



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

THAMIRES GONÇALVES DOS SANTOS

**EFEITOS DE NANOBIOPESTICIDAS À BASE DE
EUGENOL E TIMOL NO COMPORTAMENTO DE
*Danio rerio***

Londrina – Paraná
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

THAMIRES GONÇALVES DOS SANTOS

**EFEITOS DE NANOBIOPESTICIDAS À BASE DE
EUGENOL E TIMOL NO COMPORTAMENTO DE
*Danio rerio***

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez
Coorientador: Caroline Santos**

**Londrina – Paraná
2025**

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

S237e Santos, Thamires .

Efeitos de nanobiopesticidas à base de eugenol e timol no comportamento de Danio rerio / Thamires Santos. - Londrina, 2025.

48 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Coorientador: Caroline Santos.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025.

Inclui bibliografia.

1. Nanobiopesticidas - TCC. 2. Danio rerio - TCC. 3. Comportamento - TCC. 4. Pesticidas - TCC. I. Bueno dos Reis Martinez, Claudia . II. Santos, Caroline . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Caroline Santos

Dr. Tiago Tomiama Alvim

Prof. Dr. Paulo Cesar Meletti (suplente)

Londrina, 09 de dezembro de 2025.

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado a minha mãe,
que sempre fez o possível e o impossível para
que eu estivesse aqui hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para chegar até aqui.

Agradeço a minha família, principalmente minha mãe Elizangela e ao meu pai Marco (*in memoriam*) por sempre terem priorizado os meus estudos para que um dia eu tivesse o que eles não tiveram. A minha irmã Thalita por ter sido a minha melhor amiga por todos os meus anos de vida. E ao meu namorado Vitor por ter compreendido as inúmeras vezes em que precisei ficar distante para que tudo isso desse certo.

Agradeço às minhas amigas Alana, Beatriz, Mariana e Mellyssa por tornarem essa jornada um pouco mais leve, e por serem meu ponto de calma e alegria por muitas vezes durante esses 5 anos de curso.

Agradeço à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Claudia Bueno dos Reis Martinez pela oportunidade de trabalhar no laboratório e pelos ensinamentos e instruções durante todas as fases que envolvem escrever uma monografia, seu trabalho foi essencial.

Agradeço à minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Caroline Santos pela disposição e por toda a ajuda durante as análises e escrita da monografia, seu trabalho também foi essencial.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Ecofisiologia Animal, em especial a Milena Aparecida dos Santos por ter me dado a oportunidade de fazer parte da sua pesquisa de doutorado, todos vocês também foram essenciais durante esse processo.

Agradeço a todos os membros da banca avaliadora, Prof^a. Dr^a. Caroline Santos, Prof. Dr. Paulo Cesar Meletti e Dr. Tiago Tomiama Alvim por aceitarem o convite, contribuindo com o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante os 5 anos de graduação. Nada disso seria realizado sem a ajuda de vocês, essa vitória é nossa.

SANTOS, Thamires. **Efeitos de nanobiopesticidas à base de eugenol e timol no comportamento de *Danio rerio***. 2025. 48 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

No Brasil o uso de agrotóxicos tem aumentado constantemente, e processos de escoamento, lixiviação e pulverização favorecem a chegada desses produtos no ambiente aquático, onde podem desencadear efeitos adversos aos organismos aquáticos. Assim, surge a necessidade de alternativas aos agrotóxicos convencionais que sejam menos prejudiciais ao ambiente, como os compostos de óleos essenciais, que podem apresentar atividade antifúngica e inseticida. O nanoencapsulamento destes compostos aumenta a adsorção do ativo, além de oferecer proteção contra degradação e proporcionar a liberação mais lenta no ambiente. A zeína permite formar nanocápsulas biodegradáveis e biocompatíveis, podendo ser utilizada na formulação de nanobiopesticidas. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os possíveis efeitos do eugenol e timol livres e em suas formas nanoencapsuladas sobre o comportamento de *Danio rerio*, após 96 h de exposição e 96 h de depuração, utilizando os testes de preferência por claro/escuro, natação espontânea e resistência natatória, e analisar os padrões glicêmicos após o período de depuração. Para isso, peixes adultos foram expostos a 5 mg L⁻¹ de cada composto e submetidos a análises comportamentais após 96h de exposição. Posteriormente, foram expostos a água desclorada com aeração contínua por 96 h e submetidos às mesmas análises comportamentais. Os resultados mostram que através dos testes comportamentais, foi possível observar efeitos ocasionados pelos compostos livres e nanoencapsulados, causando alterações no tempo de permanência no claro/escuro e na análise de nível glicêmico. Porém, a depuração se mostrou efetiva quando analisados alguns parâmetros comportamentais, mostrando que o composto pode ser eliminado do organismo do animal.

Palavras-chave: Agrotóxicos, depuração, ecotoxicologia, nanopartículas, *zebrafish*.

SANTOS, Thamires. **Effects of eugenol and thymol-based nanobiopesticides on the behavior of *Danio rerio***. 2025. 48 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University, Londrina. 2025.

ABSTRACT

In Brazil, the use of pesticides has been steadily increasing, and runoff, leaching, and spraying processes favor the arrival of these products in the aquatic environment, where they can trigger adverse effects on aquatic organisms. Thus, the need arises for alternatives to conventional pesticides that are less harmful to the environment, such as essential oil compounds, which may exhibit antifungal and insecticidal activity. Nanoencapsulation of these compounds increases the adsorption of the active ingredient, in addition to offering protection against degradation and providing slower release into the environment. Zein allows the formation of biodegradable and biocompatible nanocapsules, which can be used in the formulation of nanobiopesticides. Thus, the objective of this study was to analyze the possible effects of free eugenol and thymol, as well as their nanoencapsulated forms, on the behavior of *Danio rerio* after 96 h of exposure and 96 h of dechlorination, using light/dark preference, spontaneous swimming, and swimming endurance tests, and to analyze glycemic patterns after the dechlorination period. To this end, adult fish were exposed to 5 mg L⁻¹ of each compound and subjected to behavioral analyses after 96 h of exposure. Subsequently, they were exposed to dechlorinated water with continuous aeration for 96 h and subjected to the same behavioral analyses. The results show that through behavioral tests, it was possible to observe effects caused by the free and nanoencapsulated compounds, causing alterations in the time spent in the light/dark environment and in the glycemic level analysis. However, dechlorination proved effective when analyzing some behavioral parameters, showing that the compound can be eliminated from the animal's organism.

Keywords: Pesticides, purification, ecotoxicology, nanoparticles, *zebrafish*.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Os agrotóxicos.....	13
2.2 Os compostos.....	13
2.3 As nanocápsulas.....	15
2.4 Os organismos aquáticos.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 O modelo biológico.....	18
4.2 Delineamento experimental.....	19
4.3 Análise de dados.....	23
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Mortalidade e parâmetros físicos e químicos da água.....	23
5.2 Claro e escuro.....	25
5.3 Natação espontânea.....	31
5.4 Resistencia natatória.....	38
5.5 Glicemia.....	39
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é conhecido por ser um dos maiores produtores agrícolas do mundo, sendo assim, também é um dos maiores consumidores de agrotóxicos desde 2008 (Lopes; Albuquerque, 2018). A ampla utilização desses produtos relaciona-se à relevância econômica do agronegócio para a economia do país (Gaboardi; Candioto; Panis, 2023), o que intensifica cada vez mais a utilização dos agrotóxicos na agricultura (Lopes-Ferreira *et al.*, 2022).

Porém, devido ao processo de escoamento, lixiviação e pulverização (Delorenzo, *et al.*, 2001), e pelo uso exacerbado de agrotóxicos, esses produtos chegam até o ambiente aquático, podendo causar riscos à saúde dos organismos que ali residem (Moschet *et al.*, 2014). Dessa forma, esses agrotóxicos podem afetar não só a qualidade da água dos lagos e ribeirões que se encontram em volta de áreas agrícolas, mas também os sistemas biológicos e fisiológicos dos organismos aquáticos, causando toxicidade, estresse e alterações no desenvolvimento (Cui *et al.*, 2023). Assim, é preciso que alternativas menos prejudiciais para o controle de pragas e doenças nos sistemas agrícolas sejam estudadas.

Uma dessas alternativas é a utilização de compostos orgânicos, como os componentes de óleos essenciais, que podem desempenhar funções como biopesticidas na agricultura (Popescu; Gostin; Blidar, 2024). Neste contexto, o eugenol é um monoterpene componente de óleos essenciais encontrado em algumas plantas aromáticas como o cravo, sendo usado como um eficiente inseticida (Fernandes *et al.*, 2020). Já o timol, é um composto obtido de óleos essenciais de plantas aromáticas como o orégano, podendo também ser utilizado como inseticida (Natal *et al.*, 2021).

Como esses compostos se decompõem facilmente no ambiente natural, a nanotecnologia pode oferecer uma proteção para os compostos ativos e

aumentar a eficiência do produto. Os nanomateriais, como as nanocápsulas, podem ser uma opção mais segura, eficaz e econômica em comparação aos agrotóxicos convencionais, visto que sua estrutura favorece a absorção e a liberação controlada do composto ativo (Fraceto *et al.*, 2016), sendo necessário menor quantidade de produto para exercer sua função.

Porém, mesmo os compostos nanoencapsulados podem atingir os ambientes aquáticos e provocar efeitos adversos em organismos aquáticos. Para a análise desses possíveis efeitos em organismos não-alvo, foi utilizado o peixe-zebra (*Danio rerio*), um teleósteo tropical de água doce amplamente utilizado em testes de ecotoxicologia e comportamento. Trata-se de uma espécie que vem ganhando rápida popularidade também nas áreas de neurociência e pesquisa comportamental (Kalueff *et al.*, 2013).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos dos componentes de óleos essenciais eugenol e timol, em suas formas livres e nanoencapsuladas, sobre o comportamento de *D. rerio* após 96 horas de exposição e 96 horas de depuração, utilizando os testes de preferência por claro/escuro, natação espontânea e resistência natatória.

As hipóteses testadas foram: I) a exposição ao eugenol e ao timol em suas formas livres promove maiores alterações comportamentais em *D. rerio* do que suas formas nanoencapsuladas, e esses efeitos tendem a ser reduzidos após 96 horas de depuração; II) devido às propriedades anestésicas desses compostos, o eugenol e o timol provocam maior letargia e redução da atividade locomotora em *D. rerio* quando comparados ao grupo controle.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OS AGROTÓXICOS

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, com a produção do agronegócio voltada para o comércio global, e conseqüentemente, se apresenta no cenário internacional como um dos principais consumidores de agrotóxicos (Gaboardi; Candiotto; Panis, 2023). Os agrotóxicos são substâncias químicas empregadas na atividade agrícola para eliminar pragas de diversas origens que comprometem a produção agrícola, incluindo insetos, plantas daninhas e nematoides (Amenyogbe *et al.*, 2021). No entanto, o uso intensivo desses produtos é responsável por parte da contaminação ambiental, prejudicando o meio ambiente através da poluição de cursos d'água, desaparecimento das nascentes e perda de diversidade aquática (Miranda *et al.*, 2007), além da contaminação e intoxicação humana. Esses efeitos decorrem de diferentes vias de dispersão, como a pulverização, escoamento superficial quando no período de chuvas intensas, lixiviação e entre outros (Katagi, 2009).

Portanto, a contaminação hídrica não representa ameaça apenas para a saúde humana, mas também a alguns organismos aquáticos como peixes e anfíbios, podendo causar alterações genéticas, dificuldade na reprodução, malformações, entre outros (Bruhl; Pieper; Weber, 2011; Lopes; Albuquerque, 2018). Sendo assim, existe uma necessidade de minimizar os impactos desses produtos a organismos não-alvo e ao meio ambiente.

2.2. OS COMPOSTOS

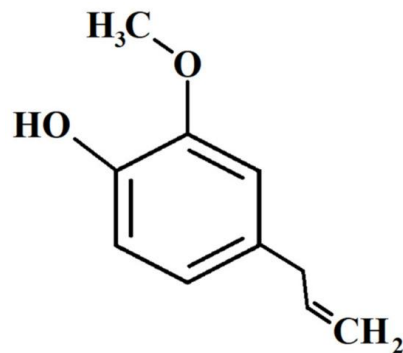
Os óleos essenciais e seus compostos ativos têm sido bastante usados nos últimos anos a fim de diminuir o uso de agrotóxicos, visto que são

apontados como uma alternativa para o controle de pragas que afetam a agricultura (Fernandes *et al.*, 2020), e assim, contribuem também para a expansão da agricultura ecológica (Popescu; Gostin; Blidar, 2024).

O eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) (Fig. 1), é um monoterpeneo componente de óleos essenciais encontrado em algumas plantas aromáticas como o cravo (Adhikari; Khanikor; Sarma, 2022), e empregado de forma eficiente como inseticida na agricultura (Da Camara *et al.*, 2022). Esse composto também pode ser usado como anestésico para peixes (Da Silveira *et al.*, 2024), devido à sua rápida absorção pelas brânquias e pela pele do animal. Durante estudos comparativos com outras substâncias anestésicas, o eugenol apresentou propriedade anestésica mais rápida, porém, apresentou maior tempo de recuperação quando comparado a outros compostos, apresentando também a diminuição na frequência de natação dos peixes (Ayala-Soldado *et al.*, 2024).

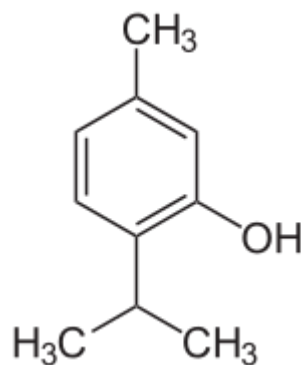
Já o timol ($C_{10}H_{14}O$) (Fig. 2), também é um composto obtido de óleos essenciais de plantas aromáticas como o tomilho (Kowalczy *et al.*, 2020), podendo também ser utilizado como inseticida (Natal *et al.*, 2021), fungicida e anestésico para peixes (Yousefi *et al.*, 2018). Além disso, existem estudos que mostram que o timol pode causar comportamentos de evitação, aumentando a distância percorrida e a velocidade de natação de alguns peixes (Aydin; Orhan, 2021). Esse composto também pode provocar um movimento opercular lento e irregular, o que pode causar letargia (Yousefi *et al.*, 2022).

Figura 1. Fórmula estrutural do eugenol



Fonte: Ulanowska; Olas, 2021.

Figura 2. Fórmula estrutural do timol.



Fonte: Wikipédia Contributors, 2007.

2.3. AS NANOCÁPSULAS

Os nanomateriais são definidos principalmente pelo seu tamanho específico de 10 a 100 nm. As nanocápsulas são descritas como sistemas onde o composto é aprisionado a uma cavidade circundada por uma única membrana de polímeros (Biswas; Wu, 2005), e suas formas podem ser descritas como esféricas, cilíndricas, tubulares, entre outras. Além disso, as superfícies podem ser lisas e homogêneas ou irregulares e onduladas (Machado *et al.*, 2015).

A nanotecnologia tem adquirido papel central em diferentes setores produtivos, incluindo as indústrias farmacêutica (Gomerdinger; Nabar; Hammond, 2025) e alimentícia (Pattnaik *et al.*, 2024), além de aplicações crescentes na agricultura (Kah *et al.*, 2018). A nanoencapsulação oferece um novo modelo de administração de alguns compostos, visto que, as nanocápsulas podem apresentar uma liberação controlada dessas substâncias (Natal *et al.*, 2021). Dessa forma, fornecem uma quantidade menor do composto, além de melhorar a solubilidade das moléculas ativas e a penetração nos locais-alvo, apresentando especificidade de sítio (Kumar *et al.*, 2019; Onyeaka; Nwabor, 2022).

As nanocápsulas de zeína formadas a partir da principal proteína de armazenamento do milho, destacam-se como orgânicas, biodegradáveis e biocompatíveis (Nunes *et al.*, 2021). A zeína tem se mostrado eficiente na encapsulação de medicamentos e compostos bioativos devido à sua capacidade de formar sistemas estáveis e proteger os ativos contra degradação. Essas características tornam as nanocápsulas de zeína uma alternativa mais sustentável e eficaz em comparação a outros compostos sintéticos não orgânicos (Malhotra; Alghuthaymi, 2022).

2.4. OS ORGANISMOS AQUÁTICOS

Os ecossistemas aquáticos frequentemente atuam como receptores finais dos contaminantes ambientais, uma vez que substâncias liberadas na atmosfera ou depositadas no solo tendem a alcançar os corpos hídricos por meio de processos como precipitação, lixiviação e escoamento superficial. No caso das paisagens rurais, o escoamento superficial e a lixiviação transportam resíduos de agrotóxicos e fertilizantes para ambientes adjacentes às áreas cultivadas (Miglioranza, 2021).

A contaminação da água e do solo, apresentando riscos a longo prazo aos organismos aquáticos ali presentes (Main *et al.*, 2014), podendo causar impactos negativos relacionados ao estresse oxidativo, comportamento e a reprodução de organismos não-alvo (Tulcan *et al.*, 2021).

A exposição de organismos aquáticos a contaminantes como agrotóxicos pode desencadear efeitos adversos mesmo em concentrações subletais, comprometendo processos fisiológicos essenciais. Esses efeitos individuais, quando acumulados em diferentes níveis de organização biológica, podem alterar dinâmicas populacionais e favorecer desequilíbrios ecossistêmicos, impactando nas relações ecológicas (Khoshnood, 2024).

Uma das maneiras de se avaliar os efeitos dos contaminantes nos organismos expostos é por meio de biomarcadores, que consistem em alterações moleculares, bioquímicas, celulares e fisiológicas induzidas por agentes tóxicos e observáveis nos sistemas biológicos (Amé *et al.*, 2021). Dentre as diversas alterações que podem ser observadas na cascata de efeitos biológicos, as mudanças comportamentais funcionam como indicadores sensíveis da interação do organismo com o ambiente. Os testes de toxicidade comportamental possuem relevância particular em concentrações subletais, nas quais podem fornecer uma perspectiva integrativa entre a ação do agente tóxico e os aspectos ecológicos associados ao organismo teste (Cuenca; Simonato; Meletti, 2022).

Com isso, a realização de mais estudos buscando compreender os efeitos das nanocápsulas isoladas e quando em combinação com o composto bioativo nos organismos não-alvo é determinante na melhor compreensão da atividade dos compostos sugeridos como alternativas menos agressivas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do eugenol e timol, em suas formas livres e nanoencapsuladas, sobre o comportamento de *D. rerio* após 96 horas de exposição e 96 horas de depuração, utilizando os testes de preferência por claro/escuro, natação espontânea e resistência natatória.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos nos parâmetros comportamentais de *D. rerio* dos compostos eugenol e timol nas suas formas livres e nanoencapsuladas após 96h de exposição;
2. Comparar os efeitos encontrados nos grupos expostos aos compostos livres e nanoencapsulados com aqueles expostos apenas às nanocápsulas, ao solvente e ao grupo controle;
3. Verificar se os efeitos encontrados após o período de 96h de exposição aos compostos foram revertidos após o ao período de depuração de 96h;
4. Identificar padrões glicêmicos relacionados com o tempo de exposição aos compostos e ao tempo de depuração.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 O MODELO BIOLÓGICO

O peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822), conhecido popularmente como paulistinha ou peixe-zebra, é um peixe ósseo da família Cyprinidae, com aproximadamente 3 a 4 cm de comprimento, comumente encontrado em águas doces no sul e sudeste da Ásia (Lawrence, 2007). Esse organismo é um modelo biológico amplamente estabelecido, caracterizado pela fácil reprodução, manejo e manutenção

em laboratório, permitindo maior padronização dos experimentos (Da Silva *et al.*, 2023). Além disto, esta espécie é bastante utilizada em estudos de toxicidade, genética, biologia do desenvolvimento, e está se tornando cada vez mais comum em testes comportamentais (Blaser; Chadwick; McGinnis, 2010; Cuenca; Simonato; Meletti, 2022). Com isso, é possível identificar respostas comportamentais relacionadas ao estresse e à ansiedade desse animal, que podem ser úteis em diversos estudos de pesquisa (Cuenca; Simonato; Meletti, 2022; Pintos, et al., 2023).

Figura 3. Indivíduo da espécie *Danio rerio*.



Fonte: Adaptado de Milena Santos, 2025.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização foram adquiridos o total de 120 peixes (comprimento médio $2,8 \pm 0,019\text{cm}$; peso médio $0,250 \pm 0,003\text{g}$; média \pm erro padrão), comprados em uma loja de aquarismo da região (Angel Fish Aquários e Peixes Ornamentais, Londrina/PR). Os animais foram aclimatados por no mínimo sete dias, em dois aquários de 80L cada, contendo água desclorada, com filtro biológico e aeração constante. Durante o período de aclimação, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados diariamente utilizando um medidor multiparâmetros (Horiba-U25), enquanto a amônia tóxica foi monitorada através de teste comercial de amônia tóxica

(LabconTest). Os animais foram mantidos em temperatura ambiente controlada (26°C), fotoperíodo 14h:10h (claro: escuro) e alimentados 2 vezes ao dia com ração seca (Alcon Basic) e suplemento de artêmias congeladas (AquaSmart).

Para os testes comportamentais, os animais foram expostos individualmente em 10 béqueres (n = 10), contendo 1,5 L de meio de exposição. Os grupos experimentais foram: grupo controle (CTR), com água limpa e desclorada; grupo NANO, com nanocápsulas de zeína vazias; grupo eugenol (EUG), com eugenol na concentração de 5 mg L⁻¹ em emulsão com o solvente Pluronic®; grupo nano eugenol (nEUG), com eugenol nanoencapsulado na concentração de 5 mg L⁻¹ e o solvente; grupo timol (TIM), com timol na concentração de 5 mg L⁻¹ em emulsão com Pluronic®; e nano timol (nTIM), água contendo timol nanoencapsulado na concentração de 5 mg L⁻¹ em emulsão com Pluronic®. O tempo total de exposição dos animais foi de 96h, onde houve renovação parcial do meio com 48h (50 %). Durante o período de exposição, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados após 96h de experimento, e amostras de água foram coletadas para caracterização das nanocápsulas por um laboratório parceiro.

Após o período total de exposição, os animais foram submetidos a três testes comportamentais subsequentes, adaptados de Cuenca; Simonato; Meletti (2022). O primeiro teste foi o claro/escuro (Serra; Medalha; Mattioli, 1999; Maximino *et al.*, 2007) (Fig. 4), no qual o peixe é colocado em um pequeno compartimento central com portas deslizantes, em um aquário retangular de 10 L (50 cm × 19 cm × 10 cm - largura × altura × profundidade), previamente revestido com papel adesivo branco/preto em cada metade. Após 5 minutos de aclimatação, o peixe é liberado da parte central e gravado por 5 minutos por uma câmera instalada acima do aquário,

assim, seu comportamento é analisado em relação a sua primeira escolha, ao tempo gasto em cada ambiente do aquário e número de cruzamentos da linha média.

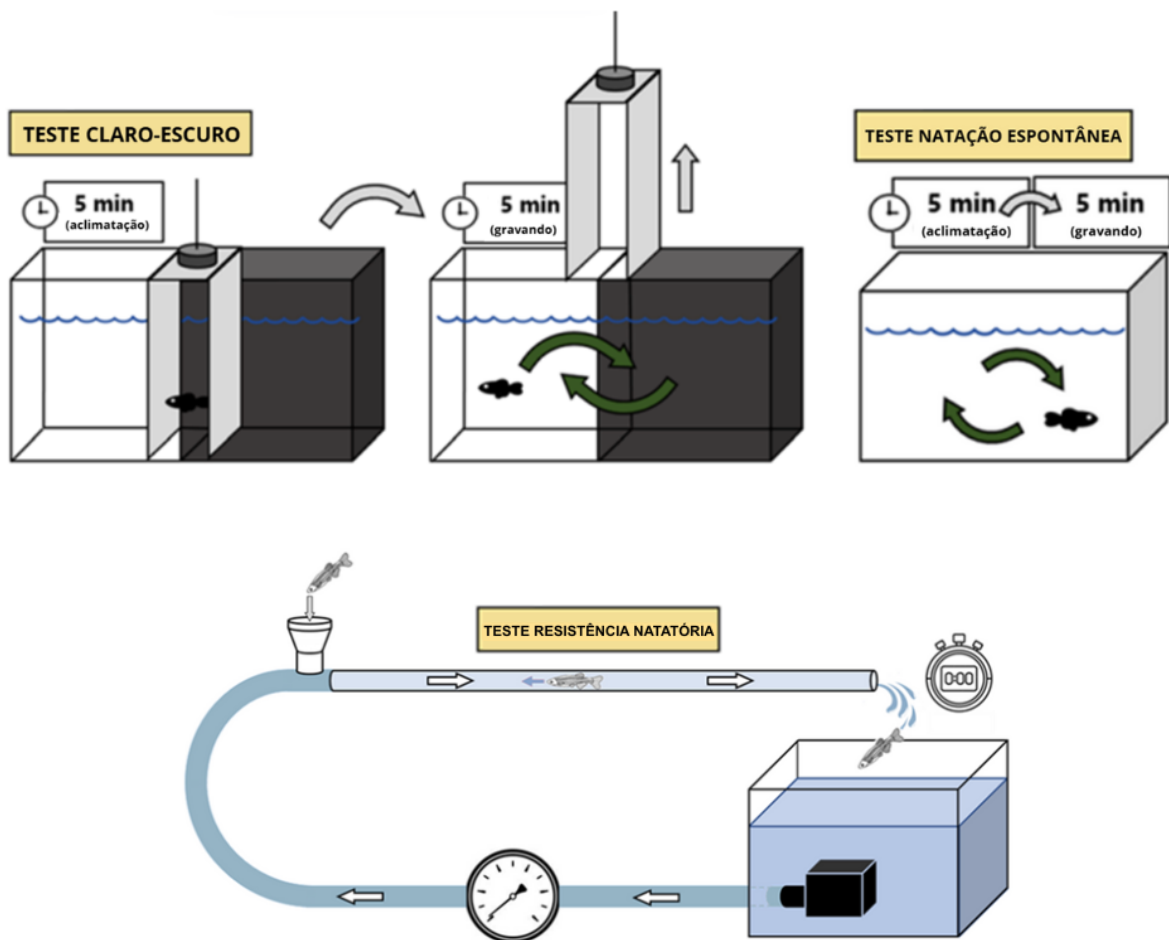
Logo depois, o mesmo animal é transferido para o segundo teste, o qual é chamado de natação espontânea (Fig. 4). O peixe é colocado em um aquário de 2L (25 cm × 17 cm × 5 cm - largura × altura × profundidade), onde o animal passa pelo processo de aclimatação de 5 minutos, e após isso, a natação do animal é gravada por uma câmera frontal por mais 5 minutos. Assim, o comportamento natatório é analisado em relação ao tempo que o animal fica em cada zona do aquário (superior ou inferior), distância total percorrida em metros e número de cruzamentos entre as zonas do aquário. A definição de cada parâmetro analisado pode ser encontrada no catálogo comportamental de *D. rerio*, publicado por Kalueff *et al.* (2013). Para este teste, a análise posterior do vídeo foi feita usando o software SACAM a 10 frames por segundo. Todas as gravações de vídeo foram realizadas dentro de uma câmera de teste isolada.

Por fim, o terceiro teste ao qual o animal é submetido é o sistema de resistência natatória (Melo, 2011) (Fig. 4). O sistema é composto por um tubo transparente de 25 mm de diâmetro (20,5 mm de diâmetro interno) e 1 metro de comprimento, uma bomba de água Sarlo Better 2700 e um registro seletor de vazões de 1 a 12 L/min. A bomba, instalada em uma caixa plástica de 15 L ao final do sistema, faz a água circular pelo registro e, na sequência, pelo tubo acrílico que retorna à caixa. Os peixes são inseridos individualmente no início do tubo de acrílico para nadar contra a corrente que é gerada dentro do sistema. Após cada minuto subsequente, a vazão de água aumenta, e caso o animal não consiga resistir à correnteza, ele é expulso do tubo para uma caixa plástica conectada. Assim, o índice de resistência natatória (IRN)

é calculado de acordo com a última vazão que o animal suportou e o tempo em segundos que resistiu, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IRN = \text{Vazão Acumulada} + \frac{\text{tempo (s) na última vazão suportada}}{60} \times \text{Última Vazão}$$

Figura 4. Representação dos testes comportamentais realizados.



Fonte: Cuenca; Simonato; Meletti, 2022. Modificado por Alana Majewski, 2025.

Ao final do teste de resistência natatória os peixes foram realocados nos béqueres de exposição, porém mantidos em água limpa e desclorada para avaliar se existe diminuição de efeitos comportamentais após o retorno para água limpa. Os animais passaram por 96h de depuração, onde não houve renovação do meio. Os

parâmetros físico-químicos da água também foram monitorados após 96h. Ao fim do período de depuração, os animais foram avaliados novamente quanto ao comportamento, realizando os três testes citados anteriormente, e em sequência, foram eutanasiados em benzocaína, medidos e pesados. Posteriormente, foi feita a secção caudal para que o teste de glicemia fosse realizado por meio de glicosímetro comercial.

Todos esses experimentos e procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEL 043.2024).

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados obtidos dos testes de comportamento foram comparados entre os diferentes grupos (CTR X NANO X EUG X nEUG X TIM X nTIM) durante o período de exposição e depuração, por meio dos testes paramétricos (*One Way ANOVA*) ou não paramétricos (Kruskal Wallis) de acordo com a distribuição dos dados (Normalidade e Homocedasticidade), seguida por testes de comparações múltiplas quando indicado. Nos casos em que a análise considerou simultaneamente os fatores *grupo* e *período experimental* (exposição e depuração) foi empregada ANOVA de duas vias (*Two Way ANOVA*), seguida de testes de comparações múltiplas quando indicado. Para a análise dos dados foi utilizado o software SigmaPlot, e considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MORTALIDADE E PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA

O período de exposições não induziu mortes em nenhum dos animais expostos. Porém, foi possível observar que os animais expostos ao grupo TIM e nTIM

apresentaram comportamentos como ataxia, quando o animal tem uma perda geral da postura corporal e/ou coordenação dos movimentos (Kalueff *et al.* 2013).

Em relação aos parâmetros físico-químicos da água (Tabela 1), não foram observadas diferenças estatísticas entre os períodos de exposição e de depuração. Também não houve variações entre os parâmetros nos diferentes grupos analisados durante o período de exposição (Tabela 2) e durante o período de depuração (Tabela 3).

Tabela 1. Média dos parâmetros físico-químicos da água durante período de exposição e depuração.

Tratamentos	pH	Temperatura	Condutividade	Turbidez	Oxigênio dissolvido
		T (°C)	(mS cm ⁻¹)	(NTU)	(mg L ⁻¹)
EXP	25,08	6,37	0,12	16,67	5,66
DEP	26,37	6,97	0,13	16,5	5,26

Fonte: Milena Santos, 2025. Modificado pela própria autora.

Tabela 2. Média dos parâmetros físico-químicos da água dos diferentes grupos durante o período de exposição.

	GRUPOS	pH	Temperatura	Condutividade	Turbidez	Oxigênio dissolvido
			T (°C)	(mS cm ⁻¹)	(NTU)	(mg L ⁻¹)
EXP	CTR	6,75	24,89	0,124	15,77	6,4
	EUG	6,31	24,84	0,122	16,53	6,1
	TIM	6,14	24,92	0,123	16,90	6,1
	NANO	6,81	24,57	0,125	17,03	5,1
	nEUG	6,23	25,51	0,123	17,13	5,2
	nTIM	6,00	25,75	0,125	16,63	5,1

Fonte: Milena Santos, 2025. Modificado pela própria autora.

Tabela 3. Média dos parâmetros físico-químicos da água dos diferentes grupos durante o período de depuração.

DEP	GRUPOS	pH	Temperatura	Condutividade	Turbidez	Oxigênio dissolvido
			T (°C)	(mS cm ⁻¹)	(NTU)	(mg L ⁻¹)
	CTR	7,14	25,27	0,128	18,93	5,6
	EUG	6,86	25,89	0,127	16,10	5,7
	TIM	6,77	25,87	0,128	16,77	5,9
	NANO	7,06	26,69	0,129	15,30	5,1
	nEUG	6,87	27,20	0,125	16,10	4,6
	nTIM	7,11	27,30	0,127	15,80	4,8

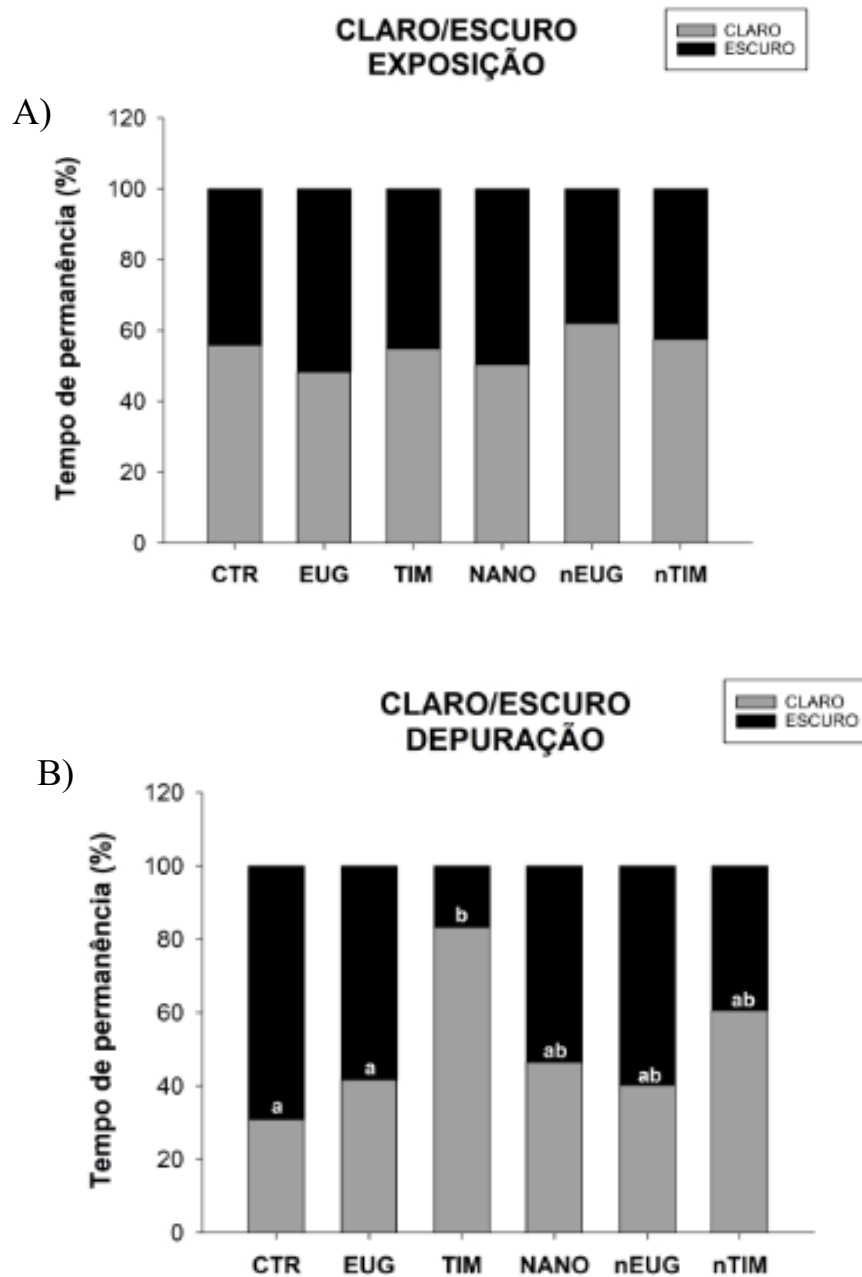
Fonte: Milena Santos, 2025. Modificado pela própria autora.

5.2 CLARO E ESCURO

O teste de claro e escuro nos permite realizar 3 análises diferentes, sendo elas: o tempo de permanência nos diferentes ambientes durante os 5 minutos de gravação, a primeira escolha do animal e o número de passagens através da linha central que o animal realizou.

Durante o teste de permanência no claro/escuro não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos experimentais durante o período de exposição ($p = 0,842$), demonstrando um tempo de permanência bem parecido entre os grupos (Fig. 5). Porém, durante o período de depuração, foram detectadas diferenças significativas entre os grupos TIM e CTR ($p = 0,003$) e entre os grupos TIM e EUG ($p = 0,036$), representadas pelas letras diferentes na Figura 5.

Figura 5. Tempo de permanência (%) no claro e no escuro durante o período de exposição (A) e após o período de depuração (B) em *Danio rerio* nos diferentes grupos analisados. As barras correspondem à porcentagem dos indivíduos que escolheram na área clara (cinza) e na área escura (preto); n=10.



Fonte: A própria autora

Esse aumento do tempo de permanência no ambiente claro no grupo TIM, durante o período de depuração, provavelmente ocorreu porque o timol apresenta propriedades anestésicas e ansiolíticas, além de promover um tempo de recuperação mais prolongado nos animais expostos (Félix; Monteiro; Venâncio, 2025), quando comparado aos outros grupos. Deste modo, os animais não realizam o seu comportamento defensivo típico, buscando abrigo ou refúgio em um ambiente escuro, permanecendo mais tempo no ambiente claro (Bakshi; Kalin, 2002). Os animais expostos por 96 h ao timol livre apresentaram fototaxia após o tempo de depuração, porém os animais expostos por 96 h ao timol nanoencapsulado não apresentaram a mesma alteração. Dessa forma, a nanocápsula pode ser eficiente para evitar esse efeito em organismos não-alvo.

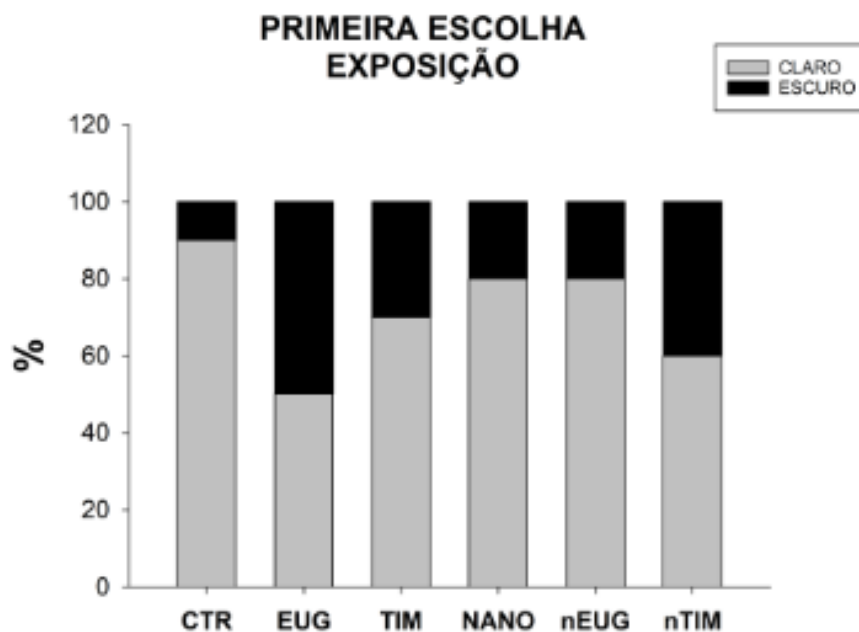
Por outro lado, o eugenol também apresenta propriedades anestésicas, porém induz o aumento da produção de fenótipos ansiogênicos em *D. rerio* (Gressler *et al.*, 2021), fazendo com que o animal busque pelo ambiente escuro ao invés do ambiente claro, o que é uma resposta normal e natural dessa espécie (Serra; Medalha; Mattioli, 1999), chamado na literatura de escototaxia. Como não foram observadas alterações significativas nos grupos expostos ao eugenol e ao eugenol nanoencapsulado, a concentração utilizada não desencadeia alterações na exploração do ambiente claro e do ambiente escuro.

É possível observar que no teste de primeira escolha claro/escuro, durante o período de exposição, os animais do grupo eugenol apresentaram uma maior tendência a preferir o lado escuro na sua primeira escolha (Fig. 6), provavelmente pelo fato do eugenol ser um composto que induz comportamentos ansiogênicos (Gressler *et al.*, 2021). Porém, durante a depuração foram os que

apresentaram uma maior preferência pelo ambiente claro (Fig. 7), provavelmente causada pela eliminação deste composto do organismo dos animais.

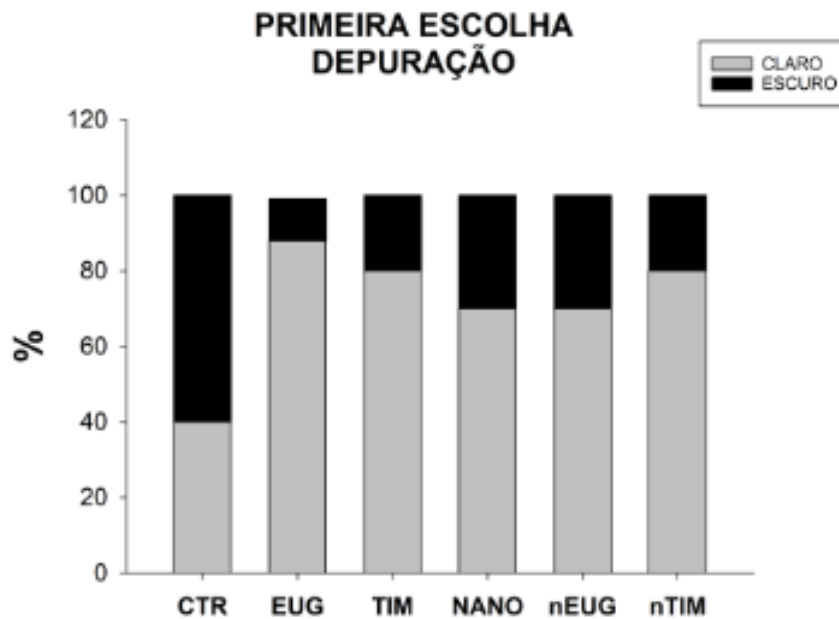
Por outro lado, apesar do eugenol livre induzir comportamentos ansiogênicos, o trabalho de Campelo *et al.* (2023), mostra que nanoemulsões carregadas com eugenol reduzem o comportamento semelhante a ansiedade em *D. rerio*, e o estudo de Ferreira *et al.* (2020) mostra que nanopartículas revestidas com quitosana contendo eugenol potencializam o efeito anestésico em *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nylo), o que pode ser a causa dos animais do grupo nEUG optarem pelo ambiente claro na sua primeira escolha em ambos os períodos de teste.

Figura 6. Primeira escolha dos animais (%) em relação ao claro e ao escuro durante o período de exposição em *Danio rerio* nos diferentes grupos analisados. As barras correspondem à porcentagem dos indivíduos que escolheram na área clara (cinza) e na área escura (preto); n=10.



Fonte: A própria autora.

Figura 7. Primeira escolha dos animais (%) em relação ao claro e ao escuro durante o período de exposição em *Danio rerio* nos diferentes grupos analisados. As barras correspondem à porcentagem dos indivíduos que escolheram na área clara (cinza) e na área escura (preto); n=10.



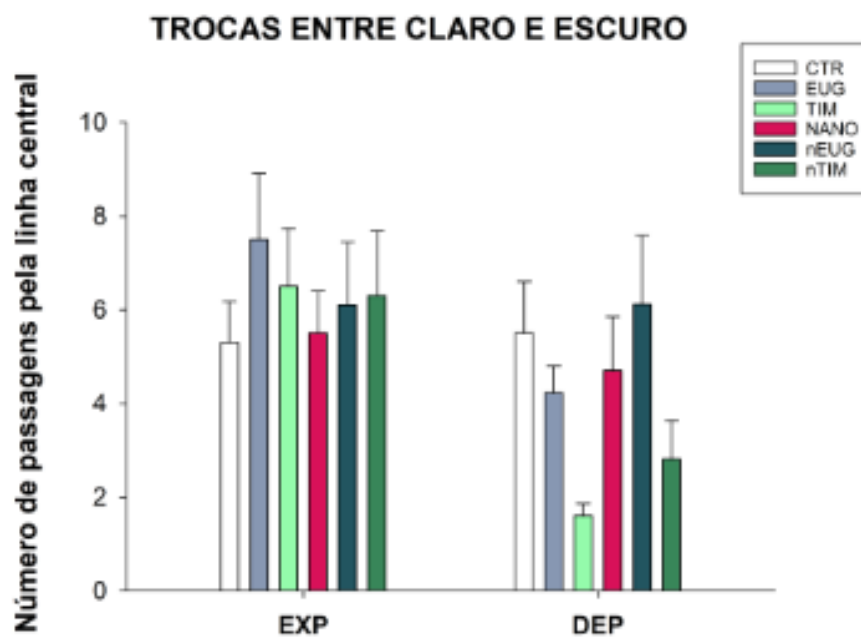
Fonte: A própria autora.

Quanto ao número de trocas entre claro/escuro, a análise foi realizada através da ANOVA de 2 vias, e assim, foi possível observar que não há diferença significativa entre os períodos de exposição e depuração, e entre os diferentes grupos analisados ($p = 0,136$) (Fig. 8).

Apesar de não observarmos nenhuma diferença significativa, existem estudos que mostram que os animais que realizam o maior número de trocas para o ambiente claro são mais afetados pelo efeito ansiolítico do composto, visto que esse ambiente oferece um maior risco de predação ao animal quando em seu habitat natural (Cuenca; Simonato; Meletti, 2022). Isto se relaciona com o fato do grupo TIM apresentar um maior número de trocas para o claro durante o período de exposição,

porém, apresentar um número bem menor de trocas no período da depuração, corroborando as observações de tempo de permanência nos ambientes (Fig. 5).

Figura 8. Número de trocas entre claro e escuro através de passagens pela linha central entre os diferentes períodos de exposição e diferentes grupos analisados. As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão (n=10).



Fonte: A própria autora.

5.3 NATAÇÃO ESPONTÂNEA

A natação espontânea é analisada através de três parâmetros, sendo eles: a velocidade média percorrida pelo animal (cm/s), a distância média percorrida pelo animal (cm) e o tempo em que o animal nadou durante os 5 minutos de gravação (segundos).

Através da análise da velocidade percorrida, é possível observar uma diferença significativa entre o grupo CTR e nEUG ($p=0,007$) durante o período de exposição, demonstrada pelas letras diferentes na Figura 9.

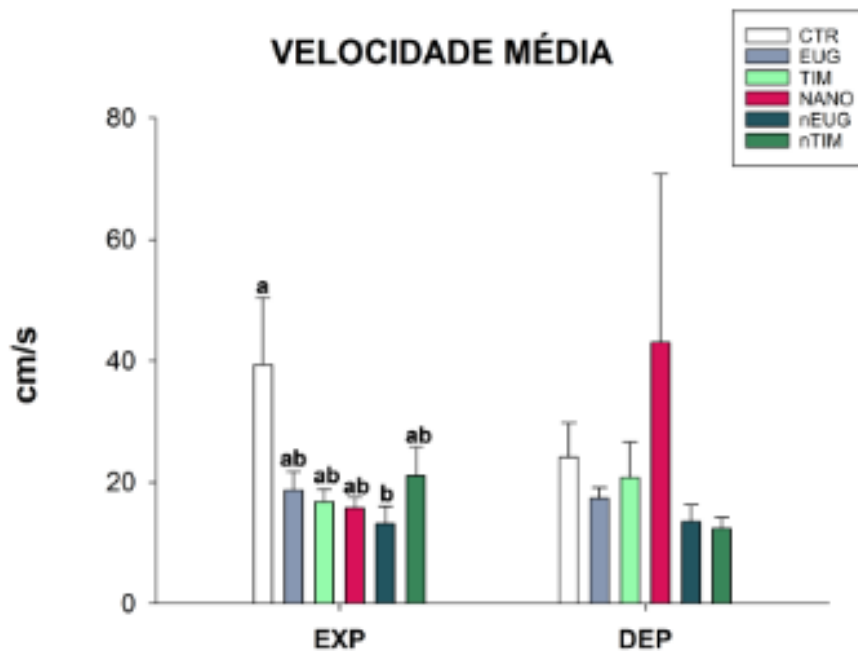
A redução da velocidade média observada no grupo nEUG em relação ao CTR pode estar relacionada às propriedades do composto nanoencapsulado. O estudo de Rocha *et al.*, (2024), observaram diminuição da velocidade de natação em larvas de *D. rerio* expostas a 2 mg L^{-1} de eugenol. Entretanto, ao comparar esse resultado com a exposição a 5 mg L^{-1} , os autores verificaram um aumento da velocidade de natação, sugerindo que os efeitos do eugenol podem variar conforme a concentração testada e a fase de vida do indivíduo.

Dessa forma, ao comparar os resultados do presente estudo com os dados disponíveis na literatura, a redução da velocidade de natação observada no grupo nEUG pode estar associada à interação do composto com as nanocápsulas, como a liberação controlada (Natal *et al.*, 2021), que podem resultar em menor disponibilidade imediata do eugenol no ambiente. Além disso, vale ressaltar que durante a análise de comportamento no período da exposição, houve um animal do grupo nEUG que se apresentou imóvel no aquário, impossibilitando a medição desse parâmetro.

Por outro lado, segundo o trabalho realizado por Ferreira *et al.*, (2020), nanopartículas revestidas com quitosana contendo eugenol potencializa o efeito anestésico do eugenol em *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo), resultando em redução da velocidade de natação dos peixes. Esses resultados são consistentes com os resultados obtidos no presente estudo, reforçando a influência da nanoencapsulação sobre a resposta locomotora.

Após a depuração, os indivíduos não apresentaram alterações significativas no parâmetro velocidade média, sugerindo que as alterações na velocidade de natação observadas no grupo nEUG não são permanentes, e os animais podem se recuperar depois da exposição ao eugenol. Porém, faz-se necessário o acompanhamento dos demais parâmetros analisados para a confirmação desta recuperação.

Figura 9. Velocidade média (cm/s) dos animais dos diferentes grupos analisados durante os diferentes períodos de tratamento. As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão (n=10).



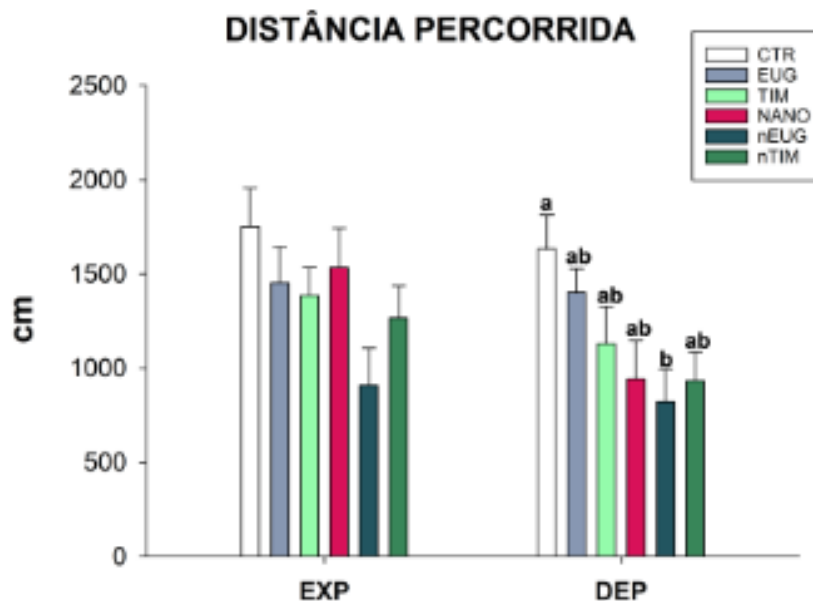
Fonte: A própria autora.

Durante a análise da distância percorrida foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos CTR e nEUG ($p = 0,028$) durante o período de depuração, representadas pelas letras diferentes (Fig. 10).

A princípio, é importante ressaltar que durante a análise do comportamento do período da depuração, houveram dois animais que ficaram imóveis no aquário, impossibilitando a medição deste parâmetro. Diante disso, é perceptível a diminuição da distância percorrida no grupo nEUG quando comparado com o CTR após a depuração, que pode ser ocasionado pelas propriedades anestésicas do composto juntamente com a sua interação as nanocápsulas.

Apesar da sugestão de recuperação dos indivíduos após a depuração apontada pelo parâmetro velocidade média, a recuperação não se demonstra efetiva quando se observa o parâmetro de distância percorrida. Desta forma, os animais expostos ao nGER retornam a uma velocidade média normal após a depuração, mas percorrem uma distância menor no aquário, o que pode ser um indicativo de que não houve eliminação completa deste composto do organismo dos animais ou seus efeitos são mais prolongados.

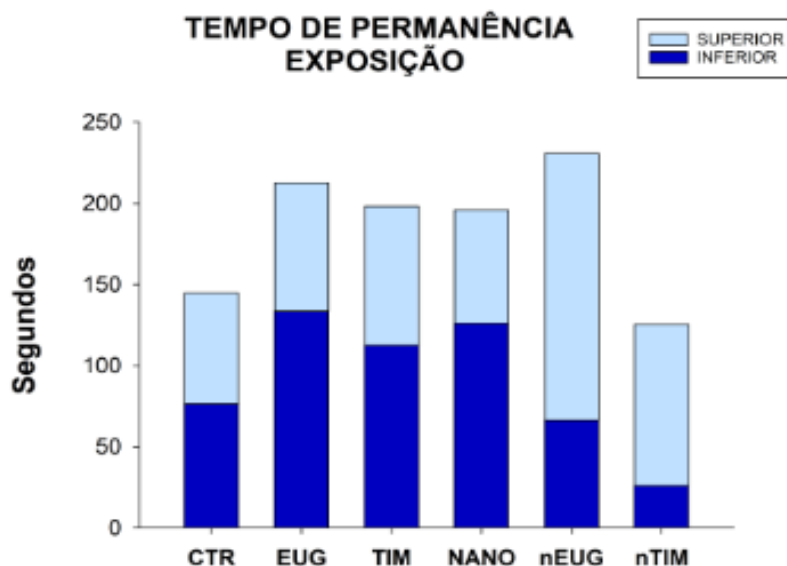
Figura 10. Distância média (cm) dos animais dos diferentes grupos analisados durante os diferentes períodos de tratamento. As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão (n=10).



Em relação ao tempo percorrido não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos experimentais na análise do estrato superior durante o período de exposição ($p = 0,989$), o que demonstra um tempo de permanência nesse estrato parecido entre os grupos (Fig. 11). A análise do estrato inferior também durante o período de exposição apresentou diferença significativa ($p = 0,028$), porém, o pós-teste utilizado não foi eficiente em demonstrar onde ocorreu essa diferença significativa (Fig 11). Deste modo, se faz necessário uma nova análise em outro programa para identificar quais grupos realmente apresentam essa diferença.

Apesar disso, é possível relacionar a permanência dos animais expostos ao eugenol e timol livres e nanoencapsulados no estrato superior do aquário, visto que esses compostos possuem propriedades anestésicas, e assim, faz com que o peixe tenha uma diminuição no tempo gasto no estrato inferior, o que seria o comportamento natural dessa espécie (Cuenca; Simonato; Meletti, 2022).

Figura 11. Tempo de permanência no estrato superior e inferior dos diferentes grupos durante o período de exposição. As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão ($n=10$).

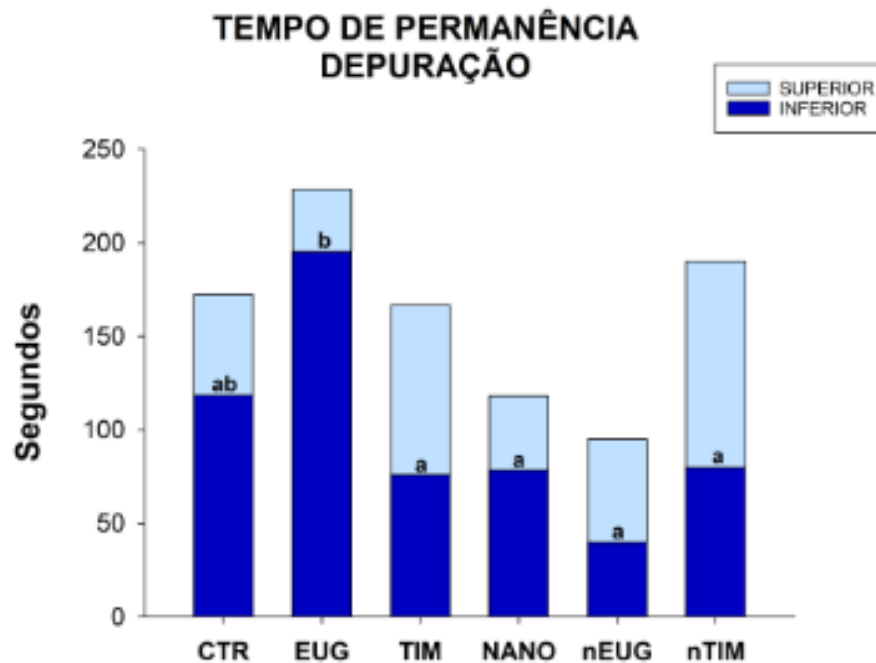


Já na análise do tempo de permanência durante o período de depuração não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos experimentais na análise do estrato superior ($p=0,577$). Porém, durante a análise do estrato inferior durante esse período, foi observada uma diferença significativa entre os grupos EUG e nEUG ($p<0,001$), EUG e nTIM ($p<0,001$), EUG e TIM ($p=0,006$) e EUG e NANO ($p=0,007$), apresentadas pelas letras diferentes na Figura 12.

Essa diferença do grupo EUG em relação ao tempo de permanência no estrato inferior em comparação aos outros grupos experimentais, pode estar relacionado a eficiência da depuração em promover a eliminação deste composto do organismo do animal, fazendo com que os peixes tenham um aumento no tempo gasto no estrato inferior, visto que no ambiente natural a permanência na coluna d'água no estrato superior causa uma maior exposição a predadores (Cuenca; Simonato; Meletti, 2022).

É interessante observar que os animais do grupo EUG e nEUG apresentam resultados diferentes nos parâmetros de natação espontânea, incluindo o tempo de permanência nos diferentes estratos. Os animais do grupo nEUG apresentam diminuição da velocidade na exposição e na distância percorrida na depuração, enquanto os animais do grupo EUG apresentaram maior tempo de permanência no estrato inferior após a depuração. Dessa forma, o eugenol livre pode estar sendo depurado rapidamente e os animais retornam a explorar o estrato inferior com maior frequência, enquanto o eugenol nanoencapsulado, ainda mantém efeitos de distância percorrida mesmo após a depuração.

Figura 12. Tempo de permanência no estrato superior e inferior dos diferentes grupos durante o período de depuração. As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão (n=10).



Fonte: A própria autora.

5.4 RESISTÊNCIA NATATÓRIA

O teste de resistência natatória nos permite realizar duas análises diferentes, sendo elas: as tentativas de natação dos animais nos diferentes grupos e o seu índice de resistência natatória.

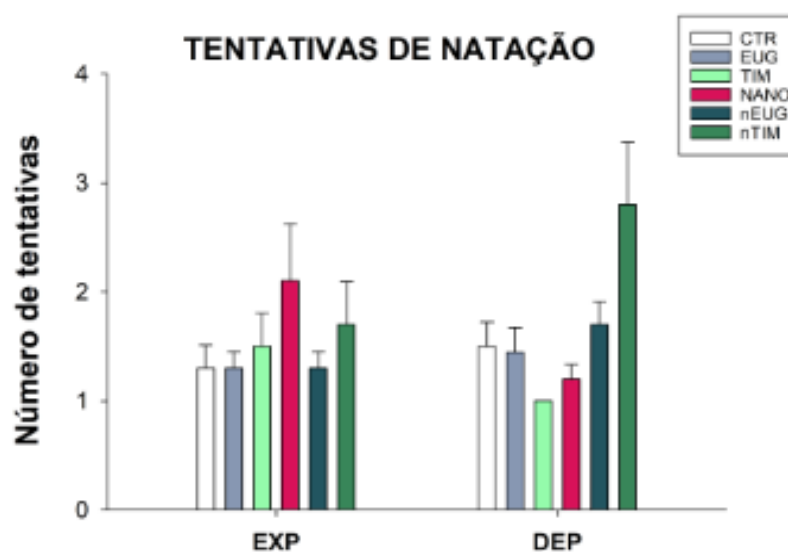
Em relação às tentativas de natação, é possível observar que não houve diferença significativa no número de tentativas entre os diferentes grupos experimentais durante o período de exposição ($p = 0,861$) (Fig. 13).

Deste modo, por mais que os compostos eugenol e timol apresentem propriedades anestésicas (Zeng *et al.*, 2024; Alagawany *et al.*, 2020), os resultados obtidos neste estudo indicam que a maioria dos indivíduos dos grupos EUG e TIM realizou apenas uma tentativa durante o teste ao longo das fases de exposição e

depuração. Esse padrão sugere que a concentração empregada (5 mg L^{-1}) não comprometeu a resposta dos organismos e permitiu uma recuperação rápida. Tal interpretação é compatível com o estudo de Aydin e Orhan (2021), que observaram eficácia anestésica acompanhada de recuperação completa e ausência de mortalidade no peixe *Garra rufa* mesmo sob concentrações superiores de timol ($25\text{--}150 \text{ mg L}^{-1}$). Isso reforça que, nas condições experimentais aplicadas, ambos os compostos produziram efeito anestésico sem prejuízo aos animais.

Por outro lado, durante a análise estatística dos diferentes grupos durante o período da depuração, o teste ANOVA demonstrou uma diferença significativa ($p = 0,020$), porém, o pós-teste utilizado não foi eficiente ao demonstrar onde ocorreu essa diferença significativa. Deste modo, se faz necessário uma nova análise em outro programa para que seja obtido quais grupos realmente apresentam essa diferença.

Figura 13. Número de tentativas de natação dos diferentes grupos durante o período de exposição (EXP) e depuração (DEP). As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão ($n=10$).



Fonte: A própria autora.

Quanto ao índice de resistência natatória, foi possível observar uma diferença significativa no período de exposição entre os grupos nEUG e nTIM ($p = 0,005$) que estão representados pelas letras diferentes (Fig. 14). O grupo nEUG apresentou valores superiores de resistência natatória, resultado que pode estar associado a alterações fisiológicas relacionadas ao aumento da demanda metabólica.

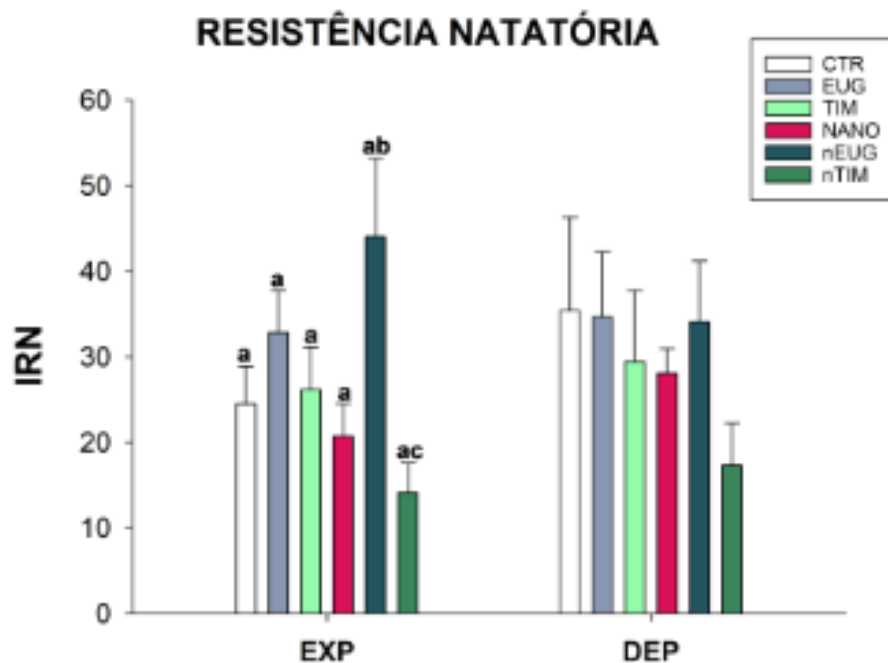
É possível observar uma diferença significativa no período de exposição entre os grupos nEUG e nTIM ($p=0,005$) que estão representados pelas letras diferentes (Fig. 14). O grupo nEUG apresentou valores superiores de resistência natatória, resultado que pode estar associado a alterações fisiológicas relacionadas ao aumento da demanda metabólica.

Conforme descrito por Beamish (1978), o aumento do consumo de oxigênio durante o esforço é convertido em unidades de energia necessárias para a manutenção da atividade, o que pode contribuir para o desempenho observado. Além disso, estudos indicam que o eugenol pode induzir respostas comportamentais compatíveis com estados ansiogênicos em peixes (Gressler et al., 2021), o que pode elevar a atividade motora e, conseqüentemente, a resistência natatória. Esses fatores ajudam a explicar, de forma mais direta, por que o grupo nEUG apresentou valores mais altos de IRN neste estudo.

Além disso, também é possível relacionar esse alto índice de resistência natatória nesse grupo com o fato das nanocápsulas apresentarem uma liberação controlada do composto (Natal et al., 2021), o que faz com que reduza os efeitos anestésicos do eugenol, o que pode ser justificado pela interação da nanocápsula com o composto, visto que o grupo nTIM apresenta um baixo índice de resistência natatória.

Diferente disso, segundo Cuenca; Simonato; Meletti (2022), a diminuição do IRN pode não estar diretamente relacionado com a diminuição da glicemia do animal, assim, o que pode justificar o baixo índice de resistência natatória do grupo nTIM neste trabalho é a exposição a esse composto e o seu possível comprometimento ao controle locomotor ou a excitabilidade muscular do animal.

Figura 14. Índice de resistência natatória dos diferentes grupos durante os períodos de exposição e depuração. As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão (n=10).



Fonte: A própria autora.

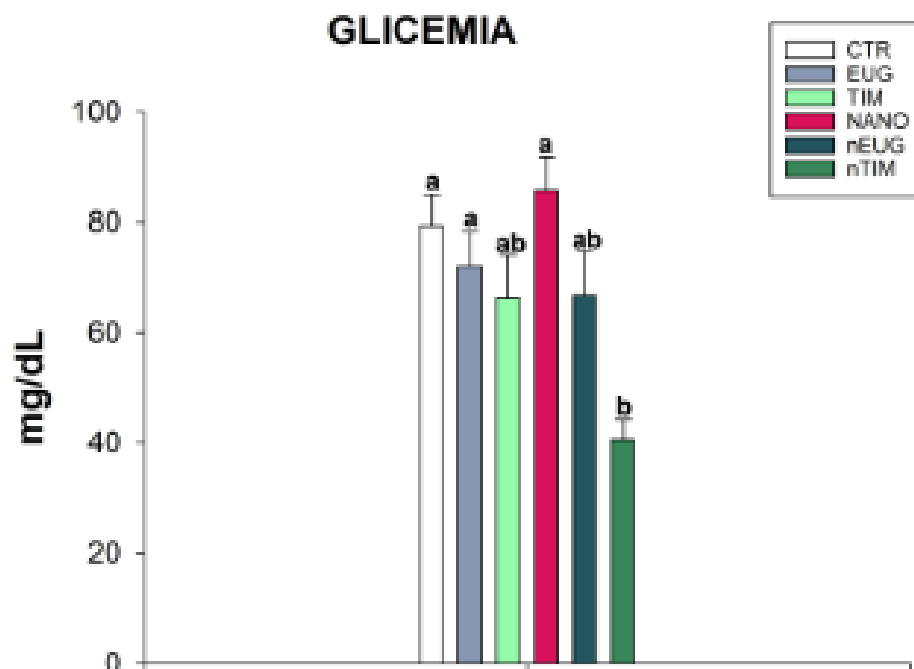
5.5 GLICEMIA

A análise de glicemia foi realizada somente após a depuração, visto que a técnica para a retirada de sangue do *D. rerio* causaria a morte do animal. Foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos NANO e nTIM ($p <$

0,001), entre os grupos CTR e nTIM ($p=0,002$) e entre os grupos EUG e nTIM ($p = 0,025$) (Fig. 15).

A diminuição do nível de glicose no sangue de *Danio rerio* no grupo nTIM pode ser associada aos efeitos anestésicos do composto juntamente com a interação das nanocápsulas de zeína, visto que a depuração aparentemente se mostrou eficiente ao fazer a limpeza dos organismos expostos ao grupo TIM, porém, devido às propriedades da nanocápsula, a depuração não foi eficiente em evitar os efeitos de longo prazo desse composto no grupo nTIM.

Figura 15 - Glicemia dos diferentes grupos durante os períodos de exposição e depuração. As barras correspondem às médias, e as linhas verticais, o erro padrão ($n=10$).



Fonte: A própria autora.

6. CONCLUSÕES

No geral, foi possível observar que os compostos analisados neste trabalho podem causar alterações no comportamento dos peixes, e que o período de depuração pode ser eficiente em alguns casos, mas que pode não ser eficiente a outros compostos. Porém, mais estudos e diferentes análises são necessários para que os efeitos desses compostos sejam analisados com mais clareza.

Com isso, pode-se rejeitar a hipótese I, visto que foi possível observar que em algumas análises os efeitos dos compostos nanoencapsulados foram maiores do que os efeitos causados pelos compostos em suas formas livres, e além disso, esses efeitos não foram reduzidos durante o período de depuração, como por exemplo na análise de glicemia. Porém, a hipótese II pode ser aceita, visto que há uma diminuição na velocidade e na distância percorrida dos organismos que foram expostos ao eugenol e timol quando comparados ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, K.; KHANIKOR, B.; SARMA, R. Persistent susceptibility of *Aedes aegypti* to eugenol. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 10 fev. 2022.
- ALAGAWANY, M. et al. A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 632–641, 10 ago. 2020.
- AMÉ, M. V et al. Principios de Ecotoxicología. 16 set. 2021.
- AMENYOGBE, E. et al. Uma visão geral dos impactos dos pesticidas em peixes e humanos. **International Journal of Aquatic Biology**, v. 9, n.1, 23 mar 2021.
- AYALA-SOLDADO, N. et al. Evaluation of the effectiveness of eugenol and MS-222 as anesthetics in *zebrafish* in repeated exposures and post-anesthesia behaviour. **Animals**, v. 14, n. 16, p. 2418–2418, 21 ago. 2024.

AYDIN, B.; ORHAN, N. Effects of thymol and carvacrol anesthesia on the electrocardiographic and behavioral responses of the doctor fish *Garra rufa*. **Aquaculture**, v. 533, p. 736134, fev. 2021.

BAKSHI, V.; KALIN, N. 6 2 ANIMAL MODELS OF PSYCHIATRIC ILLNESS Animal Models: Types Of Validity. **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress**, p. 884–901 (2002).

BEAMISH, F. W. H. Swimming Capacity. **Fish Physiology**, p. 101–187, 1978.

BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 56–62, mar. 2010.

BRÜHL, C. A.; PIEPER, S.; WEBER, B. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 2465–2472, 20 set. 2011.

CAMPELO, S. et al. Clove volatile oil-loaded nanoemulsion reduces the anxious-like behavior in adult zebrafish. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 183–192, 28 ago. 2023.

CHRISTOPH MOSCHET et al. How a Complete Pesticide Screening Changes the Assessment of Surface Water Quality. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 10, p. 5423–5432, 12 maio 2014.

CUENCA, A.L.R., SIMONATO, J.D. & MELETTI, P.C. Acute exposure of embryo, larvae and adults of *Danio rerio* to fipronil commercial formulation reveals effects on development and motor control. **Ecotoxicology**, 31, 114–123 (2022).

CUI, J. et al. Toxicity effects of pesticides based on zebrafish (*Danio rerio*) models: Advances and perspectives. **Chemosphere**, v. 340, p. 139825, 1 nov. 2023.

DA CAMARA, C. et al. Novel Insecticides from Alkylated and Acylated Derivatives of Thymol and Eugenol for the Control of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 2, 24 jan. 2022.

DA SILVA, I. I. et al. Essential Oils Produce Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos and Cause Behavior Changes in *Zebrafish* Larvae. **Biomedicines**, v. 11, n. 10, p. 2821, 18 out. 2023.

DA SILVEIRA, V. E. F. V. et al. Effects of glyphosate-based herbicide on target organs of *Astyanax altiparanae* in different treatments. **Journal of Molecular Histology**, v. 56, n. 1, 27 nov. 2024.

DELORENZO, M. E.; SCOTT, G. I.; ROSS, P. E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 84–98, jan. 2001.

FÉLIX, L.; MONTEIRO, S. M.; VENÂNCIO, C. Evaluation of thymol application for anaesthesia of adult *zebrafish*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 5, 1 set. 2025.

FERNANDES, M. J. G. et al. New Eugenol Derivatives with Enhanced Insecticidal Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9257, 4 dez. 2020.

FERREIRA, A. L. et al. Chitosan-coated zein nanoparticles containing eugenol potentiates anesthesia in *Nile tilapia*. **Aquaculture**, v. 529, p. 735659–735659, 1 dez. 2020.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, 22 mar. 2016.

GABOARDI, S. C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; PANIS, C. Agribusiness in Brazil and its dependence on the use of pesticides. **Hygiene and Environmental Health Advances**, v. 8, p. 100080, 1 dez. 2023.

GOMERDINGER, V.F., NABAR, N. & HAMMOND, P.T. Advancing engineering design strategies for targeted cancer nanomedicine. **Nature Reviews Cancer**, v. 25, p. 657–683, 2025.

- GRESSLER, L. T. et al. Behavioral and histological features of zebrafish following sedation with eugenol or propofol. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 244, p. 105482, 1 nov. 2021.
- KAH, M. et al. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v. 13, p. 677–684 (2018).
- KALUEFF, A. V. et al. Towards a Comprehensive Catalog of *Zebrafish* Behavior 1.0 and Beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, mar. 2013.
- KATAGI, T. Bioconcentration, Bioaccumulation, and Metabolism of Pesticides in Aquatic Organisms. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1–132, 25 nov. 2009.
- KOWALCZYK, A. et al. Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4125, 9 set. 2020.
- KUMAR, S. et al. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. **Journal of Controlled Release**, v. 294, p. 131–153, 28 jan. 2019.
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 1–20, set. 2007.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, jun. 2018.
- LOPES-FERREIRA, M. et al. Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 6, p. 3198, 1 jan. 2022.
- MACHADO, S. et al. Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. **Science of The Total Environment**, v. 533, p. 76–81, nov. 2015.
- MAIN, A. R. et al. Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada’s Prairie Pothole Region. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92821, 26 mar. 2014.

MALHOTRA, S. P. K.; ALGHUTHAYMI, M. A. Chapter 6 - Biomolecule-assisted biogenic synthesis of metallic nanoparticles. Elsevier, 2022.

MAXIMINO, C. et al. A Comparative Analysis of the Preference for Dark Environments in Five Teleosts. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 20, n. 4, 31 dez. 2007.

MELO, F. R. M. Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe *Poecilia vivipara*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. [2011].

MIGLIORANZA, K. Principales familias de contaminantes, fuentes, distribución y destino ambiental. In: CARRIQUIRIBORDE, P. **Principios De Ecotoxicología**. La Plata: EDULP, 2021. p. 27-62.

MIRANDA, A. C. DE et al. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 7–14, mar. 2007.

NATAL, C. M. et al. New carvacrol and thymol derivatives as potential insecticides: synthesis, biological activity, computational studies and nanoencapsulation. v. 11, n. 54, p. 34024–34035, 18 out. 2021.

NUNES, M.R. *et al.* Zein Nanoparticles: Bioactive Compounds and Controlled Delivery. In **Nanoengineering of Biomaterials**. 2022.

ONYEAKA, H. N.; NWABOR, O. F. Nanotechnology and nanomaterial delivery in the food system. **Elsevier eBooks**, p. 247–257, 1 jan. 2022.

PATTNAIK, R. *et al.* Prospects and challenges of nanomaterials in sustainable food preservation and packaging: a review. **Discover Nano**, v. 19, p. 178, 2024.

PINTOS, S. et al. Daily rhythms in the behavioural stress response of the *zebrafish* *Danio rerio*. **Physiology & Behavior**, v. 268, p. 114241, 16 maio 2023.

POPESCU, I. E.; GOSTIN, I. N.; BLIDAR, C. F. An Overview of the Mechanisms of Action and Administration Technologies of the Essential Oils Used as Green Insecticides. **AgriEngineering**, v. 6, n. 2, p. 1195–1217, 26 abr. 2024.

ROCHA, C. A. et al. Antinociceptive Analysis of Natural Monoterpenes Eugenol, Menthol, Carvacrol and Thymol in a **Zebrafish** Larval Model. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 4, p. 457, 1 abr. 2024.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1551–1553, dez. 1999.

SUPE TULCAN, R. X. et al. Typical herbicide residues, trophic transfer, bioconcentration, and health risk of marine organisms. **Environment International**, v. 152, p. 106500, jul. 2021.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 1 abr. 2021.

WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. Structure of Thymol. **Wikipedia**, 13 dez. 2007.

YOUSEFI, M. et al. Anesthetic efficacy and hemato-biochemical effects of thymol on juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 547, p. 737540–737540, 1 jan. 2022.

YOUSEFI, M. et al. Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. **Aquaculture**, v. 495, p. 376–383, 1 out. 2018.

KHOSHNOOD. Z. A review on toxic effects of pesticides in Zebrafish, *Danio rerio* and common carp, *Cyprinus carpio*, emphasising Atrazine herbicide. **Toxicology Reports**, v. 13, p. 101694–101694, 14 jul. 2024.

ZENG, X. et al. Assessment of the molecular mechanism in fish using eugenol as anesthesia based on network pharmacology. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 2191–2205, 23 jul. 2024.