. 41-50, 2003.

Hassanein, H. M. A., Okail, H. A. Toxicity determination and hypoglycaemic effect of neem biopesticide on the grass carp "*Ctenopharyngodon idella*". **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 37-49, 2008.

Hill R. W., Wyse, G. A., Anderson, M. **Fisiologia Animal**. 2ª edição. Artmed, 2012.

Hu, Y. L., Gao, J. G. Potential neurotoxicity of nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, p. 115-121, 2010.

Hu, K., McClements, D. J. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Research International**, v. 64, p. 329-335, 2014.

Isman, M. B. Botanical insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

Isman, M. B., Grieneisen, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 140-145, 2014.

Johnson, S., Dureja, P., Dhingra, S. Photostabilizers for Azadirachtin-A (A neem-based pesticide). **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 38, p. 451-462, 2003.

Kar, A., Choudhary, B. K., Bandyopadhyay, N. G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethno-pharmacology**, v. 84, p. 105-108, 2003.

Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

Koul, O., Multani, J. S., Goomber, S., Daniewski, W. M., Berlozecki, S. Activity of some nonazadirachtin limonoids from *Azadirachta indica* against lepidopteran larvae. **Australian Journal of Entomology**, v. 43, p. 189-195, 2004.

Koul, O., Singh, R., Kaur, B., Kanda, D. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 428-436, 2013.

Kumar, S. The Role of Biopesticides in Sustainably Feeding the Nine Billion Global Populations. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 4, 1000e114, 2013.

Kumar, A., Prasad, M. R., Srivastava, K., Tripathi, S., Srivastav, A. K. Branchial histopathological study of catfish *Heteropneustes fossilis* following exposure to purified neem extract, Azadirachtin. **World Journal of Zoology**, v. 5, p. 239-243, 2010.

Kumar, A. N., Murugan, K., Madhiyazhagan, P., Prabhu, K. Spinosad and neem seed kernel extract as bio-controlling agents for malarial vector, *Anopheles stephensi* and non-biting midge, *Chironomus circumdatus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 614-618, 2011.

Kumar, A., Prasad, M. R., Mishra, D., Srivastav, S. K., Kumar, A. Acute toxicity of azadirachtin to a teleost, *Heteropneustes fossilis*. **Acta Scientiarum**, v. 34, p. 213-216, 2012.

Kumar, A., Prasad, M. R., Srivastava, K., Srivastav, S. K., Suzuki, N., Srivastav, A. K. Cyto-histopathological Alterations in the Liver of Azadirachtin Treated Catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 609-613, 2013.

Kumar, A., Prasad, M., Suzuki, N., Srivastav, S. K., Srivastav, A. K. Influence of a botanical pesticide, azadirachtin, on ultimobranchial gland of the freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 95, p. 1702-1711, 2014.

Kwankua, W., Sengsai, S., Kuleung, C., Euawong, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 949-954, 2010.

Lai, L. F., Guo, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 317-323, 2011.

Laurén, D. J., McDonald, D. G. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 155, p. 635-644, 1985.

Lindblom, T. H., Dodd, A. K. Xenobiotic Detoxification in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 305A, p. 720-730, 2006.

Lombardi, P. E., Peri, I. S., Verrengia Guerrero, N. R. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1704-1711, 2010.

Lushchak, V. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 711–747, 2016.

Mondal, D., Barat, S., Mukhopadhyay, M. K. Toxicity of neem pesticides on a fresh water loach, *Lepidocephalichthys guntea* (Hamilton Buchanan) of Darjeeling district in West Bengal. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, p. 119-122, 2007.

Moon, T. W. Stress effect on growth and metabolism. *In*: Farrel, A. P. **Encyclopedia of fish from genome to environment**. 2^oed. Academic Press, 2011, p. 1534-1540.

Moraes, M. F. P. G., Barbola, I. F., Guedes, E. A. C. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do “curimbatá”, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, p. 169-180, 1997.

Morgan, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4096-4105, 2009.

Mossini, S. A. G., Kimmelmeier, C. A árvore Neem (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, p. 139-148, 2005.

Murussi, C. R., Costa, M. D., Leitemperger, J. W., Flores-Lopes, F., Menezes, C. C., Loebens, L., de Avila, L. A., Rizzetti, T. M., Adaime, M. B., Zanella, R., Loro, V. L. Acute exposure to the biopesticide azadirachtin affects parameters in the gills of common carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology Pharmacology**, v. 180, p. 49-55, 2016a.

Murussi, C. R., Menezes, C. C., Nunes, M. E. M., Araújo, M. C. S., Quadros, V. A., Rosemberg, D. B., Loro, V. L. Azadirachtin, a Neem-Derived Biopesticide, Impairs Behavioral and Hematological Parameters in Carp (*Cyprinus Carpio*). **Environmental Toxicology**, v. 31, p. 1381-1388, 2016b.

Oliveira, H. C., Stolf-Moreira, R., Martinez, C. B. R., Grillo, R., de Jesus, M. B., Fraceto, L. F. Nanoencapsulation Enhances the Post-Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mustard Plants. **Plos One**, v. 10, e0132971, 2015.

Paliwal, R., Palakurthi, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v.189, p. 108-122, 2014.

Papalia, I. S., Londero, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, v. 45, p. 552-559, 2015.

Parveen, M., Kumar, S., Sharma, R. Effect of neem seed pesticide, neemta 2100 to the *Tilapia mossambica*. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 6. p. 567-569, 2004.

Pascoli, M., de Lima, R., Fraceto, F. L. Zein Nanoparticles and Strategies to Improve Colloidal Stability: A Mini-Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 1-5, 2018.

Pascoli, M., Jacques, M. T., Agarrayua, D. A., Avila, D. S., de Lima, R., Fraceto, L. F. Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. **Science of the Total Environment**, v. 677, p. 57-67, 2019.

Pascoli, M., Albuquerque, F. P., Calzavara, A. K., Tinoco-Nunes, B., Oliveira, W. H. C., Gonçalves, K. C., Polanczyk, R. A., Vechia, J. F. D., Matos, S. T. S., Andrade, D. J., Oliveira, H. C., Souza-Neto, J., de Lima, R., Fraceto, L. F. The potential of nanobiopesticide based on zein nanoparticles and neem oil for enhanced control of agricultural pests. **Journal of Pest Science**, v. 93, 793-806, 2020.

Pasquoto-Stigliani, T., Campos, E. V. R., Oliveira, J. L., Silva, C. M. G., Bilesky-José, N., Guilger, M., Troost, J., Oliveira, H. C., Stolf-Moreira, R., Fraceto, L. F., de Lima, R. Nanocapsules Containing Neem (*Azadirachta Indica*) Oil: Development, Characterization, And Toxicity Evaluation. **Scientific Reports**, v. 7, 5929, 2017.

Patel, A., Hu, Y., Tiwari, J. K., Velikov, K. P. Synthesis and characterisation of zein-curcumin colloidal particles. **Soft Matter**, v. 6. p. 6192-6199, 2010.

Patrício, I., Martins, F. G., Bonfim, T. C. S., Vasconcellos, M. C., Pinheiro, J., Faro, M. J., Mello-Silva, C. C. The Influence of Pesticides on the Biology and Physiology of the Land Snail *Bulimulus tenuissimus* (Orbigny, 1935). **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, p. 1433-1439, 2019.

Pereira, A. E. S., Grillo, R., Mello, N. F. S., Rosa, A. H., Fraceto, L. F. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207-215, 2014.

Plhalova, L., Blahova, J., Divisova, L., Enevova, V., Di Tocco, F. C., Faggio, C., Tichy, F., Vecerek, V., Svobodova, Z. The effects of subchronic exposure to NeemAzal T/S on zebrafish (*Danio rerio*). **Chemistry and Ecology**, v. 34, p. 199-210, 2017.

Podaralla, S., Perumal, O. Influence of Formulation Factors on the Preparation of Zein Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, p. 919-927, 2012.

Qiao, J., ZOU, X., LAI, D., YAN, Y., WANG, Q., LI, W., DENG, S., XU, H., GU, H. Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature

synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1041-1047, 2014.

Rahman, M. F., Siddiqui, M. K. J., Jamil, K. Sub-chronic effect of neem based pesticide (Vepacide) on acetylcholinesterase and ATPases in rat. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 34, p. 873-884, 1999.

Rath, S., Misra, B. N. Toxicological effects of dichlorvos (DDVP) on brain and liver acetylcholinesterase (AChE) activity of *Tilapia mossambica*, Peters. **Toxicology**, v. 19, p. 239-245, 1981.

Rinaldi, F., Hanieh, P. N., Longhi, C., Carradori, S., Secci, D., Zengin, G., Ammendolia, M. G., Mattia, E., del Favero, E., Marianecchi, C., Carafa, M. Neem oil nanoemulsions: characterisation and antioxidant activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 1265-1273, 2017.

Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J. A novel "integrated biomarker response" calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 2721-2725, 2013.

Saravanan, M., Kumar, D. V., Malarvizhi, A., Ramesh, M. Biosafety of *Azadirachta indica* (A. Juss) leaves extracts on certain biochemical parameters of *Labeo rohita*. **Journal of Biopesticides**, v. 3, p. 227-231, 2010.

Saravanan, M., Kumar, K. P., Ramesh, M. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, p. 206-211, 2011.

Shailey, S., Basir, S. F. Long term effect of *Azadirachta indica* on hyperglycemia, associated hyperlipidemia and tissue glycogen content in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, p. 810-812, 2011.

Shang, Q., Shi, Y., Zhang, T., Shi, H. Pesticide-conjugated polyacrylate nanoparticles: novel opportunities for improving the photostability of emamectin benzoate. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 24, p.137-143, 2012.

Shibatta, O. A., Orsi, A. L., Bennemann, S. T., Silva-Souza, A. T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. *In*: Medri, M. E., Bianchini, E., Shibatta, O. A., Pimenta, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: MC Gráfica, 2002. p. 403-424.

Shibatta, O. A., Gealh, A. M., Bennemann, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 125-134, 2007.

Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., Cruz, C., Fernandes, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the

gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 388-396, 2012.

Shukla, R., Cheryan, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, p. 171-192, 2001.

Silva, L. T. **Adaptações morfológicas do trato digestório do peixe neotropical *Steindachnerina notonota* (Characiformes, Curimatidade) ao hábito alimentar detritívoro**. Dissertação (Mestrado em Biologia Estrutural e Funcional) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, p. 116, 2016.

Silva, C. T. S., Wanderley-Teixeira, V., Cruz, G. S., Cunha, F. M., Teixeira, A. A. C. Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs sprayed with azadirachtin. **Austral Entomology**, 2019. No prelo.

Singh, D., Singh, A. Effect of stem-bark extract of some common plants on non-target fresh water fish *Channa marulius* (Ham.). **Indian Journal of Fisheries**, v. 50, p. 525-531, 2003.

Sohn, E. K., Chung, Y. S., Johari, S. A., Kim, T. G., Kim, J. K., Lee, J. H., Kang, S. W., Yu, I. J. Acute toxicity comparison of single-walled carbon nanotubes in various freshwater organisms. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1-7, 2015.

Sousa, G. F. M., Gomes, D., Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., Fraceto, L. F., Stolf-Moreira, R., Oliveira, H. C. Post-Emergence Herbicidal Activity of Nanoatrazine Against Susceptible Weeds. **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, p. 1-6, 2018.

Suresh, C. H. B., Shailender, M., Rajagopal Reddy, S., Krishna, P. V. Effect of acute toxicity of Azadirachtin on the survival of freshwater cat fish, *Pangasius hypophthalmus*. **International Journal of Research in Biological Sciences**, v. 3, p. 112-115, 2013.

Tavechio, W. L. G., Guidelli, G., Portz, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 335-341, 2009.

Tiwari, S., Singh, A. Control of common freshwater predatory fish, *Channa punctatus*, through *Nerium indicum* leaf extracts. **Chemosphere**, v. 53, p. 865-875, 2003.

United Nations. World Population Prospects – The 2019 Revision. Division Population, Department of Economic and Social Affairs. 2019.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

Velludo, M. R. **Ecologia Trófica da Comunidade de Peixes do Reservatório de Cachoeira Dourada, Rio Paraíba, Bacia do Alto Rio Paraná, Brasil**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 137, 2011.

Venkateswara Rao, J. V. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, p. 492-498, 2006.

Venkateswara Rao, J. V., Kavitha, P., Jakka, N. M., Sridhar, V., Usman, P. K. Toxicity of Organophosphates on Morphology and Locomotor Behavior in Brine Shrimp, *Artemia salina*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 227-232, 2007.

Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., Cabrera, L. C., Risso, W. E., Primel, E. G., Meletti, P. C., Fillmann, G., Martinez, C. B. R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 44-56, 2016.

Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D., Raimundo, C. C. M., Martinez, C. B. R. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 195, p. 125-134, 2018.

Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Caldas, S. S., Tesser, M. E., Risso, W. E., Escarrone, A. L. V., Primel, E. G., Bianchini, A., Martinez, C. B. R. An integrated approach in subtropical agro-ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. **Science of the Total Environment**, v. 666, p. 508–524, 2019.

Weintraub, P. G., Recht, E., Mondaca, L. L., Harari, A. R., Diaz, B. M., Bennison, J. Arthropod Pest Management in Organic Vegetable Greenhouses. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, p. 1-14, 2017.

Wendelaar Bonga, S. E. Hormonal controls. *In*: Farrell, A. P. **Encyclopedia of fish from genome to environment**, 1° ed. Academic Press, 2011, p. 1515-1534.

Winkaler, E. U., Santos, T. R. M., Machado-Neto, J. G., Martinez, C. B. R. Acute lethal and sublethal effects of nim leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 145, p. 236-244, 2007.

Wu, Y., Luo, Y., Wang, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT – Food Science and Technology**, v. 48, p. 283-290, 2012.

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 156/2018

Londrina, 24 de Setembro de 2018.

Prezado (a) professor (a)


Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação dos efeitos de nanopartículas contendo bioinseticida a base de neem para *Prochilodus Lineatus*" protocolo CEUA nº 16105.2018.19 sob a responsabilidade de **Claudia Bueno dos Reis Martinez**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **24/09/2018**.

O objetivo do projeto é investigar se exposições agudas ao óleo de neem nanoencapsulado promovem alterações nos biomarcadores genotóxicos, fisiológicos e bioquímicos no peixe neotropical *P. Lineatus*. GI: 2

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/10/2018 a 01/02/2020
Espécie/ linhagem/ raça	Peixe/ <i>Prochilodus lineatus</i>
Nº de animais	96
Peso/ Idade	20g
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Aquicultura Venites, Linha Nova Videira- Coopagro, Toledo, Paraná, Brasil
Amostras a serem coletadas	Sangue, Brânquias, Fígado, Cérebro e Músculo

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

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


 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Claudia Bueno dos Reis Martinez
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Fisiológicas/ CCB

C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas
 C/C para a Direção de Centro do CCB