



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILENA APARECIDA DOS SANTOS SILVA

**EFEITOS DO GERANIOL CONVENCIONAL E
NANOENCAPSULADO EM *Prochilodus lineatus*:
ANÁLISE DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Milena Aparecida dos Santos Silva

**Efeitos do geraniol convencional e nanoencapsulado
em *Prochilodus lineatus*: Análise de múltiplos
biomarcadores**

Londrina
2024

MILENA APARECIDA DOS SANTOS SILVA

Efeitos do geraniol convencional e nanoencapsulado
em *Prochilodus lineatus*: Análise de múltiplos
biomarcadores

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

MILENA APARECIDA DOS SANTOS SILVA

Efeitos do geraniol convencional e nanoencapsulado em *Prochilodus lineatus*: Análise de múltiplos biomarcadores

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Orientadora

Profa. Dra. Marta Margarete Cestari
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
Universidade Federal de Goiás - UFG

Londrina, 31 de julho de 2024.

“JUST A PART OF SOMETHING BIGGER”
AMBER RUN

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a minha família. Não tenho palavras pra descrever como minha família foi importante em toda minha jornada acadêmica. Obrigado Mamis (minha melhor amiga), por absolutamente tudo, conselhos, broncas, amizade e inspiração. Obrigado Vô (pelas idas ao mercado) e Vó (pelo amor em forma de atos de serviço), por confiarem em mim e me apoiarem com orgulho em tudo que eu faço. Obrigado Pai (por demonstrar amor e preocupação do seu jeitinho) e Mu (por me tornar tia), pelo suporte e carinho nesses anos. Obrigado loirinho e lulu, por me fazerem amar de novo e enxergar que o amor é simples. Amo imensamente todos vocês.

Quero agradecer a todo o pessoal do laboratório pelo aprendizado e apoio que todos me ofereceram nesses últimos anos. Em especial, ao meu amigo Tiago que foi parte fundamental no desenvolvimento deste trabalho, obrigado de coração migo, amo você. A todos os meus amigos, Allan, Bal, Babu, Carlos, Catia, Jota, João, Rafa, Mari, por deixarem os dias mais leves, amo vocês.

Agradeço a minha orientadora a professora doutora Claudia, por me orientar em todos esses anos com muito carinho e respeito. Muito obrigado por todos os conselhos e sugestões, sou muito grata por tudo que fez por mim. Ao professor Leonardo Fraceto e todo pessoal da Unesp de Sorocaba pela parceria. Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Ao Carrefour pela bolsa de mestrado concedida. Ao CNPq (Processo 405799/2021-7) e ao INCT-NanoAgro (CNPq) pelos recursos financeiros.

SILVA, M. A. S. **Efeitos do geraniol convencional e nanoencapsulado em *Prochilodus lineatus*: Análise de múltiplos biomarcadores.** 2024. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O Brasil é considerado um dos maiores produtores agrícolas e enfrenta um cenário preocupante devido ao uso excessivo de agrotóxicos, que causam sérios impactos ambientais. Alternativas mais sustentáveis aos agrotóxicos, como o geraniol, composto de origem botânica, com propriedades fungicidas, inseticidas e repelentes, vem sendo exploradas, além do seu nanoencapsulamento, que permite uma liberação controlada e confere maior eficiência. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos adversos causados pelo geraniol convencional e nanoencapsulado no teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*, testando a hipótese de que as nanocápsulas de zeína isoladas não vão causar alterações significativas aos animais e que a exposição ao geraniol nanoencapsulado minimiza os efeitos que o composto convencional pode causar em uma espécie não alvo. Para realizar esse estudo, juvenis de *P. lineatus* foram expostos aos tratamentos: geraniol (GER), nanocápsulas de zeína (NANO) e geraniol nanoencapsulado (nGER), todos em uma concentração de 5 mg L⁻¹. Um grupo controle (CTR) foi exposto apenas ao solvente (Pluronic F-68®). Após 24 e 96 h de exposição os animais foram amostrados, para a retirada de sangue, cérebro, músculo, fígado e brânquias, para as análises dos biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos. Observamos mortalidade de 100% dos animais expostos às NANO, após 24h de exposição. Nossos resultados mostraram aumento significativo na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro dos animais expostos ao nGER e GER em relação ao CTR, e diminuição significativa no conteúdo de glutathione (GSH) nas brânquias dos animais expostos ao nGER. Aumento significativo no escore de danos no DNA dos animais expostos ao GER em comparação ao CTR, também foi observado. Não foram encontradas alterações significativas quanto à lipoperoxidação (LPO), frequência de micronúcleos e outras alterações eritrocíticas nucleares. Os biomarcadores fisiológicos e histológicos analisados também não apresentaram alterações. Assim, verificamos que a exposição apenas às nanocápsulas de zeína (NANO) causaram efeitos tóxicos na espécie de peixe estudada; O geraniol convencional causou danos no DNA, enquanto o geraniol nanoencapsulado exibiu baixa toxicidade para *P. lineatus*.

Palavras-chave: Nanobiopesticida. Ecotoxicologia. Agricultura. Nanotecnologia. Peixes.

SILVA, M. A. S. **Effects of conventional and nanoencapsulated geraniol on *Prochilodus lineatus*: Multiple biomarker analysis.** 2024. 68pp. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Brazil is considered one of the largest agricultural producers and faces a worrying scenario due to the excessive use of pesticides, which cause serious environmental impacts. More sustainable alternatives to pesticides, such as geraniol, a compound of botanical origin, with fungicidal, insecticidal and repellent properties, have been explored, in addition to its nanoencapsulation, which allows controlled release and provides greater efficiency. Therefore, the objective of this work was to evaluate the possible adverse effects caused by conventional and nanoencapsulated geraniol on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*, testing the hypothesis that isolated zein nanocapsules will not cause significant changes to the animals and that exposure to nanoencapsulated geraniol minimizes the effects that the conventional compound can cause in a non-target species. To carry out this study, *P. lineatus* juveniles were exposed to the treatments: geraniol (GER), zein nanocapsules (NANO) and nanoencapsulated geraniol (nGER), all at a concentration of 5 mg L⁻¹. A control group (CTR) was exposed only to the solvent (Pluronic F-68®). After 24 and 96 h of exposure, the animals were sampled to remove blood, brain, muscle, liver and gills, for analysis of biochemical, genotoxic, physiological and histological biomarkers. We observed 100% mortality of animals exposed to NANO, after 24 hours of exposure. Our results showed a significant increase in acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain of animals exposed to nGER and GER in relation to CTR, and a significant decrease in glutathione (GSH) content in the gills of animals exposed to nGER. A significant increase in the DNA damage score of animals exposed to GER compared to CTR was also observed. No significant changes were found regarding lipid peroxidation (LPO), and the frequency of micronuclei and other erythrocytic nuclear alterations. Also, the physiological and histological biomarkers that were analyzed did not show any significant changes. Thus, we verified that exposure only to zein nanocapsules (NANO) caused toxic effects in the fish species studied; Conventional geraniol caused DNA damage, while nanoencapsulated geraniol exhibited low toxicity to *P. lineatus*.

Key-words: Nanobiopesticide. Ecotoxicology. Agriculture. Nanotechnology. Fish.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 – Estrutura molecular do geraniol

Figura 2 – Propriedades e aplicações da zeína (Modificado de Jaski *et al.*, 2022).

Figura 3 – Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*. Barra = 1 cm.

Figura 4 – Biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos em *Prochilodus lineatus* utilizados para avaliação da ecotoxicidade. AChE= acetilcolinesterase; GSH= glutationa; LPO= Lipoperoxidação; MN= micronúcleo; AENs= alterações eritrocíticas nucleares.

Figura 5 – Mecanismo de defesa antioxidante. ERO = espécies reativas de oxigênio; LPO= peroxidação lipídica; PCO= carbonilação de proteínas; GSH= glutationa.

Figura 6 – Síntese e reciclagem da acetilcolina. ACh = acetilcolina; AChE= acetilcolinesterase; CoA= acetil-CoA; Ch= colina; A= acetato.

Figura 7 – Micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (AENs) observadas em *Prochilodus lineatus* expostos a dois inseticidas, imidacloprido e lambda cialotrina. NR= núcleo em forma de rim; NS= núcleo segmentado; NL= núcleo lobulado; CB= células binucleadas.

Figura 8 – Classificação do dano no DNA em *Prochilodus lineatus* a partir da cauda formada. Imagens representativas de nucleóides após coloração com GelRed.

MANUSCRITO

Figura 1 – Caracterização do geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado (nGER). Os valores correspondem a média $\pm$ EP, das amostras coletadas durante o experimento independente em 0h, 6h, 12h, 24h, 48h pré-renovação, 48h pós-renovação e 96h; n = 4.

Figura 2 – Concentrações de glutationa ($\mu\text{g GSH.mg ptn}^{-1}$) nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o

solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; n= 5-8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 3 – Lipoperoxidação (nmol TBARS.mg ptn⁻¹) nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; n= 5-8.

Figura 4 – Atividade cerebral (A) e muscular (B) da enzima acetilcolinesterase (nmol min⁻¹.mg ptn⁻¹) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; n= 5-8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 5 – Escore de danos no DNA de eritrócitos de *Prochilodus lineatus*, após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; n= 5-8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). As fotomicrografias das diferentes classes de cometa: Classe 0= sem dano visível; classe 1= cauda até 1x o diâmetro do núcleo; classe 2= comprimento de cauda > 1 até 2x o diâmetro do núcleo; classe 3= comprimento da cauda $>$ que 2x o diâmetro do núcleo; foram coradas com GelRed, com ampliação de 40x, em microscópio de fluorescência.

Figura 6 – Concentrações plasmáticas (mg dL⁻¹) de glicose (A) e

lactato (B) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; n= 5-8.

Figura 7 – Cortes histológicos de brânquias de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). **A** - Brânquia em condição normal de um animal do grupo CTR; **B** – Parasita encontrado na brânquia de um animal do grupo GER; **C** Aneurisma encontrado na brânquia de um animal do grupo nGER; **D** – Brânquia com descolamento epitelial de um animal do grupo GER; **E** – Brânquia com fusão incompleta e completa das lamelas de um animal do grupo CTR; **F** – Brânquia com congestão vascular de um animal do grupo CTR; Escala: 20 μ m. Coradas com H&E.

Figura 8 – Índice de resposta de biomarcador integrado (IBR) em *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados dos biomarcadores estão representados em relação ao grupo controle (CTR) (linha tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
AENs	Alterações eritrocíticas nucleares
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GER	Geraniol convencional
GSH	Glutathiona
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematócrito
IAH	Índice de alterações histológicas
LPO	Lipoperoxidação
MN	Micronúcleo
NANO	Nanocápsulas de zeína
N	Número de amostras
nGER	Geraniol nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
RBC	Número de eritrócitos
SNC	Sistema nervoso central
ZnO-NPs	Nanopartículas de óxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1	Problemática dos agrotóxicos	9
1.2	Geraniol	10
1.3	Nanotecnologia e as nanocápsulas de zeína	12
1.4	Prochilodus lineatus como modelo biológico	14
1.5	Biomarcadores	16
1.6	OBJETIVOS E HIPÓTESES	22
1.6.1	Objetivo geral	22
1.6.2	Objetivos específicos	22
1.6.3	Hipóteses	22
	REFERÊNCIAS	23
2	MANUSCRITO	29
2.1	RESUMO	29
2.1.2	DESTAQUES.....	30
2.1.3	RESUMO GRÁFICO	30
2.2	INTRODUÇÃO	31
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.3.1	Síntese das nanopartículas e do geraniol	32
2.3.2	Delineamento experimental	33
2.3.3	Homogeneização de tecidos	34
2.3.4	Proteínas totais	35
2.3.5	Biomarcadores bioquímicos	35
2.3.6	Biomarcadores genotóxicos	35
2.3.7	Biomarcadores fisiológicos	36
2.3.8	Biomarcadores histológicos	36
2.3.9	Análise estatística	37
2.4	RESULTADOS	38
2.5	DISCUSSÃO	50
2.6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de ética no uso de animais	62
---	----

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Problemática dos Agrotóxicos

Com o passar dos anos, as atividades agrícolas têm sido cada vez mais exploradas, principalmente devido à demanda alimentar em constante crescimento, decorrente do crescimento populacional. Nessa perspectiva, o aumento na utilização de agrotóxicos ficou evidente (Carvalho *et al.*, 2022). O Brasil possui condições climáticas favoráveis e extensas áreas de terras cultiváveis, sendo o local ideal para a agricultura, e reconhecido como um dos maiores produtores e o segundo maior exportador de produtos agrícolas no mundo. Porém, atrelado à grande produtividade, o consumo de agrotóxicos é elevado (Souza *et al.*, 2023).

O Brasil enfrenta cenário preocupante devido ao uso excessivo de agrotóxicos. Áreas com intensa atividade agrícola podem ser apontadas como um dos locais mais propícios para a liberação de contaminantes para o meio aquático, tendo em vista utilização de produtos químicos em plantações (Fernandes *et al.*, 2020). Vários fatores como escoamento, lixiviação, pulverização e irrigação fazem com que os produtos químicos utilizados não atinjam somente as lavouras, mas cheguem no ambiente aquático (Erthal; Berticelli, 2018; Bijlsma *et al.*, 2021; Araújo; Caldas; Oliveira-filho, 2022) afetando organismos não-alvo, como peixes (Ribeiro *et al.*, 2022), moluscos (Faro *et al.*, 2021) e anfíbios (Borges *et al.*, 2019), causando mudanças tanto no habitat quanto na fisiologia desses organismos.

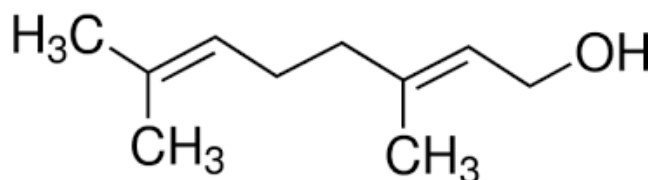
A exposição de peixes a diferentes contaminantes, dentre eles, agrotóxicos, pode levar à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e indução de estresse oxidativo, inflamação, imunotoxicidade, genotoxicidade, podendo reduzir também o crescimento do animal, ou seja, afeta a saúde dos peixes de várias maneiras (Subaramaniam *et al.*, 2023). Em muitas plantações, frequentemente são empregadas misturas de diversos agrotóxicos, cujos efeitos combinados podem ser mais danosos do que quando aplicados individualmente (Bacchetta *et al.*, 2014). Estudos que investigaram essas combinações demonstraram que tanto os produtos isolados quanto em conjunto podem causar impactos adversos em organismos aquáticos, com a associação sendo mais tóxica em períodos de tempo relativamente curtos, representando assim uma ameaça para todo o ecossistema (Wang *et al.*, 2015; Alvim; Martinez, 2019).

Grande parte dos agrotóxicos possui características físicas e químicas que conferem resistência à degradação e uma boa solubilidade, características essas que facilitam seu transporte ao longo dos corpos d'água (Souza *et al.*, 2023). Assim, quando presentes no ambiente aquático, esses produtos químicos têm a tendência de se espalhar por grandes áreas, contaminando numerosos organismos e habitats até sua completa degradação, cujo tempo pode variar. Diante da problemática evidente, alternativas mais sustentáveis aos agrotóxicos vêm sendo exploradas com o intuito de diminuir seu uso e, eventualmente, substituir o emprego dos agrotóxicos convencionais.

1.2 Geraniol

O geraniol (Fig.1), é um álcool monoterpênico acíclico ($C_{10}H_{18}O$) encontrado nos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas, tais como rosa, capim-limão, citronela, dentre outras geralmente do gênero *Cymbopogon* (Mączka *et al.* 2020). O geraniol pode ser inserido na agricultura como uma alternativa aos agrotóxicos convencionais por exibir propriedades fungicidas, inseticidas e repelentes, sendo usado como um agente natural para o controle de pragas, além de exibir baixa toxicidade para mamíferos (Chen; Viljoen, 2010, 2022). Ele também é conhecido por ser amplamente utilizado em produtos comerciais, incluindo cosméticos, fragrâncias e medicamentos, por suas características farmacológicas, como atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (De sá *et al.*, 2021).

Figura 1. Estrutura molecular do geraniol.



Fonte: ChemBioDraw

Os óleos essenciais e seus componentes, como o geraniol, além de suas distintas aplicações, são considerados mais vantajosos como inseticidas em comparação aos sintéticos de uso atual, tanto do ponto de vista ecológico quanto do econômico (Chen; Viljoen, 2022). A Tabela 1 contém uma visão geral do uso do

1 geraniol, alguns de seus diferentes efeitos e aplicações. Hamouda *et al.* (2021)
 2 testaram a atividade inseticida de cinco álcoois, cíclicos e acíclicos, dentre eles o
 3 geraniol, contra uma espécie de besouro da farinha (*Tribolium castaneum*), e
 4 concluíram que todos os cinco exibiram atividade contra o organismo, a qual foi maior
 5 nos álcoois acíclicos em comparação aos cíclicos, destacando a potencial utilização
 6 do geraniol no controle de pragas. Barbosa *et al.* (2020) testaram componentes de
 7 óleos essenciais, dentre eles o geraniol, contra o caruncho-do-feijão (*Callosobruchus*
 8 *maculatus*) e confirmaram sua eficácia como inseticida, visto que causaram redução
 9 no número e viabilidade dos ovos assim como na emergência dos insetos.

Tabela 1. Utilização do geraniol: alguns de seus efeitos e aplicações.

Espécie-alvo	Efeitos	Referência
<i>Tribolium castaneum</i>	Atividade repelente contra insetos; álcoois acíclicos (geraniol) mais potentes; CL50 = 48.57 µL/L ar.	Hamouda <i>et al.</i> , 2021
<i>Callosobruchus maculatus</i>	Redução no número e viabilidade dos ovos; redução na emergência dos insetos; potencial inseticida; CL50 = 77.42 ppm.	Barbosa <i>et al.</i> , 2020
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Redução do ataque do patógeno (potencial antifúngico); retardou a progressão da doença em frutos e plântulas; aumento significativo na inibição a partir da concentração de 0,5 µL/ mL.	Neto <i>et al.</i> , 2020
<i>Sitophilus zeamais</i> e <i>Acanthoscelides obtectus</i>	Causou toxicidade e afetou a emergência e sobrevivência dos adultos; atividade inseticida.	Ataide <i>et al.</i> , 2022
<i>Sitophilus zeamais</i>	Aumento da mortalidade de adultos; atividade inseticida em adultos; reduziu a alimentação dos insetos e não afetou a germinação das sementes de milho;	Seneme <i>et al.</i> , 2023
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	Inibiu fortemente o crescimento de ambas; atividade antibacteriana.	Ola <i>et al.</i> , 2021

A atividade antifúngica do geraniol e linalol contra cinco espécies de *Candida* foi avaliada por Singulani *et al.* (2018). Os autores mostraram que ambos os componentes inibiram o crescimento das espécies, porém o geraniol se mostrou mais eficaz. Entretanto, apesar dos estudos ressaltando as qualidades do geraniol, não se deve descartar seus possíveis efeitos tóxicos em organismos não alvo, visto que esse mesmo estudo verificou que apesar do geraniol apresentar eficácia contra a *Candida*, ele pode também causar efeitos genotóxicos em *Danio rerio*, induzindo deformidades nos adultos e mortalidade em embriões.

O geraniol também já foi explorado como uma alternativa segura para imobilização e facilitação no manejo dos peixes, atuando como um anestésico natural. Araújo *et al.* (2021) apresentaram resultados consistentes de que o geraniol é capaz de promover a imobilização total do corpo de peixes (*Colossoma macropomum*), atribuindo tal efeito, em parte, às suas propriedades miorelaxantes. A concentração de 70 $\mu\text{L L}^{-1}$ de geraniol já foi suficiente para imobilizar os animais, reduzindo a ventilação e diminuindo significativamente a frequência cardíaca durante a anestesia, sem comprometimento na retomada tanto da ventilação quanto da função cardíaca normal, e sem mortalidade observada.

Ademais, grande parte da literatura destaca as propriedades farmacológicas do geraniol. No artigo de revisão de Lei *et al.* (2019), essas propriedades são enfatizadas, apresentando o composto botânico como um forte candidato a medicamento para o tratamento de diversas doenças, já que exerce múltiplas atividades biológicas. Seguindo a mesma linha, a revisão de Mączka *et al.* (2020), apresenta as distintas faces do geraniol, abordando sua série de atividades biológicas, destacando estudos onde o princípio ativo se mostrou eficaz como antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante. Em resumo, sabe-se que o geraniol possui distintas aplicações e seu uso confere vantagens tanto do ponto de vista agrícola quanto farmacológico.

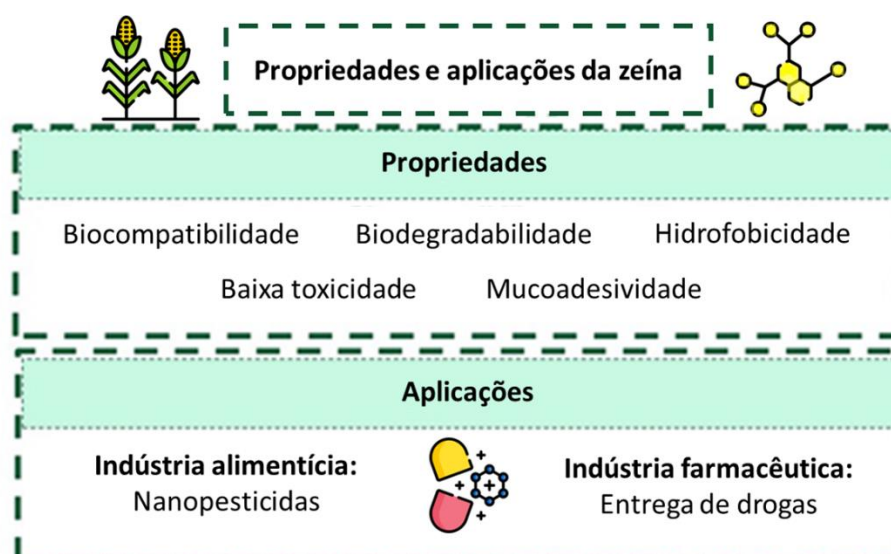
1.3 Nanotecnologia e as nanocápsulas de Zeína

Com o avanço e desenvolvimento da nanotecnologia, muitas atividades em diferentes setores têm buscado meios de associar essa inovação com práticas mais sustentáveis. E a agricultura tem ganhado destaque pelas crescentes pesquisas acerca das nanopartículas (Saldivar *et al.*, 2018). A utilização de nanocápsulas confere vantagens como liberação controlada de agrotóxicos, aumento

da biodisponibilidade do produto para a espécie alvo (maior especificidade de ação), além de garantir que chegue no local de ação sem sofrer grandes degradações (Apolinário *et al.*, 2020). Em adição aos nanopesticidas sintéticos, temos os nanobiopesticidas de origem botânica, os quais tendem a ser menos tóxicos que os sintéticos e por isso são considerados promissores para a conservação do ambiente (Sow; Samadder, 2022). A zeína, proteína do milho, tem sido investigada por suas propriedades, e já se mostrou eficaz no nanoencapsulamento de óleos essenciais, permitindo sua melhor dispersão em água e aumento no potencial de uso, indicando vantagens de aplicação das nanocápsulas associadas aos óleos essenciais (Wu *et al.*, 2012).

A zeína é um biomaterial reconhecido como seguro por suas características que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, hidrofobicidade e mucoadesividade (Luo; Wang, 2014; Jaski *et al.*, 2022). É vista como viável na fabricação de nanocápsulas por apresentar boa solubilidade, propriedades hidrofóbicas, digestibilidade relativamente mais lenta do que outras proteínas, além de sua fácil conjugação com outros compostos, que resultam na fácil fabricação (Luo; Wang, 2014). Por possuir propriedades físico-químicas únicas, esta proteína é explorada por diferentes setores, desde a indústria farmacêutica a alimentícia, que trabalham no desenvolvimento de nanocarreadores, ou seja, fabricando nanocápsulas de zeína para liberação controlada de medicamentos e nutrientes (Luo; Wang, 2014; Jaski *et al.*, 2022) (Fig. 2).

Figura 2. Propriedades e aplicações da zeína (Modificado de Jaski *et al.*, 2022).



A indústria farmacêutica aponta que a entrega de medicamentos é mais vantajosa quando os mesmos são encapsulados em nanopartículas, e a zeína pelas propriedades comentadas anteriormente, pode ser facilmente formulada como uma nanopartícula ideal para fitoquímicos (Hassan *et al.*, 2022). Ademais, o nanoencapsulamento de agrotóxicos (nanopesticidas) também ganhou destaque na indústria, se mostrando mais eficientes e, em alguns casos, menos tóxicos do que os seus homólogos convencionais, porém ainda podendo apresentar toxicidade para organismos não-alvo, como por exemplo embriões e larvas de zebrafish (Ale *et al.*, 2023).

1.4 *Prochilodus lineatus* como modelo biológico

Por apresentarem um importante papel ecológico e serem representantes da comunidade aquática, os peixes são muito utilizados em estudos para avaliação dos efeitos de agrotóxicos e compostos nanoencapsulados (Tesser *et al.*, 2020; Freire *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023), tendo em vista sua exposição direta a esses contaminantes. Muitos estudos utilizando peixes para avaliação ambiental destacam o potencial de espécies nativas, garantindo relevância ao estudo em regiões tropicais e subtropicais e incentivando a proteção da ictiofauna local (Aguilar *et al.*, 2022), no entanto, ainda são poucos os estudos utilizando espécies nativas da América Latina (Aca *et al.*, 2018).

O teleósteo neotropical de água doce *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) popularmente conhecido como curimba ou curimbatá (Fig. 3), é um peixe migratório notável como um dos mais proeminentes, abundantes e amplamente distribuídos nos rios da América do Sul (Barroca *et al.*, 2015), tendo grande relevância ecológica para ictiofauna brasileira. Foi selecionado como modelo biológico por se tratar de uma espécie nativa sensível aos efeitos de diferentes classes de agrotóxicos (Vieira *et al.*, 2018; Portruneli *et al.*, 2021; Lajmanovich *et al.*, 2023), por possuir hábito alimentar do tipo iliófago (Moraes *et al.*, 1997), que influencia na exposição aos contaminantes visto que buscam alimentos no fundo dos rios, e por se adaptarem facilmente às condições laboratoriais, facilitando sua manutenção.

Figura 3. Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*. Barra = 1 cm.



Fonte: a própria autora.

Vieira *et al.* (2018a) utilizaram *P. lineatus* como modelo biológico em seu trabalho sobre o imidacloprido, um inseticida muito utilizado, expondo os animais a diferentes concentrações do composto. Os autores observaram alterações significativas em diferentes órgãos e biomarcadores dos animais, mostrando que a espécie foi altamente sensível aos efeitos do inseticida. Lajmanovich *et al.* (2023), avaliaram a presença de agrotóxicos em *P. lineatus* e observaram uma alta concentração de diferentes agrotóxicos simultaneamente nos tecidos, concluindo que os animais incorporaram vários resíduos dos contaminante. Essa bioacumulação, pode provocar um aumento dos efeitos nocivos dos contaminantes à saúde dos peixes, característica relevante para estudos ecotoxicológicos, tornando essa espécie uma excelente escolha para avaliação de efeitos adversos de agrotóxicos.

Davico *et al.* (2020) analisaram os efeitos da exposição de *P. lineatus* a diferentes concentrações de uma formulação comercial da cipermetrina, um inseticida amplamente utilizado, e observaram uma diminuição significativa das defesas antioxidantes, além de um aumento significativo na frequência de micronúcleo, mostrando que a espécie foi sensível à formulação utilizada. Rossi *et al.* (2024) analisaram os efeitos de dois fungicidas, isolados e em mistura, em *P. lineatus* e observaram que, além de se bioacumularem, ambos causaram neurotoxicidade e alterações em biomarcadores de estresse oxidativo em diversos órgãos.

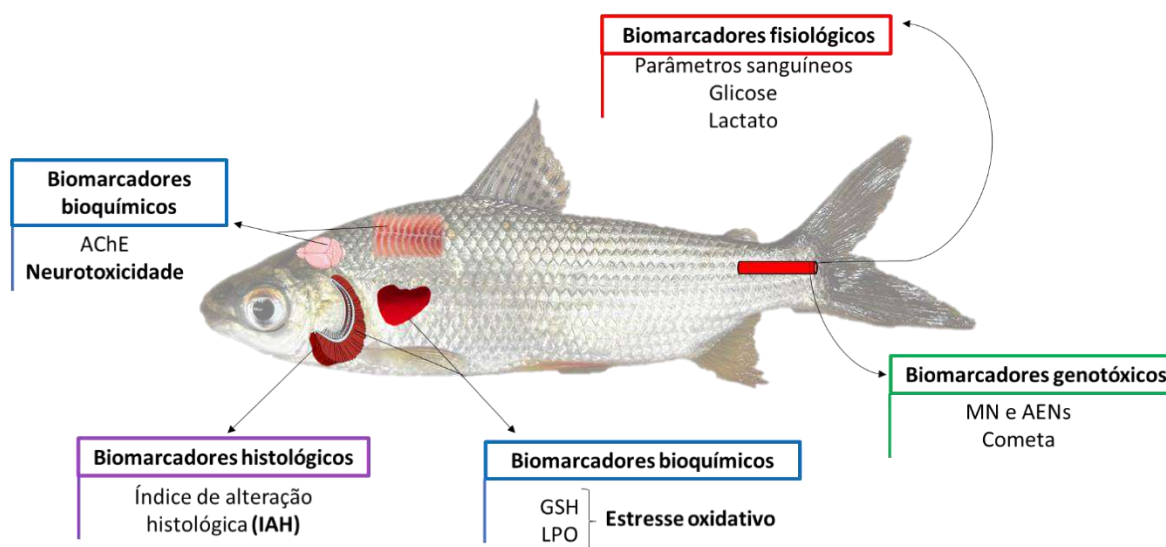
Além de se apresentarem sensíveis a diferentes classes de agrotóxicos, estudos utilizando *P. lineatus* mostraram a sensibilidade dos animais a outras classes de contaminantes. Por exemplo, Silva *et al.* (2023) avaliaram os efeitos do cádmio (um metal não essencial) em *P. lineatus* e observaram que ele se acumula e afeta o funcionamento de vários órgãos, além alterar a atividade de muitas enzimas e o comportamento dos animais. Roda *et al.* (2020) verificaram os efeitos induzidos por microplásticos (um contaminante emergente) e cobre (um metal essencial) em *P.*

lineatus e concluíram que os contaminantes, tanto isolados e como em mistura, promoveram danos genotóxicos, neurotóxicos e fisiológicos nos peixes.

1.5 Biomarcadores

Para se avaliar os possíveis efeitos causados por contaminantes nos organismos aquáticos, os biomarcadores ganham destaque, por serem importantes ferramentas que fornecem informações precoces e que podem indicar alterações desde níveis moleculares até os ecossistemas (Carriquiriborde *et al.*, 2021). Dentre os múltiplos biomarcadores utilizados, podemos destacar os bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos (Hook *et al.*, 2014). O uso integrado de diferentes classes de biomarcadores auxilia na compreensão dos efeitos adversos causados por contaminantes, por isso neste trabalho estes diferentes biomarcadores serão utilizados a fim de se obter resultados mais consistentes sobre os possíveis efeitos do geraniol (Fig. 4).

Figura 4. Biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos em *Prochilodus lineatus* utilizados para avaliação da ecotoxicidade. AChE= acetilcolinesterase; GSH= glutatona; LPO= Lipoperoxidação; MN= micronúcleo; AENs= alterações eritrocíticas nucleares.

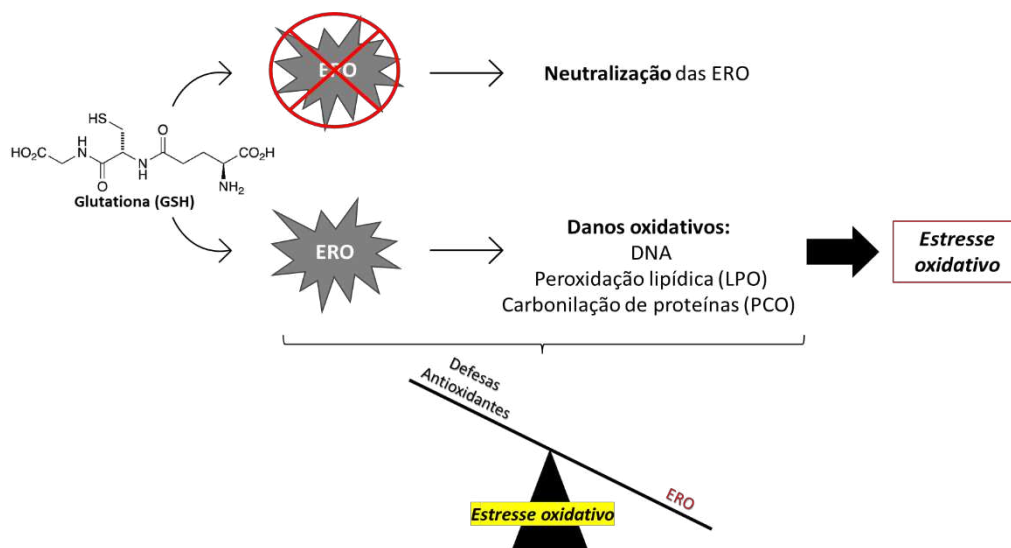


Fonte: a própria autora.

Os biomarcadores bioquímicos constituem uma das principais classes utilizadas em estudos ecotoxicológicos, avaliando se houve um desequilíbrio entre a

1 geração de compostos oxidantes e sua neutralização, representada pelos
 2 mecanismos de defesa antioxidante (Fig. 5), cujo objetivo é neutralizar as espécies
 3 reativas de oxigênio (ERO) (Barbosa *et al.*, 2010; Carriquiriborde *et al.*, 2021;
 4 Nikinmaa, 2014). Dentre os compostos que possuem propriedades antioxidantes,
 5 temos a glutatona (GSH), um tripeptídeo composto por resíduos de glutamato,
 6 cisteína e glicina, que pode se ligar a compostos oxidantes (Nikinmaa, 2014).
 7 Entretanto, quando as defesas antioxidantes não conseguem neutralizar as ERO,
 8 danos oxidativos podem acontecer em proteínas, DNA e lipídeos, como a peroxidação
 9 lipídica (LPO) (Nikinmaa, 2014; Carriquiriborde *et al.*, 2021). Deste modo, a análise de
 10 biomarcadores bioquímicos associados ao estresse oxidativo, como o conteúdo de
 11 GSH e ocorrência de LPO se fazem de extrema importância. Silva *et al.* (2023),
 12 observaram alterações nesses biomarcadores em seu trabalho com *P. lineatus*
 13 expostos ao cádmio, com aumento significativo na concentração de GSH e alterações
 14 significativas de LPO em diferentes tratamentos.

Figura 5. Mecanismo de defesa antioxidante. ERO = espécies reativas de oxigênio; LPO= peroxidação lipídica; PCO= carbonilação de proteínas; GSH= glutatona.

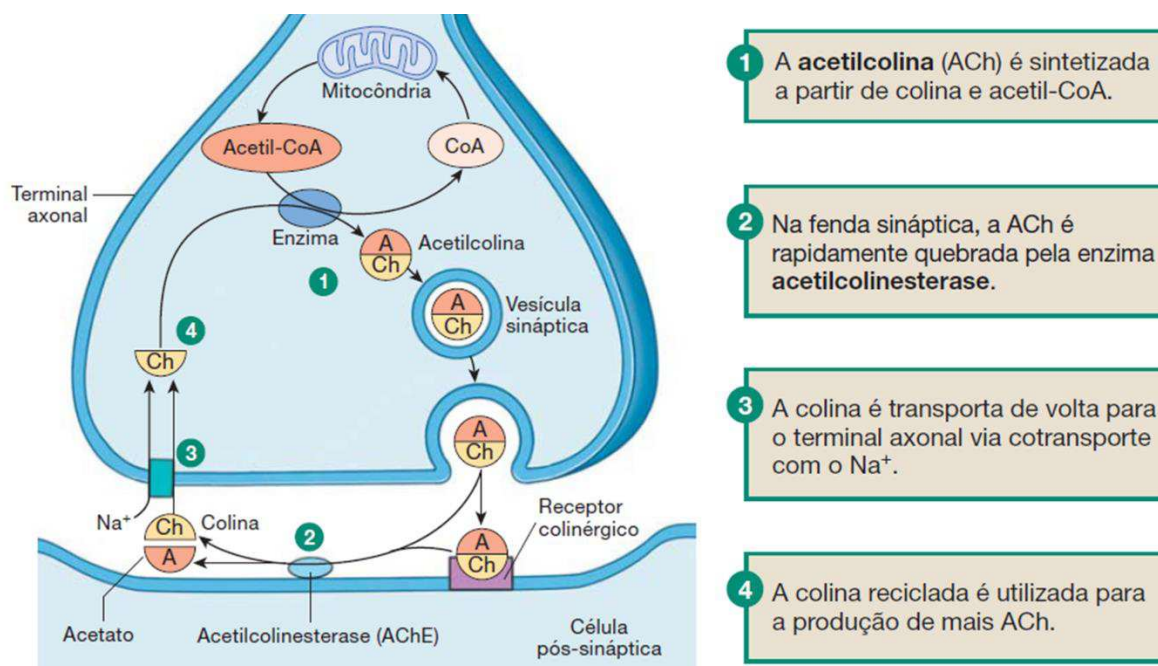


Fonte: A própria autora, com base em Nikinmaa, 2014 e Carriquiriborde *et al.*, 2021.

15 A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é um biomarcador
 16 bioquímicos associado à neurotoxicidade. Essa enzima degrada o neurotransmissor
 17 acetilcolina, responsável pela transmissão de impulsos nervosos na fenda sináptica.
 18 A acetilcolina é sintetizada a partir de colina e acetil-CoA no terminal axonal. Já na

1 fenda sináptica, a acetilcolina é quebrada de maneira rápida pela enzima
 2 acetilcolinesterase, em acetato e colina. A colina por sua vez é transportada de volta
 3 para o terminal axonal via co-transporte com o sódio (Na^+), assim a colina é reciclada
 4 e utilizada para a produção de mais acetilcolina (Fig. 6). Alterações na atividade da
 5 AChE podem acarretar modificações significativas na transmissão desses impulsos
 6 nervosos, podendo influenciar no funcionamento dos sistemas sensoriais e
 7 neuromusculares desses animais, levando a mudanças comportamentais e até
 8 mesmo a morte do organismo (Nikinmaa, 2014; Carriquiriborde *et al.*, 2021). Roda *et*
 9 *al.* (2020), avaliaram a atividade dessa enzima em *P. lineatus* expostos ao MP e ao
 10 cobre e observaram uma inibição em todos os tratamentos, indicando que os
 11 contaminantes causaram danos neurotóxicos nos animais.

Figura 6 – Síntese e reciclagem da acetilcolina. ACh = acetilcolina; AChE= acetilcolinesterase; CoA= acetil-CoA; Ch= colina; A= acetato.

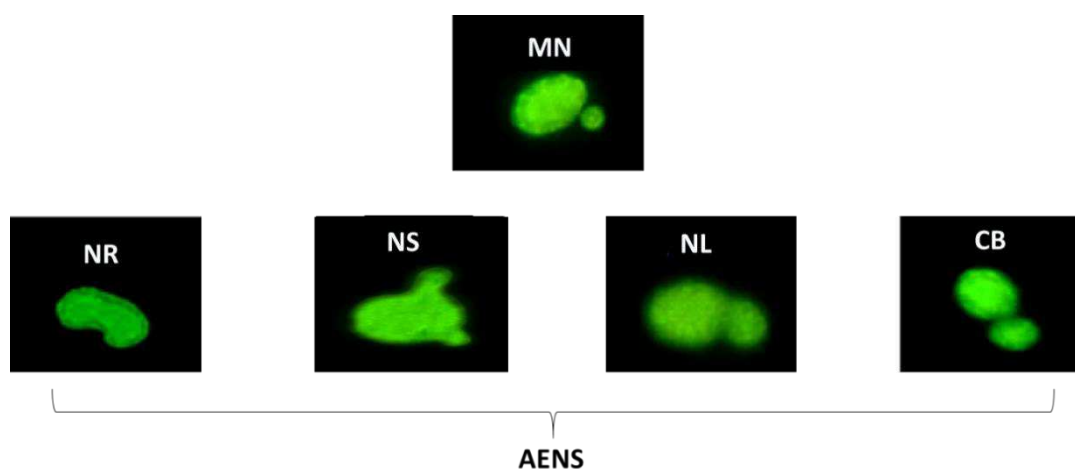


Fonte: Silverthorn, 7ª ed, 2017

12 Outro tipo de biomarcador de extrema relevância em estudos que
 13 avaliam a contaminação por xenobióticos, são os biomarcadores genotóxicos,
 14 utilizados para analisar os possíveis danos que os contaminantes podem causar no
 15 DNA. Dentre eles temos o teste do micronúcleo (MN), que avalia o dano induzido em

1 nível cromossômico, além de outras alterações eritrocíticas nucleares (AENs), tais
 2 como núcleo em forma de rim (NR), núcleo segmentado (NS), núcleo lobulado (NL) e
 3 células binucleadas (CB) (Nikinmaa, 2014; Carriquiriborde *et al.*, 2021). Alvim e
 4 Martinez (2019), observaram um aumento significativo na frequência de AENs em seu
 5 trabalho com *P. lineatus* expostos a dois inseticidas isolados e em mistura (Fig. 7).

Figura 7 – Micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (AENs) observadas em *Prochilodus lineatus* expostos a dois inseticidas, imidacloprido e lambda cialotrina. NR= núcleo em forma de rim; NS= núcleo segmentado; NL= núcleo lobulado; CB= células binucleadas.



Fonte: Modificado de Alvim; Martinez, 2019

6 O ensaio alcalino do cometa permite avaliar quebras de fita simples
 7 ou dupla na molécula de DNA induzidas por um xenobiótico. O nome do ensaio se dá
 8 pela imagem gerada ao final do ensaio, que se assemelha a um cometa, assim
 9 conseguimos observar a migração do DNA, que é diretamente proporcional ao dano
 10 que o mesmo apresenta, ou seja, quanto mais danos no DNA, maior o número de
 11 fragmentos a migrar e maior a cauda do cometa (Carriquiriborde *et al.*, 2021). Os
 12 danos podem ser classificados visualmente em diferentes classes (Fig.8). Vieira *et al.*
 13 (2018a), avaliaram esses danos em *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações
 14 do inseticida imidacloprido e concluíram que todas promoveram um aumento no
 15 score de danos ao DNA nos animais.

Figura 8 – Classificação do dano no DNA em *Prochilodus lineatus* a partir da cauda formada pelos fragmentos de DNA. Imagens representativas de nucleóides após coloração com GelRed.

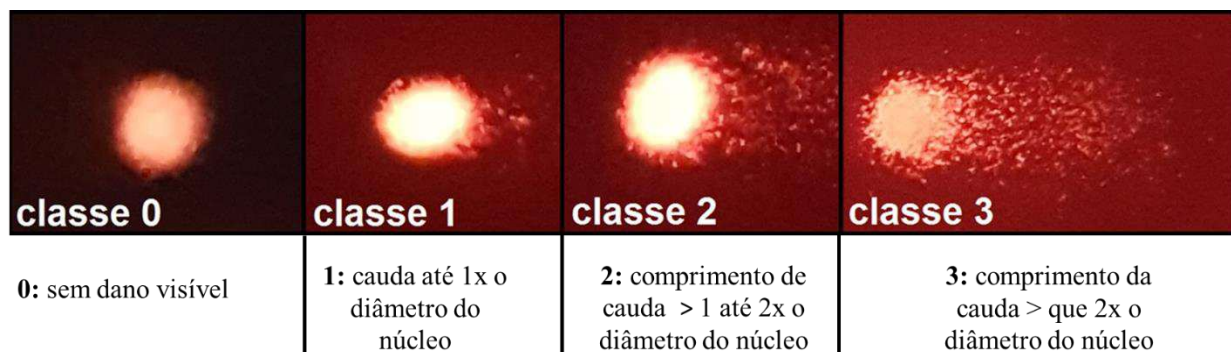


Foto: Tiago Alvim.

A glicemia, assim como o glicogênio armazenado nos tecidos são parâmetros que podem ser utilizados como biomarcadores fisiológicos, visto que exposições a xenobióticos podem levar ao aumento da glicemia devido à quebra das reservas de glicogênio hepático, deixando a glicose disponível para musculatura esquelética (Schreck *et al.*, 2016). Ainda sobre os biomarcadores fisiológicos, temos os parâmetros hematológicos que são considerados muito importantes para o diagnóstico do estado de saúde geral dos organismos, pois além de serem acessíveis e de rápida execução, respondem muito bem à exposição a diferentes xenobióticos e ao estresse. Dentre os parâmetros sanguíneos que podem ser avaliados temos o conteúdo de glóbulos vermelhos, conteúdo de hemoglobina e hematócrito (Carriquiriborde *et al.*, 2021). Tesser *et al.* (2020), avaliaram alguns parâmetros hematológicos em *P. lineatus* expostos ao cobre e nanopartículas de cobre, e observaram diminuição significativa do hematócrito e conteúdo de hemoglobina, indicando anemia nos animais.

Por fim, em nível tecidual, os biomarcadores histológicos são ótimos indicadores da saúde dos animais, sendo que além de serem considerados uma ferramenta de fácil uso e custo acessível, avaliam os possíveis efeitos subletais e até mesmo crônicos devido a exposição a contaminantes (Carriquiriborde *et al.*, 2021). Tais alterações na histologia dos animais aparecem devido a mudanças em seu organismo, sejam essas fisiológicas ou bioquímicas, permitindo assim, aferir e examinar diferentes órgãos ou tecidos na busca de possíveis alterações. Tesser *et al.* (2020), também utilizaram biomarcadores histológicos em *P. lineatus* expostos ao

1 cobre e nanopartículas de cobre e observaram danos nas brânquias e fígado dos
2 animais, resultados relevantes quanto a importância da avaliação desse biomarcador
3 na espécie escolhida.

4 Portanto, a partir das informações apresentadas, o objetivo deste
5 trabalho foi avaliar os possíveis efeitos de exposições agudas (24 e 96h), ao geraniol
6 convencional e nanoencapsulado em biomarcadores do teleósteo *Prochilodus*
7 *lineatus*, uma espécie nativa que pode ser impactada, visando a segurança e proteção
8 da ictiofauna local considerando a potencial utilização dos compostos como
9 alternativas aos agrotóxicos convencionais.

1 1.6 OBJETIVOS E HIPÓTESES

2 1.6.1 Objetivo Geral

3 Avaliar os possíveis efeitos de exposições agudas (24 e 96h) ao geraniol e geraniol
4 nanoencapsulado em biomarcadores do teleósteo *Prochilodus lineatus*.

5 1.6.2 Objetivos específicos

6 (1) Identificar se a nanocápsula de zeína apresenta toxicidade a *P. lineatus* em
7 exposições agudas;

8 (2) Verificar se o geraniol nanoencapsulado com a proteína do milho se mostra mais
9 seguro para *P. lineatus*, em relação ao convencional;

10 (3) Avaliar qual biomarcador é mais sensível a exposição às duas formas do geraniol
11 em diferentes tempos experimentais;

12 (4) Avaliar qual ou quais tecidos são mais afetados pelos compostos.

13 1.6.3 Hipóteses

14 (1) A nanocápsula de zeína isolada não vai causar alterações significativas aos
15 animais.

16 (2) O geraniol nanoencapsulado vai causar menos efeitos em *P. lineatus* do que o
17 geraniol convencional;

REFERÊNCIAS

- ACA, V.L.; GONZALEZ, P.V.; CARRIQUIRIBORDE, P. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. **Ecotoxicology**, v. 27, p. 968-979, 2018.
- AGUIAR, O. F.; FERREIRA, L. S. L.; SANTOS, A. C. P.; RIBEIRO, J. S.; MOURA, L.S.; TAUBE JÚNIOR, P. S.; SANTANA, M. B.; GUL, K.; MALIK, S.; LOPES, R. B. Estudos de ecotoxicidade aquática no Brasil: o uso de peixes de vida livre como organismos-teste. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.13, n.10, p.224-246, 2022.
- ALE, A.; ANDRADE, V.S.; GUTIERREZ, M.F.; BACCHETTA, C.; ROSSI, A.S.; ORIHUELA, P.S.; DESIMONE, M.F.; CAZENAVE, J. Nanotechnology-based pesticides: Environmental fate and ecotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 116560, 2023.
- 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 Mutagenesis**, v. 842, p. 85-93, 2019.
- APOLINÁRIO, A. C.; SALATA, G. C.; BIANCO, A. F. R.; FUKUMORI, C.; LOPES, L. B. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo'. **Química Nova**, v. 43, p. 212-225, 2020.
- ARAÚJO, E.R.L.; SILVA, J.S.; LOPES, L.M.; TORRES, M.F.; COSTA, B.M.P.A.; AMARANTE, C.B.; HAMOY, M.; BARBAS, L.A.L.; SAMPAIO, L.A. Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. **Aquaculture**, v. 537, p. 736517, 2021.
- ARAÚJO, E. P.; CALDAS, E. D.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Pesticides in surface freshwater: a critical review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 6, p. 452, 2022.
- ATAIDE, J. O; HOLTZ, F. G.; DEOLINDO, F. D.; HUVER, A.; ZAGO, H. B.; MENINI, L. Insecticidal activity and sublethal effects of essential oils on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and on *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Acta Biológica Paranaense**, v. 51, n. 1, p. 1-13, 2022.
- BACCHETTA, C.; ROSSI, A.; ALE, A.; CAMPANA, M.; PARMA, M.J.; CAZENAVE, J. Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach.

- Ecological Indicators**, v. 36, p. 532-538, 2014.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.D.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.
- BARBOSA, D.R.S.; OLIVEIRA, J.V.; SILVA, P.H.S.; BREDÁ, M.O.; DUTRA, K.A.; LOPES, F.S.C.; ARAÚJO, A.M.N. Efficacy of bioactive compounds and their association with different cowpea cultivars against their major stored pest. **Pest Management Science**, v. 76, n. 11, p. 3770-3779, 2020.
- BARROCA, T. M.; GUTIÉRREZ-ESPINOSA, M. A.; GIRALDO, A.; BEDORE, A. G.; GODINHO, A. L. Coded wire tagging of juvenile curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes): mortality, tag retention, and growth. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 02, p. 383-388, 2015.
- BIJLSMA, L.; PITARCH, E.; HERNÁNDEZ, F.; FONSECA, E.; MARÍN, J.M.; IBÁÑEZ, M.; PORTOLÉS, T.; RICO, A. Ecological risk assessment of pesticides in the Mijares River (eastern Spain) impacted by citrus production using wide-scope screening and target quantitative analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 412, p. 125277, 2021.
- BORGES, R.E.; SANTOS, L.R.S.; ASSIS, R.A.; BENVINDO-SOUZA, M.; FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 2623-2634, 2019.
- CARRIQUIRIBORDE, P. Principios de Ecotoxicología. **Libros de Cátedra**, 2021.
- CARVALHO, A. C.; CARVALHO, D. F.; CASTRO, A. C. Análise sobre crescimento populacional e transição demográfica: limites e divergências. **Conjecturas**, v. 22, n. 2, p. 845-859, 2022.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol—A review update. **South African Journal of Botany**, v. 150, p. 1205-1219, 2022.
- DAVICO, C.E.; LOTESTE, A.; PARMA, M.J.; POLETTA, G.; SIMONIELLO, M.F. Stress oxidative and genotoxicity in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) exposed to commercial formulation of insecticide cypermethrin. **Drug and chemical toxicology**, v. 43, n. 1, p. 79-84, 2020.
- DE SÁ, R. E.; MONTEIRO, L. D.; SILVA, P. C.; SANTOS, E. S.; VASCONCELOS, V. R.

- M.; VIEIRA, R. B.; SOUZA, J. D. L.; NASCIMENTO, A. L. L.; CARVALHO, B. L. L.; SILVA, L. F. Geraniol, um componente dos óleos essenciais de plantas—um mapeamento científico de suas propriedades farmacológicas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, 2021.
- ERTHAL, E. S.; BERTICELLI, R. Sustentabilidade: Agricultura irrigada e seus impactos ambientais. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 64-74, 2018.
- FARO, M.J.; MOURA, V.S.; AUGUSTO, R.C.; VASCONCELLOS, M.C. Evaluation of original Roundup® effects on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Biotemas**, v. 34, n. 1, p. 4, 2021.
- FERNANDES, C.L.F.; VOLÇÃO, L.M.; RAMIRES, P.F.; MOURA, R.R.; JUNIOR, F.M.R.S. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environmental science: Processes & impacts**, v. 22, n. 2, p. 256-270, 2020.
- FREIRE, M.M.; GOMEZ, C.; MOREIRA, J.C.; ARIAS, A.R.L. Multibiomarker approach in fish to assess a heavily polluted Brazilian estuary, Guanabara Bay. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 1, p. 187, 2023.
- HAMOUDA, A.B.; BNINA, E.B.; CHAIEB, I.; LAARIF, A.; JANNET, H.B. Cyclic and acyclic alcohols: a structure-activity relationship study correlation between insecticidal activity and chemical structure. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, p. 961-968, 2021.
- HASSAN, E.A.; HATHOUT, R.M.; GAD, H.A.; SAMMOUR, O.A. A holistic review on zein nanoparticles and their use in phytochemicals delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 73, p. 103460, 2022.
- HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, p. 327-341, 2014.
- JASKI, A.C.; SCHMITZ, F.; HORTA, R.P.; CADORIN, L.; SILVA, B.J.G.; ANDREAUS, J.; PAES, M.C.D.; RIEGEL-VIDOTTI, I.C.; ZIMMERMANN, L.M. Zein-a plant-based material of growing importance: New perspectives for innovative uses. **Industrial Crops and Products**, v. 186, p. 115250, 2022.
- LAJMANOVICH, R.C.; REPETTI, M.R.; BOCCIONI, A.P.C.; MICHLIG, M.P.; DEMONTE, L.; ATTADAMO, A.M.; PELTZER, P.M. Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. **Science of The Total Environment**, v. 870, p. 162019, 2023.

- LEI, Y. FU, P.; JUN, X.; CHENG, P. Pharmacological properties of geraniol—a review. **Planta medica**, v. 85, n. 01, p. 48-55, 2019.
- LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro-and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 16, 2014.
- MAÇZKA, W.; WIŃSKA, K.; GRABARCZYK, M. One hundred faces of geraniol. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3303, 2020.
- MORAES, M.F.P.G; BARBOLA, I.F.; GUEDES, É.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.
- NETO, A. A. P.; GONÇALVES, G. D.; BENJAMIN, C. S.; COSTA, L. C. B.; OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, S. M. A.; LUZ, E. D. M. N. Bioatividade de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 267-272, 2020.
- NIKINMAA, M. **An introduction to aquatic toxicology**. Elsevier, 2014.
- OLA, A. R. B.; NIIS, M. R.; SUGI, Y.; WOGO, H. E., NENOTEK, P.; NAHAS, M. A. E. Essential oil of *Cymbopogon nardus* from Timor island: Excellent source of geraniol. **AIP Conference Proceedings**, v. 2370, 2021.
- PORTRUNELI, N.; BONANSEA, R.I.; VALDÉS, M.E.; SILVA, L.C.M.; VIANA, N.P.; GOULART, B.V.; SOUZA, I.C.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; MONTAGNER, C.C.; WUNDERLIN, D.A.; FERNANDES, M.N. Whole-body bioconcentration and biochemical and morphological responses of gills of the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid or fipronil individually or in a mixture. **Aquatic Toxicology**, v. 240, p. 105987, 2021.
- RIBEIRO, Y. M.; MOREIRA, D. P.; WEBER, A. A.; SALES, C. F.; MELO, R. M. C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; PASCHOALINI, A. L. Adverse effects of herbicides in freshwater Neotropical fish: a review. **Aquatic Toxicology**, p. 106293, 2022.
- RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 242, p. 110659, 2020.
- ROSSI, A. S.; MICHLIG, M. P.; REPETTI, M. R.; CAZENAVE, J. Single and joint toxicity of azoxystrobin and cyproconazole to *Prochilodus lineatus*: Bioconcentration and biochemical responses. **Science of The Total Environment**, v. 907, p. 167992,

- 2024.
- SALDIVAR, R. H. L.; ARGUELLO, M. B.; VILLARREAL, G. L. S.; REYES, L. V. Nanotechnology potential in sustainable agriculture. **Acta universitaria**, v. 28, n. 2, p. 9-24, 2018.
- SANTOS, K.P.E.; SILVA, I.F.; MANO-SOUSA, B.J.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; CASTRO, W.V.; RIBEIRO, R.I.M.A.; SANTOS, H.B.; THOMÉ, R.G. Abamectin promotes behavior changes and liver injury in zebrafish. **Chemosphere**, v. 311, p. 136941, 2023.
- SENEME, A. M.; GOMES, L. P.; FERRIANI, A. P.; MORAES, C. P. Óleo essencial de *Cymbopogon nardus* L. (Poaceae) no controle de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho. **Revista fitos**. v. 17, p. 357-366, 2023.
- SILVA, A. O. F.; BEZERRA, V.; MELETTI, P. C.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. Cadmium effects on the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Accumulation and biochemical, genotoxic, and behavioural biomarkers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 99, p. 104121, 2023.
- SINGULANI, J. L.; PEDROSO, R. S.; RIBEIRO, A. B.; NICOLELLA, H. D.; FREITAS, K. S.; DAMASCENO, J. L.; VIEIRA, T. M.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; PIRES, R. H. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiology**, v. 13, n. 15, p. 1637-1646, 2018.
- SOUZA, M.C.O.; CRUZ, J.C.; CESILA, C.A.; GONZALEZ, N.; ROCHA, B.A.; ADEYEMI, J.A.; NADAL, M.; DOMINGO, J.L.; BARBOSA, F. Recent trends in pesticides in crops: A critical review of the duality of risks-benefits and the Brazilian legislation issue. **Environmental Research**, p. 115811, 2023.
- SOW, P.; SAMADDER, A. Nanotechnological Approach in Combating Pesticide Induced Fish Toxicity: Pros and Cons Controversy. **Proceedings of the Zoological Society**. Springer India, p. 1-15, 2021.
- SUBARAMANIYAM, U.; ALLIMUTHU, R.S.; VAPPU, S.; RAMALINGAM, D.; BALAN, R.; PAITAL, B.; PANDA, N.; RATH, P.K.; RAMALINGAM, N.; SAHOO, D.K. Effects of microplastics, pesticides and nano-materials on fish health, oxidative stress and antioxidant defense mechanism. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 2023.
- SCHRECK, C.B.; TORT, L. The concept of stress in fish. **Fish physiology**. Academic Press, p. 1-34, 2016.
- TESSER, M.E.; DE PAULA, A.A.; RISSO, W.E.; MONTEIRO, R.A.; PEREIRA, A.E.S.;

- FRACETO, L.F.; MARTINEZ, C.B.R. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. **Science of the total environment**, v. 704, p. 135332, 2020.
- VIEIRA, C.E.D.; PÉREZ, M.R.; ACAYABA, R.D.A.; 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, 2018a.
- WANG Y.; CHEN, C.; QIAN, Y.; ZHAO, X.; WANG, Q.; KONG, X. Toxicity of mixtures of λ -cyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.111, p. 242-247, 2015.
- 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, n. 2, p. 283-290, 2012.

2. MANUSCRITO

Efeitos do geraniol convencional e nanoencapsulado em biomarcadores de *Prochilodus lineatus*

Milena Aparecida dos Santos Silva; Tiago Tomiama Alvim; Claudia Bueno dos Reis Martinez

Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico "Science of the Total Environment".

2.1 RESUMO

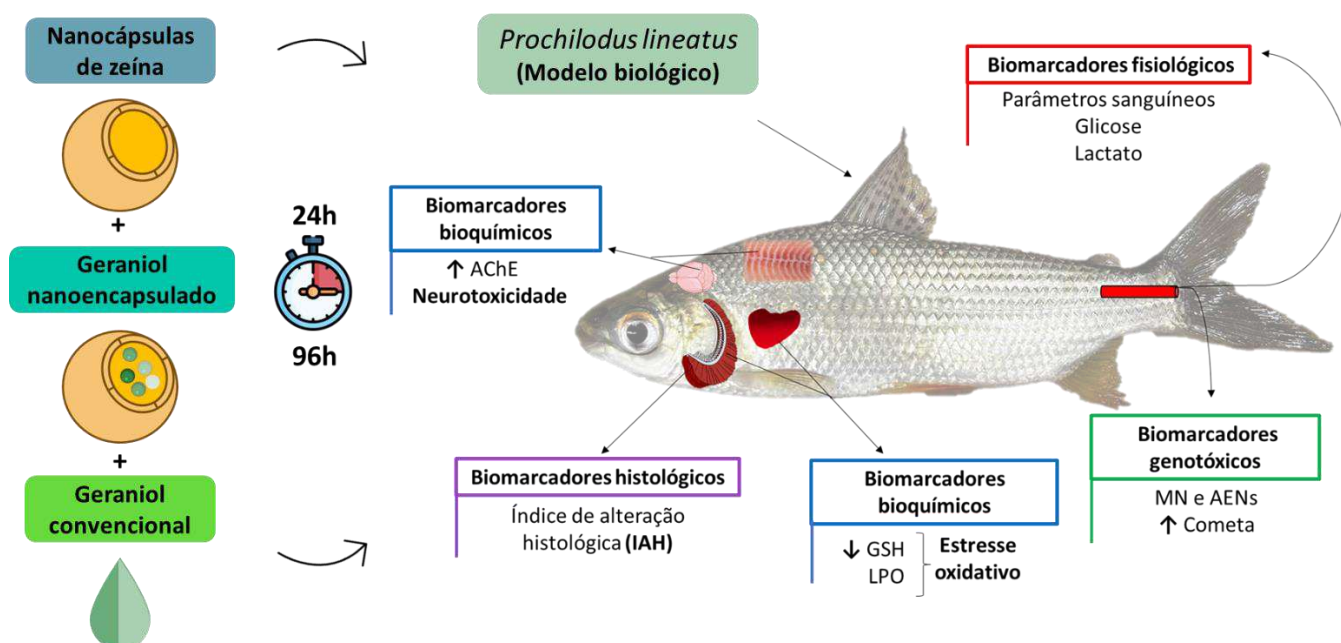
Alternativas mais sustentáveis aos agrotóxicos vêm sendo exploradas, como o uso do geraniol (composto de origem botânica). Ele possui propriedades fungicidas, inseticidas, repelentes e baixa toxicidade, que o torna passível de ser utilizado no controle natural de pragas. O nanoencapsulamento deste composto pode torná-lo ainda mais viável, conferindo uma liberação graduada e precisa. Assim, este trabalho objetivou avaliar os possíveis efeitos de exposições agudas (24 e 96h) ao geraniol e geraniol nanoencapsulado em biomarcadores do teleósteo *Prochilodus lineatus*. Para isso, juvenis de *P. lineatus* foram expostos a diferentes tratamentos: geraniol na forma convencional (GER), nanocápsulas de zeína (NANO) e geraniol nanoencapsulado (nGER), todos em uma concentração de 5 mg L⁻¹. Um grupo controle (CTR) foi exposto apenas ao solvente (Pluronic F-68®). Após 24 e 96 h de exposição, foram analisados biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos no sangue, cérebro, músculo, fígado e brânquias. Observamos mortalidade de 100% dos animais expostos às NANO, após 24h de exposição. Nossos resultados mostraram aumento significativo na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro dos animais expostos ao nGER e GER em relação ao CTR. Diminuição significativa no conteúdo de glutathione (GSH) nas brânquias dos animais expostos ao nGER. E aumento significativo no escore de danos no DNA dos animais expostos ao GER em comparação ao CTR. Não foram encontradas alterações significativas quanto à lipoperoxidação (LPO), ao MN e AENs, biomarcadores fisiológicos e histológicos. Assim, verificamos que a exposição apenas às nanocápsulas de zeína (NANO) causaram efeitos tóxicos na espécie de peixe estudada; O geraniol convencional causou danos no DNA, enquanto o geraniol nanoencapsulado exibiu baixa toxicidade para *P. lineatus*.

Palavras-chave: Nanobiopesticida. Ecotoxicologia. Agricultura. Nanotecnologia. Peixes.

1 2.1.2 DESTAQUES

- 2 • As nanocápsulas de zeína apresentaram toxicidade para *P. lineatus* na
- 3 concentração de 5 mg L⁻¹;
- 4 • O geraniol nanoencapsulado exibiu baixa toxicidade para *P. lineatus*;
- 5 • O geraniol convencional causou danos genotóxicos no DNA de *P. lineatus*.

6 2.1.3 RESUMO GRÁFICO



2.2 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior consumidor mundial de agrotóxicos e enfrenta um cenário preocupante devido ao seu uso excessivo (Fernandes et al., 2020). Vários fatores como escoamento, lixiviação, pulverização e irrigação (Erthal; Berticelli, 2018) facilitam a entrada dos agrotóxicos no ambiente aquático, que acabam atingindo organismos não-alvo ali presentes, como os peixes (Araújo et al., 2022; Ribeiro et al., 2022). Assim, as áreas agrícolas são apontadas como fontes de liberação de contaminantes para o meio aquático (Fernandes et al., 2020), ressaltando a importância da busca por práticas mais sustentáveis.

Uma das alternativas mais sustentável aos agrotóxicos convencionais é a utilização de compostos de origem natural. O geraniol é um álcool monoterpênico acíclico encontrado nos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas como rosa, capim-limão e citronela (Mączka et al., 2020; Chen; Viljoen, 2022). Ele pode ser utilizado em diversos produtos comerciais, incluindo cosméticos, fragrâncias e medicamentos, por suas características farmacológicas, como atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (De sá et al., 2021). Pode ser inserido também na agricultura, por exibir propriedades fungicidas, inseticidas e repelentes, sendo usado como um agente natural para o controle de pragas e exibindo baixa toxicidade (Chen; Viljoen, 2010, 2022).

Em adição aos compostos de origem botânica, outra alternativa mais sustentável é a utilização da nanotecnologia, mais especificadamente de nanocápsulas contendo o ingrediente ativo desejado. As nanocápsulas conferem vantagens como liberação controlada do princípio ativo e o aumento da biodisponibilidade do produto para a espécie alvo (maior especificidade de ação), além de garantir que ele chegue no local desejado sem sofrer grandes degradações (Apolinário et al., 2020). A zeína, proteína do milho, tem sido investigada por suas propriedades, e já se mostrou eficaz no nanoencapsulamento de óleos essenciais, permitindo melhor dispersão em água e aumento no potencial de uso, indicando vantagens de aplicação das nanocápsulas associadas aos óleos essenciais (Wu et al., 2012).

Os peixes apresentam um importante papel ecológico, sendo representantes da comunidade aquática muito utilizados em estudos para avaliação dos efeitos de agrotóxicos e compostos nanoencapsulados (Tesser et al., 2020; Freire

et al., 2023; Santos et al., 2023). No entanto, ainda são poucos os estudos utilizando espécies nativas da América Latina (Aca et al., 2018). O teleósteo de água doce *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836), popularmente conhecido como curimba ou curimbatá, foi selecionado como modelo biológico para este estudo. Trata-se de uma espécie neotropical, considerado um dos mais proeminentes, abundantes e amplamente distribuídos nos rios da América do Sul (Barroca et al., 2015), sensível aos efeitos de diferentes classes de agrotóxicos (Vieira et al., 2018a; Davico et al., 2020; Portruneli et al., 2021; Lajmanovich et al., 2023). Além disto, o hábito alimentar do tipo iliófago (Moraes et al., 1997) de *P. lineatus* predispõe os indivíduos da espécie a entrarem em contato com tanto com os contaminantes presentes na coluna d'água, como aqueles presentes no sedimento.

Assim, para se avaliar os efeitos do geraniol e do geraniol nanoencapsulado, selecionamos biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos (Nikinmaa, 2014; Carriquiriborde et al., 2021). O uso integrado dessas diferentes classes de biomarcadores deve auxiliar na compreensão dos possíveis efeitos adversos causados pelos compostos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos de exposições agudas (24 e 96h) ao geraniol e do geraniol nanoencapsulado em biomarcadores do teleósteo *Prochilodus lineatus*. Com as hipóteses de que a nanocápsula de zeína isolada não vai causar alterações significativas aos animais e que o geraniol nanoencapsulado vai causar menos efeitos em *P. lineatus* do que o geraniol convencional.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Síntese das nanopartículas e do geraniol

Os compostos avaliados foram formulados pela equipe do laboratório de nanotecnologia ambiental da Universidade Estadual Paulista (UNESP/campus Sorocaba). As nanopartículas foram preparadas seguindo a metodologia descrita por (Hu; Mcclements, 2014) com algumas modificações (Rogerio et al., 2022). A zeína foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e o geraniol foi obtido da Quinari (Ponta Grossa, Brasil).

Para determinar a concentração de geraniol na água dos aquários, um experimento independente de 96h, contendo dois grupos experimentais (nGER:

geraniol nanoencapsulado; e GER: geraniol convencional; n= 4, por grupo), nas mesmas concentrações (5 mg L⁻¹) e condições físico-químicas (temperatura: 22,2 ± 0,14 °C; pH: 7,46 ± 0,06; oxigênio dissolvido: 5,6 ± 0,2 mg L⁻¹; condutividade: 100 ± 1 µS cm⁻¹; turbidez: 0 UNT; média ± E.P.), dos experimentos biológicos descritos posteriormente (2.3.2), foi realizado. Amostras de água foram coletadas em 0h, 6h, 12h, 24h, 48h pré-renovação, 48h pós-renovação e 96h e imediatamente congeladas a -20 °C.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas para o processo de extração do geraniol e submetidas a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). O cálculo da concentração de geraniol nas amostras foi realizado a partir da equação da reta obtida de uma curva com concentrações conhecidas de geraniol e padrão interno (2-Undecanona) na mesma concentração das amostras. A razão entre a área do geraniol e do padrão interno foi utilizada para a obtenção da equação da reta ($y = 1121,8x - 3,1637$; $R^2 = 0,9795$). Os resultados foram expressos em mg L⁻¹.

2.3.2 Delineamento experimental

Os animais (n=64; comprimento parcial 9,93 ± 0,12cm; comprimento total 12,19 ± 0,14 cm; peso 21,40 ± 0,65 g; média ± EP) foram adquiridos de uma piscicultura da região de Londrina (Alevinos online) e transportados para o laboratório em sacos plásticos (50 cm x 80 cm x 0,18 cm), contendo 30 L de água dos tanques da piscicultura, com oxigenação, em uma densidade máxima de 30 animais, respeitando-se a densidade de 1 g de peixe por litro de água. Desse modo, a água ocupou 2/3 do saco plástico e 1/3 foi preenchido com oxigênio, visando o bem-estar dos animais durante o transporte. Após a chegada ao laboratório, os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanques de 500 L, contendo água desclorada, aeração constante, fotoperíodo de 14h claro: 10h escuro, temperatura controlada (27°C) e filtro tipo Canister. Durante o período de aclimação os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados por uma sonda de multiparâmetros (Horiba U-50) e se mantiveram constantes (média ± EP): temperatura 23,73 ± 0,41 °C; pH 7,28 ± 0,22; condutividade 0,69 ± 33,0 mS cm⁻¹; turbidez 5,24 ± 0,93 NTU; oxigênio dissolvido 7,26 ± 0,10 mg L⁻¹. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nutricon Goldfish – Crescimento para peixes) a cada 48 horas, para evitar acúmulo de alimento e aumento de amônia tóxica no tanque, sendo a alimentação suspensa

24 horas antes do início do experimento.

Após o período de aclimação, os animais (n= 64) foram expostos individualmente aos diferentes meios experimentais em aquários de vidro contendo 10 L de água. Os animais foram expostos simultaneamente aos seguintes tratamentos (n = 8 peixes por tratamento): geraniol na concentração de 5 mg L⁻¹ (GER), nanocápsulas de zeína na concentração de 5 mg L⁻¹ (NANO), geraniol nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína, na concentração de 5 mg L⁻¹ (nGER) e apenas à água desclorada contendo o solvente (grupo controle – CTR). O tensoativo Pluronic F-68® (0,0005%), obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), foi adicionado a todos os meios experimentais. Foram realizados dois experimentos independentes, um com duração de 24h e outro com duração de 96h. Durante as exposições os peixes foram mantidos sob condições laboratoriais controladas de fotoperíodo de 14h claro: 10h escuro e aeração constante, assim como durante a aclimação, com renovação parcial do meio experimental (80%) a cada 48h. Os peixes não foram alimentados durante os experimentos. As concentrações testadas foram definidas previamente, em experimentos testes realizados no laboratório.

Após as exposições, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹ de água) para a pesagem, medição e coleta de sangue pela veia caudal, com seringas descartáveis devidamente heparinizadas. Em seguida, os animais foram eutanasiados por secção medular para a retirada dos órgãos, como o fígado, músculo, cérebro e brânquias que foram mantidos congelados a -80°C até o momento das análises. O sangue total foi centrifugado (3000 g, 10 min) e as amostras de plasma foram armazenadas a -20 °C. O experimento realizado no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (protocolo CEUA nº 064.2023).

2.3.3 Homogeneização de tecidos

Brânquias (proporção massa:volume = 1:5) e fígado (proporção massa:volume = 1:10) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0), centrifugadas (20 min, 13000 g, 4°C), e o sobrenadante obtido foi utilizado para realização das análises. Cérebro e músculo foram homogeneizados (1:10) em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5) e centrifugados (20 min, 13000 g, 4°C), a fim de se obter o sobrenadante para análise.

2.3.4 Proteínas totais

Os resultados dos biomarcadores bioquímicos foram expressos em relação ao conteúdo total de proteínas, que foi analisado por meio da reação das proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, de acordo com Bradford (1976). A curva padrão foi determinada com albumina de soro bovino (BSA) em espectrofotômetro a 595 nm.

2.3.5 Biomarcadores bioquímicos

A concentração de glutathiona (GSH), um tripeptídeo capaz de se ligar a compostos oxidantes, foi determinada pela reação de tióis não proteicos com o substrato 5,5'-ditiobis-ácidonitrobenzóico (DTNB) em espectrofotômetro (412 nm), como proposto por Beutler et al. (1963) nas brânquias e fígado. A lipoperoxidação (LPO) foi quantificada, nas brânquias e fígado, através do ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) descrito por Ohkawa et al. (1979), com modificações, utilizando a reação do produto final de peroxidação lipídica (malondialdeído - MDA), com ácido tiobarbitúrico (TBA). Após centrifugação (5000 g, 4 °C por 10 min), a absorbância do sobrenadante foi medida a 530-540 nm.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo, foi determinada pela degradação do iodeto de acetilcolina (9mM) pela acetilcolinesterase da amostra, em leitora de microplacas, a 415 nm de acordo com Ellmann et al. (1961) e Costa et al. (2007).

2.3.6 Biomarcadores genotóxicos

O teste do micronúcleo (MN) foi realizado de acordo com a técnica descrita por Ueda et al. (1992) e as alterações eritrocíticas nucleares (AENs) foram avaliadas de acordo com Carrasco et al. (1990). Para ambas as análises (MN e AENs), logo após a coleta de sangue, lâminas de vidro com esfregaço sanguíneo foram feitas e fixadas em metanol. Posteriormente as lâminas foram coradas com laranja de acridina e observadas em microscópio de fluorescência. Para cada peixe foram analisados 3000 eritrócitos (n=6-8, por grupo).

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos como proposto por Singh et al. (1988), com modificações descritas por Alvim e Martinez (2019). Parte do sangue (10µL) foi armazenado em tubos plásticos contendo tampão de criopreservação (Sacarose 250 mM, Citrato de Sódio 40 mM, DMSO 5%, pH 7,6),

até o dia do ensaio. Após realização do ensaio, as lâminas obtidas foram fixadas em etanol absoluto, coradas com GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula para a análise de 100 nucleóides por animal, por meio de teste cego em um microscópio de fluorescência com objetiva de 40x. Os danos foram classificados como: Classe 0= sem dano visível; classe 1= cauda até 1x o diâmetro do núcleo; classe 2= comprimento de cauda > 1 até 2x o diâmetro do núcleo; classe 3= comprimento da cauda > que 2x o diâmetro do núcleo.

2.3.7 Biomarcadores fisiológicos

Os seguintes parâmetros hematológicos foram determinados: i) contagem do número de células vermelhas (RBC) - amostra de sangue foi diluída (1:200) em tampão formol citrato (citrato de sódio 130 mM em formaldeído 0,4%) e uma alíquota dessa mistura foi colocada em câmara de Neubauer, para a contagem de células em microscópio de luz, na objetiva de 40x; ii) hematócrito - uma alíquota de sangue foi depositada em microcapilares de vidro, centrifugados (1200 g, 7 min), para a separação das células e do plasma, e posteriormente, a porcentagem de eritrócitos foi definida com auxílio de um cartão padronizado; iii) concentração de hemoglobina - a partir de um método colorimétrico com o cianeto de metahemoglobina utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro a 540 nm.

A concentração de glicose plasmática foi determinada utilizando o teste enzimático colorimétrico (Labtest Diagnóstica, Brasil) pelo método da glicose oxidase em espectrofotômetro a 505 nm. A concentração de lactato plasmática também foi dosada por kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), pelo método da lactato desidrogenase, em razão do aumento da absorbância em 340 nm.

2.3.8 Biomarcadores histológicos

Os danos histológicos foram determinados semi-quantitativamente pelo índice de alteração histológica (IAH), como proposto por Poleksić e Mitrović-Tutundžić (1994), nas brânquias (um arco da porção esquerda; n= 6, por grupo), que foram fixadas em solução de Alfac (85 mL de etanol 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por 14 horas, posteriormente mantidas em etanol 70% até o momento da desidratação em concentrações seriadas de etanol seguidas de diafanização em xilol e por fim anexas em parafina a 60 °C. Utilizando um micrótomo rotativo semiautomático (Leica Biosystems, RM2245), os blocos foram cortados (5

1 μm) para realização das lâminas que foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E)
2 para análise em microscópio de luz (Zeiss, Primo Star, Alemanha).

3 Seguindo o critério do IAH, os danos foram classificados como
4 alterações de: Estágio I (0-10) = não alteram o funcionamento normal do tecido;
5 Estágio II = que prejudicam o funcionamento normal do tecido e são reversíveis (11-
6 20: danos leves ao órgão; 21-50: mudanças moderadas no órgão); Estágio III = que
7 causam danos irreparáveis (50-100: lesões graves; >100: danos irreversíveis). Para o
8 cálculo dos valores de IAH a seguinte formula foi utilizada: $\text{IAH} = (1 \times \Sigma\text{I}) + (10 \times \Sigma\text{II})$
9 $+ (100 \times \Sigma\text{III})$, onde a soma de I, II e III correspondem respectivamente ao número de
10 alterações nos estágios I, II e III.

11 **2.3.9 Análise estatística**

12 Os valores obtidos para cada biomarcador, para cada tratamento
13 (CTR x GER x NANO x nGER) foram comparados entre si, considerando-se os tempos
14 experimentais separadamente (24 e 96 h). Os resultados foram primeiro testados
15 quanto à normalidade e homogeneidade da variância e comparados entre si, através
16 da análise de variância paramétrica (ANOVA), ou não paramétrica (Kruskal-Wallis).
17 Quando indicado, foram empregados testes de comparações múltiplas Student
18 Newman Keuls (para dados paramétricos) ou Dunns (para dados não paramétricos).
19 O software SigmaPlot 15.0 foi utilizado para realização das análises e valores de $p <$
20 0,05 foram considerados significativos.

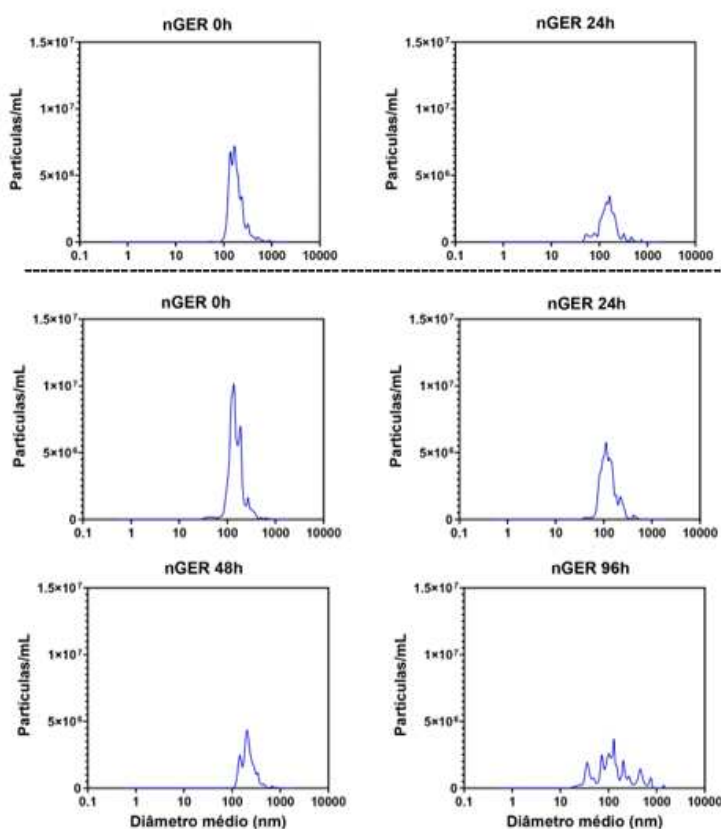
21 Os resultados de todos os biomarcadores, para cada tempo de
22 exposição, foram integrados no Índice de Respostas de Biomarcadores (IBR), descrito
23 por Beliaeff; Burgeot (2002) e adaptado por Sanchez *et al.* (2013).

2.4 RESULTADOS

A caracterização das nanopartículas isoladas (NANO) e contendo o geraniol (nGER), utilizadas em 24h e 96h, abrangendo potencial zeta, tamanho médio (nm), valores de polidispersão (Spam) e concentração (partículas/mL), estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas de zeína isoladas (NANO) e contendo o geraniol (nGER). Os valores correspondem a média $\pm$ EP, das amostras coletadas durante as exposições de 24h (início e fim da exposição) e 96h (início, meio e fim da exposição). Spam = polidispersão.

	Potencial Zeta	Tamanho médio (nm)	Spam	Concentração (partículas/mL)
NANO 0h	$-0,55 \pm 0,6$	$193,6 \pm 21,1$	1,7	$5,28 \times 10^8 \pm 5,71 \times 10^8$
NANO 24h	$-13,2 \pm 2,5$	$174,3 \pm 14,4$	1,3	$3,89 \times 10^8 \pm 1,84 \times 10^8$
nGER 0h	$-15,6 \pm 1,8$	$240,7 \pm 8,3$	1,3	$9,17 \times 10^8 \pm 3,50 \times 10^8$
nGER 24h	$-14,2 \pm 1,5$	$210,2 \pm 11,7$	1,5	$4,38 \times 10^8 \pm 3,08 \times 10^8$
nGER 0h	$-12,2 \pm 4,7$	$193,6 \pm 7,4$	1,1	$9,50 \times 10^8 \pm 5,97 \times 10^8$
nGER 24h	$-16,4 \pm 0,6$	$164,9 \pm 6,2$	1,5	$5,82 \times 10^8 \pm 5,65 \times 10^8$
nGER 48h	$-19,3 \pm 0,1$	$268,6 \pm 10,4$	0,10	$5,66 \times 10^8 \pm 6,13 \times 10^8$
nGER 96h	$-14,8 \pm 1,8$	$274 \pm 90,8$	1,1	$6,81 \times 10^8 \pm 1,78 \times 10^8$



A caracterização do geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado (nGER), das amostras coletadas durante o experimento independente de 96h estão expressos na Figura 1. Os valores representam a média $\pm$ EP em mg L⁻¹, do GER em 0h ($7,6 \pm 1,8$), 6h ($5,9 \pm 1,5$), 12h ($6,9 \pm 1,0$), 24h ($6,2 \pm 1,2$), 48h pré-renovação ($5,0 \pm 0,8$), 48h pós-renovação ($4,5 \pm 0,4$) e 96h ($6,0 \pm 0,2$). E do nGER em 0h ($6,9 \pm 1,8$), 6h ($7,5 \pm 2,0$), 12h ($6,8 \pm 1,0$), 24h ($8,1 \pm 2,3$), 48h pré-renovação ($5,0 \pm 0,4$), 48h pós-renovação ($6,7 \pm 0,9$) e 96h ($7,4 \pm 1,2$).

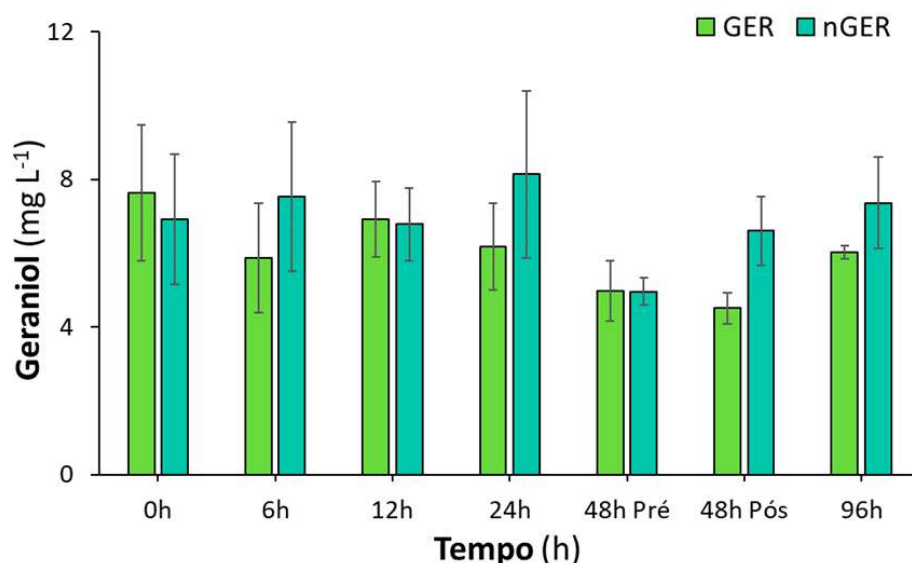


Figura 1. Caracterização do geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado (nGER). Os valores correspondem a média $\pm$ EP, das amostras coletadas durante o experimento independente em 0h, 6h, 12h, 24h, 48h pré-renovação, 48h pós-renovação e 96h; $n = 4$.

Ao longo do experimento, os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados e não apresentaram variações significativas entre os grupos. Tanto em 24h: temperatura $25,43 \pm 0,04$ °C; pH $6,98 \pm 0,21$; condutividade $0,13 \pm 0,00$ mS cm^{-1} ; turbidez $5,94 \pm 1,46$ NTU; oxigênio dissolvido $4,78 \pm 0,23$ mg L^{-1} . Quanto em 96h: temperatura $23,12 \pm 0,37$ °C; pH $6,85 \pm 0,18$; condutividade $0,11 \pm 0,01$ mS cm^{-1} ; turbidez $3,13 \pm 1,53$ NTU; oxigênio dissolvido $5,77 \pm 0,30$ mg L^{-1} .

No primeiro período de exposição de 24 horas, observamos 100% de mortalidade dos animais do grupo exposto apenas às nanocápsulas de zeína (NANO). Assim, por termos dados consistentes sobre a mortalidade dos animais em um curto período de tempo e a fim de evitar repetida mortalidade neste grupo, seguindo o princípio dos 3R's (*redução, substituição e refinamento*), no segundo tempo de exposição, 96 horas, o grupo que seria exposto apenas às NANO foi excluído. Ademais, reduzida mortalidade foi observada nos animais expostos ao nGER, com apenas 25%, entre 72 e 96h, e no grupo GER (12,5%) em 24h, onde um animal saltou do aquário.

Durante a exposição apenas às NANO, foi possível observar no primeiro tempo experimental de 24 horas, mortalidade total de animais. Observamos

um comportamento anormal dos animais em comparação aos demais grupos. Poucas horas após o primeiro contato com as NANO, os animais se encontravam agitados e nadavam por todo o aquário, muitas vezes saltando para fora do mesmo. Outra característica observada, que difere do normal, foi na respiração dos animais: além de permanecerem próximos à superfície e aos aeradores, passaram a abrir e fechar a boca e o opérculo constantemente, sendo esses sinais indicativos de hiperventilação nos peixes.

Em relação as concentrações branquiais de glutathione (GSH), temos que em 24h, o grupo nGER se mostrou 33% maior em relação ao CTR, apesar de não apresentar diferenças significativas. Já em 96h de exposição, o conteúdo de GSH das brânquias foi significativamente menor ($p = 0,017$) no grupo experimental do geraniol nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Não foram detectadas diferenças significativas no conteúdo de GSH no fígado dos animais em ambos os tempos de exposição, porém observamos que em 24h, assim como nas brânquias, os valores de GSH no grupo nGER e GER foram relativamente menores que no grupo CTR, enquanto em 96h observamos um aumento de 97% no grupo GER em relação ao CTR (Fig. 2).

Quanto a ocorrência de danos oxidativos em lipídeos (LPO), nas brânquias e no fígado, tanto em 24h quanto em 96h, não foram detectadas diferenças significativas em ambos os tempos experimentais nos dois tecidos analisados. Porém, é possível observar que nas brânquias em 24h temos um aumento de 51% no grupo GER em relação ao CTR, enquanto em 96h, o grupo nGER e GER aumentaram proporcionalmente em relação ao CTR. Quanto ao fígado, apesar da visível diminuição em 24h no nGER e GER em relação ao CTR, em 96h observamos um aumento de 73% no grupo GER em relação ao CTR (Fig. 3).

Acerca da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), observamos um aumento significativo ($p = 0,005$) no cérebro dos animais expostos ao nGER e GER em relação ao controle, respectivamente, em 24h de exposição. Porém, em 96h não foram observadas diferenças significativas, mas conseguimos notar uma diminuição de 12 % no grupo GER em relação ao CTR. Já no músculo, apesar de não apresentar diferenças significativas, percebe-se uma tendência de diminuição no GER, tanto em 24h quanto em 96h, em relação ao CTR (Fig.4).

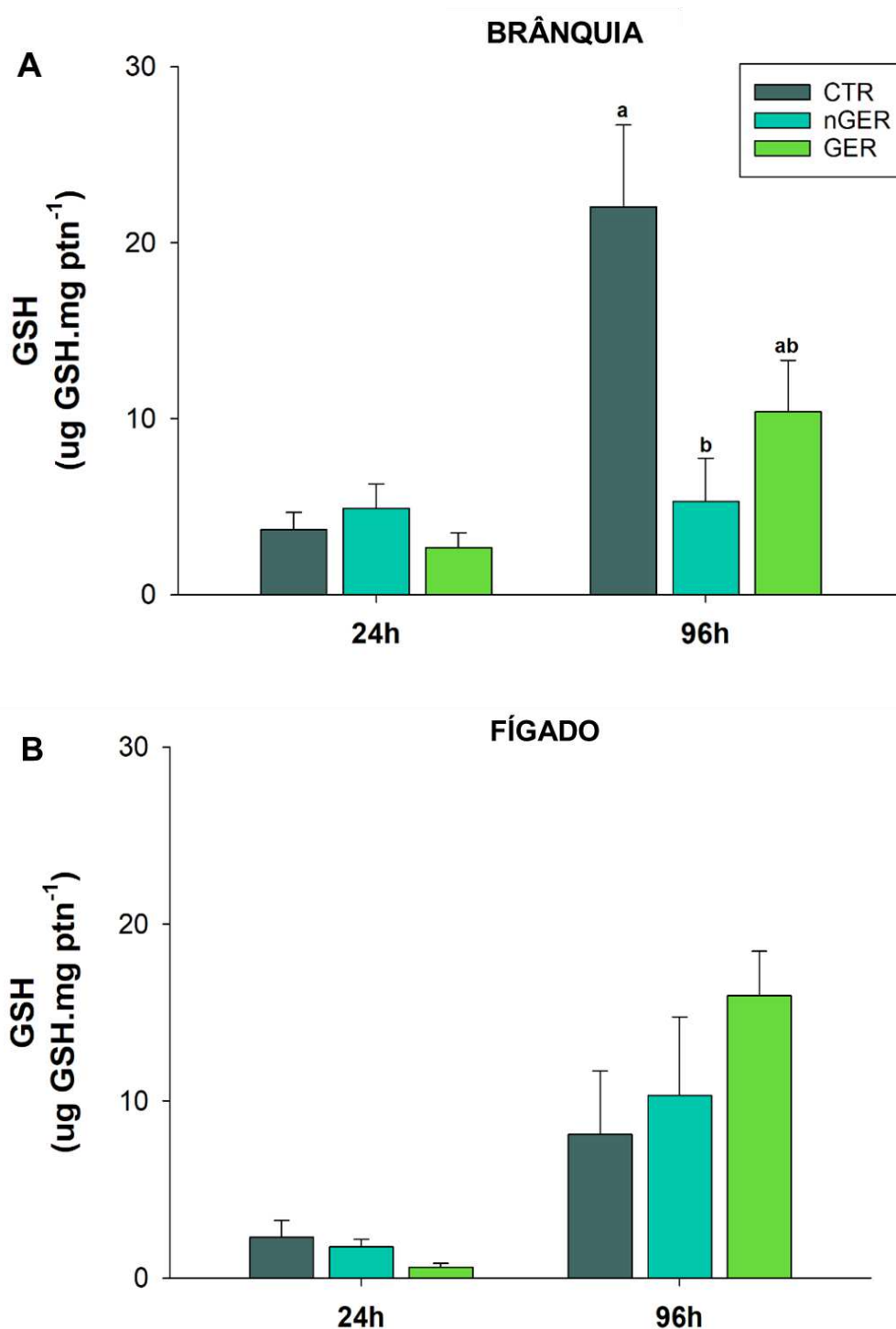


Figura 2. Concentrações de glutathiona ($\mu\text{g GSH.mg ptn}^{-1}$) nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; $n = 5-8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

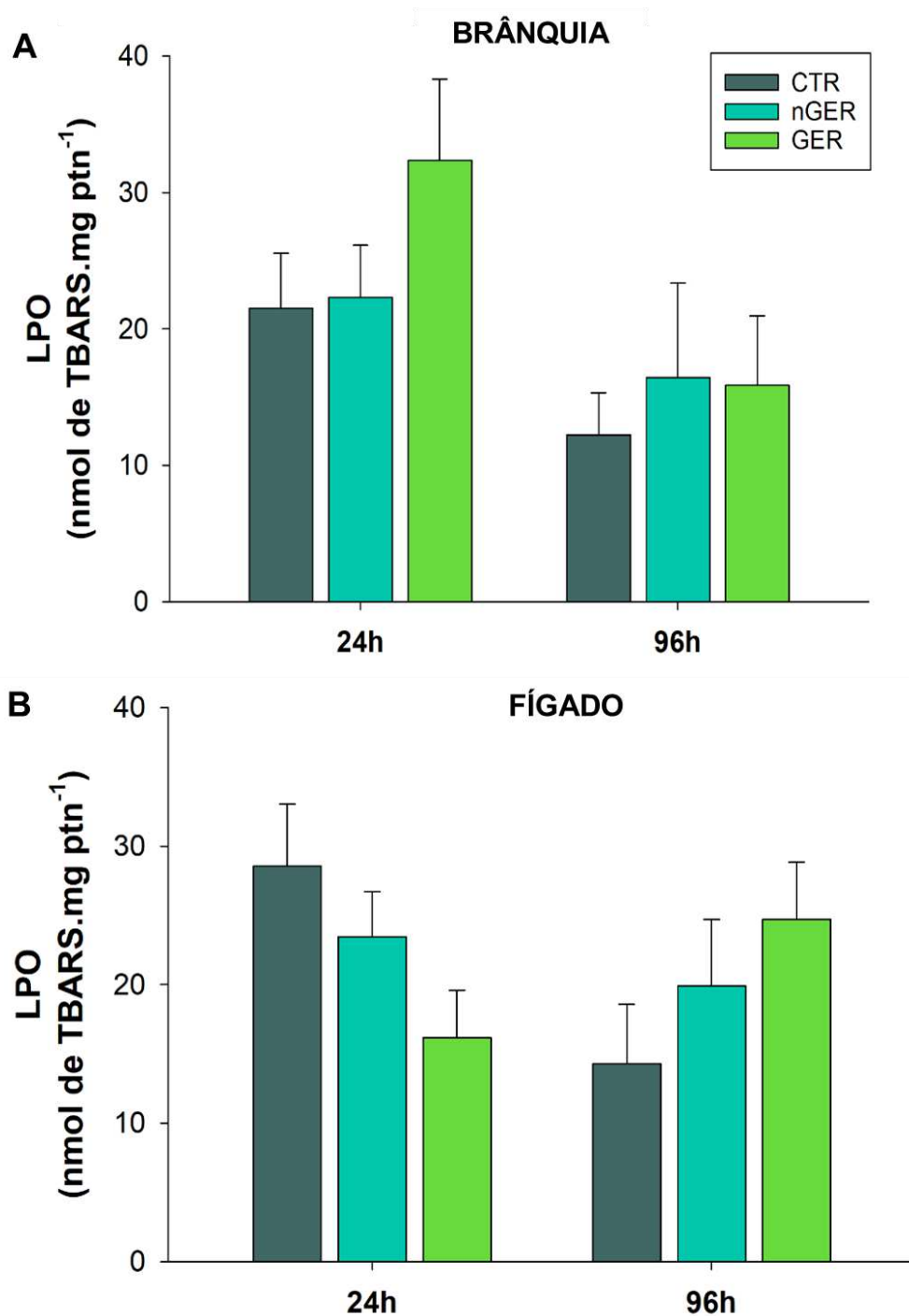


Figura 3. Lipoperoxidação (nmol TBARS.mg ptn⁻¹) nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média ± EP; n= 5-8.

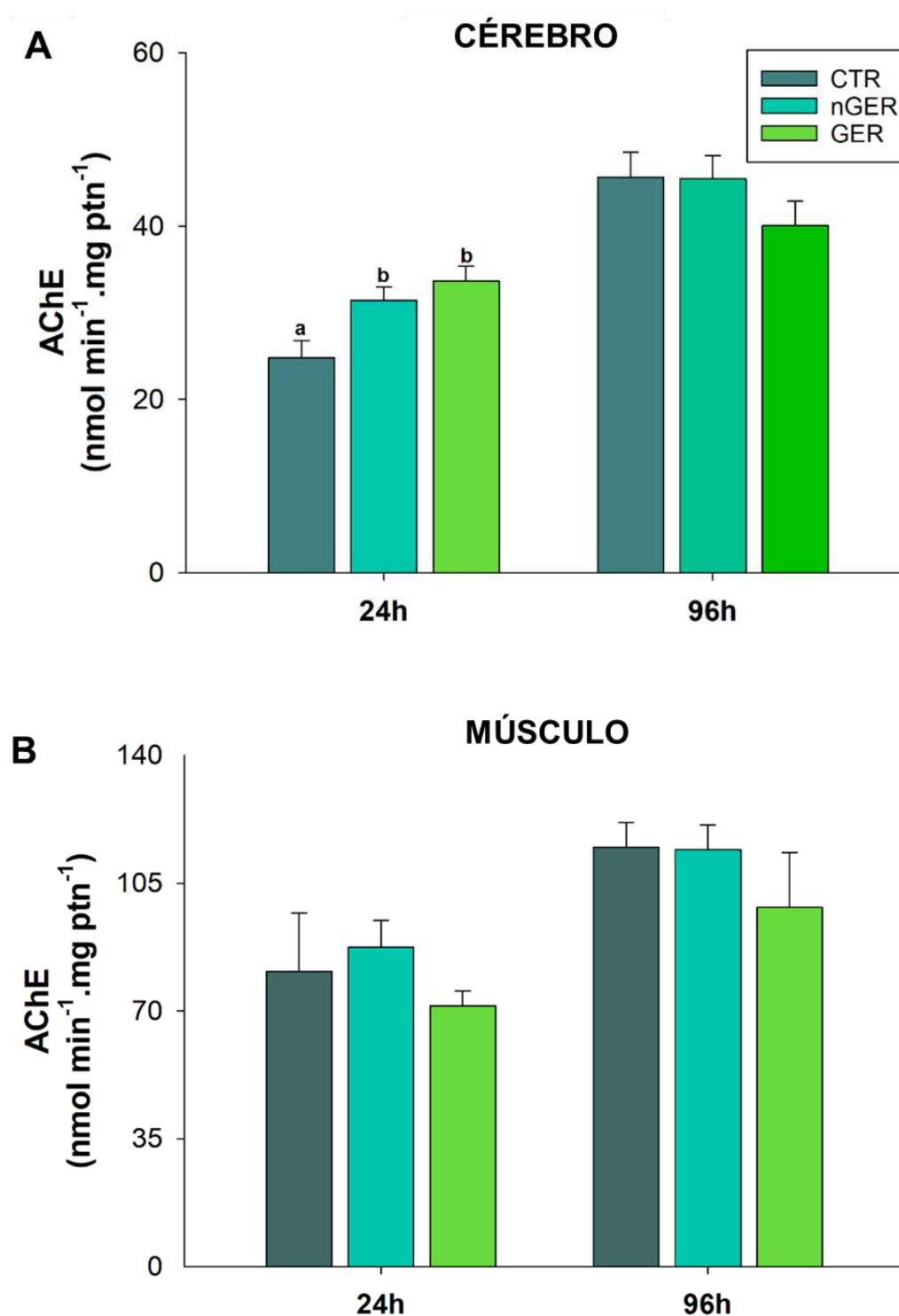
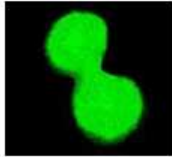
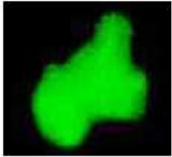
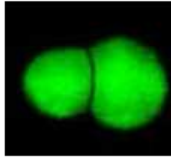


Figura 4. Atividade cerebral (A) e muscular (B) da enzima acetilcolinesterase (nmol min⁻¹.mg ptn⁻¹) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média ± EP; n= 5-8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p > 0,05).

1 A média das frequências de alterações eritrocíticas nucleares, tanto
 2 em 24h quanto em 96h, se mantiveram constantes e não apresentaram diferenças
 3 significativas entre os tempos experimentais e entre nenhum dos tratamentos (tabela
 4 2). Em relação ao escore de danos no DNA no sangue dos animais, observamos um
 5 aumento significativo ($p = 0,004$) de danos no GER em relação ao CTR em 96h de
 6 exposição. Já em 24h, apesar de não ter sido indicado diferenças significativas, um
 7 aumento foi observado no grupo nGER e GER, respectivamente, em relação ao CTR
 8 (Fig.5).

Tabela 2. Frequência (%) de AENs totais, núcleos em forma de rim, núcleos lobulados, núcleos segmentados e células binucleadas em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; $n = 6-8$. As fotomicrografias foram coradas com laranja de acridina, com ampliação de 100X + óleo de imersão, em microscópio de fluorescência.

		AENs totais	Núcleos em forma de rim	Núcleos lobulados	Núcleos segmentados	Células binucleadas
						
24h	CTR	$0,5 \pm 0,15^a$	$0,3 \pm 0,10^a$	$0,2 \pm 0,09^a$	$0,04 \pm 0,4^a$	$0,04 \pm 0,04^a$
	nGER	$0,4 \pm 0,10^a$	$0,3 \pm 0,08^a$	$0,04 \pm 0,04^a$	0^a	$0,1 \pm 0,06^a$
	GER	$0,4 \pm 0,17^a$	$0,1 \pm 0,10^a$	$0,2 \pm 0,10^a$	0^a	$0,05 \pm 0,04^a$
96h	CTR	$0,4 \pm 0,08^a$	$0,2 \pm 0,06^a$	$0,2 \pm 0,08^a$	0^a	$0,04 \pm 0,04^a$
	nGER	$0,5 \pm 0,17^a$	$0,2 \pm 0,11^a$	$0,1 \pm 0,06^a$	0^a	$0,2 \pm 0,14^a$
	GER	$0,2 \pm 0,06^a$	$0,04 \pm 0,04^a$	$0,1 \pm 0,05^a$	0^a	$0,1 \pm 0,05^a$

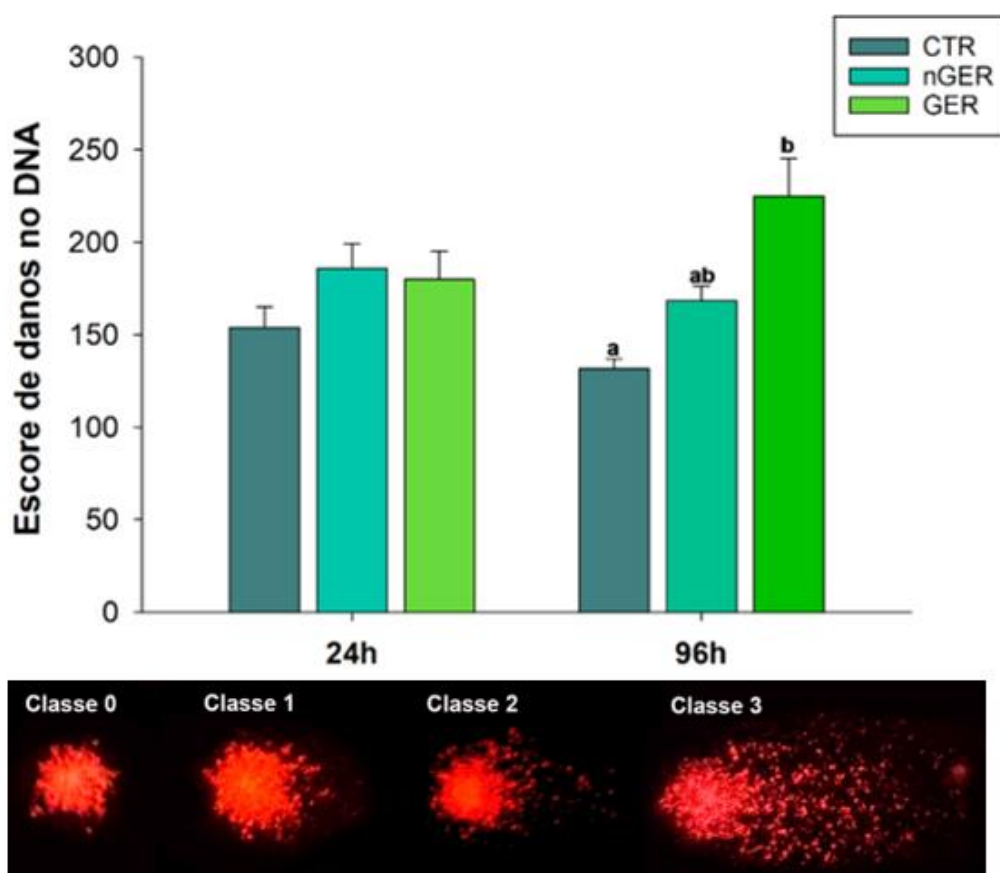


Figura 5. Escore de danos no DNA de eritrócitos de *Prochilodus lineatus*, após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; $n = 5-8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). As fotomicrografias das diferentes classes de cometa: Classe 0= sem dano visível; classe 1= cauda até 1x o diâmetro do núcleo; classe 2= comprimento de cauda > 1 até 2x o diâmetro do núcleo; classe 3= comprimento da cauda $>$ que 2x o diâmetro do núcleo; foram coradas com GelRed, com ampliação de 40x, em microscópio de fluorescência.

- 1 Os resultados dos parâmetros hematológicos, tanto em 24h quanto
- 2 em 96h, se mantiveram constantes e não apresentaram diferenças significativas entre
- 3 os tempos experimentais e entre nenhum dos tratamentos. Os valores referentes à
- 4 porcentagem de hematócritos em 96h não foram utilizados devido a não realização
- 5 da análise neste tempo experimental (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração de hemoglobina, hematócrito, número de eritrócitos (RBC), hemoglobina corpuscular média (HCM) e volume corpuscular médio (VCM) avaliados em *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; n= 6-8.

		Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Hematócrito (%)	RBC (10 ⁶ mm ³)	HCM (pig/célula)	VCM (μ m ³)
24h	CTR	8,52 $\pm$ 0,50 ^a	43,75 $\pm$ 2,40 ^a	1,77 $\pm$ 0,23 ^a	47,67 $\pm$ 3,11 ^a	244,65 $\pm$ 12,00 ^a
	nGER	8,69 $\pm$ 0,40 ^a	43,75 $\pm$ 2,43 ^a	1,67 $\pm$ 0,30 ^a	47,30 $\pm$ 1,63 ^a	229,90 $\pm$ 16,39 ^a
	GER	8,37 $\pm$ 0,53 ^a	38,33 $\pm$ 2,76 ^a	1,96 $\pm$ 0,36 ^a	45,84 $\pm$ 2,60 ^a	201,62 $\pm$ 10,43 ^a
96h	CTR	8,88 $\pm$ 0,43 ^a	-	1,79 $\pm$ 0,11 ^a	50,46 $\pm$ 3,63 ^a	-
	nGER	7,92 $\pm$ 0,73 ^a	-	1,45 $\pm$ 0,26 ^a	56,61 $\pm$ 7,70 ^a	-
	GER	8,49 $\pm$ 0,55 ^a	-	1,69 $\pm$ 0,14 ^a	44,68 $\pm$ 2,58 ^a	-

1 Do mesmo modo, as concentrações plasmáticas de glicose e lactato,
2 tanto em 24h quanto em 96h, não apresentaram diferenças significativas. Porém,
3 notasse um aumento de 17% na glicose dos animais expostos ao nGER em 24h em
4 relação ao CTR, enquanto em 96h, tanto o nGER quanto o GER, tiveram uma
5 diminuição sutil em relação ao CTR. Quanto ao lactato, percebesse que em 24h houve
6 uma diminuição de 31% na concentração plasmática dos animais expostos ao nGER
7 em relação ao CTR, e em 96h o nGER e GER se mantiveram maiores que o CTR (Fig.
8 6).

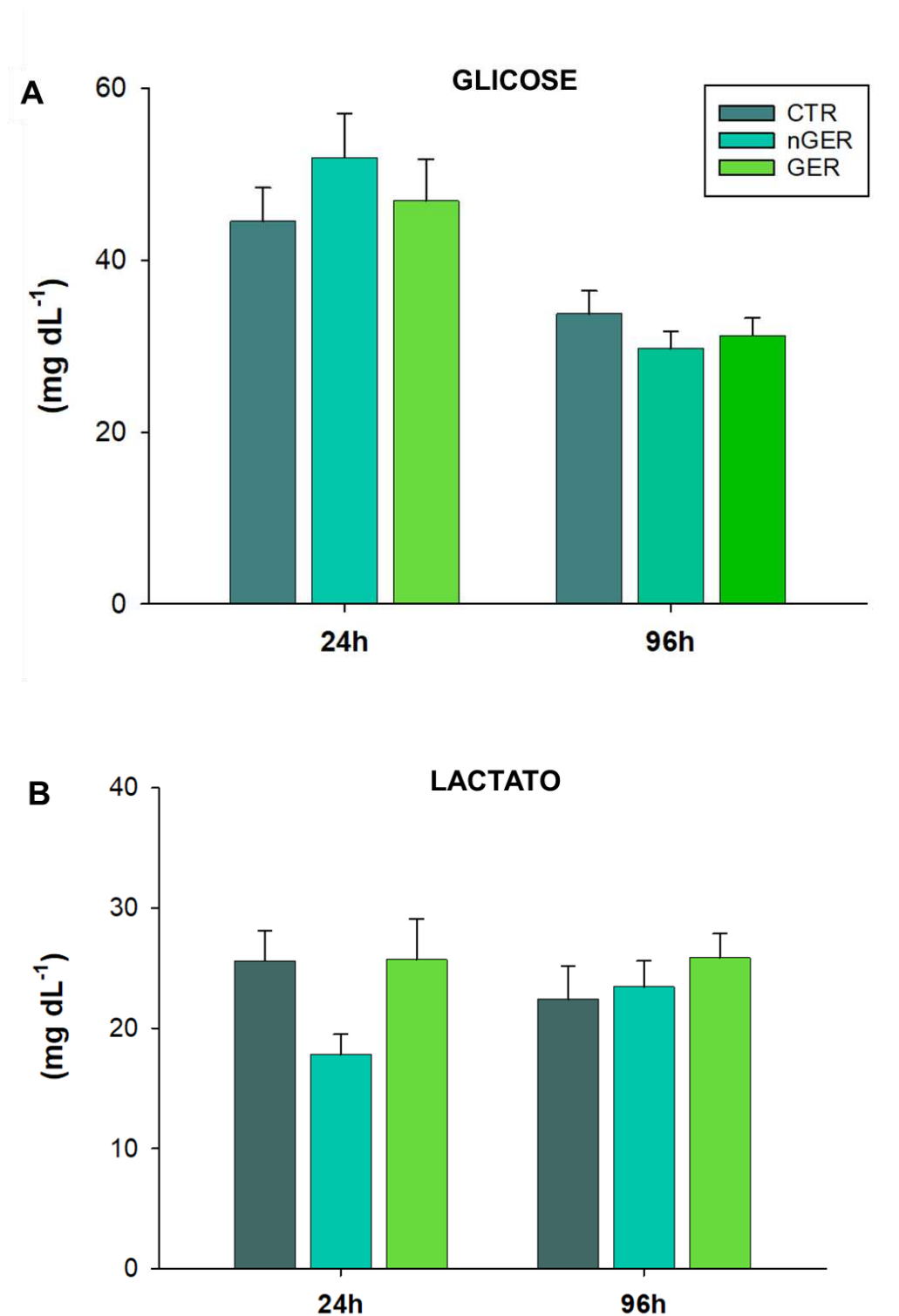


Figura 6. Concentrações plasmáticas (mg dL⁻¹) de glicose (A) e lactato (B) de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média ± EP; n= 5-8.

Os cortes histológicos representando as condições normais e as alteradas de *P. lineatus*, como congestão vascular, aneurisma, fusão incompleta e completa das lamelas, descolamento epitelial e presença de parasitas, estão apresentadas na Figura 7. A média das frequências de alterações histológicas e o índice de alterações histológicas (IAH) observadas nos animais, tanto em 24h quanto em 96h, foi relativamente baixa considerando que as alterações não comprometem o funcionamento normal do órgão, e não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, apesar das alterações observadas (Tabela 4).

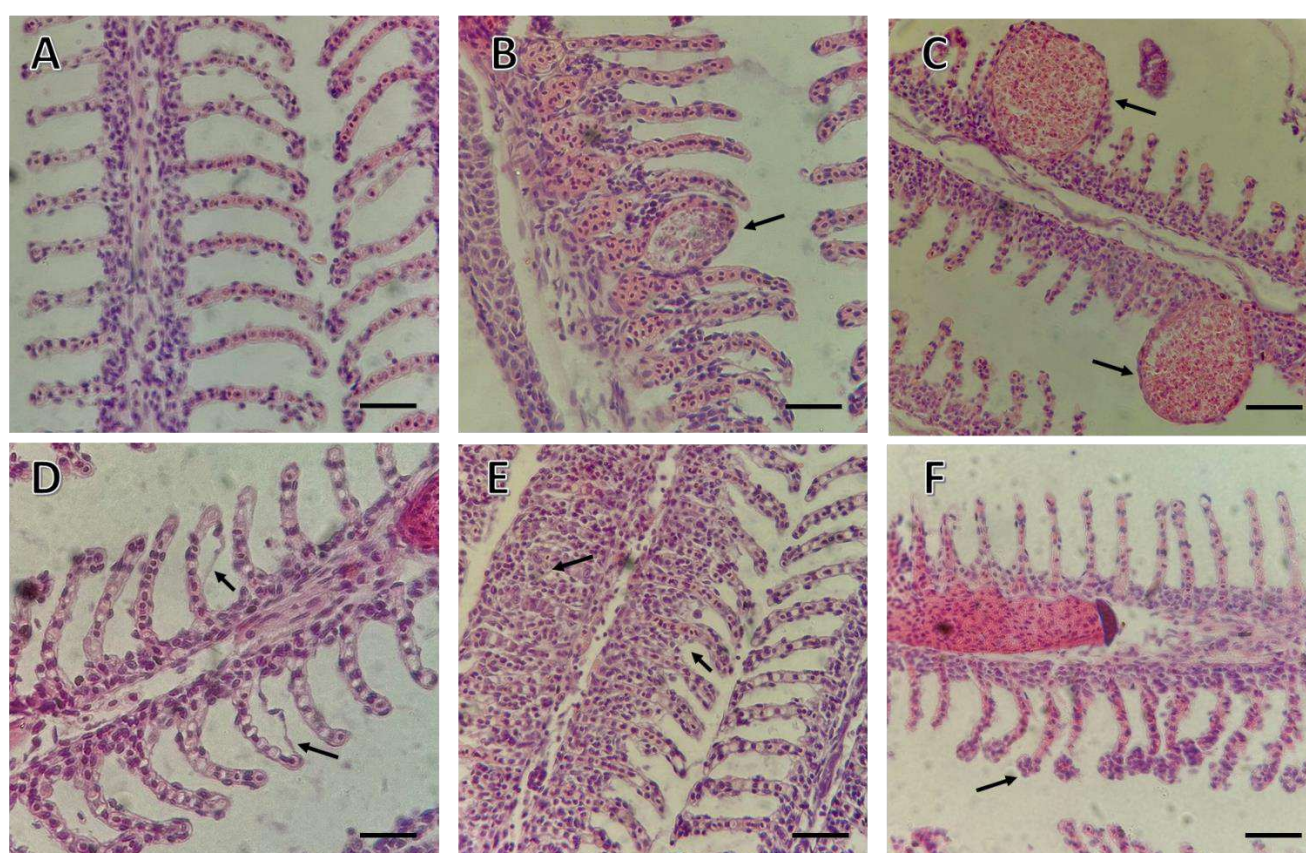


Figura 7. Cortes histológicos de brânquias de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). **A** - Brânquia em condição normal de um animal do grupo CTR; **B** - Parasita encontrado na brânquia de um animal do grupo GER; **C** - Aneurisma encontrado na brânquia de um animal do grupo nGER; **D** - Brânquia com descolamento epitelial de um animal do grupo GER; **E** - Brânquia com fusão incompleta e completa das lamelas de um animal do grupo CTR; **F** - Brânquia com congestão vascular de um animal do grupo CTR; Escala: 20µm. Coradas com H&E.

Tabela 4. Frequência de alterações histológicas e o índice de alterações histológicas (IAH) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados representam a média $\pm$ EP; n= 6. Onde: 0 = ausente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente; ++++ = extremamente frequente.

		Frequência de alterações		
Alterações	Severidade	CTR	nGER	GER
		24h		
Congestão vascular	I	+	++	0
Fusão completa de lamelas	I	+	+	+
Fusão incompleta de lamelas	I	++	+	+
Descolamento epitelial	I	+	+	++
Presença de parasitas	I	0	0	+
Aneurisma	II	+	+	0
IAH		$4,8 \pm 2,0^a$	$3,7 \pm 1,7^a$	$1,5 \pm 0,5^a$
		96h		
Congestão vascular	I	++	+	+
Fusão completa de lamelas	I	+	++	++
Fusão incompleta de lamelas	I	++	++	++
Descolamento epitelial	I	++	++	++
Presença de parasitas	I	+	0	0
Aneurisma	II	+	0	0
IAH		$4,3 \pm 2,0^a$	$2,5 \pm 0,4^a$	$2,5 \pm 0,6^a$

1 Considerando o índice integrado de respostas de biomarcadores
2 (IBR), aquele mais responsivo em 24h foi o cometa no sangue dos animais expostos
3 ao nGER e GER, e em 96h a LPO nas brânquias dos animais expostos ao nGER e
4 GER. Os valores totais do IBR mantiveram-se próximos, entretanto, tanto em 24h
5 quanto em 96h os valores do IBR do nGER foram menores que o GER (Fig. 8).

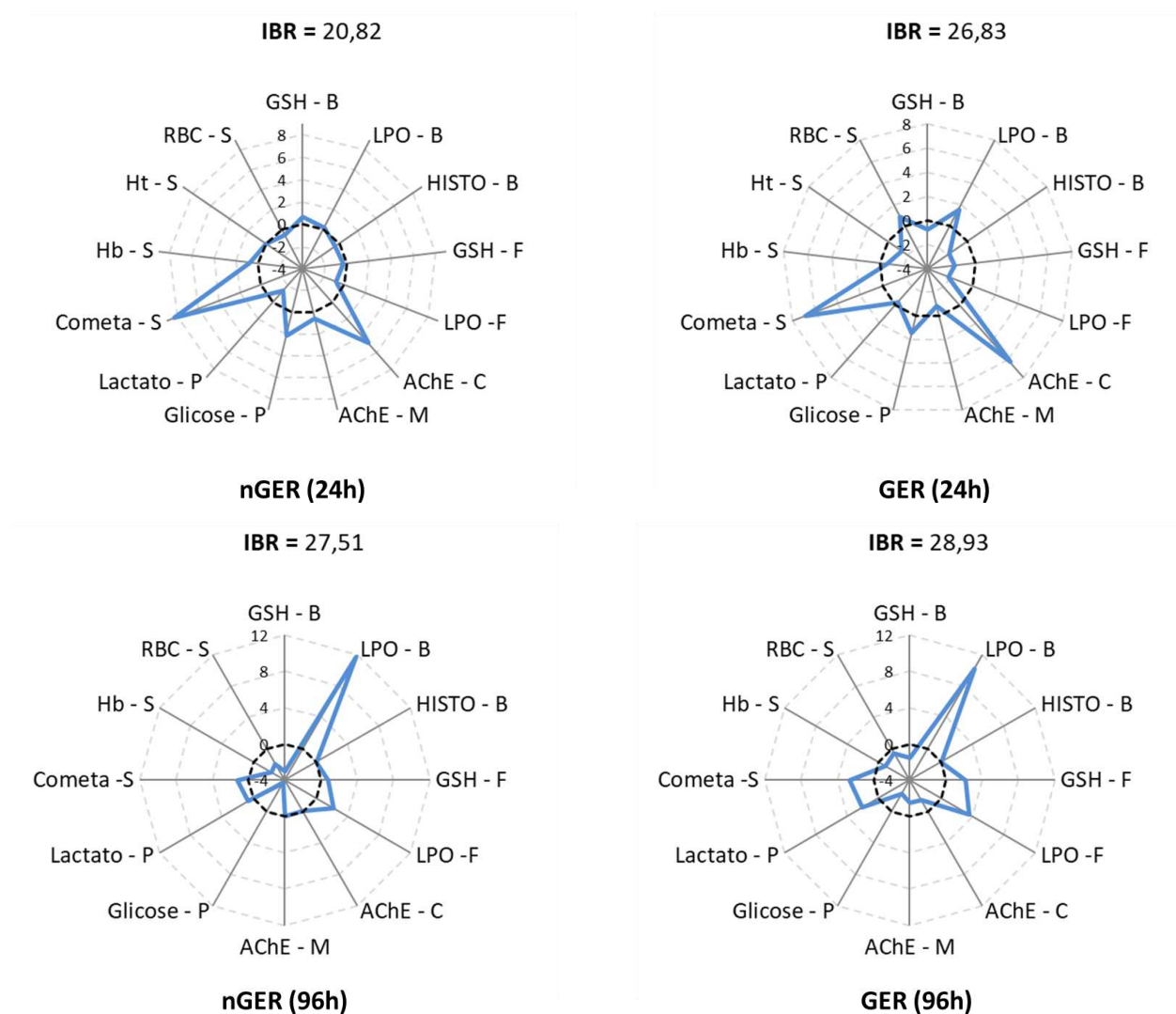


Figura 8. Índice de resposta de biomarcador integrado (IBR) em *Prochilodus lineatus* após as exposições de 24h e 96h apenas à água desclorada contendo o solvente Pluronic F-68® 2% (CTR), ao geraniol convencional (GER) e nanoencapsulado em nanocápsulas de zeína (nGER). Os resultados dos biomarcadores estão representados em relação ao grupo controle (CTR) (linha tracejada). A área acima de 0 reflete a indução do biomarcador e abaixo de 0 indica redução do biomarcador.

1 2.5 DISCUSSÃO

2 De maneira geral, as evidências apresentadas no presente trabalho
3 demonstram que o nGER causou menos efeitos em *P. lineatus* do que o GER. Porém,
4 não é possível aceitar a hipótese de que as nanocápsulas de zeína não causam
5 alterações significativas para *P. lineatus*, tendo em vista elevada mortalidade neste
6 grupo. Em relação aos compostos utilizados, apesar da observada diminuição na
7 concentração de partículas no grupo NANO e nGER no decorrer das exposições em

1 comparação ao tempo inicial (0h), seu tamanho médio se manteve, ou seja, elas ainda
2 se mantiveram bem distribuídas nos meios experimentais. Quanto as concentrações
3 de geraniol, temos que em ambos os grupos (GER e nGER), elas se mantiveram
4 próximas a concentração nominal utilizada (5mg L^{-1}), no início do experimento
5 independente de 96h.

6 Ambos os aspectos observados no grupo exposto apenas às NANO
7 (comportamentos anormais de natação e função ventilatória anormal), são definidos
8 como sinais clínicos e alterações comportamentais indicativas de toxicidade em
9 peixes pelo “Test Guideline N° 203” (OCDE, 2019). Alguns autores associam estas
10 anormalidades na atividade respiratória a doenças nas brânquias, anemia ou baixos
11 níveis de oxigênio dissolvido na água (Belem-Costa et al., 2021). Porém, os animais
12 passaram por um período de aclimação e se encontravam saudáveis, assim como
13 os parâmetros da água (oxigênio dissolvido), que não mostraram alterações
14 significativas e se mantiveram normais, tanto na aclimação quanto durante a
15 exposição, o que indica que a formulação das NANO utilizadas neste estudo, na
16 concentração de 5 mg L^{-1} , se mostrou tóxica para *P. lineatus*.

17 Em contrapartida, sabe-se que o geraniol apresenta propriedades
18 miorrelaxantes, podendo ser utilizado como anestésico, reduzindo a ventilação e
19 diminuindo a frequência cardíaca em peixes (Araújo et al., 2021). Essas evidências
20 nos levam a crer que as propriedades do geraniol atenuaram a toxicidade induzida
21 pelas nanocápsulas, uma vez que não se observou igual índice de mortalidade,
22 tampouco comportamento anormal nos animais expostos às nanocápsulas de zeína
23 contendo o princípio ativo geraniol. Podemos levar em consideração que a NANO
24 isolada tem uma determinada estrutura e sua associação com o óleo confere a ela
25 uma outra conformação, ou seja, a interação da zeína com o geraniol pode alterar a
26 estrutura da NANO resultando em outros efeitos no organismo dos animais, como a
27 diferença de mortalidade aqui observada. Também podemos pressupor que a
28 exposição às NANO pode ter apresentado este resultado devido a uma possível
29 aglomeração das mesmas, formando agregados que atuaram como uma barreira
30 física sobre as brânquias, diminuindo assim as trocas gasosas gerando tal desconforto
31 nos animais como mencionado anteriormente.

32 A utilização da nanotecnologia, mais especificamente a técnica de
33 nanoencapsulamento de agrotóxicos convencionais, tem sido sugerida como uma
34 forma de mitigar os danos causados pela utilização excessiva de herbicidas e

1 inseticidas. Esta abordagem busca reduzir a quantidade de agrotóxicos aplicados,
2 com o objetivo de melhorar a produção agrícola sem causar tanto dano ao ambiente
3 (Marín-Bustamante et al., 2021). Porém, já foi comprovado que, apesar de serem
4 benéficos para a agricultura, os nanopesticidas podem apresentar toxicidade para
5 organismos não-alvo, como, por exemplo, os peixes (Sow; Samadder, 2021). Outra
6 hipótese a ser abordada é a disponibilidade dessas nanocápsulas no ambiente após
7 todo princípio ativo ser esgotado de seu interior. Como ainda nada se sabe sobre o
8 tempo de sua degradação, após a liberação gradual do princípio ativo de seu interior,
9 as NANO estariam disponíveis no ambiente e poderiam acabar entrando em contato
10 com organismos não-alvo e sendo tóxica para os mesmos como observado neste
11 estudo.

12 Embora estudos comprovem a eficácia dos nanopesticidas
13 (Samadder et al., 2019), esse é um campo ainda relativamente novo que precisa ser
14 explorado cada vez mais, pois cada nanocápsula, seja sintética ou biológica, possui
15 propriedades específicas que podem afetar os organismos de diferentes formas,
16 reduzindo os efeitos de um contaminante (Andrade et al., 2019), ou sendo ainda mais
17 tóxica. Neste estudo observamos que, apesar de serem nanocápsulas de origem
18 botânica, consideradas menos tóxicas e promissoras na agricultura (Sow; Samadder,
19 2021), as nanocápsulas de zeína isoladas apresentaram efeitos tóxicos como aqueles
20 observados em exposições utilizando nanocápsulas sintéticas (Meredith et al., 2016;
21 Blewett et al., 2019).

22 Em relação aos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo,
23 observamos no tempo experimental de 96h, uma diminuição significativa do conteúdo
24 de GSH nas brânquias, nos animais do grupo nGER. A diminuição significativa nos
25 níveis de defesas antioxidantes, como o conteúdo de GSH nas brânquias, está
26 associada a um aumento nos danos oxidativos. Porém, apesar dos níveis de GSH
27 terem diminuído nas brânquias dos animais expostos ao nGER em 96h, não foi
28 observado um aumento significativo de LPO no mesmo tecido. Podemos associar tal
29 fato, às propriedades do geraniol. A capacidade antioxidante deste composto tem sido
30 amplamente documentada na literatura. Lin et al. (2021) mostraram que o geraniol
31 diminuiu significativamente as concentrações de citocinas inflamatórias e fatores de
32 estresse oxidativo em camundongos infectados por *Staphylococcus aureus* resistente
33 à metilicina (MRSA), indicando o potencial do geraniol como uma substância natural
34 viável de ser utilizada como antioxidante e antiinflamatório. Da mesma forma, Hosseini

et al. (2020) verificaram que a presença do geraniol foi capaz de atenuar o estresse oxidativo induzido pelo cloreto de alumínio (AlCl₃) em ratos Wistar. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de oxidação da GSH, em resposta a exposição a contaminantes e condições de estresse no organismo dos animais.

O potencial antioxidante do geraniol pode auxiliar sistemas a lidar com o estresse causado por contaminantes. Farokhchah et al. (2021) investigaram a eficácia do geraniol na redução da neurotoxicidade induzida por nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) em ratos Wistar, encontrando melhorias na memória e atenuação dos efeitos neurotóxicos devido às suas propriedades antioxidantes. Esses resultados reforçam o potencial terapêutico do geraniol para melhorar a função cognitiva e controlar a neurotoxicidade. No artigo de revisão de Mączka et al. (2020), são abordadas as distintas faces do geraniol, incluindo sua aplicação em fragrâncias, cosméticos e suas diversas atividades biológicas, como antioxidante, destacando sua baixa toxicidade e alta eficácia. Entretanto, apesar de sua comprovada eficácia e utilização, pesquisas acerca de sua associação com outros compostos precisam ser exploradas, não descartando o fato de que o mesmo pode se tornar tóxico em algum momento.

Quanto à neurotoxicidade, observamos um aumento significativo na atividade da AChE cerebral no grupo nGER e GER em relação ao controle, após 24h de exposição. A exposição a muitos agrotóxicos convencionais normalmente tende a diminuir (Assis et al., 2012; Vieira et al., 2017), ou inibir a atividade da AChE, além de causar padrões comportamentais anormais nos animais afetados (Umar; Aisami, 2020). Santana et al. (2021) abordaram, em seu artigo de revisão, os efeitos dos agrotóxicos em peixes, particularmente na variabilidade e atividade média de colinesterases (AChE e Butirilcolinesterase - BChe). Embora tenha sido observado um aumento na variabilidade causado por inseticidas e herbicidas, os inseticidas demonstraram ser mais tóxicos para os peixes em comparação aos herbicidas, resultando em uma inibição mais significativa da atividade da AChE. Em conformidade com essa abordagem, Vieira et al. (2018b) observaram os efeitos de um inseticida mundialmente utilizado, a lambda cialotrina, sobre *P. lineatus*. Eles observaram uma redução na atividade da AChE no músculo dos animais em todas as concentrações testadas (5, 50, 250 e 500 ng L⁻¹), juntamente com a indução de danos bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos.

Nosso estudo revelou um aumento na atividade da AChE no cérebro

dos animais expostos ao nGER e ao GER em comparação com o grupo controle, durante o período experimental de 24 horas. Resultados semelhantes foram observados por Bonifacio et al. (2016), expondo o peixe *Cnesterodon decemmaculatus* a um agrotóxico organofosforado clorpirifós, amplamente utilizado na agricultura. Os autores discutem que tal resultado pode estar associado a uma possível compensação que o cérebro dos animais estaria realizando para aumentar a síntese de AChE e lidar com a inibição causada pelos contaminantes. Além disso, os autores constaram que esta resposta pode ter ocorrido devido ao acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e à necessidade de neutralizar o neurotransmissor, a fim de evitar os eventuais distúrbios devido ao estímulo constante sem interrupções. Como mencionado anteriormente, Farokhcheh et al. (2021) demonstraram o potencial do geraniol na melhoria da função cognitiva e na redução da neurotoxicidade. Por ser um composto de origem natural, podemos atribuir o aumento na atividade enzimática não apenas a uma possível compensação tecidual, como abordado por Bonifacio et al. (2016), mas também às respostas que o geraniol tende a provocar quando presente no organismo.

Ademais, podemos relacionar o aumento observado na atividade da AChE com a potencial diminuição da atividade do indivíduo, apresentando letargia ou anestesia, referente a exposição ao geraniol. Como mencionamos anteriormente, o geraniol pode promover a anestesia total do corpo de peixes, por possuir propriedades miorrelaxantes (Araújo et al., 2021). Hacke et al. (2020), concluíram que o geraniol (1, 5 e 10 mg L⁻¹) exibiu efeitos ansiolíticos em *Danio rerio* e em associação com outros componentes de óleos essenciais possui efeito sinérgico quanto a essa ação. Os autores também realizaram um teste comportamental de claro-escuro com os animais e observaram a preferência dos mesmo pelo lado claro do tanque, que reflete a menores níveis de ansiedade para os animais, visto que a permanência no lado escuro é uma reação típica da espécie e representa uma estratégia defensiva. Assim esses resultados indicam efeito ansiolítico induzido pelos compostos estudados pelos autores. Araujo et al. (2023), avaliaram a resposta cardíaca do tambaqui *Colossoma macropomum* expostos ao geraniol (70 µL L⁻¹), e observaram que ele induziu a imobilização do corpo inteiro, algumas alterações cardíacas (bradicardia), com recuperação mais rápida dos animais, após a anestesia.

Em relação aos biomarcadores genotóxicos, não foram identificados aumentos significativos na frequência de MN e AENs. No entanto, mesmo sem

1 evidência de danos mutagênicos, constatou-se um aumento significativo no escore de
2 danos no DNA de animais expostos ao GER em comparação com o grupo CTR.
3 Singulani et al. (2018), observaram que o geraniol na concentração de 800 µg mL⁻¹,
4 foi capaz de induzir danos genotóxicos em *Danio rerio*. Ademais, Mamur (2020)
5 investigou o efeito citotóxico e genotóxico do GER em linfócitos humanos e observou
6 que em concentrações mais elevadas (50, 100, e 500 µg mL⁻¹), ele aumentou
7 significativamente a cauda do cometa, exercendo dano no DNA. Porém vale ressaltar,
8 que assim como no presente estudo, as metodologias e concentrações utilizadas
9 diferem daquelas abordadas na literatura que demonstram os efeitos benéficos do
10 geraniol e a ausência de atividade genotóxica do mesmo.

11 Quanto aos biomarcadores fisiológicos, não foram observadas
12 alterações significativas entre os parâmetros hematológicos, a glicose e o lactato,
13 indicando que os compostos não afetaram o metabolismo energético dos animais.
14 Ademais, não foram observadas alterações significativas quanto os biomarcadores
15 histológicos. Nossos resultados indicam, de acordo com a classificação do prejuízo
16 funcional do tecido determinada com os valores de IAH, o funcionamento normal do
17 órgão, com valores variando entre 1,5 e 4,8. Ou seja, apesar das alterações
18 observadas (Parasita; aneurisma; descolamento epitelial; fusão completa e
19 incompleta; congestão vascular), os compostos não causaram prejuízos significativos
20 no papel das brânquias.

21 Por fim, os valores do IBR são muito próximos entre os grupos (nGER
22 e GER), sendo menores no nGER apontando uma menor variação nos
23 biomarcadores. O aumento observado nos valores em 96h, pode ser explicado em
24 virtude do aumento do tempo de exposição. Beliaeff & Burgeot (2002), associam o
25 IBR a gráficos de estrela/radar que facilitam o entendimento das respostas obtidas
26 quanto aos biomarcadores e exposições realizadas. A disposição dos biomarcadores
27 no gráfico nos permite visualizar com mais clareza quais biomarcadores foram mais
28 sensíveis, tornando possível a visualização de diferenças entre os grupos, para
29 comparação das condições de exposição. De acordo com o IBR, concluímos que o
30 biomarcador mais responsivo neste estudo em 24h foi o cometa no sangue dos
31 animais expostos ao nGER e GER, e em 96h a LPO nas brânquias dos animais
32 expostos ao nGER e GER, apesar de não apresentarem diferenças significativas.

1 2.6 CONCLUSÃO

2 Este trabalho visou avaliar os possíveis efeitos do geraniol e do
3 geraniol nanoencapsulado em biomarcadores do teleósteo *Prochilodus lineatus*. Com
4 base nos resultados, observamos que as nanocápsulas de zeína apresentam
5 toxicidade aos animais, tendo em vista a mortalidade total do grupo exposto apenas
6 às nanocápsulas. Estes resultados evidenciam que nas concentrações utilizadas, a
7 substância se mostra tóxica para *P. lineatus*, em exposição aguda. Por outro lado, a
8 exposição ao geraniol nanoencapsulado com a proteína do milho demonstrou ser
9 menos tóxica para os animais, sugerindo que a interação do geraniol com as
10 nanocápsulas atenuou os efeitos induzidos pelas NANO vazias. Com isso refutamos
11 a hipótese de que as nanocápsulas de zeína isoladas não iriam causar alterações
12 significativas aos animais. Além disso, apesar da redução das defesas antioxidantes
13 e dano genotóxico observado, o geraniol nanoencapsulado causou menos efeitos em
14 *P. lineatus* do que o geraniol convencional, o que sugere a possível utilização do
15 nGER em práticas agrícolas. Seus benefícios no controle de pragas e sua baixa
16 toxicidade para peixes são aspectos promissores a serem considerados. Porém,
17 ressaltamos que mais estudos devem ser realizados, tanto para avaliar os efeitos do
18 geraniol em outras concentrações, quanto para solucionar os problemas relacionados
19 às nanopartículas, visando obter um composto viável de ser utilizado como uma
20 alternativa para uma agricultura mais sustentável.

REFERÊNCIAS

- Aca, et al. 2018. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. **Ecotoxicol**, 27:968-979.
- Alvim; Martinez. 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, 842:85-93.
- Andrade, et al. 2019. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Sci Total Environ**, 663:548-559.
- Apolinário, et al. 2020. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo'. **Quím Nova**, 43:212-225.
- Araújo, et al. 2021. Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. **Aquac**, 537:736517.
- Araújo, et al. 2022. Pesticides in surface freshwater: a critical review. **Environ Monit Assess**, 194:452.
- Araújo, et al. 2023. Cardiac response of tambaqui *Colossoma macropomum* anaesthetised with geraniol and citronellol. **Aquac**, 565:739101.
- Assis, et al. 2012. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Sci Total Environ**, 441:141-150.
- Barroca, et al. 2015. Coded wire tagging of juvenile curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes): mortality, tag retention, and growth. **Neotrop Ichthyol**, 13:383-388.
- Belem-costa, et al. 2021. Protocolos para Diagnóstico de Doenças em Peixes. **Edit Appris**.
- Beliaeff; Burgeot. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environ Toxicol Chem**, 21:1316-1322.
- Beutler, et al. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab and Clin Med**, 61:882-888.
- Bonifacio, et al. 2016. Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. **Ecol indic**, 67:88-97.

- Blewett, et al. 2019. Toxicity of nanoencapsulated bifenthrin to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ Sci: Nano**, 6:2777-2785.
- Bradford. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal biochem**, 72:248-254.
- Carrasco, et al. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can J Fish Aquat Sci**, 47:2123- 2136.
- Carriquiriborde. 2021. Principios de Ecotoxicología. **Libr Cáted**.
- Chen; Viljoen. 2010. Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. **S Afr J Bot**, 76:643-651.
- Chen; Viljoen. 2022. Geraniol—A review update. **S Afr J Bot**, 150:1205-1219.
- Costa, et al. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicol Environ Saf**, 67:82-88.
- Davico, et al. 2020. Stress oxidative and genotoxicity in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) exposed to commercial formulation of insecticide cypermethrin. **Drug Chemical Toxicol**, 43:79-84.
- De sá, et al. 2021. Geraniol, um componente dos óleos essenciais de plantas—um mapeamento científico de suas propriedades farmacológicas. **Res Soc Dev**, 10.
- Ellman, et al. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, 7:88-95.
- Erthal; Berticelli. 2018. Sustentabilidade: Agricultura irrigada e seus impactos ambientais. **Ciênc Tecnol**, 2:64-74.
- Farokhcheh, et al. 2021. Geraniol improved memory impairment and neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles in male wistar rats through its antioxidant effect. **Life sci**, 282:119823.
- Fernandes, et al. 2020. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environ sci Process impacts**, 22:256-270.
- Freire, et al. 2023. Multibiomarker approach in fish to assess a heavily polluted Brazilian estuary, Guanabara Bay. **Environ Monit Assess**, 195:187.
- Hacke, et al. 2020. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). **J Ethnopharmacol**, 260:113036.
- Hosseini, et al. 2020. Geraniol attenuates oxidative stress, bioaccumulation, serological and histopathological changes during aluminum chloride-hepatopancreatic toxicity

- in male Wistar rats. **Environ Sci Pollut Res**, 27:20076-20089.
- Hu; McClements. 2014. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Res Int**. 64:329–335.
- Lajmanovich, et al. 2023. Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. **Sci Total Environ**, 870:162019.
- Lin, et al. 2021. The inhibitory efficiencies of geraniol as an anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial, natural agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in vivo. **Infect drug resist**, 2991-3000.
- Mączka, et al. 2020. One hundred faces of geraniol. **Molecules**, 25:3303.
- Mamur. 2022. Geraniol, a natural monoterpene, identifications of cytotoxic and genotoxic effects in vitro. **J Essent Oil Res**, 34:54-64.
- Marín-bustamante, et al. 2021. Nanotecnología y Agricultura: Detección, Monitoreo y Remediación de Contaminantes. **Rev Salud Admin**, 8:29-35.
- Meredith, et al. 2016. The influence of size on the toxicity of an encapsulated pesticide: a comparison of micron-and nano-sized capsules. **Environ inter**, 86:68-74.
- Moraes, et al. 1997. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do "curimbatá", *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do Sul do Brasil. **Rev brasil zool**, 14:169-180.
- Nikinmaa. 2014. An introduction to aquatic toxicology. **Elsevier**.
- OCDE. Organisation for Economic Cooperation and Development. Test Guideline No. 203 - **Fish, Acute Toxicity Testing**. 2019. Disponível em <
https://www.oecdilibrary.org/environment/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en > Acesso em 09 de janeiro de 2024.
- Ohkawa, et al. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal biochem**, 95:351-358.
- Poleksić; Mitrović-tutundžić. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. **Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish**, 339- 352.
- Portruneli, et al. 2021. Whole-body bioconcentration and biochemical and morphological responses of gills of the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid or fipronil individually or in a mixture. **Aquat Toxicol**, 240:105987.
- Ribeiro, et al. 2022. Adverse effects of herbicides in freshwater Neotropical fish: a review.

Aquat Toxicol, 106:293.

- Rogério, et al. 2022. Cellulose hydrogels containing geraniol and icaridin encapsulated in zein nanoparticles for arbovirus control. **ACS Appl Bio Mater**, 5:1273-1283.
- Samadder, et al. 2019. Efficacy of nanoencapsulated pelargonidin in ameliorating pesticide toxicity in fish and L6 cells: Modulation of oxidative stress and signalling cascade. **Sci Total Environ**, 671:466-473.
- Sanchez, et al. 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environ Sci Pollut Res**, 20:2721-2725.
- Santana, et al. 2021. Pesticide effects on fish cholinesterase variability and mean activity: A meta-analytic review. **Sci Total Environ**, 757:143829.
- Santos, et al. 2023. Abamectin promotes behavior changes and liver injury in zebrafish. **Chemosphere**, 311:136941.
- Singh, et al. 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, 175:184-191.
- Singulani, et al. 2018. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiol**, 13:1637-1646.
- Sow; Samadder. 2021. Nanotechnological Approach in Combating Pesticide Induced Fish Toxicity: Pros and Cons Controversy. **Proc Zool Soc**, 1-15.
- Tesser, et al. 2020. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. **Sci total environ**, 704:135332.
- Ueda, et al. 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Sci Technol**, 25:235-240.
- Umar; Aisami. 2020. Acetylcholinesterase enzyme (AChE) as a biosensor and biomarker for pesticides: A mini review. **Bullet Environ Sci Sustain Manag**, 4:7-12.
- Vieira, et al. 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Sci Total Environ**, 586:598- 609.
- Vieira, et al. 2018a. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, 195:125-134.
- Vieira; Martinez. 2018b. The pyrethroid λ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**,

210:958-967.

Wu, et al. 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT-Food Sci Technol**, 48:283-290.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de ética no uso de animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 141/2023

Londrina, 06 de dezembro de 2023.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: “**Análise comparativa dos efeitos do geraniol convencional e nanoencapsulado em diferentes biomarcadores de *Prochilodus lineatus***” protocolo CEUA nº **064.2023** 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia **06/12/2023**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os possíveis efeitos do geraniol e do geraniol nanoencapsulado em biomarcadores do teleosteo *Prochilodus lineatus*. **Grau de invasividade: GI2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	06/12/2023 a 31/07/2024
Espécie/ linhagem/ raça	Peixe
Nº de animais	128
Peso/ Idade	Juvenis / 10g
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Piscicultura da região de Londrina - Alevinos Online
Amostras a serem coletadas	Sangue, brânquias, fígado, cérebro, rim 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.

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

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

Profª Drª  Patricia Chimin Perandini
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a) Prof.(a) Dr.(a) Claudia Bueno dos Reis Martinez
Coordenador(a) do Projeto
C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB
C/C para a Direção de Centro de Ciências Biológicas/CCB