



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS



GISELE CUSTÓDIO DE SOUZA

**ESTUDO DA TOXICIDADE DA NANOEMULSÃO DE ÁLCOOL  
PERÍLICO (NPOH) SOBRE ZEBRAFISH (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**

Macapá

2015

**GISELE CUSTÓDIO DE SOUZA**

**ESTUDO DA TOXICIDADE DA NANOEMULSÃO DE ÁLCOOL  
PERÍLICO (NPOH) SOBRE ZEBRAFISH (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, na área de concentração Biologia Farmacêutica como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho.

**Macapá**

**2015**

**GISELE CUSTÓDIO DE SOUZA**

**ESTUDO DA TOXICIDADE DA NANOEMULSÃO DE ÁLCOOL  
PERÍLICO (NPOH) SOBRE ZEBRAFISH (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, na área de concentração Biologia Farmacêutica, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Data da aprovação:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

---

**Orientador: Prof.<sup>o</sup> Tit. José Carlos Tavares Carvalho**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra Deyse de Souza Dantas**

---

**Prof.<sup>o</sup> Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa**

Dedico este trabalho a minha mãe Emília  
Custódio, por me ajudar a chegar até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A Universidade Federal do Amapá, através do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao meu orientador, Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho, que acreditou em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponível e disposto a ajudar, você é uma referencia profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar tanto em mim!

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A minha família, a qual amo muito, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência;

A equipe do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, em especial a Adriana Maciel e Jonatas Lobato pela colaboração para realização deste trabalho.

A equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia de Fitofarmacêutica, na pessoa do Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

Aos colegas da turma de mestrado 2013.

Aos amigos, Benedito Jr, Beatriz Sá, Nayara Melo, Claudete Melo, Paulo Francysco, Hugo Favacho, Gabriela Marinho e Jéssica Vilhena pelo incentivo e apoio.

A um amigo mais que especial Muller Duarte, pela disponibilidade de sempre me acompanhar em todos os momentos.

A todos, muito obrigada!

*“Por isso posso me deitar tranquilo e dormir em paz. Quando  
acordo, me sinto seguro, porque Deus cuida de mim”.*

*Salmos 3:5 - Bíblia Sagrada*

## RESUMO

A nanotecnologia tem caráter multidisciplinar, unindo diversas áreas do conhecimento, tais como: química, física, biologia, farmácia e engenharias. Nos últimos anos, um crescente interesse tem sido dado aos materiais nanoestruturados em diversas áreas biomédicas. No entanto, ainda é necessário identificar os pontos finais de toxicidade e as relações dose-resposta que podem ser causadas por nanoestruturas. Neste sentido, o *Danio rerio* tornou-se um modelo vertebrado de destaque para avaliar a toxicidade de diversas drogas e produtos químicos. O álcool perílico (POH) é um monoterpeno monocíclico hidroxilado encontrado em óleos essenciais de limão, lavanda entre outros. É amplamente conhecido por possuir atividade antitumoral. Assim, o objetivo deste trabalho, foi estudar a toxicidade da nanoemulsão de álcool perílico (NPOH) sobre o *Danio rerio* (zebrafish). Para tanto foram determinadas: a) a concentração letal 50 ( $CL_{50}$ ); b) os efeitos sobre o comportamento; e c) os efeitos da administração aguda (48 horas) das concentrações da NPOH sobre os parâmetros histológicos das brânquias, fígado e rins. Pela exposição às diferentes concentrações da NPOH (25, 35, 50 e 125  $\mu\text{g/L}$ ) obteve-se a  $CL_{50}$  de 33,4 $\mu\text{g/L}$ , sendo que as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/L}$  da NPOH causaram 100% de mortalidade, produzindo também alterações comportamentais notáveis. As concentrações de 25 e 35 $\mu\text{g/L}$  da NPOH causaram maiores danos ao tecido branquial quando comparados com as demais concentrações, e com a concentração de 125 $\mu\text{g/L}$  do tensoativo (controle,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , Anova, teste Tukey-Kramer). As concentrações de 25, 35 e 50 $\mu\text{g/L}$  da NPOH causaram danos significativos no tecido hepático quando comparado ao controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ). Nos rins as alterações histológicas observadas não foram significativas. Portanto, a partir desses resultados sugere-se que a NPOH apresenta os padrões de toxicidade observados para nanoformulações de fármacos e xenobióticos.

Palavras chaves: *Danio rerio*, álcool perílico, nanoemulsão, toxicidade, histopatologia.

## ABSTRACT

The Nanotechnology has a multidisciplinary approach, combining various areas of knowledge, such as chemistry, physics, biology, pharmacy and engineering. In recent years a growing interest has been given to nanostructured materials in various biomedical areas. However, it is still necessary to identify the end points of toxicity and the dose-response relationships can be caused by nanostructures. In this regard, the *Danio rerio* has become an important vertebrate model to assess the toxicity of various drugs and chemicals products. The perillyl alcohol (POH) is a hydroxylated monocyclic monoterpenes found in essential oils of lemon, lavender and others. It is widely known to possess anti-tumor activity. The aim of this work was to study the toxicity of perillyl alcohol nanoemulsion (NPOH) on *Danio rerio* (zebrafish). Therefore, we determined: a) the Lethal Concentration 50 ( $LC_{50}$ ); b) the effects on behavior; and c) the effect of the acute administration (48 hours) of the NPOH concentrations on histological parameters of the gills, liver and kidneys. By exposure to different concentrations of NPOH (25, 35, 50 and 125 mg/L) was obtained the  $LC_{50} = 33,4\mu\text{g}/\text{L}$  and the concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{L}$  of NPOH caused 100% mortality, yielding also notable behavioral alterations. The concentrations of 25 to 35 $\mu\text{g}/\text{L}$  of NPOH causes majors damage to the gill tissue as compared to the other concentrations, and the concentration of 125 $\mu\text{g}/\text{L}$  of surfactant (control,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey-Kramer test). The concentrations of 25, 35 and 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  of NPOH caused significant damage in the liver to the compared to controls ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ). In the kidneys, the histological alterations were not significant. Therefore, from these results it is suggested that the NPOH shows the toxicity patterns observed for drugs and xenobiotics nanoformulations.

Keywords: *Danio rerio*, perillyl alcohol, nanoemulsion, toxicity, histopathology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Imagen de <i>D. rerio</i> .....	24
<b>Figura 2.</b>	O modelo <i>D. rerio</i> e suas vantagens sobre outras espécies experimentais.....	29
<b>Figura 3.</b>	Estrutura química do álcool perílico (POH).....	42
<b>Figura 4.</b>	Fluxograma com o resumo da metodologia experimental.....	45
<b>Figura 5.</b>	Exposição aguda do <i>D. rerio</i> as diferentes concentrações da NPOH	46
<b>Figura 6.</b>	Etapas para preparação histológica dos órgãos do <i>D. rerio</i> .....	48
<b>Figura 7.</b>	Efeito da administração das diferentes concentrações da NPOH em solução (25 $\mu$ g/L, 35 $\mu$ g/L, 50 $\mu$ g/L e 125 $\mu$ g/L) sobre <i>D. rerio</i> . N = 15/grupo, CL50 = 34,3 $\mu$ g/L.....	58
<b>Figura 8.</b>	a) Filamento branquial normal em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> . cm-canal marginal; cp-célula pilar; EF-epitélio estratificado do filamento; ELS – epitélio pavimentoso das lamelas secundárias; LS - lamela secundária, SVC-seio venoso central; b) Filamento branquial em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> expostos a 125 $\mu$ g/L do Tensoativo. Observar o desprendimento do epitélio respiratório das lamelas (setas); c) Filamento branquial em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> expostos a 125 $\mu$ g/L NPOH. Observar hipertrofia das células epiteliais (+), hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias (setas preta) e presença de células de cloreto (setas branca). Detalhe no seio venoso central (SVC); d) Filamento branquial em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> expostos a 50 $\mu$ g/L NPOH. Observar o deslocamento total do epitélio respiratório (*) e Necrose das células do epitélio respiratório (N); e) Filamento branquial em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> expostos a 35 $\mu$ g/L NPOH. Observar deslocamento das células do epitélio lamelar (*), Secreção de muco (setas branca), degeneração das células do epitélio lamelar (Setas preta) e Necrose (N). f) Filamento branquial em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> expostos a 25 $\mu$ g/L NPOH. Observar o deslocamento total do epitélio respiratório (*) e Necrose das células do epitélio respiratório (N). (HE, 5 $\mu$ m);.....	60

- Figura 9.** Média do IAH a partir das alterações observadas nas brânquias de *D. rerio* expostas as concentrações da NPOH (25, 35, 50 e 125 $\mu$ g/L). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de n = 15/grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer, a = p < 0.001, b = p < 0.001, e c = p < 0.01..... 63
- Figura 10.** a) Fígado normal em corte longitudinal de *D. rerio*. Notar os hepatócitos (H); b) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo. Nota a vacuolização do citoplasma (\*); c) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L NPOH. Observar vacuolização citoplasmática (>), estagnação biliar (cabeça das setas), degeneração nuclear (setas pretas), degeneração do citoplasma (\*) e diminuição do glicogénio (+); d) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto à concentração de 50 $\mu$ g/L NPOH. Observe a intensa vacuolização do citoplasma (>), diminuição do glicogênio (+), atipia do contorno celular (setas), e diminuição na frequência relativa de núcleos; e) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 35 $\mu$ g/L NPOH Observe a degeneração do citoplasma (setas), estagnação biliar (cabeça das setas), bem como presença de sinusóides e intensa presença de leucócitos (\*) caracterizando hiperemia; f) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 25 $\mu$ g/L NPOH. Observe intensa vacuolização do citoplasma (\*), degeneração citoplasmática (+) e Necrose focal (N). (HE, 5 $\mu$ m)..... 65
- Figura 11.** Efeitos das aplicações das diferentes concentrações da NPOH (25, 35, 50 e 125 $\mu$ g/L) sobre os fígados de *D. rerio*. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de n = 15/grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer, a = p < 0.05, b = p < 0.01, e c = p < 0.01 comparado com o tensoativo (125  $\mu$ g/L)..... 67
- Figura 12.** a) Rim normal em corte longitudinal de *D. rerio*. Notar a presença de um glomérulo (G). O asterisco mostra o espaço intercapsular. Observar o tecido linfoide (TL), o túbulo contorcido distal (TD), o túbulo contorcido proximal (TP); b) Rim em corte longitudinal de

<i>D. rerio</i> exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo. Observar dilatação dos capilares glomerulares (seta) e obstrução tubular (*); c) Rim em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L NPOH. Observar o aumento do espaço da capsula de Bowman (*) e degeneração da hialina tubular leve (seta); d) Rim em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> exposto a concentração de 50 $\mu$ g/L NPOH. Observar o aumento do espaço da capsula de Bowman (*) resultante da degeneração glomerular (seta) e degeneração da hialina tubular severa (cabeça da seta); e) Rim em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> exposto a concentração de 35 $\mu$ g/L NPOH. Observar diminuição do espaço da cápsula de Bowman (seta), aumento do lúmen tubular (*) e desorganização tubular (DT). f) Rim em corte longitudinal de <i>D. rerio</i> exposto a concentração de 25 $\mu$ g/L NPOH. Observa-se a degeneração tubular (seta) e aumento do lúmen tubular. (HE, 5 $\mu$ m).....	70
<b>Figura 13.</b> Efeitos das aplicações das diferentes concentrações da NPOH (25, 35, 50 e 125 $\mu$ g/L) sobre os rins do <i>D. rerio</i> . Os pontos representam a média $\pm$ EPM de n = 15/grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer.....	72

## LISTA DE SIGLAS

**AdE-** adelgamento do epitélio

**AECB-** aumento do espaço da cápsula de Bowman

**AFreqVas-** aumento da frequência relativa de vasos;

**ALumTub-** aumento do diâmetro do lúmen tubular

**An-** aneurisma

**ASTM-** Sociedade Americana de Testes e Materiais

**AtrofNuc-** atrofia nuclear

**AVolCel-** aumento do volume celular

**AVolNuc-** aumento do volume nuclear

**AVolVasos-** aumento do volume de vasos

**CCLS-** células cloreto nas lamelas secundárias

**CE-** concentração efetiva

**CL<sub>50</sub>-** Concentração Letal Média

**CPC -** canais de poros do córion

**CV-** congestão vascular

**DC-** degeneração celular

**DCG-** dilatação dos capilares glomerulares

**DCTub-** degeneração citoplasmática das células tubulares

**DeC-** desorganização de capilares

**DegCanBil-** degeneração de canalículos biliares

**DECB-** diminuição do espaço da cápsula de Bowman

**DegCit-** degeneração citoplasmática

**DegG-** degeneração glomerular

**DegNuc-** degeneração nuclear

**D-ELS-** Deslocamento ou elevação do epitélio da lamela secundária

**DesCH-** desorganização/descaracterização dos cordões hepáticos

**DesG-** desorganização glomerular

**DesT-** desorganização tubular

**DFreqG-** diminuição da frequência relativa de glomérulos

**DFreqNuc-** diminuição da frequência relativa de núcleos

**DHL-** degeneração hialina leve

**DHS**- degeneração hialina severa  
**DiC**- dilatação de capilares  
**DilVS**- dilatação de vasos sanguíneos  
**DimGlic**- diminuição do glicogênio  
**DL<sub>50</sub>** – dose letal  
**DNTub**- degeneração nuclear das células tubulares  
**DT**- degeneração tubular  
**EstBil**- estagnação biliar  
**EUA** – Estados Unidos da América  
**FCalgLS**- fusão completa de algumas lamelas secundárias  
**FCtodLS**- fusão completa de todas as lamelas secundárias  
**Fib**- fibrose  
**FTIR** – infravermelho de Fourier  
**HE**- hematoxilina/Eosina  
**Hem**- hemorragia  
**HH**- hiperemia  
**HHem**- hiperemia  
**HPBLS**- hiperplasia na base das lamelas secundárias  
**HPLS**- hiperplasia ao longo das lamelas secundárias  
**HP/HTCC**- hiperplasia/trofia das células cloreto  
**HP/HTCM**- hiperplasia/trofia das células mucosas  
**HTCE**- hipertrofia das células epiteliais  
**HTCT**- hipertrofia das células tubulares  
**IAH** – índice de alteração histológica  
**ISO** – Organização Internacional de Normatização  
**LCF** – Liberação Controlada de Fármacos  
**LeuELS**- presença de leucócitos  
**MuLS**- presença de muco entre as lamelas secundárias  
**N**- necrose  
**Nec**- necrose  
**NPAg**- Nanoparticula de prata  
**NPAu** – Nanoparticula de ouro  
**NPCu** – Nanoparticula de Cobre

**NPNi**- Nanoparticula de níquel

**NPOH** – Nanoemulsão de álcool perílico

**NP<sub>s</sub>Al** – Nanopartículas de alumínio

**NPSF**- Nanoparticula de sílica fluorescente

**NPTiO<sub>2</sub>**- Nanoparticula de dióxido de titânio

**NPZO**- Nanoparticula de óxido de zinco

**ObsTub**- obstrução tubular

**OCDE** – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

**PA** – ácido perílico

**PAMAM** - Poliamidoamina

**Par**- presença de parasitas

**PCTL**- perda do contorno ou contorno atípico das células do tecido linfoide

**PContCel**- perda ou atipia do contorno dos hepatócitos

**PContNuc**- perda ou atipia do contorno do núcleo dos hepatócitos

**POH** – álcool perílico

**RE**- ruptura epitelial

**RompCel**- rompimento celular

**RupVas**- ruptura de vasos

**RVS**- ruptura de vasos sanguíneos

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SWCNT** – nanotubos de carbono de parede única

**TLCB**- tecido linfoide na Capsula de Bowman

**TR/NN**- ocorrência de túbulos em regeneração ou de novos néfrons

**USEPA** – Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

**VacCit**- vacuolização citoplasmática

**VacNuc**- vacuolização nuclear

**VMA** – valor médio de alteração

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Alterações histológicas consideradas na análise das branquiais de <i>D. rerio</i> expostos às diferentes concentrações da NPOH. O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Poleksic; Mitrovic-Tutundzic (1994).....	51
<b>Tabela 2</b>	Alterações histológicas consideradas na análise do rim de <i>D. rerio</i> expostos as diferentes concentrações das NPOH. O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Rigolin-Sá (1998) e em alterações descritas por Takashima; Hibiya (1995).....	52
<b>Tabela 3</b>	Alterações histológicas consideradas na análise do fígado de <i>D. rerio</i> expostos às diferentes concentrações das NPOH. O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Rigolin-Sá (1998).....	53
<b>Tabela 4</b>	Alterações comportamentais das diferentes concentrações das NPOH e controle sobre o <i>D. rerio</i> nas diferentes horas de observação. Estágio I: 1) aumento na atividade do nado e 2) tremores no eixo da cauda; Estágio II: 1) Nado Circular e 2) Perda da postura; Estagio III: 1)Perda da motilidade; 2) Deposição do animal no fundo do aquário e 3) Morte.....	56
<b>Tabela 5</b>	Numero e porcentagem de animais mortos sob as diferentes concentrações das NPOH sobre o <i>D. rerio</i> .....	57
<b>Tabela 6</b>	Ocorrência das alterações branquiais nos grupos expostos as diferentes concentrações das NPOH. Os números representam, em porcentagens, o numero de peixe que apresentou dano, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). HTCE=hipertrofia das células epiteliais; AdE=adelgamento do epitélio; D-ELS=Deslocamento ou elevação do epitélio da lamela secundária (LS); HPBLS: hiperplasia na base das LS.; HPLS=hiperplasia ao longo das LS.; LeuELS= presença de leucócitos; HP/HTCM=hiperplasia/trofia das céls. mucosas; HP/HTCC= hiperplasia/trofia das céls. cloreto; CCLS=céls cloreto	

nas LS; MuLS=presença de muco entre as LS; DiC=dilatação de capilares; DeC=desorganização de capilares; CV=congestão vascular; Par=presença de parasitas; FCalgLS=fusão completa de algumas LS; FCtodLS=fusão completa de toas as LS; DC=degeneração celular; RE=ruptura epitelial; Hem=hemorragia; An=aneurisma; Fib=fibrose; N=necrose.....	61
<b>Tabela 7</b> Média do Índice de alterações histológicas (IAH) das Brânquias de <i>D. rerio</i> para cada triplicata (N=5/T- N=15/grupo) nas concentrações de exposição a NPOH.....	62
<b>Tabela 8</b> Ocorrência das alterações hepáticas nos expostos às concentrações das NPOH. Os números representam, em porcentagens, o número de peixes que apresentaram o dano, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). DesCH=desorganização/ descaracterização dos cordões hepáticos; PContCel=perda ou atipia do contorno dos hepatócitos; PCont Nuc=perda ou atipia do contorno do núcleo dos hepatócitos; AVolCel=aumento do volume celular; AVolNuc=aumento do volume nuclear; VacCit=vacuolização citoplasmática; DFreqNuc=diminuição da frequência relativa de núcleos; AFreqVas=aumento da frequência relativa de vasos; AVolVasos=aumento do volume de vasos; DimGlic=diminuição do glicogênio; EstBil=estagnação biliar; HHem=hiperemia; RupVas=ruptura de vasos; DegCanBil=degeneração de canalículos biliares; VacNuc=vacuolização nuclear; DegCit= degeneração citoplasmática; DegNuc=degeneração nuclear; AtrofNuc= atrofia nuclear; RompCel=rompimento celular.....	66
<b>Tabela 9</b> Média do Índice de alterações histológicas (IAH) do Fígado de <i>D. rerio</i> para cada triplicata (N=5/T- N=15/grupo) nas concentrações de exposição a NPOH.....	67
<b>Tabela 10</b> Ocorrência das alterações renais nos grupos expostos às diferentes concentrações das NPOH. Os números representam, em porcentagens, o número de peixes que apresentaram o dano, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). PCTL=	

perda do contorno ou contorno atípico das células do tecido linfóide; DHL= degeneração hialina leve; HTCT=hipertrofia das células tubulares; DesT=desorg. tubular; DesG=desorganização glomerular; AECB=aumento do espaço da cápsula de Bowman (CB); DECB=diminuição do espaço da cápsula de Bowman; DCG=dilatação dos capilares glomerulares; TR/NN=ocorrência de túbulos em regeneração ou de novos néfrons; PAST=presença de material PAS-positivo nas céls tubulares; DFreqG=diminuição da freq. relativa de glomérulos; DilVS=dilatação de vasos sanguíneos; ALumTub=aumento do diâm. do lúmen tubular; ObsTub=obstrução tubular; DHS=degeneração hialina severa; DT=degeneração tubular; DegG=degeneração glomerular; DCTub=deg. citoplasmática das células tubulares; DNTub=deg. nuclear das céls tubulares; TLCB=tecido linfóide na CB; HH=hiperemia; RVS=ruptura de vasos sanguíneos; Nec=necrose... 71

**Tabela 11** Média do Índice de alterações histológicas (IAH) do Rim de *D. rerio* para cada triplicata (N=5/T- N=15/grupo) nas concentrações de exposição a NPOH..... 72

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	22
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	23
3.1 TOXICIDADE.....	23
3.2 O <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822) .....	24
<b>3.2.1. A utilização da histologia como ferramenta para avaliar efeitos tóxicos em <i>D. rerio</i>.....</b>	24
3.2.1.1. Brânquias.....	25
3.2.1.2. Fígado.....	26
3.2.1.3. Rins .....	26
<b>3.2.2. Emprego do <i>Danio rerio</i> como modelo experimental.....</b>	27
<b>3.2.3. Emprego do <i>Danio rerio</i> em estudos toxicológicos de novos fármacos .....</b>	30
<b>3.2.4. Emprego do <i>Danio rerio</i> em estudos toxicológicos de nanoformulações .....</b>	32
3.3. AS NANOFORMULAÇÕES .....	39
<b>3.3.1. Nanoemulsões .....</b>	40
3.4.O ALCOOL PERÍLICO – POH.....	41
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	44
<b>4.2.OBTENÇÃO DA NANOEMULSAO.....</b>	44
<b>4.2.1. Preparação das nanoemulsões.....</b>	44
<b>4.3.ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA .....</b>	44
<b>4.3.1. Animais experimentais.....</b>	44
<b>4.3.2. Avaliação dos parâmetros comportamentais em condições ambientais normais....</b>	45
<b>4.3.3. Determinação da CL<sub>50</sub>.....</b>	46
<b>4.3.4. Avaliação dos parâmetros comportamentais.....</b>	47
<b>4.3.5. Monitoramento da mortalidade .....</b>	47
<b>4.3.6. Avaliação dos parâmetros histológicos.....</b>	48
<b>4.3.7. Método de análise do material preparado .....</b>	50
<b>4.4.ANALISE ESTATÍSTICA .....</b>	55

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	56
<b>5.2.AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS .....</b>	56
<b>5.3.DETERMINAÇÃO DA CL<sub>50</sub>.....</b>	58
<b>5.4.AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS HISTOLÓGICOS (BRANQUIAS).....</b>	59
<b>5.5.AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS (FÍGADO).....</b>	64
<b>5.6.AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS (RINS).....</b>	69
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	74
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	75

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos biomédicos empregam vários modelos animais em níveis celular e molecular, tanto para melhor compreensão da fisiopatologia de doenças humanas, quanto para o desenvolvimento de novas terapias. O *Danio rerio* é um pequeno peixe (de no máximo 0,5 cm) que vive nas regiões tropicais de água doce na Índia e Sul da Ásia. É amplamente conhecido pelos fãs de aquário e tem demonstrado eficiência como modelo experimental para avaliação da toxicidade de nanoformulações.

A nanotecnologia tem caráter multidisciplinar, unindo diversas áreas de conhecimento, tais como: química, física, biologia, farmácia e engenharias. Apesar de estar relacionada a estruturas muito pequenas, a nanotecnologia traz benefícios enormes, permitindo atingir o que em alguns anos atrás era apenas ficção. Uma das grandes vantagens da nanotecnologia é o aumento da área superficial dos materiais na escala nanométrica tornando-os muito mais reativos. Estes materiais não possuem necessariamente tamanho nanométrico, mas possuem em sua composição estruturas nanométricas que geraram novas propriedades e aplicações. Por esta razão, as nanotecnologias são agora um dos campos mais importantes e promissores mundialmente.

A nanotecnologia farmacêutica teve início em meados da década de 1970 com os lipossomas como carreadores de fármacos hidro ou lipofílicos. Em 1980 surgiram as nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos lipofílicos, principalmente empregando polímeros biodegradáveis. Nos últimos anos um crescente interesse tem sido dado aos materiais nanoestruturados nas diversas áreas biomédicas. Especificamente na área de liberação de fármacos este interesse reflete a necessidade de liberação do fármaco em áreas específicas do corpo, objetivando principalmente, aumentar o índice terapêutico e diminuir efeitos colaterais.

Para avaliar a toxicidade de um fármaco, é essencial identificar os pontos finais de toxicidade e as relações dose-resposta, a elucidação dos mecanismos de toxicidade, e determinar a toxicodinâmica da droga. Além de efetuar estudos toxicológicos de um fármaco, existe também a necessidade da realização de screening em grande escala para a toxicidade de vários fármacos. Em ambos os casos, o *D. rerio* tem atributos diversos.

O *D. rerio* tornou-se um modelo de vertebrados de destaque para avaliar a toxicidade de drogas e produtos químicos. Apesar das diferenças óbvias entre os peixes e os seres humanos em relação a fisiologia, o *D. rerio* oferece uma plataforma ideal para

ensaio in vivo, todo o animal, de médio a alto grau de transferência para o campo de descoberta de fármacos, bem como uma relação custo-benefício vantajosa em relação aos modelos de doenças humanas em ratos. No entanto, como o *D. rerio* é evolutivamente mais distante dos seres humanos, os resultados a partir de tais experiências terão de ser repetido em outros sistemas antes que eles possam ser diretamente correlacionados aos seres humanos (GUYON et al., 2007).

A grande motivação para a utilização de estruturas nanométricas aplicadas a sistemas biológicos são suas inúmeras vantagens como o direcionamento a alvos específicos, liberação progressiva do fármaco, menor toxicidade, menor número de doses, diminuição dos picos plasmáticos, melhor adsorção e difusão através de membranas.

Para isso afirma-se que os estudos farmacêuticos efetuados em *D. rerio*, até agora, demonstraram que é possível aplica-lo para rastrear compostos com atividade biológica específica, sendo o modelo do *D. rerio* ideal para screening de nanoformulações para utilização como agentes terapêuticos, bem como a obtenção de informações confiáveis sobre a toxicidade de diferentes nanoformulações ao nível de todo o animal, podendo então ser usados para extrapolar os efeitos adversos da exposição dessas nanoformulações para os seres humanos e outros vertebrados.

A partir destas considerações propôs-se pesquisar o seguinte problema: A utilização das concentrações de nanoemulsões de álcool perílico (NPOH) promove toxicidade aguda em *D. rerio*? e formulou-se as seguintes hipóteses:  $H_0$ : As concentrações das NPOH são capazes de provocar efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda (48 horas) em *D. rerio*.  $H_1$ : As concentrações das NPOH não são capazes de provocar efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda (48 horas) em *D. rerio*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito toxicológico agudo da nanoemulsão do álcool perfílico (NPOH) sobre o *D. rerio*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a concentração letal média ( $CL_{50}$ );
- ✓ Avaliar os efeitos da administração aguda das concentrações das NPOH sobre os parâmetros comportamentais e observação da mortalidade de *D. rerio* de ambos os sexos;
- ✓ Avaliar os efeitos da administração aguda (48 horas) das concentrações das NPOH sobre os parâmetros histológicos (brânquias, fígado e rins) de *D. rerio* de ambos os sexos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 TOXICIDADE

Toxicidade é uma propriedade relativa de uma substância química que se refere ao seu potencial de causar danos aos organismos vivos e é uma função da concentração da substância química e da duração da exposição (RAND & PETROCELLI, 1985). A expressão da toxicidade de uma substância química depende das características de sua exposição e do seu comportamento no organismo, relacionado aos mecanismos de transporte e de interação com sítios ou órgãos-alvo, ou seja, os efeitos tóxicos só se manifestam se o agente tóxico alcançar locais específicos do organismo em concentrações suficientes para produzir algum tipo de efeito (BARROS; DAVINO, 2008).

Os testes de toxicidade possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas, além de avaliar em o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores (BERTOLETTI, 1990).

Em testes de toxicidade podem ser observados os efeitos agudos e os efeitos crônicos, sendo os primeiros àqueles que ocorrem rapidamente com um resultado da exposição ao agente tóxico por um curto período de tempo (para peixes, horas, dias ou semanas). Segundo Lombardi, (2004) os testes de toxicidade aguda são experimentos de curta duração, que proporcionam rápidas respostas em estudos sobre efeitos tóxicos letais, em que o objetivo é determinar a Concentração Letal Média ( $CL_{50}$ ) de certa substância, sobre os organismos aquáticos, em um tempo de 24 a 96 horas de exposição. Normalmente o efeito é a letalidade (ou para alguns organismos, como os microcrustáceos, pode ser a imobilidade).

Para a avaliação do efeito agudo são consideradas a  $CL_{50}$  e a  $CE_{50}$ , sendo a primeira a concentração letal média, ou a concentração do agente tóxico que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos num intervalo de 24 a 96 horas, e a última, a concentração efetiva média, ou a concentração do agente tóxico que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos no mesmo intervalo de tempo. De acordo com Weinstein; Birk (1989), o estresse agudo é caracterizado por danos morfológicos severos, alterações significativas no metabolismo, colapso celular e perda de tecido. Se essa perda for muito grande ou se algum processo fisiológico vital for permanentemente comprometido, o

organismo irá morrer. Isso caracteriza a toxicidade letal aguda que resulta de um rápido bloqueio do metabolismo.

### 3.2 O *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

O *D. rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) ou mais vulgarmente conhecido como paulistinha ou peixe-zebra (Figura 1), é um peixe tropical de água doce originário da Ásia que vive em média três anos e atinge, no máximo, 5 cm de comprimento, são onívoros de comportamento pacífico e muito ativo (KNIE; LOPES, 2004).



**Figura 1** Imagem de *D. rerio*.

Fonte: A autora

#### 3.2.1. A utilização da histologia como ferramenta para avaliar efeitos tóxicos em *D. rerio*

A histologia é considerada um excelente método de avaliação para se diagnosticar efeitos diretos e indiretos que afetem tecidos animais (HEATH, 1995). Quando associados a outros métodos de análise, estudos histológicos podem auxiliar na compreensão profunda de determinadas situações. Sendo assim, é crucial a escolha dos órgãos que serão alvo do estudo para relevância dos dados obtidos. (HEATH, 1995)

Segundo Lins, et al., (2010), os órgãos de contato direto com agentes toxicantes são as brânquias, fígados e rins, sendo que estes dois últimos representam órgãos de

metabolismo e excreção de xenobióticos. Podendo indicar alterações de ação crônica desses agentes em tecidos animais.

### 3.2.1.1. Brânquias

Assim como na maioria dos teleósteos, as brânquias do *D. rerio* localizam-se na cavidade opercular e dividem-se em 4 arcos em cada lado da faringe. Destes divergem filamentos branquiais nos quais se inserem duas fileiras de lamelas secundárias que se projetam de ambos os lados do filamento (FERGUSSON, 1989; MELETTI, 2003).

Os filamentos branquiais, também chamados de lamelas primárias, possuem um epitélio cartilaginoso, um sistema vascular e um epitélio multiestratificado. As lamelas são ricamente vascularizadas, revestidas por um epitélio pavimentoso simples e sustentado por células pilares, as quais formam lacunas que separam os capilares lamelares e por onde se inserem os capilares sanguíneos (HYBIYA, 1982, MELETTI, 2003). Além de ser o primeiro local de excreção, exercendo importante papel no balanceamento iônico, essa estrutura é responsável pelas trocas gasosas (hematose) (BALDISSEROTTO, 2002). Segundo Hibyia (1982), podem ser encontrados na base dos filamentos branquiais: células de cloreto, células mucosas, melanócitos, macrófagos e linfócitos.

Uma característica importante no que diz respeito às trocas gasosas ( $O_2/CO_2$ ) é o contato direto das brânquias com o ambiente aquático, sendo particularmente sensíveis à presença de substâncias tóxicas (BARRETO, 2007).

Os principais estudos relacionados a alterações patológicas das brânquias são os de impactos ambientais. Breseghele (2004) avaliou os efeitos de uma substância muito utilizada como insumo industrial, tratamento de saúde bucal, doenças ósseas e no controle biológico de hospedeiros da esquistossomose em estudo experimental do fluoreto de sódio. Este estudo evidenciou alterações como hiperplasia de células epiteliais e de células de cloreto e hipertrofia epitelial. Simonato (2006), ao avaliar o efeito do óleo diesel sobre curimbatás, além das lesões estruturais como deslocamento do epitélio, fusão lamelar, hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar e além de rompimentos e descamação epitelial, observou alterações vasculares como congestão, aneurisma e hemorragia. Altinok e Capkin (2007), ao avaliar o efeito do agrotóxico Endosulfan sobre brânquias, fígado e cérebro de trutas arco-iris observou que houve alterações significantes nas brânquias, baço, fígado e rim, ocorrendo nestas, deslocamento de epitélio branquial, hiperplasia de células epiteliais,

hipertrofia de células epiteliais, fusão lamelar e necrose. Miron (2008) relacionou as alterações de pH e diferentes concentrações de amônia à danos graves na espécie jundiás (*Rhamdia quelem*) onde ocorreram fusão de lamelas secundárias.

### 3.2.1.2. Fígado

Segundo Leake (1975) o fígado dos peixes é muito semelhante estruturalmente ao dos demais vertebrados compostos por parênquima celular (hepatócitos) e por fibras que promovem sua sustentação.

Além da secreção de bile, as células hepáticas tem funções vitais como participação no metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos, e também estão envolvidos em processos de desintoxicação, de hematopoesia (TAKASHIMA E HIBIYA, 1995). São células uninucleadas com forma poligonal. É possível visualizar também no fígado vascularização de grande calibre, sinusoide (vasos sanguíneos de pequeno calibre), ductos biliares, tecido pancreático e centro melanográfico (HIBIYA, 1982).

Diversos estudos relacionados a alterações patológicas no fígado de peixes têm sido realizados. Camargo; Martinez (2007) estudaram a saúde da espécie neotropical de peixe *Prochilodus lineatus*, submetida a testes *in situ* por 7 dias em um ribeirão urbano contaminado e em um local de referência, durante o inverno e o verão. E observou que as lesões mais severas foram no fígado e os peixes apresentavam as seguintes alterações histológicas: hepatócitos hipertrofiados, degeneração citoplasmática e nuclear, agregados de melanomacrófagos, estagnação biliar e um caso de necrose focal.

### 3.2.1.3. Rins

Segundo Lins et al., (2010) O rim de teleósteos, é apresentado como um órgão misto composto de elementos hematopoiéticos, reticuloendoteliais, endócrinos e excretores, que participam ativamente de processos fisiológicos importantes. Este órgão é suscetível a uma infinidade de doenças causadas por processos parasitários, bacterianos, virais, de manejo nutricional e de contaminantes. A presença de nefrons com corpúsculos renais (glomérulos e cápsula de Bowman) caracteriza a estrutura morfológica dos rins de teleósteos (FERRAZ DE LIMA; REIS; CECCARELLI, 1993; HEATH, 1995). No tecido

hematopoiético encontram-se os melanóforos, apresentando-se como centros melanomacrófagos ou de forma distribuída (ROBERTS, 1975).

Camargo (2007) ao realizar estudos toxicológicos e ambientais, descreveu alterações histológicas como degeneração hialina, oclusão de túbulos renais, hipertrofia celular (BARRETO, 2007), intensa atividade melanomacrogáfica, metaplasia cartilaginosa (CARDOSO, 2009) e congestão renal (ALBINATI, 2009).

Mekkawy et al., (2013) avaliou os efeitos da exposição de cadmio sobre rins de *Oreochromis niloticus* durante 15 dias e observou presença de edema e hipertrofia dos túbulos com deterioração e picnose nuclear. Alternância glomerular também foi observada. Mas no caso de uma exposição mais longa (30 dias), um dano grave na estrutura do rim foi notado (necrose)

### **3.2.2. Emprego do *Danio rerio* como modelo experimental**

O *D. rerio* vem sendo considerado um modelo ideal para estudos de numerosas doenças humanas (SLOMAN et al., 2003; BEST; ALDERTON, 2008). Tendo como pioneiro em realizar pesquisas utilizando *D. rerio* o pesquisador George Streisinger que no final da década de 60, aplicava as técnicas de análise mutacional para avaliar o desenvolvimento embrionário do zebrafish (GRUNWALD; EISEN, 2002).

As características que favorecem o uso do *D. rerio* como modelo de estudo são varias, tais como: pouco espaço para a sua manutenção, baixo custo, fácil manipulação, desenvolvimento e ciclo biológico rápidos, fácil análise comportamental em um ambiente controlado, boa sensibilidade para drogas, pequeno tamanho e metabolismo rápido (GOLDSMITH, 2004; SLOMAN et al., 2003).

O crescimento no número de pesquisas publicadas usando o *D. rerio* como modelo experimental, está diretamente ligado ao crescente conhecimento sobre esta espécie. Após o sequenciamento do genoma, iniciado pelo Instituto Sanger em 2001, expandiu-se as possibilidades de uso do *D. rerio* em diversos estudos genéticos (STERN; ZON 2003). Por apresentar genoma similar com os genomas humanos e de camundongos, a utilização deste modelo para pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas (BARBAZUK et al., 2000). Hoje o *D. rerio* possui grande importância na pesquisa mundial, resultando na criação de um site especializado neste assunto, ZFIN (<http://zfin.org>), onde são depositadas todas as informações necessárias para o seu uso.

Além disso, existe um excelente manual de manutenção e controle das condições de criação deste teleósteo em laboratórios (WESTERFIELD, 2000).

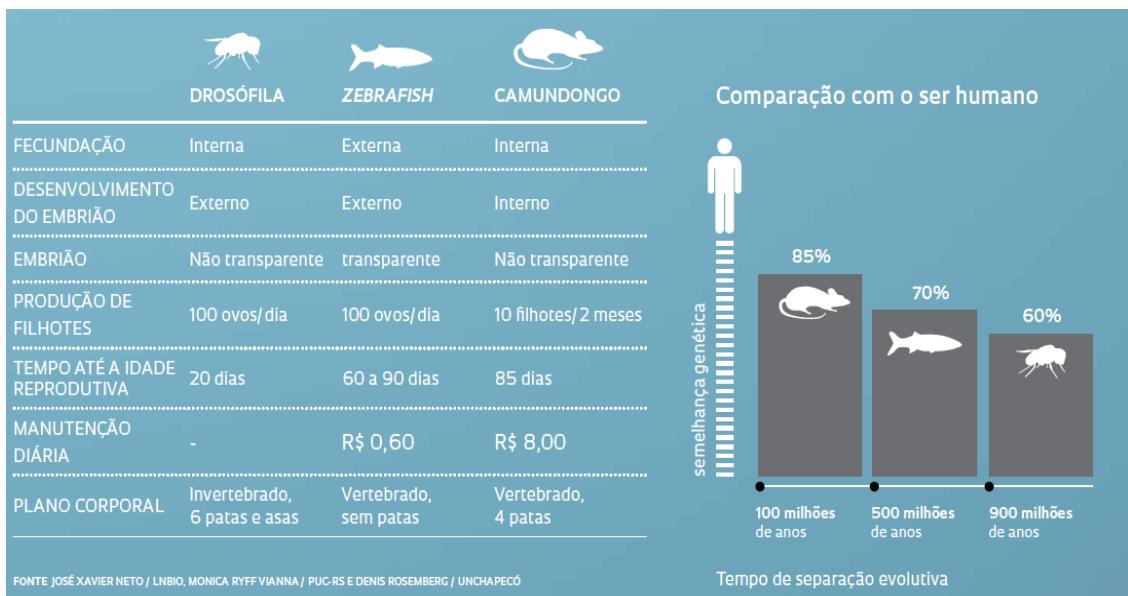
As áreas, para as quais a utilização do *D. rerio* está se expandindo são muitas, tais como biologia do comportamento (GERLAI, 2003; GUO, 2004), bioquímica (TAYLOR et al., 2004), farmacologia (GOLDSMITH et al., 2004), neurociências (EDWARDS; MICHEL, 2002) e toxicologia (HILL et al., 2005).

Essa espécie desperta maior interesse devido a sua rápida capacidade reprodutiva e as suas características morfológicas e fisiológicas, que oportuniza a aceleração do processo da descoberta de novas drogas (STERN; ZON, 2003). Além disto, compostos que são adicionados diretamente na água, são absorvidos de forma rápida e acumulados em diferentes tecidos, principalmente no sistema nervoso central (SNC) pelo *D. rerio* (GROSELL; WOOD, 2002). Muitos estudos envolvendo aspectos toxicológicos após a exposição a diferentes nanopartículas já foram realizados, tais como as nanopartículas de quitosano biodegradável (HU et al., 2011); nanopartículas de óxido de ferro (ZHU; TIAN; CAI, 2012) e nanopartículas de prata (BILBERG, et al., 2012).

Estão sendo desenvolvidos também, diversos estudos para avaliar características comportamentais do *D. rerio* (EMRAN et al., 2008; GUO, 2004; SPENCE et al., 2008). Tendo alguns desses estudos observado a importância do comportamento inato e adquirido em modelos de agressividade, sociabilidade e sua preferência por ambientes claros ou escuros (SERRA et al., 1999).

Atualmente, muitas pesquisas estão sendo realizadas com esta espécie com o objetivo de estudar a toxicidade de nanoformulações (HU, et al., 2011; ZHU et al., 2012; BILBERG, et al., 2012; SHAU; HANDI, 2012).

A figura 2 mostra interessante comparação entre os diversos modelos experimentais e enfatiza as vantagens da utilização do *D. rerio* como modelo experimental.



**Figura 2** O modelo *D. rerio* e suas vantagens sobre outras espécies experimentais.

**Fonte:** José Xavier Neto / LNBio, Monica Ryff Vianna / PUC-RS e Denis Rosenberg / Unchapecó.

O *D. rerio* adulto e embrião são usados para determinação de toxicidade aguda de vários compostos (incluindo metais pesados, pesticidas e compostos causadores de inúmeras contaminações do ambiente). O teste de toxicidade aguda inclui a determinação do valor da CL<sub>50</sub> (concentração que é letal para 50% dos peixes empregados no teste). Uma abordagem semelhante pode ser usada para o screening de toxicidade aguda de drogas. Existem testes de toxicidade padrão descritas e recomendadas pela Organização Internacional de Normalização (ISO, 1996), a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 1992), Agencia de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA), Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) e outros. Os países, principalmente da Comunidade Europeia empregam métodos recomendados pela ISO. As normas sobre a determinação de toxicidade aguda desenvolvido pela ISO são muito próximas as recomendadas pela OCDE (VOSYLIEN, 2007).

A determinação da toxicidade é um passo decisivo durante o desenvolvimento de novos medicamentos, porque a toxicidade inaceitavelmente elevada comprometeria os ensaios clínicos. O *D. rerio* adulto e embriões são usados tanto para a determinação da toxicidade total e toxicidade de órgãos específicos (MCGRATH, 2008; LANGHEINRICH et al., 2002; ZHANG et al., 2003).

### 3.2.3. Emprego do *Danio rerio* em estudos toxicológicos de novos fármacos

Recomendações internacionais sobre testes de toxicidade aguda têm sido desenvolvidos tanto para *D. rerio* adulto e embriões (BRAUNBECK; LAMMER, 2006; OCDE, 2006). Um estudo de toxicidade aguda em *D. rerio* leva em consideração apenas a concentração aquosa da substância teste (mas não a quantidade da substância absorvida). Inicialmente, estudos em *D. rerio*, de absorção distribuição, metabolismo e excreção de diversas substâncias (BERGHMANS et al., 2008; SCHOLZ et al., 2008), verificou que estes parâmetros podem ser diferentes em mamíferos. No entanto, a determinação dos valores da CL para *D. rerio* ajuda positivamente na compreensão dos efeitos tóxicos de drogas potenciais em mamíferos (KARI et al., 2007). Parng et al. (2002) comparando os valores de CL para 18 compostos químicos (incluindo preparações de drogas) em embriões de *D. rerio* e roedores, observaram que os valores da CL para embriões de *D. rerio* foram expressos em mg/L de solução, e para mamíferos em mg/kg de peso corporal (DL). A comparação mostrou que os embriões do *D. rerio* foram mais sensíveis para o tratamento tóxico que os mamíferos. Baseado no fato de que os embriões de *D. rerio* são transparentes e desenvolvidos fora de um corpo materno, portanto, representam um modelo ideal para triagem da teratogenicidade de drogas. Este modelo tem sido utilizado para estudos do efeito teratogênico do etanol, que pode ser comparado com a síndrome alcoólica fetal, do homem (ARENZANA et al., 2006; CARVAN et al., 2004; TANGUAY, 2006 ;). Em um estudo recente do modelo de *D. rerio* tem sido utilizado para a avaliação de embriotoxicidade e segurança da aplicação da droga: o presente estudo incluiu testes de 12 compostos para os quais os valores de CL e (utilizando protocolo de avaliação visual) as alterações no desenvolvimento de embriões de *Danio rerio* foram determinados (SENG, 2007).

Os resultados foram comparados com a teratogenicidade destes compostos estudados em mamíferos. No caso de compostos não teratogênicos foi observada coincidência em 75%, enquanto no caso dos compostos teratogênicos houve coincidência de 100% (MCGRATH; LI, 2008).

A determinação da toxicidade é um passo decisivo durante o desenvolvimento de novos medicamentos, porque a toxicidade inaceitavelmente elevada comprometeria os ensaios clínicos. Rubinstein et al. (2006) acreditam que a avaliação do potencial tóxico nos estudos de desenvolvimento de drogas empregando o modelo *D. rerio* devem ser incluídos

no programa de estudos da toxicidade pré-clínicos. O Instituto Nacional de Saúde dos EUA (EUA National Institutes of Health) apoia ativamente os estudos que utilizam *D. rerio* como modelo alternativo aos de vertebrados (PARNG et al., 2002). Este modelo pode promover a descoberta de novos medicamentos e elucidação dos mecanismos de doenças humanas, devido à sua aplicabilidade em células diversas, moleculares e abordagens genéticas.

O processo de desenvolvimento dos vasos sanguíneos é complexo nos vertebrados, e, portanto, os embriões de *D. rerio* são usados com sucesso como modelo comparativo de vertebrado para a triagem de drogas que influenciem a angiogênese. Sabe-se que a angiogênese é necessária para maior crescimento tumoral e metástases. Drogas que exibem atividade anti-angiogênica são utilizadas para quimioterapia do câncer, e mais de 40 substâncias medicamentosas com atividade anti-angiogênica estão em estudos clínicos como preparações medicamentosas anticancerígenas nos EUA (FOLKMAN, 2007). Por outro lado, estimuladores da angiogênese são importantes para o tratamento de tecidos em regeneração. Embriões do *D. rerio* são, portanto, utilizados para o screening de formulações de droga em organismos vivos.

Vasos embrionários podem ser corados e visualizados em microscópio. O sistema vascular pode ser também visualizado por lente específica impermeável com microesferas fluorescentes que se ligam à superfície vascular (SERBEDZIJA, 1999). Além disso, os estudos de angiogênese empregam peixes transgênicos expressando proteína verde-recife de coral fluorescente (KARI et al., 2007; KIDD; WEINSTEIN, 2003; CROSS et al., 2003).

O *D. rerio* adulto e embriões são usados tanto para a determinação da toxicidade total e toxicidade de órgãos específicos (MCGRATH, 2008; LANGHEINRICH et al., 2002; TON; PARNG, 2005; ZHANG et al., 2003).

Os dados sobre a toxicidade de órgão específico de vários compostos testados em embriões de *D. rerio* foram resumidos em uma recente revisão por Kari et al. (2007). Estes resultados sugerem a existência de muitas características comuns pelos efeitos de várias drogas em órgãos diferentes no *D. rerio* e mamíferos. Deve-se notar que a maioria dos genes humanos homólogos têm domínios funcional de proteínas em *D. rerio*. Uma vez que a ligação de fármacos, ocorre em domínios funcionais, o uso do modelo de *D. rerio* para o estudo da ação da droga sobre os seres humanos é bastante razoável (CHAOYONG, 2004). Foi demonstrado que certas drogas causam alongamento do intervalo QT, induzindo bradicardia e bloqueio AV no zebrafish. Alguns autores (BOEHMLER et al., 2007;

LOCKWOOD et al., 2004) investigaram o efeito de substâncias sedativas na atividade locomotora em *D. rerio*.

Estes dados resumidos em recente revisão de Barros et al. (2008) sugere aplicabilidade deste modelo para testar os efeitos de drogas sobre a atividade locomotora. Heiden et al. (2007) utilizando embriões de *D. rerio* para determinação da toxicidade de poliamidoamina (PAMAM), dendrímeros e seus conjugados com RGD-peptídeo, revelou que RGD conjugados G3.5 dendrímeros exibem menor toxicidade. Acredita-se que este modelo é ideal para a determinação da toxicidade de novos fármacos em nanoterapêutica.

Em 2007, os resultados dos estudos de transporte e acumulação de nanopartículas de prata nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário do *D. rerio* foram publicados (LEE et al., 2007). Propriedades ópticas únicas de nanopartículas de prata permitiu a sua observação em tempo real dentro de um embrião em desenvolvimento. Verificou-se que o transporte de nanopartículas de prata (tamanho 5-46 nm) ocorre através de difusão passiva através de canais de poros do córion (de 0.5-0.7 $\mu$ m de diâmetro).

### **3.2.4. Emprego do *Danio rerio* em estudos toxicológicos de nanoformulações**

A avaliação da toxicidade de nanoformulações sobre o *D. rerio* tem crescido consideravelmente tanto na fase embrionária quanto na fase adulta e mostrado resultados significativos na avaliação do desenvolvimento embrionário, dos aspectos comportamentais e histológicos, como mostram os diversos estudos recentemente publicados.

Valerie, et al., (2009) classificou o *D. rerio* como modelo correlativo e preditivo para avaliar a nanotoxicidade de biomateriais. A falta de modelos correlativos e preditivos para avaliar a toxicidade aguda e crônica limita o rápido desenvolvimento dos estudos pré-clínicos de novos agentes terapêuticos. Esta barreira é devido, em parte, ao aumento exponencial da nanotecnologia, juntamente com a falta de testes de rigorosos e padrões putativos. É um processo bastante simples e de baixo custo para iniciar estudos toxicológicos de nanomateriais usando culturas de células in vitro; infelizmente, é quase impossível de fazer uma comparação com o sistema in vivo. Assim, o *D. rerio* surgiu como um modelo rápido, barato e fácil de avaliar de forma eficiente a toxicidade dos nanomateriais.

As principais nanoformulações testadas nos diversos estudos são de produtos químicos (Ferro, Cobre, Dióxido de titânio entre outros), mostrando assim, a necessidade de ampliar os estudos toxicológicos de nanoformulações principalmente empregando produtos naturais (CLEMENTE et al., 2013; LEE et al., 2007).

O embrião do *D. rerio* tem ganhado destaque em estudos para avaliar a toxicidade de nanoformulações, como mostrado por Chen, Li e Tseng (2011) em que, os embriões de *D. rerio* foram expostos a nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO<sub>2</sub>) desde a fecundação até inicio da natação. E foi observado que não houve alterações quanto a taxa eclosão, sobrevivência, e malformação nos embriões expostos. No entanto, os parâmetros de natação larval, incluindo média e máxima velocidade e nível de atividade foi significativamente afetada pela NPsTiO<sub>2</sub>. Este estudo demonstrou ainda que os parâmetros comportamentais foram mais sensíveis do que outros (por exemplo, eclodibilidade e de sobrevivência) para detectar toxicidade de NPsTiO<sub>2</sub> no desenvolvimento de peixes. Clemente et al., (2013) também avaliou a toxicidade do NPsTiO<sub>2</sub> em embriões do *D. rerio*, sob diferentes condições de iluminação. Os embriões do *D. rerio* foram expostos sob luz visível e radiação ultravioleta (UV). As NPsTiO<sub>2</sub> apresentaram baixa toxicidade aguda em todas as condições testadas, porém após 96 h de exposição o grupo exposto a 100 mg/L com radiação UV apresentou 5% de mortalidade e redução no tamanho das larvas vivas. Observou-se eclosão prematura nos grupos expostos a NPsTiO<sub>2</sub> sem UV. Estes resultados contribuem para compreensão dos efeitos toxicológicos das NPsTiO<sub>2</sub> e indicam a que condição de iluminação influencia tais efeitos.

Embriões do *D. rerio* foram expostos a nanopartículas de sílica fluorescente (NPSF) 6 horas pós-fertilização (hpf) em 24 poços, durante 96 hpf. As concentrações foram analisados utilizando um infravermelho de Fourier (FTIR). A toxicidade foi avaliada pela mortalidade, tempo de incubação, sucesso de eclosão, e por alterações morfológicas. As NPSF com tamanho de -60 e -200 nm foram adsorvida no córion dos ovos. Nenhuma mortalidade ou deformidades ocorreu. Mostrando que estas nanopartículas e/ou agregados, que se acumularam no córion do embrião não apresentam embriotoxicidade evidente (FENT, et al., 2010).

Ispas et al., (2009) avaliaram a Toxicidade e Desenvolvimento de anomalias em *D. rerio* utilizando Nanopartículas de Níquel (NPNi) de diferentes tamanhos e formas. E verificou que a exposição a nanoparticula de níquel causa o adelgaçamento do epitélio intestinal e separação da fibra muscular esquelética.

King-Heidem et al., (2009) avaliou a nanotoxicidade de Quantum utilizando o embrião de *D. rerio* e concluiu que o desenvolvimento do *D. rerio* proporciona uma abordagem rápida, de baixo custo para avaliar as relações estrutura-toxicidade das nanopartículas.

Em estudo realizado por Asharani et al., (2011) para comparar a toxicidade de nanopartículas de prata, ouro e platina no desenvolvimento de embriões do *D. rerio*, mostrou que a toxicidade foi registrada em termos de mortalidade, incubação demorada, defeitos fenotípicos e acumulação do metal. A adição de NPAg resultou em um aumento dependente da concentração na taxa de mortalidade. Atrasos eclosão foi observada nas nanopartículas de prata e platina, bem como uma concentração dependente da frequência cardíaca, a resposta ao toque e eixo de curvaturas. As NPAg também induziram outras alterações fenotípicas significativas, incluindo derrame do pericárdio, morfologia cardíaca anormal, defeitos circulatórios e ausência ou malformação dos olhos. Em contraste, NPAu não mostraram qualquer evidência de toxicidade. Entre as nanopartículas estudadas, NPAg foram consideradas mais tóxicas que as NPAu que foram consideradas não-tóxicas. Esse mesmo resultado foi observado em estudo realizado por Bar-Ilan et al., (2009) que avaliou a toxicidade das nanopartículas de Ouro e Prata em embriões do *D. rerio*, onde as NPAg produziu mortalidade de quase 100% dos embriões em 120 horas pós-fertilização e malformações morfológicas, enquanto NPAu produz mortalidade inferior a 3%, no mesmo período de tempo.

Ao avaliar o transporte e biocompatibilidade de nanopartículas de prata no inicio do desenvolvimento do embrião do *D. rerio*, Lee et al., (2007), realizaram essa observação em tempo real. Pois as nanopartículas de prata (5 – 46 nm) são transportadas para dentro e para fora do embrião através dos canais de poros do córion (CPC). As nanopartículas ficaram presas dentro do CPC e da massa interna dos embriões, mostrando difusão restrita. As nanopartículas de prata foram observadas no interior dos embriões em todas as fases de desenvolvimento, causando deformação e morte, mostrando que a biocompatibilidade e a toxicidade de nanopartículas são altamente dependente da concentração exposta. Como evidenciado por Asharani et al., (2008) que também realizou estudo da toxicidade de nanopartículas de prata em embriões do *D. rerio*. Utilizando parâmetros toxicológicos como mortalidade, eclosão, edema do pericárdio e frequência cardíaca. Em que também ficou evidenciado que os sinais de toxicidade são dependentes da concentração utilizada,

onde observou-se a mortalidade, atraso incubação, eixo do corpo anormal , notocorda torcida, o fluxo sanguíneo lento, edema de pericárdio e arritmia cardíaca.

Cambero et al., (2012) investigaram os efeitos letais e sub-letais de nanopartículas de ouro (NPAu) solúveis no desenvolvimento de embriões do *D. rerio*. Os resultados mostraram que as NPAu não foram toxicas para o desenvolvimento do zebrafish durante 48hs de exposição. O ouro Solúvel (HAuCl<sub>4</sub>) foi letal em concentração > 64,1 mg / L. As concentrações subletais HAuCl<sub>4</sub> não alteraram o desenvolvimento embrionário, os movimentos espontâneos ou taxa de batimentos cardíacos, mas a capacidade de eclosão foi afetada a > 5,7 mg/L.

Com o uso extensivo de nanopartículas de óxido de metal em uma variedade de aplicações Zhu et al., (2009) avaliaram o impacto de NPZnO no desenvolvimento embrionário do *D. rerio*. Foi observado que 48hs após a exposição as NPZnO formaram agregados. Esses agregados exerceram toxicidade dependente da concentração de exposição para os embriões e larvas do *D. rerio*, reduzindo a taxa de eclosão e causando edema do pericárdio. O uso crescente de NPs de metal e sua liberação no ambiente e a possível toxicidade sobre os organismos se tornou uma preocupação para o público e cientistas tornando-se necessário a compreensão abrangente dos seus efeitos tóxicos para expandir de forma segura sua utilização (Chang et al.,). Outro estudo da toxicidade de nanopartículas de ZnO em embriões do *D. rerio* foi realizado por Bai et al., (2009) que avaliaram os efeitos físico-químico, os mecanismo de toxicidade. Neste trabalho, as propriedades das Nanopartículas de ZnO (NPZnO, 30 nm) foram caracterizados e observou-se que as NPZnO formaram agregados com tamanhos diferentes; pequenos agregados (142,4-517,7nm) ainda foram suspensas, mas grandes agregados (1 mL) foram rapidamente depositado na parte inferior das placas dos 24 poços. Nas suspensões dos pequenos agregados das NPZnO, e grandes agregados poderam exercer conjuntamente influência sobre o desenvolvimento de embriões do *D. rerio*. O teste de toxicidade nos embriões revelou que NPZnO causou mortalidade (50 e 100 mg/L), retardo no período de incubação, redução no comprimento das larvas, e causando malformações a exposição 96hpf.

Nanotubos de carbono de parede única (SWCNT) foram testados para avaliar seus efeitos no desenvolvimento do embrião do *D. rerio*. Essa exposição induziu um atraso significativo na incubação do embrião entre 52 a 72hpf em concentrações superiores a 120 mg/L, no entanto, 99% dos embriões expostos eclodidos em 75hpf. A análise molecular e

celular mostraram que o desenvolvimento embrionário dos peixes expostos até a 96hpf não foi afetada pelo SWCNT nas concentrações de até 360mg/L. Inspeção microscópica eletrônico de varredura mostrou que o tamanho dos poros no córion do embrião são nanométricos e que o tamanho dos aglomerados SWCNT foi maior, indicando que o córion dos embriões do *D. rerio* foi uma barreira protetora eficaz contra os aglomerados SWCNT (CHENG, et al., 2007).

Segundo Zhu et al., (2007) ao avaliar o desenvolvimento de toxicidade no embrião do *D. rerio* após a exposição a nanomateriais: agregados de mistura de fulereno (nc60) e fulerol. Os parâmetros toxicológicos observados no embrião foram: sobrevivência, taxa de eclosão, batimento cardíaco e edema de pericárdio, descritos no prazo de 96 h de exposição. Fulerol (um hidroxilado Derivado de C60, C60 (OH) 16-18), a 50mg/L não exerceu toxicidade. Enquanto que, NC60 a 1,5mg/L retardou o desenvolvimento larval do embrião, diminui a sobrevida, taxas de eclosão e causou edema pericárdio. A toxicidade foi mitigada por adição de um antioxidante (glutationa), o que sugere que um mecanismo de radical livre induzida ou outra forma de estresse oxidativo desempenhou um papel no desenvolvimento de toxicidade.

Henry et al., (2007) investigaram as alterações na sobrevivência e expressão genica em *D. rerio* após a exposição aos agregados de C60 preparados em dois métodos: a) agitação e sonicação de C60 em agua (THF-agua); e b) suspensão de C60 em THF seguido por rotovaporização, ressuspensão em agua e borbulhamento com azoto gasoso (THF-C60). Observou que a sobrevivência da larva do *D. rerio* foi reduzida em THF-C60 e THF-água, mas não em C60-água. As maiores diferenças na expressão de genes foram observadas em peixes expostos a THF-C60 e a maior parte (182) destes genes foram expressos de forma semelhante em peixes expostos a THF-água. Análises de THF-C60 e THF-água por cromatografia gasosa espectrometria de massa não detectou THF mas encontrou produtos de oxidação THF  $\gamma$ -butirolactona e tetra-hidro-2-furanol. Toxicidade de  $\gamma$ -butirolactona (72-h concentração letal para matar previu 50% foi de 47 ppm) indicou efeitos em tratamentos THF pode resultar de toxicidade  $\gamma$ -butirolactona.

Ao realizar estudo para abordar a biocompatibilidade e biodistribuição de sensores Raman de nanopartículas em embriões do *D. rerio*, Wang, et al., (2010) observaram que o espalhamento Raman de Superfície reforçada (SERS) nanossondas (PN) compreendendo nanopartículas de ouro (AuNPs) como reforço do substrato e rótulos Raman não fluorescentes foram sintetizados em microinjeções em embriões do *D. rerio* no estádio de

uma célula. Mapeamento Raman foi realizada para avaliar a sua distribuição em vários tipos de células e tecidos do embrião em desenvolvimento em cinco estágios diferentes entre 6 e 96hpf (horário pós-fertilização). Estudos de biocompatibilidade e de toxicidade indicaram que os PN não são tóxicos e os embriões foram encontrados para exibir expressão morfológicas e gene normal para além da forma e da função de órgãos vitais, tais como o coração e vascularização adequada.

Zhu, Tian e Cai (2012) realizaram estudo para avaliar a toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro nas fases iniciais de vida do *D. rerio*. Neste estudo, as nanopartículas de óxido de ferro mostraram-se tóxicas ao embrião do *D. rerio*, provocando mortalidade, incubação demorada e malformação.

O estudo da utilização do *D. rerio* adulto em testes toxicológicos de nanoformulações tem se mostrado escassos. O *D. rerio* é um excelente modelo para avaliação toxicológica total e de toxicidade de órgãos específicos (MCGRATH, 2008; LANGEHEINRICH ET AL., 2002; ZHANG ET AL., 2003), como mostrado em estudo realizado por Xiong et al., (2011) que avaliaram a toxicidade, estresse e dano oxidativos de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e ZnO sobre o *D. rerio* verificou-se que, a toxicidade aguda observada para NPZnO, uma suspensão granel de ZnO, e uma solução de Zn<sup>2+</sup> foram bastante semelhantes entre si. Os resultados mostraram que nas brânquias não apresentaram danos oxidativos, já no fígado os efeitos oxidativos foram mais severos. Além disso, tecidos do intestino exibiram efeitos oxidativos após a exposição as suspensões das NP.

Após longo prazo de exposição, Chen et al., (2011) avaliaram os efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO<sub>2</sub>) sobre o crescimento e alguns parâmetros histológicos do *D. rerio*. Onde evidenciou que de acordo com alguns estudos, nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO<sub>2</sub>) seriam de baixa toxicidade ecológica em testes de curto prazo. Mas os riscos a longo prazo das NPTiO<sub>2</sub> ainda são desconhecido. Os resultados revelaram que há efeito adverso óbvios para o *D. rerio*, incluindo concentração dependente, inibição de crescimento e diminuição da proporção em peso do fígado. Enquanto isso, apenas as brânquias exibiram mudanças histopatológicas incluindo espessamento das lamelas e edema das lamelas. ICP-MS exame mostrou que NPTiO<sub>2</sub> foram acumulados e distribuídos em brânquia, fígado, coração e cérebro.

Choi et al., (2010) avaliaram indução de estresse oxidativo e apoptose por nanopartículas de prata no fígado de *D. rerio* adulto e observaram que as nanopartículas

de prata podem induzir efeitos deletérios na vida aquática. Os *D. rerio* foram expostos a uma solução NPAg em que os + íons de Ag livre estavam ausentes durante o tempo de tratamento. Um certo número de alterações celulares incluindo ruptura dos cordões de células hepáticas e alterações apoptóticas foram observados na análise histológica dos tecidos do fígado. Estes dados sugerem que o stress oxidativo e apoptose está associada com a toxicidade no fígado gerado pelas NPAg.

Segundo Wang et al., (2011) a exposição crônica das fêmeas do *D. rerio* a NPTiO2 reduz significativamente sua reprodução após 13 semanas de exposição em aproximadamente 29,5% do numero total de ovos.

Ao realizar uma comparação das alterações moleculares e histológicas das brânquias do *D. rerio* expostos a nanopartículas metálicas, Griffitt et al., (2008) demonstraram que as nanopartículas metálicas produzem toxicidade em organismos aquáticos que é devido em grande parte aos efeitos de partículas, em oposição à libertação de iôns dissolvidos. Analisaram ainda, a interação da composição das nanopartículas e dissolução da resposta das brânquias, após a exposição a substâncias tóxicas (NPCu ou NPAg) ou não tóxicos (NPTiO2). As NPCu aumentou da largura média do filamento branquial por três a quatro vezes entre 24 e 48 h, enquanto NPAg não alterou largura filamento branquial em qualquer período de tempo. As diferenças nas respostas entre as posições indica que cada partícula tem um efeito biológico distinto que não parece ser acionada unicamente pela liberação de íons metálicos solúveis na coluna de água. Griffitt et al., (2007) realizaram estudo que comprovou que a exposição aguda de nanopartículas de cobre causa lesão nas brânquias e Letalidade em *D. rerio*, pois as brânquias foram o principal órgão alvo para a nanoparticula de cobre. Para investigar mais profundamente os efeitos da nanoparticula no tecido branquial, os *D. rerio* foram expostas a 100 $\mu$ g/L de nanoparticula de cobre ou para a concentração correspondente de cobre solúvel que apresentam devido à dissolução das partículas. Sob estas condições, as nanopartículas de cobre produziram diferentes efeitos morfológicos e padrões de expressão de genes das brânquias, demonstrando claramente que os efeitos das nanopartículas de cobre sobre brânquia não são mediados apenas por dissolução.

Griffitt et al., (2010) ainda investigaram a toxicidade de nanopartículas de alumínio em *D. rerio*. Para examinar essa toxicidade, fêmeas do *D. rerio* adulta foram expostas à NPsAl ou cloreto de alumínio por até 48 horas. Não houve mortalidade causadas pelas concentrações de NPAI até 12,5mg/L. Após a exposição, as concentrações de alumínio nos

tecidos causaram efeito na morfologia branquial, Na1, atividade K1-ATPase (NKA) e os padrões da expressão foram examinados. Estes resultados indicam que nanopartículas de alumínio tem pouca toxicidade aguda para *D. rerio*.

Ao avaliar os impactos de nanopartículas de ouro alimentares em *D. rerio* na pressão de baixa contaminação, verificando o papel do tamanho, concentração e tempo de exposição, Geffroy et al., (2011) constataram que houveram varias disfunções na escala sub celular, e a concentração NPAu em alimentos, mostrou alteração da composição do genoma, com o número de sítios de hibridação em que as sondas de amplificação foi significativamente alterada após exposição a NPAu. Disfunções mitocondriais apareceram no cérebro e no músculo para ambas as doses testadas, mas a acumulação do ouro em tecidos do *D. rerio* apenas pode ser observadas na exposição à dose máxima.

Em estudo para avaliar a toxicidade in vivo de nanopartículas de prata e íons de prata em *D. rerio*, Bilberg, et al., (2012) observaram aumento da taxa de movimento do opérculo e respiração superficial após a exposição nanoparticula de prata, sugerindo toxicidade respiratória.

A avaliação da toxicidade dessas nanoformulações é de extrema importância para a saúde humana, já que seu alcance aos órgãos no organismo é facilitado pelo seu tamanho reduzido e vários estudos demonstraram que as nanopartículas podem até mesmo entrar no cérebro e causar lesão tecidual (MEDINA, et al., 2007; SHARMA 2007).

### 3.3. AS NANOFORMULAÇÕES

O avanço da nanotecnologia vem impulsionando o mercado mundial e potencializando o consumo de materiais, produtos e processos voltados para essa área. Tal fato é verificado através do uso de nanoproductos em diferentes segmentos como alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar, agrícola, entre outros (MOORE, 2006; CHEN; SCHLUESENER, 2008).

Dentro das perspectivas para desenvolvimento de moléculas estáveis e com alto efeito sobre organismos alvo, a nanotecnologia tem se apresentado como importante ferramenta, considerando sua aplicação no desenvolvimento de produtos contendo ingredientes ativos em escalas nanométricas (FERREIRA, et al., 2012).

Nessa perspectiva, as nanoformulações do tipo nanoemulsão vêm sendo utilizadas como sistemas de liberação de fármacos contribuindo para a biodisponibilização de fontes

vegetais, com diminuição de efeitos adversos. No entanto, os tensoativos podem limitar o uso farmacológico destes sistemas (RODRIGUES et al, 1998).

### **3.3.1. Nanoemulsões**

Sendo definidas como pequenas gotículas lipídicas dispersas num meio aquoso, em que cada gotícula está interligada por uma barreira fina de moléculas de agentes emulsificantes, as nanoemulsões são sistemas coloidais de transportes de fármacos extremamente promissores para diversas aplicações terapêuticas. (MC CLEMENTS, 2012; YILMAZ E BORCHERT, 2006). Diferentes das microemulsões que são sistemas estáveis, as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis porém, cineticamente estáveis, ou seja, metaestáveis e se caracterizam por permanecer estável por um longo período. Os processos de preparo e de estabilização estérica são primordiais para determinar a estrutura. Isso acontece devido o pequeno tamanho de glóbulos, proporcionando assim, grande redução na força da gravidade, superada pelo movimento browniano (FERNANDES, et al., 2004; TARDOS, 2004; CAPEK, 2004).

As nanoemulsões podem ser transparentes ou translúcidas dependendo da dimensão das gotículas relativamente ao comprimento de onda (MC CLEMENTS, 2012). As nanoemulsões necessitam de menor quantidade de agente tensoativo, na faixa de 5 a 10% quando comparados à microemulsões (HOELLER et al., 2009; FERNANDES, et al., 2004; TADROS; IZQUERDO; ESQUENA, 2004).

Sendo sistemas naturalmente frágeis, torna-se perceptível o menor sinal de desestabilização, devido a transparência e fluidez, muitas vezes tornando-se opacas e cremosas. A natureza de fase oleosa e a adição de polímeros são as duas maiores fontes de instabilidade desses sistemas. Sua textura pode ser alterada através do aumento da sua consistência, com o aumento do conteúdo lipídico ou por adição de agentes espessantes e gelificantes (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004)

O tamanho reduzido das gotículas é capaz de penetrar facilmente através das camadas da pele e promover a penetração das substâncias ativas incorporadas, possibilitando a liberação controlada de um fármaco, direcionando a célula alvo, constituindo algumas das vantagens apresentadas pelas nanoemulsões (HOELLER et al., 2009). O desenvolvimento de formulações para liberação ocular, oral e intravenosa das nanoemulsões apresenta grande potencial por reduzir os efeitos colaterais de vários

fármacos de grande potencia e promove um efeito farmacológico prolongado (YILMAZ E BORCHERT, 2006).

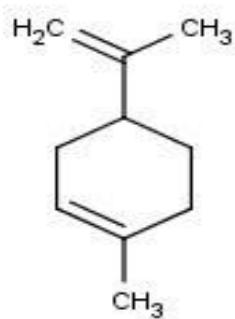
As nanoemulsões do tipo O/A apresentam desvantagens, como a instabilidade física que pode ser provocada pela incorporação do fármaco no sistema ou pelo simples fato de alguns lipídeos demonstrarem solubilidade insuficiente para fármacos de possível interesse para incorporação em emulsões (MÜLLER et al., 2000). A formação de um anel esbranquiçado ou um filme de óleo em torno da superfície do recipiente é a manifestação mais comum de deterioração das nanoemulsões, sendo resultado de vários mecanismos físico-químicos que ocorrem no interior da emulsão. Assim, é de extrema importância compreender os fatores de maior impacto na formação de emulsões, e determinando também a influencia de composição do sistema na sua estabilidade (RAO E MCCLEMENTS, 2012).

### 3.4. O ALCOOL PERÍLICO – POH

Novas drogas quimioterápicas têm sido desenvolvidas, sendo a maioria originada de fontes naturais, como os vegetais. Os terpenos são exemplos de tais compostos com propriedades antimitóticas de grande interesse médico (FERNANDES et al., 2005; BELANGER, 1998). Esses hidrocarbonetos são classificados de acordo com o numero de unidades isoprénicas formadas em: hemiterpenos (C5, 1 unidade isoprénica), Monoterpenos (C10, 2 unidades isoprénicas), sesquiterpenos (C15, 3 unidades isoprénicas), diterpenos (C20, 4 unidades isoprénicas) e politerpenos (C5)n (MCGARVEY E CROTEAU, 2005).

Monoterpenos tendem a ser altamente voláteis e frequentemente constituem os componentes primários de óleos essenciais, a fragrância principal das plantas. Óleos essenciais são utilizados como perfumes e aromatizantes para cosméticos, alimentos e medicamentos (BOIK, 2001). O limoneno é um monoterpeno monocíclico presente em cascas de frutos cítricos, principalmente de limão e laranja. Esta substancia de baixa toxicidade possui atividade quimiopreventiva e quimioterapeutica contra vários tipos de tumores, devido a sua capacidade de inibir a sua isoprenilação pós-traumática de GTPase, incluindo membros da família Ras (GELB, et al., 1995; HOLSTEIN E HOLL, 2003; NAKADA, et al., 2007).

A alta dose de limoneno (100mg/kg/dia) necessária para os efeitos benéficos têm limitado seu uso. Por esse motivo, outros monoterpenos passaram a ser investigados, principalmente seus metabólitos álcool perílico (POH) (Figura 3) e ácido perílico (PA). Em humanos aproximadamente 40% do limoneno é metabolizado a PA.



**Figura 3.** Estrutura química do álcool perílico (POH)

O POH também é inibidor da isoprenilação da proteína Ras, atuando desta forma, no controle da proliferação celular (HOLSTEIN E HOHL, 2003) na ativação das vias pós-apoptóticas e bloqueando o ciclo celular de diferentes células tumorais *in vitro* (XU, et al., 2004; FERNANDES, et al., 2005; YERUVA, et al., 2007).

O POH também é encontrado em óleos essenciais de limão, lavanda, hortelã, salvia, sementes de aipo, bergamota selvagem, gengibre e cerejas, por possuir uma atividade antitumoral mais potente, é considerado como uma substâncias com potencial atividade regressora de diferentes tumores, incluindo mamários, pancreáticos e cerebrais (YURI, et al., 2004; DA FONSECA, et al., 2006<sup>a</sup>, 2006b e 2007; MATOS, et al., 2008). Apresenta também efeito radiosensibilizador (RAJESH et al., 2003) e significante inibição angiogênica (LOUTRARI, et al., 2004). Já foram descritas diversas atividades antitumorais do POH e sua capacidade de bloquear o ciclo celular e causar apoptose em células leucêmicas (CLARK, et al., 2002), de tumor pulmonar (YERUVA et al., 2007) e adenocarcinoma (ELEGBEDE et al., 2003; WISERMAN, et al., 2007), ativar proteínas apoptóticas (CLARK, 2006), inibir metástase em células da glia (BALASSIANO, et al., 2002), inibir proliferação de células de câncer de pulmão (XU, et al., 2004), inibir migração (WAGNER, et al., 2002) e proliferação de células de tumor da mama (YURI, et al., 2004).

Em recente estudo, Salazar et al., (2014) observaram que a administração intranasal de POH ativa o sistema imune e brônquios de 80µg de POH por dia não houve sinais

clínicos da doença, tais como perda de peso, convulsões e diarreia. A análise morfológica dos tecidos indicou que não houve alterações nos tecidos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Amapá. A execução dos diversos protocolos experimentais foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, situado na Rodovia Juscelino Kubitscheck, Km-02 - Zerão – Macapá, AP- Brasil.

### **4.2. OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO.**

A NPOH foi obtida e gentilmente cedida pelo Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica do Departamento de Ciências Biológicas da Saúde da Universidade Federal do Amapá.

#### **4.2.1. Preparação das nanoemulsões**

As nanoemulsões foram obtidas por método de baixo aporte de energia (OSTERTAG et al, 2012) usando 90 % (p/p) de agua destilada, 5 % (p/p) de álcool perílico e 2,2 % (p/p) de polissorbato 80 mais 2,8% (p/p) de monoleato de sorbitano, variando a massa final em 50 g. O óleo essencial e o tensoativo foram agitados a 800 rpm em agitador magnético por 30 minutos. A água foi adicionada, em um fluxo de 3.5 mL/min. A mistura foi agitada a 800 rpm por 60 min. As nanoemulsões obtidas foram armazenadas em local com temperatura adequada ( $20\pm2$  °C).

## **4.3. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA**

### **4.3.1. Animais experimentais**

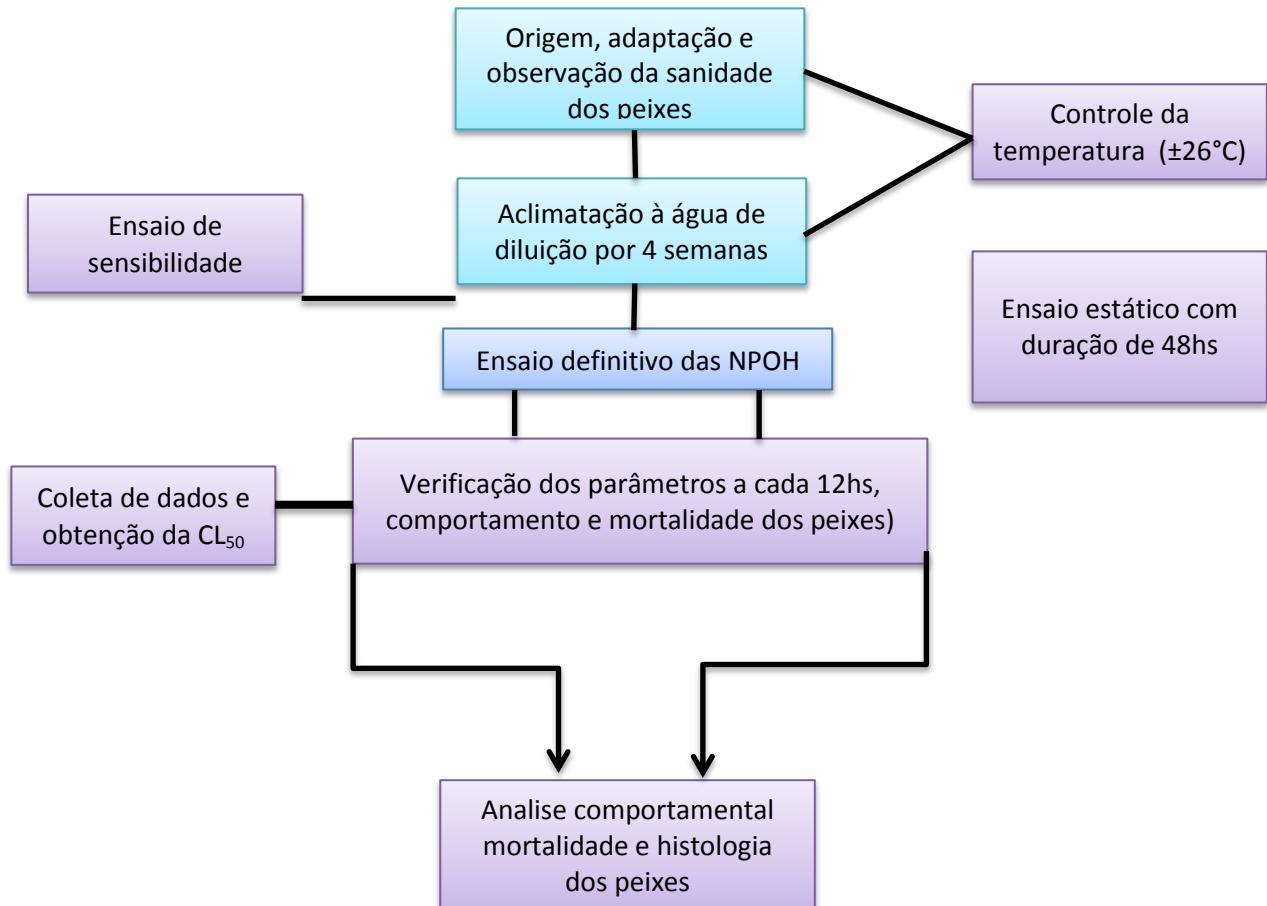
Os animais foram adquiridos da empresa Acqua New Aquários e Peixes LTDA ME situada em Itagassu – PE, sob o protocolo de autorização de uso nº 526140011289802 de 07 de maio de 2014, com registro no IBAMA nº 82957, sendo transportado por via aérea até a cidade de Macapá pela empresa Gollog serviços de cargas aéreas, protocolo de envio nº 12700094619755.

#### **4.3.2. Avaliação dos parâmetros comportamentais em condições ambientais normais**

Para realização deste estudo, foram utilizados 90 animais, tanto para análise comportamental como para análise histológica. Para todos os estudos foram utilizados animais adultos (12 a 14 meses). Os *D. rerio* foram mantidos no Anexo I do laboratório de Pesquisa em Fármacos na temperatura de  $26 \pm 10^{\circ}\text{C}$  e 10 - h claro / 14 -h escuro. Foi utilizada água normalizada (ISSO 1996) para a manutenção dos *D. rerio* adultos. Para a produção de água padronizada, foi preparada a partir de água desionizada e os seguintes sais foram adicionados:  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (117,6 mg/L),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (49.3 mg/L),  $\text{NaHCO}_3$  (25.9 mg/L) e cloreto de potássio (2,3 mg/L) (Sigma Aldrich).

A água do tanque mãe era constituída por água desmineralizada misturada com água não clorada (16:1), adicionada de NaCl a uma condutividade de cerca de 275  $\mu\text{S}$  (132 mg  $\text{L}^{-1}$ ), o que é ótimo para o zebrafish de acordo com Nusselin-Volhard e Dahm (2000), e também previne o crescimento de fungos. As concentrações (em mg  $\text{L}^{-1}$ ) dos íons predominantes na água do tanque mãe são:  $\text{SO}_{42}^-$  - 4.25,  $\text{Na}^+$  43.19,  $\text{NO}_3^-$ -0.09,  $\text{Mg}_2^+$  0.75,  $\text{K}^+$  0.21,  $\text{Cl}^-$  63.93,  $\text{Ca}_2^+$  5.31, e  $\text{HCO}_3^-$  19.31, total de  $\sim 137 \text{ mg L}^{-1}$ . O fotoperíodo foi de 10:14 (luz: escuro), onde o período de luz foi iniciado no nascer do sol artificial. O nascer do sol foi feito aumentando gradualmente a tensão da lâmpada luminosa fraca por 10 minutos antes da intensidade luminosa rosa na sala. Os aquários eram iluminadas com 95-105 Lux a partir de uma fonte de luz artificial.

Os *D. rerio* adulto foram alimentados com ração comercial duas vezes ao dia. Os animais foram tratados de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de experimentação. O comportamento dos peixes foi avaliado por um observador humano e filmado, após 0, 3, 6, 12, 24, 27, 30, e 48 horas.



**Figura 4** Fluxograma com o resumo da metodologia experimental.

#### 4.3.3. Determinação da CL<sub>50</sub>

Em um béquer de vidro de 1L a NPOH foi diluída em diferentes concentrações (25, 35, 50, 125µg/L de NPOH e 125µg/L de Tensoativo) para obtenção da concentração letal média (CL<sub>50</sub>), sendo que este teste foi realizado em triplicata (FIGURA 5), utilizando-se assim, 15 animais para cada concentração e os peixes permaneceram em contato com a solução por 48hs. Nesse período os animais foram observados e as alterações comportamentais e mortalidade foram registradas.

Os *D. rerio* ficaram em jejum por 24 horas antes do experimento, de modo a manter constantes as concentrações de exposição, uma vez que a nanoemulsão pode aderir às partículas de alimentos e fezes (LEAD; WILKINSON, 2006).



**Figura 5** Exposição aguda do *D. rerio* as diferentes concentrações da NPOH.  
**Fonte:** Própria.

#### 4.3.4. Avaliação dos parâmetros comportamentais

A análise comportamental foi realizada através da exposição de 5 peixes (triplicata n=15) em cada bêquer contendo as soluções testadas durante 48h. Nesse período foi observado o comportamento do peixe após a aplicação da NPOH, avaliado por um observador humano e filmado, após 0, 3, 6, 12, 24, 27, 30, e 48 horas da exposição às nanoemulsão e tratamento com a solução controle. As reações comportamentais foram caracterizadas em estágios:

- ✓ Estágio I: 1) aumento na atividade do nado e 2) tremores no eixo da cauda;
- ✓ Estágio II: 1) Nado Circular e 2) Perda da postura
- ✓ Estágio III: 1)Perda da motilidade; 2) Deposição do animal no fundo do aquário e 3) Morte.

#### 4.3.5. Monitoramento da mortalidade

A mortalidade foi monitorizada continuamente, e o peixe foi considerado morto quando o movimento do opérculo e resposta a estímulos mecânicos já não puderam ser detectados. Após o término do experimento, os peixes restantes foram submetidos à eutanásia em água gelada.

#### **4.3.6. Avaliação dos parâmetros histológicos**

Para avaliação histológica, os órgãos (brânquias, fígado e rins) foram fixados em solução de Bowin por 24hs. Os peixes fixados tiveram as nadadeiras removidas e a calda seccionada na linha que vai do ânus até a porção posterior da nadadeira dorsal, este procedimento reduz o tamanho dos blocos, o que facilitou a microtomia. Após a fixação, as peças foram descalcificadas em solução de EDTA a 7% por 48hs. As metades foram desidratadas em uma bateria de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (em lentilhas, marca Inlab), como se segue:

**Desidratação:**

- Álcool 70% (1h)
- Álcool 80% (1h)
- Álcool 90% (1h)
- Álcool 100% I (1h)
- Álcool 100% II (1h)

**Diafanização:**

- Xilol I (40')
- Xilol II (40')

**Impregnação:**

- Parafina I (1h)
- Parafina II (2hs)

**Inclusão:**

- Parafina Pura

Após o blocos foram cortados longitudinalmente em micrótomo rotativo (Slee Medical) com navalhas descartáveis (Slee) na espessura de 5 $\mu$ m. Para a realização dos cortes os peixes foram posicionados em decúbito lateral. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro para microscopia óptica, as quais foram deixadas por 25 minutos em estufa a 50°C para a secagem e melhor aderência do material.

O material foi corado em HE (hematoxilina de Harris-LABORCLIN e eosina amarelada-INLAB), de acordo com o seguinte protocolo:

- Xilol 100% (10')
- Álcool 100% I (3')
- Álcool 100% II (3')
- Álcool 95% (3')
- Álcool 80% (3')
- Álcool 70% (3')
- Agua destilada (apenas colocar e tirar)
- Hematoxilina (3')
- Agua destilada (5')
- Eosina (6')
- Agua destilada (apenas colocar e tirar)
- Álcool 70% (10'')
- Álcool 80% (10'')
- Álcool 90% (10'')
- Álcool 100% II (10'')
- Álcool 100% I (1')
- Xilol 100% (1')
- Montagem c/ bálsamo do Canadá

A figura 6 mostra algumas etapas da preparação histológica do *D. rerio*.



**Figura 6** Etapas para preparação histológica dos órgãos do *D. rerio*.

**Fonte:** Própria.

Para a análise dos órgãos dos peixes submetidos aos testes de toxicidade ( $N = 15$  peixes por concentração), foram preparadas de 4 lâminas por peixe, com cada lâmina contendo de 4 a 6 cortes. Os cortes foram realizados “de dentro para fora” do peixe, ou seja, como os peixes foram incluídos em metades, foi possível iniciar os cortes da espinha dorsal em direção à pele. Esse procedimento, além de diminuir o desgaste da peça, evita danos à navalha causados por escamas que eventualmente não são descalcificadas.

As lâminas foram observadas em microscópios ópticos marcas Olympus-micronal BX41 e fotografadas com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital).

#### **4.3.7. Método de análise do material preparado**

Para a análise das lâminas foi considerada uma série de alterações histopatológicas nas brânquias, rins e fígado, conforme mostram as tabelas 5, 6 e 7, que foram classificadas em ordem de gravidade e as ocorrências foram registradas. Isso possibilitou a aplicação de dois índices para a avaliação das alterações. Um deles é o VMA (valor médio de avaliação), proposto por Schwaiger et al. (1997), calculado a partir de uma análise semiquantitativa baseada em uma escala de severidade e ocorrência das lesões:

grau 1 = sem alterações patológicas;

grau 2 = alterações pontuais brandas a moderadas;

grau 3 = alterações patológicas severas e amplamente distribuídas.

Estes valores foram determinados separadamente para cada órgão de cada animal e a média e o erro padrão entre os peixes de cada local foram calculados. O outro índice utilizado foi o IAH (índice de alterações histológicas) utilizado por Poleksic; Mitrovic-Tutundzic (1994) na avaliação de efeitos crônicos da poluição nas brânquias de três espécies de peixes ciprinideos. Este índice foi baseado em uma lista de lesões branquiais, sendo cada tipo de lesão classificado, conforme a severidade, em estágios I, II e III.

De acordo com os autores, os estágios foram assim descritos:

Estágio I: Alterações que não comprometem o funcionamento do tecido.

Estágio II: Alterações mais severas que comprometem o funcionamento normal do órgão.

Estágio III: Alterações muito severas e irreversíveis.

A partir dessa classificação das lesões em estágios, os autores assumiram empiricamente que a cinética das alterações tem um crescimento exponencial. Então:

- a) para o primeiro estágio:  $10^0$
- b) para o segundo estágio:  $10^1$
- c) para o terceiro estágio:  $10^2$

Assim, os índices foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^{na} a_i + 10 \sum_{i=1}^{nb} b_i + 10^2 \sum_{i=1}^{nc} c_i}{N}$$

Sendo:

a: primeiro estágio de alterações.

b: segundo estágio de alterações.

c: terceiro estágio de alterações.

na: número total de alterações consideradas como sendo do primeiro estágio.

nb: número total de alterações consideradas como sendo do segundo estágio.

nc: número total de alterações consideradas como sendo do terceiro estágio.

N: número de peixes analisados por tratamento.

No presente trabalho, esta equação foi utilizada para calcular o índice de alterações não só nas brânquias, mas também nos rins e fígado. Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994) estabeleceram, ainda, as seguintes relações entre os valores de/e os efeitos nas brânquias. No presente trabalho essas relações foram extrapoladas para os rins e o fígado. Então, de maneira geral, as relações ficaram assim estabelecidas:

<b>Valores de</b>	<b>Efeitos</b>
0-10	órgão funcionalmente normal
11-20	órgão com alterações de leves a moderadas
21-50	órgão com alterações de moderadas a graves
>100	órgão com danos irreversíveis

**Tabela 1.** Alterações histológicas consideradas na análise das branquiais de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações da NPOH.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
<b>a) Hipertrofia e hiperplasia do tecido respiratório</b>	
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I
Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
<b>b) Alterações nas células mucosas e cloreto</b>	
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células cloreto	I
Presença de células cloreto nas lamelas secundárias	I
<b>c) Alterações nos vasos sanguíneos lamelares</b>	
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	I
Aneurisma lamelar	II
<b>d) Estágio terminal</b>	
Fibrose	III
Necrose	III
<b>e) Parasitas branquiais</b>	
Presença de parasitas	I

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994).

**Tabela 2.** Alterações histológicas consideradas na análise do fígado de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações da NPOH

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
a) Alterações nos hepatócitos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento do volume celular	I
Aumento do volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização nuclear	II
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	I
Estagnação biliar	I
b) Alterações nos vasos sanguíneos	
Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Aumento do volume relativo dos vasos	I
c) Alterações nos canalículos biliares	
Degeneração dos canalículos biliares	II
d) Estágio terminal	
Necrose (focal ou total)	III

. O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Rigolin-Sá (1998).

**Tabela 3.** Alterações histológicas consideradas na análise do rim de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações da NPOH.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
a) Alterações no tecido linfoide	
Perda do contorno celular ou contorno celular atípico	I
b) Alterações nos glomérulos e túbulos renais	
Degeneração hialina tubular leve	I
Degeneração hialina tubular severa	II
Hipertrofia das células tubulares	I
Desorganização tubular	I
Desorganização glomerular	I
Degeneração tubular	II
Degeneração glomerular	II
Aumento do espaço da cápsula de Bowman	I
Diminuição do espaço da cápsula de Bowman	I
Dilatação dos capilares glomerulares	I
Degeneração citoplasmática das células tubulares	II
Degeneração nuclear das células tubulares	II
Presença de túbulos em regeneração ou de “novos néfrons”	I
Obstrução tubular	I
Aumento do lúmen tubular	I
Presença de tecido linfoide na cápsula de Bowman	II
Diminuição da frequência relativa de glomérulos	I
c) Alterações nos vasos sanguíneos	
Dilatação dos vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura dos vasos sanguíneos	II
d) Estágio terminal	
Necrose	III

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Rigolin-Sá (1998) e em alterações descritas por Takashima & Hibiya (1995).

#### **4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os valores da CL<sub>50</sub> mais seus intervalos de confiança de 95% foram calculados pela análise de probitos utilizando o Software GraphPad Prism versão 5.0. Para análise dos dados histológicos aplicou-se ANOVA (one-way) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos testes e controle. Os dados foram expressos como média ± o erro padrão médio. Resultados com p < 0.05, p<0,01 e p<0,001 foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

A submissão via imersão do *D. rerio* às diferentes concentrações da NPOH desencadearam expressivas alterações comportamentais nos peixes e foram classificadas em estágio I, II e III (Tabela 4). Ribeiro (2013) também classificou as alterações comportamentais do *D. rerio* em estágios I, II e III ao expor esses organismos ao extrato etanólico de *Spilanthes acmella* (Jambú) e observou que essas alterações iniciam com o aumento da excitabilidade do animal que culminam com perda de postura, deposição do animal no fundo do bêquer até a morte.

Durante a exposição à NPOH o comportamento dos peixes foi filmado durante 2 minutos a cada hora de observação. A ação tóxica da NPOH foi relativamente rápida, com sinais de estresse aparecendo desde o momento da exposição. Na concentração mais elevada da NPOH ( $>50\mu\text{g/L}$ ), os sinais de estresse observados foram; aumento na atividade do nado, seguido pela perda de postura, perda de motilidade, dai por diante ocorreu à respiração superficial e finalmente o peixe ficou parado no fundo do bêquer até que o movimento do opérculo não pode mais ser observado caracterizando assim a morte (4 minutos após a exposição).

Bilberg et al., (2012) ao avaliar a toxicidade de nanopartículas de prata sobre os parâmetros comportamentais do *D. rerio*, também observou que, as altas concentrações ( $>70\mu\text{g/L}$ ) causam significativas alterações comportamentais nesses organismos, que culminaram na morte.

Nas concentrações de  $25\mu\text{g/L}$  e  $35\mu\text{g/L}$  da NPOH, as alterações mais frequentes foram de estágio II e III e 33hs após a exposição já não foram registrados alterações comportamentais para os peixes expostos a concentração de  $25\mu\text{g/L}$ . Não foram observadas alterações comportamentais nos peixes expostos a concentração de  $125\mu\text{g/L}$  de tensoativo em nenhuma hora após a exposição.

A atividade natatória é dentre as alterações comportamentais a mais importante, pois é um indicador que integra o status interno do animal (LITTLE et al., 1993). Segundo Schreck et al. (1997) a exposição do peixe a uma situação de estresse, acarreta no seu primeiro mecanismo de defesa que na maioria das vezes, é o comportamento de fuga, na

tentativa de diminuir a probabilidade de morte, ou então, pode ocorrer um comportamento de economia do gasto metabólico para manter a homeostasia fisiológica.

**Tabela 4.** Alterações comportamentais das diferentes concentrações da NPOH e controle sobre o *D. rerio* nas diferentes horas de observação.

Alterações comportamentais das diferentes concentrações da NPOH e controle sobre *D. rerio*.

		25 µg/L de NPOH	35 µg/L de NPOH	50 µg/L de NPOH	125µg/L de NPOH	125µg/L de Tensoativo
Estágio I	0'	1 e 2	1	1 e 2	1 e 2	1
Estágio II	0'	2	2	1 e 2	1 e 2	
Estágio III	0'	1 e 2	1 e 2	1 e 2	1, 2 e 3	
Estágio I	3hs	2				
Estágio II	3hs	2	2	2		
Estágio III	3hs	1 e 2	1 e 2	1, 2 e 3		
Estágio I	9hs					
Estágio II	9hs	2	2			
Estágio III	9hs	1 e 2	1 e 2			
Estágio I	24hs					
Estágio II	24hs	1 e 2	2			
Estágio III	24hs	3	1 e 2			
Estágio I	27hs					
Estágio II	27hs	2	2			
Estágio III	27hs	2	1 e 2			
Estágio I	33hs					
Estágio II	33hs		2			
Estágio III	33hs		1, 2 e 3			
Estágio I	48hs					
Estágio II	48hs		2			
Estágio III	48hs		1, 2 e 3			

Estágio I: 1) aumento na atividade do nado e 2) tremores no eixo da cauda; Estágio II: 1) Nado Circular e 2) Perda da postura; Estágio III: 1) Perda da motilidade; 2) Deposição do animal no fundo do aquário e 3) Morte.

### 5.3. DETERMINAÇÃO DA CL<sub>50</sub>

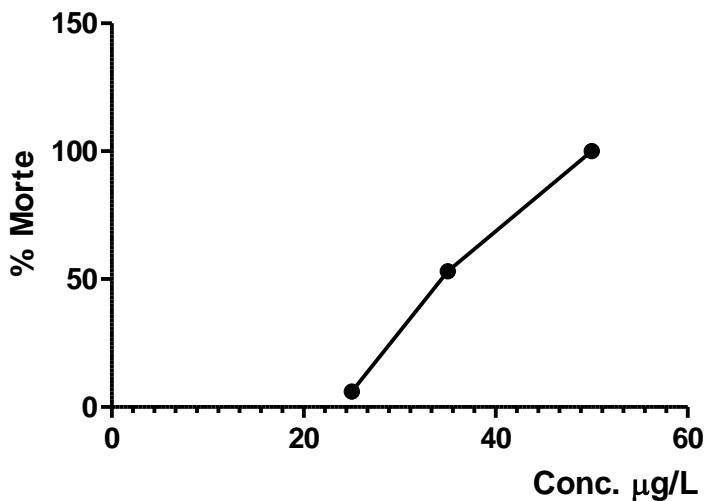
A tabela 5 mostra o percentual de animais mortos pelas diferentes concentrações da NPOH. Tais resultados mostraram susceptibilidade crescente do *D. rerio* a diferentes concentrações de exposição, sendo que nas altas concentrações ( $>50\mu\text{g}/\text{L}$ ) a letalidade chegou a 100%. Segundo Bilberg et al., (2012) a medida que se aumenta a concentração de nanoformulações a mortalidade dos peixes também aumenta.

Foi observado ainda que os à concentração de  $25\mu\text{g}/\text{L}$  da NPOH não produziu efeito visível sobre os animais, expressando a mortalidade em apenas um peixe. Griffitt et al., (2010) ao avaliar a toxicidade de nanopartículas de alumínio, observaram que a concentração de  $12,5\mu\text{g}/\text{L}$  não causou mortalidade em *D. rerio*, indicando que concentrações menores que  $25\mu\text{g}/\text{L}$  não causam mortalidade em *D. rerio*. Não houve registro de mortalidade no grupo de  $125\mu\text{g}/\text{L}$  de tensoativo.

**Tabela 5** Número e porcentagem de animais mortos pelas diferentes concentrações da NPOH sobre o *D. rerio*.

Concentração	sobre <i>D. rerio</i>				
	$25\mu\text{g}/\text{L}$	$35\mu\text{g}/\text{L}$	$50\mu\text{g}/\text{L}$	$125\mu\text{g}/\text{L}$	$125\mu\text{g}/\text{L}$ de Tensoativo
Numero de animais mortos	1	8	15	15	0
Porcentagem	6%	53%	100%	100%	0%

Para determinação da dose letal media (CL<sub>50-48hs</sub>), foram plotados no gráfico da figura 7 a percentagem de animais mortos para apenas três das concentrações de exposição (25, 35 e  $50\mu\text{g}/\text{L}$ ), já que a concentração de  $125\mu\text{g}/\text{L}$  também foi letal a 100% dos peixes, a mesma não foi incluída. Assim, a CL<sub>50</sub> foi de  $34,3\mu\text{g}/\text{L}$ . Chae, et al., (1999) ao avaliaram a toxicidade de nanopartículas prata em ensaios de 96hs encontrou o valor da CL<sub>50</sub> de  $34,6\mu\text{g}/\text{L}$ -1, semelhante ao valor da CL<sub>50</sub> do NPOH.



**Figura 7.** Efeito da administração das diferentes concentrações da NPOH em solução (25µg/L, 35µg/L, 50µg/L e 125µg/L) sobre zebrafish. n = 15/grupo, CL<sub>50</sub> = 34,3µg/L.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS HISTOLÓGICOS (BRANQUIAS).

O *D. rerio* possuem, em cada lado da faringe, conforme já descrito para a maioria dos teleósteos, 4 arcos branquiais, cada um com duas fileiras de filamentos, os quais contêm, de ambos os lados, as lamelas secundárias. A figura 8a demonstra, trechos de um filamento branquial de *D. rerio*. É um órgão bilateral, situado fora da cavidade opercular e apresenta aparência glandular pelo fato dos filamentos branquiais estarem completamente "aglutinados" por um tecido glandular (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Sendo caracterizado como locais potenciais na absorção de agentes tóxicos presentes na água, as brânquias são consideradas como órgão de dominância na tomada de substâncias da água, devido a características como a grande superfície de absorção, a pequena distância de difusão e o grande fluxo contracorrente entre água e sangue (BARRON in HOFFMAN et al., 1995).

No tecido branquial do *D. rerio*, as alterações histológicas mais frequentes estão apresentadas na tabela 6. As alterações consideradas como de primeiro estágio foram: a hipertrofia do epitélio respiratório (Fig 8c) hiperplasia das células epiteliais (Fig 8b), células de cloreto nas lamelas secundárias e dilatação dos capilares.

Rigolin-Sá (1998) afirma que a hipertrofia do epitélio respiratório, bem como a hiperplasia e outras alterações, é um mecanismo de defesa das brânquias promovendo o aumento da barreira água e sangue que reduz e até mesmo impede a passagem de água

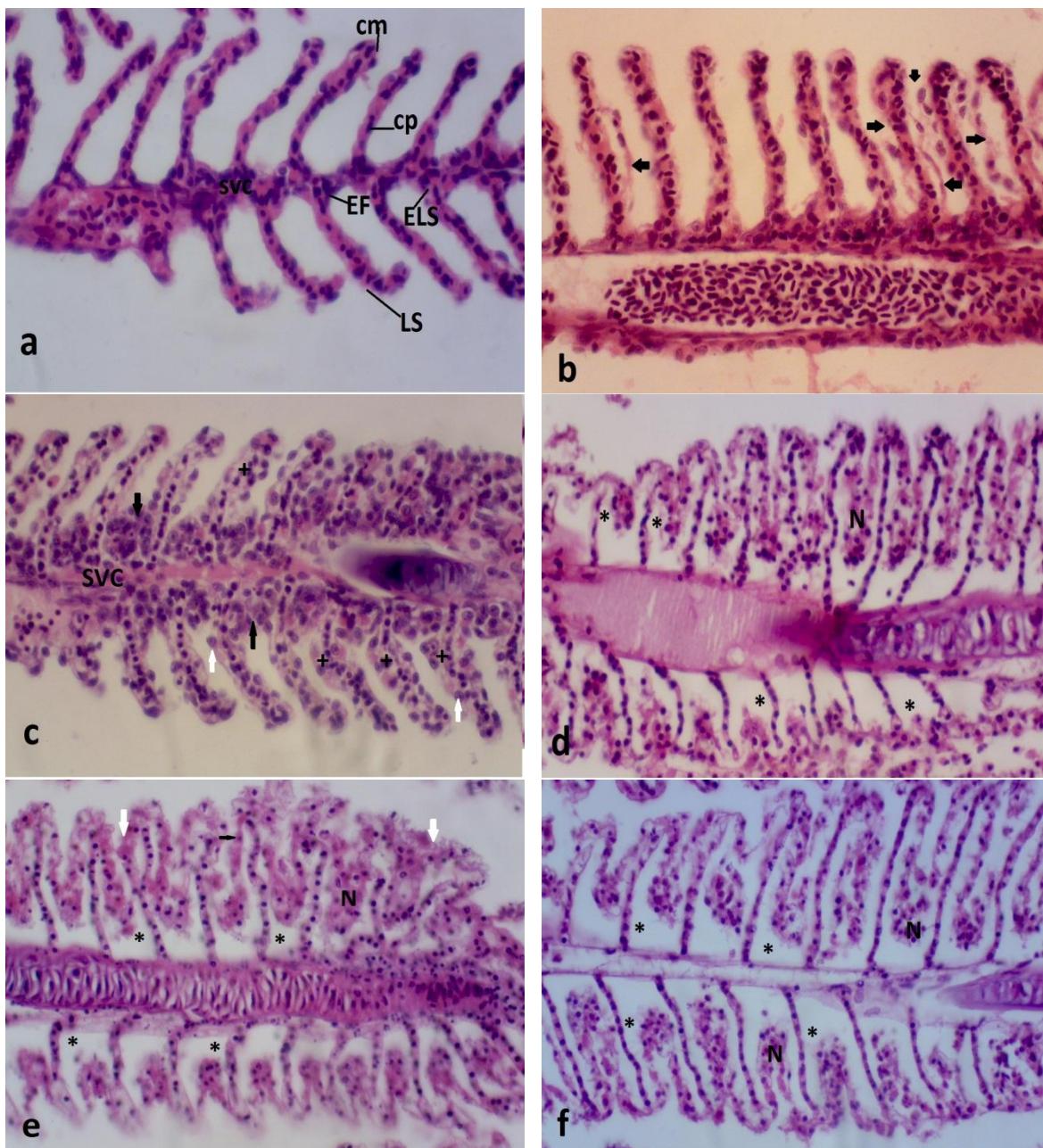
entre as lamelas secundárias podendo resultar ou não na fusão dessas lamelas e causando uma perda da superfície respiratória que pode levar a morte por anoxia (RAND; PETROCELLI, 1985; RUDNICKI 2004). A fusão das lamelas secundárias será parcial se a hiperplasia se restringir à base ou somente a uma porção dessas lamelas, conforme observado com frequência nas concentrações de 35 e 50 $\mu$ g/L da NPOH, porém, se a hiperplasia estiver presente ao longo dos filamentos a fusão será total, considerando que as células hiperplásicas preenchem todo espaço interlamelar. Em casos extremos de hiperplasia segundo Meletti (2003) a fusão das lamelas pode ocorrer em todo o filamento branquial, situação não observada em nenhuma das concentrações de exposição.

O deslocamento total do epitélio das lamelas secundárias foi observado com maior intensidade nos indivíduos expostos as concentrações de 50, 35 e 25 $\mu$ g/L da NPOH (Fig. 8d, 8e, 8f), sendo considerada por muitos autores como uma das primeiras alterações observadas nas brânquias de peixes expostos a agentes tóxicos (HEATH, 1987; MULLER; LLOYD 1994; RIGOLIN-SÁ 1998).

Segundo Meletti (2003), as células mucosas e as células de cloreto podem se tornar hiperplásicas e/ou hipertróficas em função de agentes tóxicos presentes na água. A presença das células de cloreto e células mucosas nos peixes expostos as concentrações da NPOH e do tensoativo se deu em todos os grupos. No entanto foi registrada menor proporção no grupo de 125 $\mu$ g/L do tensoativo (Tabela 6).

A ocorrência de dilatação dos capilares das lamelas secundárias foi frequentemente acompanhada de congestão vascular, caracterizada pela estagnação do sangue. Esse tipo de alteração é raramente observado em condições normais, a presença de muitos eritrócitos pode ocasionar o aparecimento de aneurisma ou até mesmo hemorragia causada pela ruptura epitelial e extravasamento de sangue (MELETTI, 2003). A presença de aneurisma foi observada com mais frequência na concentração de 35 $\mu$ g/L da NPOH.

Foram ainda observadas neste estudo, as alterações regressivas, que são causadas pela hipofunção de células e tecidos, envolvendo degeneração e necrose. Segundo Takashima; Hibyia (1995), muitos agentes patológicos podem levar a edemas epiteliais, vacuolização e necrose nas lamelas secundárias. O prejuízo ao fluxo sanguíneo das alterações observadas no tecido branquial compromete a função primordial das brânquias de realizarem as trocas gasosas (MELETTI, 2003).



**Figura 8.** Imagens de filamentos branquiais de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de exposição da NPOH. a) Filamento branquial normal em corte longitudinal de *D. rerio*. cm - canal marginal; cp - célula pilar; EF - epitélio estratificado do filamento; ELS - epitélio pavimentoso das lamelas secundárias; LS - lamela secundária; SVC - seio venoso central; b) Filamento branquial em corte longitudinal de *D. rerio* expostos a 125 µg/L do Tensoativo. Observar o desprendimento do epitélio respiratório das lamelas (setas); c) Filamento branquial em corte longitudinal de *D. rerio* expostos a 125 µg/L NPOH. Observar hipertrofia das células epiteliais (+), hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias (setas preta) e presença de células de cloreto (setas branca). Detalhe no seio venoso central (SVC); d) Filamento branquial em corte longitudinal de *D. rerio* expostos a 50 µg/L NPOH. Observar o deslocamento total do epitélio respiratório (\*) e Necrose das células do epitélio respiratório (N); e) Filamento branquial em corte longitudinal de *D. rerio* expostos a 35 µg/L NPOH. Observar deslocamento das células do epitélio lamelar (\*), Secreção de muco (setas branca), degeneração das células do epitélio lamelar (Setas preta) e Necrose (N). f) Filamento branquial em corte longitudinal de *D. rerio* expostos a 25 µg/L NPOH.

Observar o deslocamento total do epitélio respiratório (\*) e Necrose das células do epitélio respiratório (N). (HE, 5 µm);

**Tabela 6:** Ocorrência das alterações branquiais nos grupos expostos as diferentes concentrações da NPOH.

Alteração	Estágio	125µg/L Tensoativo	25µg/L de NPOH	35µg/L de NPOH	50µg/L de NPOH	125µg/L de NPOH
HTCE	I	86,6	100	100	100	100
AdE	I	6,6	0	0	0	0
D-ELS	I	80	100	100	93,3	40
HPBLS	I	73,3	80	100	93,3	100
HPLS	I	13,3	53,3	33,3	40	33,3
FPLS	I	33,3	80	93,3	93,3	33,3
LeuELS	I	0	0	6,6	6,6	0
HP/HTCM	I	6,6	80	93,3	86,6	60
HP/HTCC	I	20	93,3	100	93,3	86,6
CCLS	I	66,6	93,3	100	93,3	86,6
MuLS	I	66,6	93,3	93,3	86,6	73,3
DiC	I	66,6	93,3	93,3	93,3	93,3
DeC	I	80	93,3	93,3	93,3	93,3
CV	I	73,3	100	80	80	6,6
Par	I	0	0	0	0	0
FCalgLS	I	20	53,3	46,6	26,6	13,3
FCtodLS	II	0	0	0	0	0
DC	II	0	100	86,6	80	0
RE	II	20	80	73,3	60	20
Hem	II	0	0	6,6	0	0
Na	II	6,6	33,3	4,0	33,3	0
Fib	III	0	0	0	0	0
Nec	III	0	100	93,3	93,3	20

Os números representam, em porcentagens, o numero de peixe que apresentou dano, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). HTCE=hipertrofia das células epiteliais; AdE=adegamento do epitélio; D-ELS=Deslocamento ou elevação do epitélio da lamela secundária (LS); HPBLS: hiperplasia na base das LS.; HPLS=hiperplasia ao longo das LS.; LeuELS= presença de leucócitos; HP/HTCM=hiperplasia/trofia das céls. mucosas; HP/HTCC= hiperplasia/trofia das céls. cloreto; CCLS=céls cloreto nas LS; MuLS=presença de muco entre as LS; DiC=dilatação de capilares; DeC=desorganização de capilares; CV=congestão vascular; Par=presença de parasitas; FCalgLS=fusão completa de algumas LS; FCtodLS=fusão completa de toas as LS; DC=degeneração celular; RE=ruptura epitelial; Hem=hemorragia; An=aneurisma; Fib=fibrose; Nec=necrose.

Como é possível observar na tabela 7 e figura 9 (a, b, c), as concentrações da NPOH (25, 35 e 50µg/L) causaram alterações significativas sobre as brânquias do *D. rerio* quando comparadas com a concentração de exposição do tensoativo (125µg/L), só não houve significância quando comparado com a concentração de 125µg/L da NPOH apresentando  $p>0,05$  (Anova, teste Tukey-Kramer). Quando comparados os IAH da NPOH entre si, foi possível observar que a concentração de 25µg/L com  $p<0,05$  e  $p<0,001$  (Fig. 9

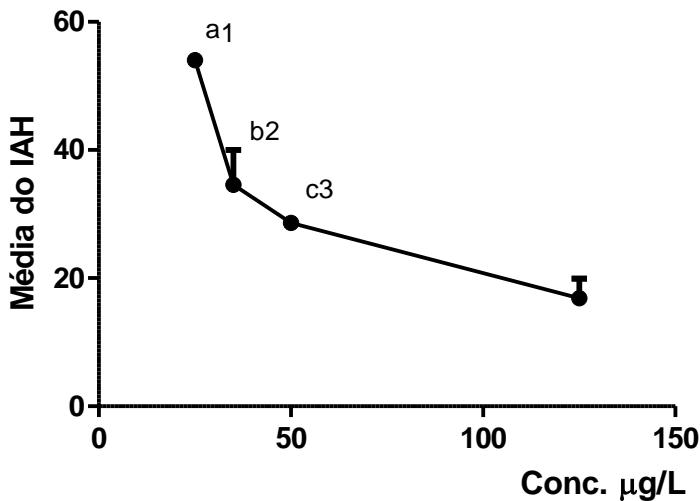
a1) causou maior dano ao tecido branquial, seguido pela concentração de 35 $\mu$ g/L com  $p<0,001$  (Fig. 9 b2). Nesse sentido, é possível afirmar que, as menores concentrações da NPOH tiveram maior IAH pelo tempo de exposição que foi maior que as demais concentrações ( $>50\mu$ g/L). Assim, esse estudo corrobora com o realizado por Federici, et al., (2007) que avaliou a toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio nas brânquias de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*): em que foi possível observar significativas no tecido branquial.

Apenas a concentração de exposição do tensoativo (125 $\mu$ g/L) apresentou órgão funcionalmente normal e sem alterações patológicas (grau I). A concentração da NPOH de 125 $\mu$ g/L apresentou órgão com alterações de leves a moderadas (grau II) e as concentrações da NPOH de 25, 35 e 50 $\mu$ g/L apresentaram órgão com alterações de moderadas a graves, amplamente distribuídas pelo órgão (grau III). Essa diferença estatística significativa quando comparada com o controle se deu principalmente pelo tempo em que o *D. rerio* ficou exposto a cada concentração. Assim, observa-se que as concentrações mais baixas ( $<35\mu$ g/L) foram mais tóxicas ao *D. rerio*, pois a maioria dos peixes sobreviveu até o final do experimento (48hs).

Diversos estudos mostram que os materiais na escala nanométrica podem produzir muitos efeitos tóxicos sobre as brânquias do *D. rerio*, e esse efeito tóxico está diretamente relacionado ao tamanho nanométrico desses materiais que podem causar diferentes alterações morfológicos pela fácil absorção (RAHMAN et al, 2002; OBERDORSTER, 2007; GRIFFITT, et al., 2007, 2008 e 2010).

**Tabela 7.** Média do Índice de alterações histológicas (IAH) das Brânquias de *D. rerio* para cada triplicata (N=5/T- N=15/grupo) nas concentrações de exposição a NPOH.

Triplicatas	Branco	125 $\mu$ g/L Tensoativo	25 $\mu$ g/L NPOH	35 $\mu$ g/L NPOH	50 $\mu$ g/L NPOH	125 $\mu$ g/L NPOH
<b>01</b>	0,0	8,8	53,8	44,6	28,4	10,9
<b>02</b>	0,0	4,6	54,2	30,8	28,6	20,6
<b>03</b>	0,0	4	54,2	26,6	28,8	19,4
<b>Média</b>	0,0	5,8	54	34,6	28,6	16,9
<b>Erro Médio Padrão</b>	$\pm 0,0$	$\pm 1,51$	$\pm 3,05$	$\pm 0,11$	$\pm 5,43$	$\pm 0,13$



**Figura 9.** Média do IAH a partir das alterações observadas nas brânquias de *D. rerio* expostas as concentrações da NPOH (25, 35, 50 e 125 $\mu\text{g/L}$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de  $n = 15/\text{grupo}$ . Anova seguida do teste Tukey-Kramer, a =  $p < 0.001$ , b =  $p < 0.001$ , e c =  $p < 0.01$  comparado com a concentração do tensoativo (125  $\mu\text{g/L}$ ), 1 =  $p < 0.05$  comparando 25 $\mu\text{g/L}$  com 50 $\mu\text{g/L}$  e  $p < 0.001$  comparando 25 $\mu\text{g/L}$  com 125 $\mu\text{g/L}$ ; 2 =  $p < 0.001$  35 $\mu\text{g/L}$  comparando com 125 $\mu\text{g/L}$  e 3 =  $p < 0.01$  comparando 50 $\mu\text{g/L}$  com 125 $\mu\text{g/L}$ .

## 5.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS (FÍGADO).

O fígado é considerado como o local mais importante na síntese e biotransformação, é também essencial a síntese de bile, armazenamento de lipídios e glicogênio, bem como a produção de vitelogenina e proteínas presentes na película que envolve o ovo (GOKSOYR; HUSOY, 1998).

O fígado de *D. rerio* possui hepatócitos com o aspecto típico descrito para a maioria dos vertebrados. Na tabela 8 encontra-se a ocorrência de alterações hepáticas nos peixes expostos as diferentes concentrações da NPOH.

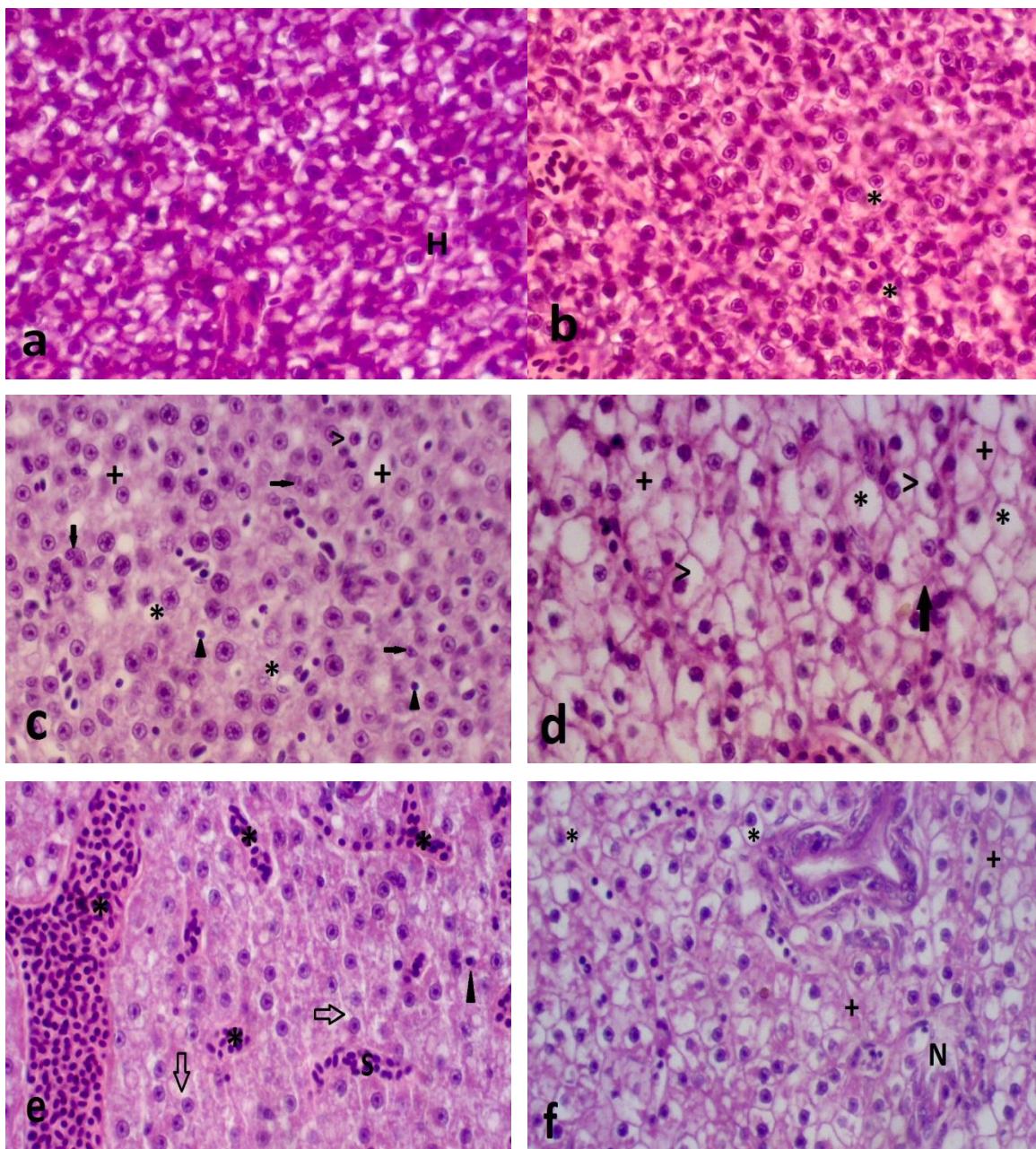
As alterações de Estágio I mais frequentes foram; desorganização dos cordões hepáticos, perda ou atipia do contorno dos hepatócitos, vacuolização citoplasmática (Fig 10b, 10c, 10d, 10f) e diminuição do glicogênio (Fig 10c, 10d). Segundo Meletti (2003), a vacuolização citoplasmática nos hepatócitos, pode ser uma medida indireta, porem não muito precisa da quantidade de glicogênio ou de lipídios nessas células. Rigolin-Sá (1998) chama a atenção para o fato de que a vacuolização pode ser devido a diminuição da concentração do glicogênio no fígado e aumento da quantidade de lipídios e que estes, por sua vez, podem se combinar com agentes tóxicos, os quais se acumulariam nos hepatócitos.

A estagnação biliar foi observada em maior proporção nas concentrações da NPOH. A bile estagnada aparece em grânulos que podem ser amarelos amarronzados ou verdes amarronzados dentro das células (TAKASHIMA; HIBYIA, 1995; PACHECO; SANTOS, 2002). Denominada como colestase, essa alteração é caracterizada como manifestação de uma condição patofisiológica, atribuída a falha do metabolismo ou da excreção de pigmentos biliares. É necessário que a bilirrubina seja solubilizada em água para ser excretada, isso ocorre somente por meio da conjugação do ácido glucurônico. Assim, se ocorrer uma diminuição na capacidade de ligação da bilirrubina a esse ácido pode ser a razão para a disfunção hepática (PACHECO; SANTOS, 2002).

A hiperemia (Fig. 10e), degeneração citoplasmática (Fig. 10c, 10e, 10f) e degeneração nuclear (fig. 10C) foram às alterações de estágio II mais frequentes e foram observadas nas concentrações de 50, 35 e 25 $\mu$ g/L. Takashima e Hibyia (1995) sugeriram que se realizem estudos mais aprofundados para elucidar se a alta vacuolização citoplasmática no fígado de *D. rerio* constitui uma alteração histológica negativa ou se é um evento que deve ser considerado como uma alteração associada com algum tipo de degeneração. A degeneração nuclear e rompimento celular nos hepatócitos demonstra o elevado grau de hepatotoxicidade a NPOH.

Quanto as alterações de estágio III, apareceram somente nas concentrações de exposição da NPOH com necrose focal e total do tecido hepático (Fig. 10c, 10d, 10e, 10f), sendo ausente na concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo (Fig. 10b). Segundo Castro et al., (2014) os agentes tóxicos provocam um aumento de reação inflamatória (infiltração de leucócitos) e de áreas de necrose. Poleksic; Karan (1999) observaram necrose nos hepatócitos de carpas e expõe a importância de estudos histopatológicos para analisar os danos causados por agentes tóxicos.

Sendo considerado como principal órgão de metabolização de drogas e com importante função de detoxificação, o fígado biotransforma e elimina muitos xenobióticos, principalmente na forma de conjugados, sem maiores consequências. No entanto, alguns são concentrados a níveis tóxicos, enquanto outros são bioativados a compostos intermediários reativos que podem lesar o fígado de diversas maneiras (KULKARNI, 1994 apud RABELO, 2008).



**Figura 10.** Imagens de fígado de *D. rerio* expostos as concentrações de exposição da NPOH. a) Fígado normal em corte longitudinal de *D. rerio*. Notar os hepatócitos (H); b) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo. Nota a vacuolização do citoplasma (\*); c) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L NPOH. Observar vacuolização citoplasmática (>), estagnação biliar (cabeça das setas), degeneração nuclear (setas pretas), degeneração do citoplasma (\*) e diminuição do glicogênio (+); d) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto à concentração de 50 $\mu$ g/L NPOH. Observe a intensa vacuolização do citoplasma (>), diminuição do glicogênio (+), atipia do contorno celular (setas), e diminuição na frequência relativa de núcleos; e) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 35 $\mu$ g/L NPOH. Observe a degeneração do citoplasma (setas), estagnação biliar (cabeça das setas), bem como presença de sinusóides e intensa presença de leucócitos (\*) caracterizando hiperemia; f) Fígado em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 25 $\mu$ g/L NPOH. Observe intensa vacuolização do citoplasma (\*), degeneração citoplasmática (+) e Necrose focal (N). (HE, 5 $\mu$ m).

**Tabela 8** Ocorrência das alterações hepáticas nos grupos expostos às diferentes concentrações da NPOH.

Alteração	Estágio	125µg/L	25µg/L de	35µg/L de	50µg/L de	125µg/L
		Tensoativo	NPOH	NPOH	NPOH	de NPOH
DesCH	I	26,6	100	93,3	66,6	60
PContCel	I	0	100	93,3	93,3	46,6
PContNuc	I	13,3	100	100	100	80
AVolCel	I	0	86,6	20	46,6	40
AVolNuc	I	0	20	6,6	33,3	26,6
VacCit	I	40	86,6	100	86,6	93,3
DFreqNuc	I	0	20	33,3	20	6,6
AFreqVas	I	0	6,6	0	33,3	33,3
AVolVas	I	0	66,6	66,6	33,3	66,6
DimGlic	I	46,6	60	86,6	73,3	100
EstBil	I	13,3	40	60	46,6	80
HHem	II	6,6	73,3	80	86,6	80
RupVas	II	0	0	6,6	60	6,6
DegCanBil	II	0	26,6	20	13,3	13,3
VacNuc	II	0	66,6	93,3	33,3	46,6
DegCit	II	26,6	100	100	100	100
DegnUC	II	0	100	93,3	100	100
AtrofNuc	II	0	33,3	20	40	13,3
RompCel	II	0	46,6	93,3	40	0
Necrose	III	0	100	100	93,3	26,6

Os números representam, em porcentagens, o número de peixes que apresentaram o dano, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). DesCH=desorganização/descaracterização dos cordões hepáticos; PContCel=perda ou atipia do contorno dos hepatócitos; PCont Nuc=perda ou atipia do contorno do núcleo dos hepatócitos; AVolCel=aumento do volume celular; AVolNuc=aumento do volume nuclear; VacCit=vacuolização citoplasmática; DFreqNuc=diminuição da frequência relativa de núcleos; AFreqVas=aumento da frequência relativa de vasos; AVolVasos=aumento do volume de vasos; DimGlic=diminuição do glicogênio; EstBil=estagnação biliar; HHem=hiperemia; RupVas=ruptura de vasos; DegCanBil=degeneração de canalículos biliares; VacNuc=vacuolização nuclear; DegCit= degeneração citoplasmática; DegNuc=degeneração nuclear; AtrofNuc= atrofia nuclear; RompCel=rompimento celular.

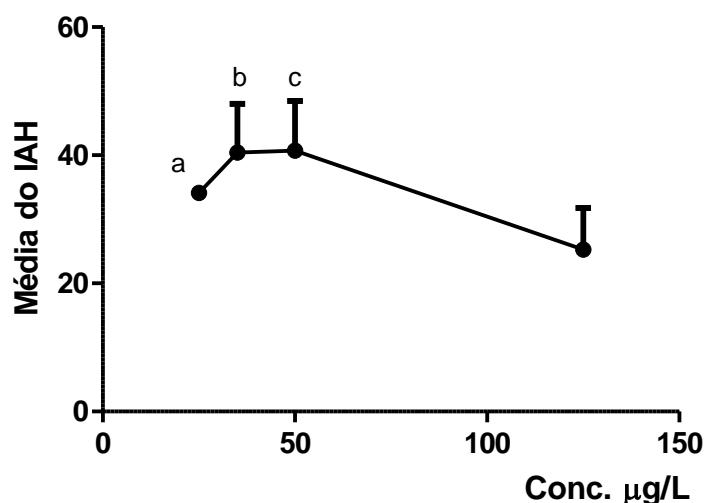
A tabela 9 e figura 11 (a, b, c) mostram que as concentrações da NPOH (25, 35 e 50µg/L) causaram alterações significativas sobre as do *D. rerio* quando comparadas com a concentração de exposição do tensoativo (125µg/L) com p<0,05, p<0,01 respectivamente. Só não houve significância quando comparado com a concentração de 125µg/L da NPOH.

Quando comparados os IAH da NPOH entre si, não foi possível observar alterações significativas, pois apresentaram  $p>0,05$ . Segundo Hudes et al., (2000); Azzoli et al., (2003) nenhuma evidência de toxicidade hepática do POH, foi relatada. Essa afirmação mostra que a NPOH se inclui nos padrões de toxicidade observados nos diversos tipos de nanoformulações que já foram testadas.

Apenas a concentração de exposição do tensoativo (125 $\mu$ g/L) apresentou órgão funcionalmente normal e sem alterações patológicas (grau I). As demais concentração da NPOH de (2, 35, 50 e 125 $\mu$ g/L) apresentaram órgão com alterações de moderadas a graves. Klingelfus, (2013) ao estudar os efeitos tóxicos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e chumbo inorgânico (PbII) em *Rhamdia quelen* observou que, após a exposição o fígado dessa espécie apresentou alterações histológicas significativas.

**Tabela 9.** Média do Índice de alterações histológicas (IAH) no Fígado de *D. rerio* para cada triplicata ( $N=5/T$ -  $N=15/\text{grupo}$ ) nas concentrações de exposição a NPOH.

Triplicatas	Branco	125 $\mu$ g/L Tensoativo	25 $\mu$ g/L NPOH	35 $\mu$ g/L NPOH	50 $\mu$ g/L NPOH	125 $\mu$ g/L NPOH
<b>01</b>	0,0	0,6	35,6	34	34,2	31,6
<b>02</b>	0,0	2,6	33,4	31,6	56,2	32
<b>03</b>	0,0	5	33,4	55,6	31,8	12,2
<b>Média</b>	0,0	2,73	34,13	40,4	40,73	25,26
<b>Erro Médio Padrão</b>	$\pm 0,0$	$\pm 1,27$	$\pm 0,73$	$\pm 7,63$	$\pm 7,76$	$\pm 6,53$



**Figura 11.** Efeitos das aplicações das diferentes concentrações da NPOH (25, 35, 50 e 125 $\mu$ g/L) sobre os fígados de *D. rerio*. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de  $n = 15/\text{grupo}$ . Anova seguida do teste Tukey-Kramer, a =  $p < 0.05$ , b =  $p < 0.01$ , e c =  $p < 0.01$  comparado com o tensoativo (125  $\mu$ g/L).

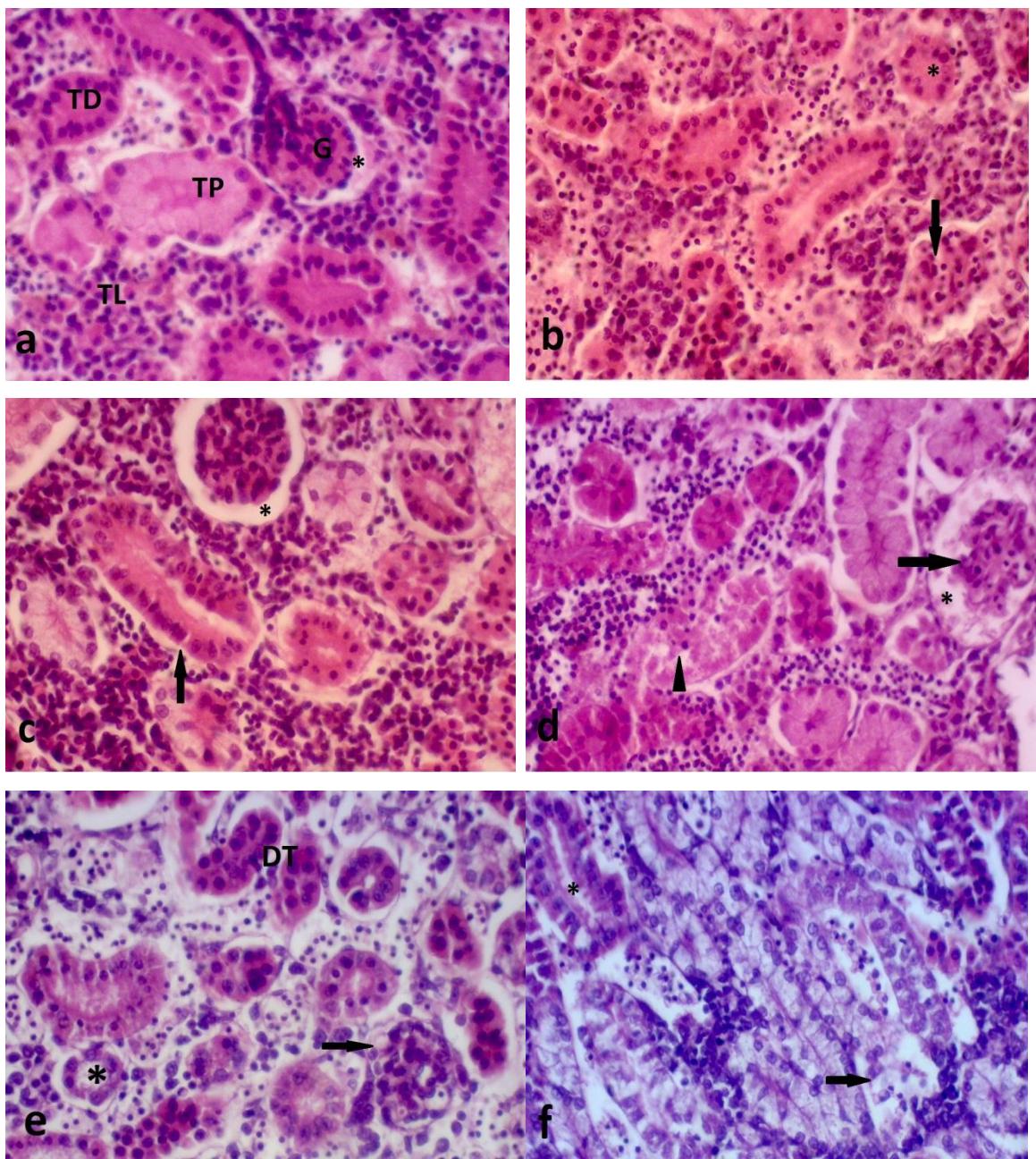
## 5.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS (RINS)

Os rins de *D. rerio* foram facilmente identificados e presentes na grande maioria dos cortes realizados para análise histológica. O corpúsculo renal, o túbulo contorcido proximal e o túbulo contorcido distal (Fig. 12a) possuem o aspecto característico descrito por Takashima & Hibiya (1995) para a maioria dos teleósteos de água doce. Não há muita diferença na constituição entre as porções anterior e posterior do rim nessa espécie, sendo que possui muitos nefrons e tecido linfoide intersticial.

Entre as alterações mais frequentes consideradas como de primeiro estágio (Tabela 10) no tecido renal do *D. rerio* expostos as concentrações da NPOH pode-se destacar as alterações tubulares observados principalmente nos peixes expostos a concentrações baixas (<50µg/L). Nestes animais, foi também observada hipertrofia das células tubulares. Essa alteração segundo Meletti (2003) é classificada como um tipo de “cloudy swelling” que se caracteriza pela presença de células epiteliais tubulares inchadas ou hipertrofiadas com grânulos finos de eosinófilos no citoplasma. Observou-se também a degeneração hialina, caracterizada pela presença de grandes grânulos eosinófilos no citoplasma que, segundo Takashima; Hibyia (1995) e Hinton; Laurén (1990) podem ser produzidos dentro da própria célula ou formados pela reabsorção do excesso de substâncias proteicas eventualmente filtradas pelo glomérulo. Grande parte das alterações tubulares observadas nos rins de *D. rerio* são provocadas por distúrbios metabólicos causados por agentes tóxicos (MELETTI, 2003). De acordo com Takashima; Hibyia (1995), a maioria das alterações tubulares é encontrada nas células epiteliais e muitas dessas alterações são degenerativas que culminam muitas vezes em necrose. No entanto, os autores afirmam que ainda não se pode confirmar que a hipertrofia das células tubulares e a degeneração da hialina sempre resultam em necrose. A necrose, classificada neste estudo como alteração de terceiro estágio foi observada em todas concentrações de exposição da NPOH e também do tensoativo, observou-se também que a proporção do aparecimento de necrose foi proporcional ao aparecimento das alterações como: hipertrofia das células epiteliais e a degeneração da hialina leve e severa (Tabela 10).

A dilatação dos capilares glomerulares, degeneração glomerular, aumento e diminuição do espaço da capsula de Bowman (Figura 12b, 12c, 12d, 12e) foi uma alteração frequente em todos os grupos expostos a NPOH e ao tensoativo (Tabela 10). De acordo com Takashima; Hibyia (1995), a ocorrência dessa alteração se dá em condições

patológicas devido a alterações da lamina basal, e normalmente é acompanhado por alterações dos podócitos e das células endoteliais, como a hiperplasia. Neste caso, ocorre a dilatação dos capilares do glomérulo, aumentando seu tamanho e consequentemente levando a diminuição do espaço da capsula de Bowman (Figura 12e), em outros casos, o glomérulo pode ser pressionado por capilares dilatados, quando há hiperemias. A hiperemia foi observada em todos os grupos de exposição a NPOH e com menor frequência no grupo exposto ao tensoativo. A diminuição do espaço da capsula de Bowman pode comprometer o processo de filtração do sangue e toda função renal. No entanto, pode ocorrer o oposto e o espaço da capsula de Bowman aumentar, essa alteração foi observada com pouca frequência nas concentrações da NPOH e do tensoativo, esse aumento pode ser causado pela atrofia ou degeneração glomerular (Figura 12d). Meletti (2003) também observou esse tipo de alteração no rim de *S. notomelas* expostos a sedimentos industriais. Srivastava (2006) também registrou padrão semelhante de alterações histológicas no tecido renal de *Channa punctatus* expostos ao zinco



**Figura 12.** Imagens de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de exposição da NPOH. a) Rim normal em corte longitudinal de *D. rerio*. Notar a presença de um glomérulo (G). O asterisco mostra o espaço intercapsular. Observar o tecido linfoide (TL), o túbulo contorcido distal (TD), o túbulo contorcido proximal (TP); b) Rim em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo. Observar dilatação dos capilares glomerulares (seta) e obstrução tubular (\*); c) Rim em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 125 $\mu$ g/L NPOH. Observar o aumento do espaço da capsula de Bowman (\*) e degeneração da hialina tubular leve (seta); d) Rim em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 50 $\mu$ g/L NPOH. Observar o aumento do espaço da capsula de Bowman (\*) resultante da degeneração glomerular (seta) e degeneração da hialina tubular severa (cabeça da seta); e) Rim em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 35 $\mu$ g/L NPOH. Observar diminuição do espaço da cápsula de Bowman (seta), aumento do lúmen tubular (\*) e desorganização tubular (DT). f) Rim em corte longitudinal de *D. rerio* exposto a concentração de 25 $\mu$ g/L NPOH. Observa-se a degeneração tubular (seta) e aumento do lúmen tubular. (HE, 5 $\mu$ m)

**Tabela 10.** Ocorrência das alterações renais nos grupos expostos às diferentes concentrações da NPOH.

Alteração	Estágio	125µg/L de tensoativo	25µg/L de NPOH	35µg/L de NPOH	50µg/L de NPOH	125µg/L de NPOH
PCTL	I	86,6	100	100	100	93,3
DHL	I	73,3	53,3	0	0	80
HTCT	I	33,3	100	100	100	86,6
DesT	I	46,6	80	86,6	100	46,6
DesG	I	0	6,6	6,6	0	0
AECB	I	6,6	33,3	33,3	26,6	13,3
DECB	I	66,6	80	60	80	80
DCG	I	73,3	80	93,3	66,6	86,6
TR/NN	I	0	0	0	0	6,6
DFreqG	I	20	13,3	40	26,6	46,6
DlVS	I	60	20	46,6	46,6	0
ALumTub	I	53,3	93,3	80	86,6	53,3
ObsTub	I	60	53,3	33,3	73,3	66,6
DHS	II	33,3	93,3	100	100	13,3
DegT	II	46,6	100	100	100	66,6
DegG	II	0	46,6	73,3	80	60
DCTub	II	60	100	100	100	93,3
DNTub	II	60	100	100	100	93,3
TLCB	II	0	0	20	13,3	33,3
HH	II	60	73,3	100	86,6	93,3
RVS	III	6,6	73,3	6,6	40	0
Nec	III	46,6	100	100	100	40

Os números representam, em porcentagens, o número de peixes que apresentaram o dano, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). PCTL= perda do contorno ou contorno atípico das células do tecido linfoide; DHL= degeneração hialina leve; HTCT=hipertrofia das células tubulares; DesT=desorg. tubular; DesG=desorganização glomerular; AECB=aumento do espaço da cápsula de Bowman (CB); DECB=diminuição do espaço da cápsula de Bowman; DCG=dilatação dos capilares glomerulares; TR/NN=ocorrência de túbulos em regeneração ou de novos néfrons; PAST=presença de material PAS-positivo nas céls tubulares; DFreqG=diminuição da freq. relativa de glomérulos; DilVS=dilatação de vasos sanguíneos; ALumTub=aumento do diâm. do lúmen tubular; ObsTub=obstrução tubular; DHS=degeneração hialina severa; DT=degeneração tubular; DegG=degeneração glomerular; DCTub=deg. citoplasmática das células tubulares; DNTub=deg. nuclear das céls tubulares; TLCB=tecido linfoide na CB; HH=hiperemia; RVS=ruptura de vasos sanguíneos; Nec=necrose.

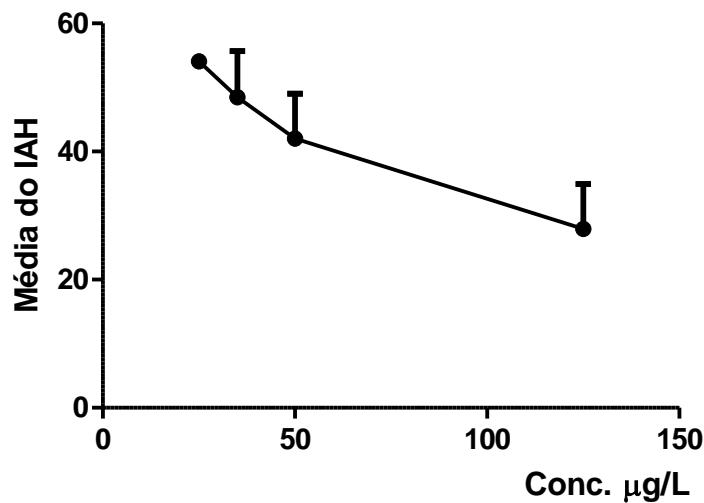
A tabela 11 e figura 13 (a, b, c) mostram que as concentrações da NPOH (25, 35 e 50µg/L) não causaram alterações significativas sobre os rins do *D. rerio* quando comparadas com a concentração de exposição do tensoativo (125µg/L) nem quando comparadas entre si. Esse resultado deu-se principalmente pela diferença de tempo que os peixes permaneceram expostos a solução da NPOH e ao tensoativo, pois, os peixes expostos às concentrações mais altas (>50µg/L) da NPOH morreram nas primeiras 3hs de

exposição (Tabela 4) não havendo tempo para metabolização da NPOH pelos rins, diferente das demais concentrações ( $<35\mu\text{g/L}$ ) em que grande maioria dos peixes sobreviveu até o final do experimento (48hs). Srivastava (2006) também registrou padrão semelhante de alterações histológicas no tecido renal de *Channa punctatus* expostos ao zinco e concluiu que essas alterações são graves o suficiente para causar prejuízo no funcionamento do rim.

As alterações presentes nos rins do *D. rerio* expostos às concentrações de exposição da NPOH e do tensoativo apresentaram órgão com alterações de moderadas a graves que são alterações amplamente distribuídas pelo órgão.

**Tabela 11.** Média do Índice de alterações histológicas (IAH) dos Rins de *D. rerio* para cada triplicata (N=5/T- N=15/grupo) nas concentrações de exposição à NPOH.

Triplicatas	Branco	125 $\mu\text{g/L}$ Tensoativo	25 $\mu\text{g/L}$ NPOH	35 $\mu\text{g/L}$ NPOH	50 $\mu\text{g/L}$ NPOH	125 $\mu\text{g/L}$ NPOH
<b>01</b>	0,0	31,8	53,8	34	33,8	14
<b>02</b>	0,0	31,8	54,2	56	36,2	36
<b>03</b>	0,0	8,2	54,2	55,4	56	33,8
<b>Média</b>	0,0	23,9	54,0	48,4	42	27,9
<b>Erro Médio Padrão</b>	$\pm 0,0$	$\pm 7,86$	$\pm 0,13$	$\pm 7,23$	$\pm 7,03$	$\pm 6,99$



**Figura 13.** Efeitos das aplicações das diferentes concentrações da NPOH (25, 35, 50 e 125 $\mu\text{g/L}$ ) sobre os rins do *D. rerio*. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de n = 15/grupo. Anova seguida do teste Tukey-Kramer.

## 6. CONCLUSÃO

A exposição do *D. rerio* as concentrações de 25, 35, 50 e 125 $\mu$ g/L da NPOH e de 125 $\mu$ g/L do tensoativo durante 48hs nos permite concluir que:

Quanto aos parâmetros comportamentais:

- As diferentes concentrações da NPOH provocam alterações comportamentais no *D. rerio*.

Quanto à mortalidade:

- A concentração de 25 $\mu$ g/L da NPOH causou mortalidade em apenas 6% dos peixes que corresponde a apenas 1 peixe;
- A concentração de 35 $\mu$ g/L da NPOH causou mortalidade em 53% dos peixes que corresponde a 8 peixes;
- As concentrações de 50 e 100 $\mu$ g/L da NPOH causou mortalidade em 100% dos peixes expostos a essas concentrações;
- A CL<sub>50</sub> da NPOH é 33,4 $\mu$ g/L;

Quanto aos Parâmetros histológicos:

- As concentrações de 25 e 35 $\mu$ g/L da NPOH causaram maiores danos ao tecido branquial quando comparados com as demais concentrações da NPOH (50 e 125 $\mu$ g/L) e com a concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo;
- As concentrações de 25, 35 e 50 $\mu$ g/L da NPOH causaram maiores danos ao tecido hepático quando comparados com a concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo, mas sem alterações significativas quando comparadas entre si;
- As concentrações de 25, 35 e 50 $\mu$ g/L da NPOH não causaram alterações significativas nos rins quando comparadas com a concentração de 125 $\mu$ g/L do tensoativo, nem quando comparadas entre si;

Assim sendo, a NPOH inclui-se nos padrões de toxicidade que têm-se observado para nanoformulações de fármacos e xenobióticos.

## 7. REFERENCIAS

- ALBINATI, A. C. L. et al. Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 621-627, 2009.
- ALTINOK, I.; CAPKIN, E. Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of Methiocarb or Endosulfan. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 3, p. 405, 2007.
- ASHARANI, P. V; WU, Y.L; GONG, Z; VALIYAVEETTIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, p. 1–8. 2008.
- ASHARANI, P. V; LIANWU, Y. I; Gong, Z; VALIYAVEETTIL, S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. **Nanotoxicology**, v. 5 p. 43-54. 2011
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. NBR 12648: ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica: método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2005.
- AZZOLI, C.G.; MILLER, V.A.; NG K.K.; KRUG, L.M.; SPRIGGS, D.R.; TONG, W.P.; RIEDEL, E.R. AND KRIS, M.G.A. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemother Pharmacology** 51(6): 493- 8. 2003
- BAI, W; ZHANG, Z; TIAN, W; HE, X; MA, Y; ZHAO, Y; CHAI, Z. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12 p. 1645–1654, 2010.
- BALASSIANO, I. T. P. S; SILVA, N. H; CABRAL, M. C; GIBALDI, D; BOZZA, M, F. C; CARVALHO, M. G. C. Effects of perillyl alcohol in glial C6 cell line in vitro and anti-metastatic activity in chorioallantoic membrane model. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 10, P. 785–788, 2002.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.
- BAR-ILAN O, A. R. M; FAKO, V. E; FURGESON, D. Y. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Small**, v. 5, p. 1897-1910, 2009.
- BARBAZUK, W. B; KORF, I; KADAVI, C; HEYEN, J; TATE, S; WUN, E; BEDELL, J.A; MCPHERSON, J. D; JOHNSON, S. L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.
- BARRETO, T. R. Alterações morfológicas e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®). 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

- BARRON, M. G. Bioaccumulation and bioconcentration in aquatic organisms. In: HOFFMAN, D. J; RATTNER, B. A; BURTON, G. A. Jr; CAIRNS, J. Jr. (1995) Handbook of Ecotoxicology. **Boca Raton, Lewis Publishers**, p. 652-666. 1995.
- BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S; CAMARGO, M. M. A; BATISTUZZO, L. A. **Fundamentos da toxicologia**. São Paulo. Ateneu, p. 59-70, 2008.
- BARROS, T. P; ALDERTON, W. K; REYNOLDS, H. M; ROACH, A. G; BERGHMANS, S. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. REVIEW. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 1400–1413, 2008.
- BELANGER, J.T. Perillyl alcohol: applications in oncology. **Alternative Medicine Review**, v. 3, n. 6, p. 448-457, 1998.
- BERTOLETTI, E. Ensaios biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. São Paulo: **Cetesb**, 1990.
- BEST J. D.; ALDERTON W.K. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. **Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.4, p.567-76, 2008.
- BILBERG K.; HOVGAARD, M. B.; BESENBACHER, F.; BAATRUP,E. In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Toxicology**, 2012.
- BOEHMLER, W; CARR, T; THISSE, C; THISSE, B; CANFIELD, V. A; LEVENSON, R. D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behavior. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, p. 155–166, 2007.
- BOIK, J. Natural compounds in cancer therapy. **1st ed. Oregon Medical Press**. Princeton, Minnesota, U.S.A. 2001.
- BRAUNBECK T; LAMMER E. Background paper on Fish Embryo Toxicity Assays. **German Federal Environment Agency**. 2006
- BRESEGHELO, L. et al. Efeitos do fl uoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 274-280, 2004.
- CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.
- CAMBERO, J. P. G; HERRANZ, A. L; LÓPEZ, G. D; CUADAL, J. S; CASTELL TORT, M. R; CALVO, A. C. The lethal and sub-lethal effects of nanoparticulated and soluble gold on the development of zebrafish embryos. **Critical Reviews in Toxicology**, 29: 75-83, 2012.

CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, P. 49–74, 2004.

CARDOSO, T. P. et al. Concentração de mercúrio e análise histopatológica em músculo, rim e cérebro de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) coletados na praia de Itaipu - Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural [online]**, v. 39, n. 2, p. 540-546, 2009.

CASTRO, J. S; SILVA, J. S; FREITAS, L. C; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 66, 2014

CHAE, Y. J; PHAM, C. H; LEE, J; BAE, E; YI, J; GU, M. B. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*), **Aquatic Toxicology**, vol. 94, no. 4, pp. 320–327, 2009.

CHANG, Y; ZHANG, M; XIA, L; ZHANG, J; XING, G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. **Materials**, v. 5, p. 2850-2871, 2012.

CHAOYONG, M.A. Animal models of disease: These systems are becoming increasingly important secondary screens of in vitro. hits. **American Chemical Society Modern Drug Discovery**, p. 30–36, 2004.

CHEN, J, XIA DONG, YUANYUAN XIN, MEIRONG ZHAO. Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. **Aquatic Toxicology**, p. 493–499, 2011.

CHEN, T-H, CHUN-YAO LIN, MEI-CHEN TSENG. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Pollution Bulletin**. P. 303–308, 2011.

CHEN, X; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p.1-12, 2008.

CHENG, J; FLAHAUT, E; CHENG, S.H. Effect of carbon nanotubes on development zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 708–716, 2007.

CHOI, J.E; KIM, S; AHN, J.H; YOUN, P; KANG, J.S; PARK, K; YI, J; DOUG-YOUNG, R., in press. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, p.151–159, 2010.

CLARK, S. S; PERMAN, S. M; SAHIN, M. B; JENKINS, G. J; ELEGBEDE, J. A. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl cells is to induce cell arrest. **Leukemia**, v. 16, p. 213- 222, 2002.

CLARK, S.S. Perillyl Alcohol Induces c-Myc-Dependent Apoptosis in Bcr/Abl-Transformed Leukemia Cells. **Oncology**, v. 70, p. 13–18, 2006.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.S. S; MOURA, M. A. M.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Exposição de embriões de *Danio rerio* a nano-tio2 sob diferentes condições de iluminação. **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. 2013.

CROSS, L. M; COOK, M. A; LIN, S; CHEN, J. N; RUBINSTEIN, A. L. Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 1, p. 911-2, 2003.

DA FONSECA C. O; LANDEIRO, J. A; CLARK, S. S; QUIRICO-SANTOS T, DA COSTA C. M DA G, GATTASS, C. R. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. **Surgical Neurology**, v. 65, 2006.

EDWARDS, J. G; MICHEL, W.C. Odor-Stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. **Journal of Comparative Neurology**, v.454, p.294-309, 2002.

ELEGBEDE, J.A; FLORES, R; WANG, R.C. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. **Life Sciences**. v. 73, p.2831–2840, 2003.

EMRAN, F; RIHEL, J; DOWLING, J. E. A behavioral assay to measure responsiveness of zebrafish to changes in light intensitiesJournal of Visualized Experiments, v.10, p.3791-923, 2008,

FEDERICI, G; SHAW, B. J; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415–430, 2007.

FENT, K; WEISBRODA, C. J; WIRTH-HELLERC, A. Uwe Pieles. Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **Aquatic Toxicology**, p. 218–228, 2011.

FERGUSON, H. W. Systemic pathology of fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. **Ames: Iowa State University Press**, 1989.

FERNANDES, J.; DA FONSECA, C.O.; TEIXEIRA, A. AND GATTASS, C.R. Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. **Oncology Reports**, v. 13, p. 943-7, 2005.

FERNANDEZ, P; ANDRE, V; REIGER, J; KUHNLE, A. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, p. 251: 53-8, 2004.

FERRAZ DE LIMA, C. L. B; REIS, N. S; CECCARELLI, P. S. Estudo topográfico e histológico do rim de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) holmberg 1887 (Teleostei, Serrasalmidae). **Boletim Técnico CEPTA**, v. 6, n. 2, p. 41-52, 1993.

FERREIRA, F. T. R; VENDRAMIM, J. D; ROSSI FORIM, M. R. Bioatividade de nanoformulações de nim sobre a traça-do-tomateiro Bioactivity of neem nanoformulations on tomato pinworm. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p.1347-1353, 2012.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 273-286, 2007.

GEFFROY, B; LADHAR, C; CAMBIER, S; TREGUER-DELAPIERRE, M; BRÈTHES, D; BOURDINEAUD, J. P. Impacto de nanopartículas de ouro alimentares em peixes-zebra na pressão muito baixa contaminação: O papel do tamanho, concentração e tempo de exposição. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 2, p. 144-60, 2011.

GELB, M.H; TAMANAI, F; YOKOYAMA, K; GHOMASHCHI, K. E; GOULD, M. N. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. **Cancer Letters**, v. 91, p. 169-75, 1995.

GOLDSMITH P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, V.4, p.504-512, 2004.

GRIFFITT, R. J; WEIL, R; HYNDMAN, K. A. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 23, p. 8178–8186, 2007.

GRIFFITT, R. J; HYNDMAN, K; DENSLAW, N. D; BARBER, D. S. Comparação das alterações moleculares e histológicos no peixe-zebra Gills Expostos ao Metallic Nanopartículas. 2008.

GRIFFITT, R. J; FESWICK, A; WEIL, R; HYNDMAN, K; CARPINONE, P; POWERS, K; DENSLAW, N. D; BARBER, D. S. Investigation of Acute Nanoparticulate Aluminum Toxicity in Zebrafish. **Environmental Toxicology**, 2010.

GERLAI R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. **Behavior Genetics**. v.33, p.461-468, 2003.

GOKSOYR, A; HUSEY, A. -M. Cellular targets of CYP IA induction in juvenile cod (*Gadus morhua L.*) after administration with different doses of BNE **Submitted**. 1998.

GROSELL, M; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 1179–1188, 2002.

GRUNWALD, D. J; EISEN J. S. Head waters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews Genetics**. v.3, p.717-24, 2002

GUO S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? **Genes. Brain. and Behav.**. v.3, p.63-74, 2004.

GUYON, J. R.; STEFFEN, L. S.; HOWELL, M. H.; PUSACK, T. J.; LAWRENCE, C.; KUNKEL, L. M. Modeling human muscle disease in zebrafish. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1772, p.205-215, 2007.

HEATH, A. G. Water pollution and fish physiology. 2nd ed. Florida: **Lewis Publishers**, 1995.

HEATH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology. **Boca Raton, CRC Press**. p. 245p, 1987.

HEIDEN, T. C. K; DENGLER, E; WEIYUAN JOHN KAO, W. J; HEIDEMAN, W; PETERSON, R. E. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 70–79, 2007.

HENRY, T. B; MENN, F-M; FLEMING, J. T; WILGUS, J; COMPTON, R. N. AND SAYLER, G. S. Attributing Effects of Aqueous C60 Nano-Aggregates to Tetrahydrofuran Decomposition Products in Larval Zebrafish by Assessment of Gene Expression. **Environmental Health Perspectives**. 2007.

HIBIYA, T. An atlas of fish histology, normal and pathological features. New York: **Gustav Fischer Verlag**, 1982.

HILL A. J.; TERAOKA H.; HEIDEMAN W.; PETERSON R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating. **Chemical Research in Toxicology**, v.86, p.6-19, 2005.

HINTON, D. E; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In. ADAMS, S. M. (Ed) Biological indicators of stress in fish. Bethesda: American Fisheries Society Symposium, v. 8, p. 51-66, 1990.

HOELLER, S; SPERGER, A; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 181-186, 2009.

HOLSTEIN, S. A; HOHL, R. J. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. **The Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1209-1215, 2003.

HU, N; YOST H. J; CLARK E. B. Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. **The Anatomical Record**, v.264, p.1-12, 2011.

HUDES, G.R.; SZARKA, C.E.; ADAMS, A.; RANGANATHAN, S.; MCCUALEY, R.A.; WEINER, L.M. AND GALLO, J.M. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol in patients with refractory solid malignancies. **Clinical Cancer Research**, 6: 3071-80. 2000.

ISPAS, C; ANDREESCU, D; PATEL, A; GOIA, D. V; ANDREESCU, S; WALLACE, K. N. Toxicidade e Desenvolvimento Defeitos de diferentes tamanhos e forma Nickel Nanopartículas no peixe-zebra. **Environmental Science & Technology**, p. 6349-6356, 2009.

KARI, G; RODECK, U; DICKER, A. P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 70-80, 2007.

KIDD, K .R; WEINSTEIN, B. M. Fishing for novel angiogenic therapies. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n, 4, p. 585-594, 2003.

KING-HEIDEN, T. C; WIECINSKI, P. N; MANGHAM, A. N; METZ, K. M; NESBIT, D; PEDERSEN, J. A; HAMERS, R. J; HEIDEMAN, W; PETERSON, R. E. Quantum Assessment Dot Nanotoxicity a utilização do embrião de peixe-zebra. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 5, p. 1605-1611, 2009.

KLINGELFUS, T. **Efeitos tóxicos de nanopartículas de dióxido de titânio (tio<sub>2</sub>) e chumbo inorgânico (pbii) em *Rhamdia quelen* (siluriformes, heptapteridae)**. Dissertação. Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná. 2013.

KNIE, J. L. W; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: **FATMA/GTZ**, p.289, 2004.

KULKARNI, A. P; BYCZKOWSKI. Hepatotoxicology.in: HODGSON, E; LEVI, P. E. Introduction to biochemical toxicology, 1994, p. 459-489.

LANGHEINRICH, U; HENNEN, E; STOT, G; VACUN, G. Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. **Current Biology**, v.12, p.2023– 2028, 2002.

LEAD, J. R; WILKINSON, K. J. Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. **Environmental Chemistry Letters**, v.3, p.159-171, 2006.

LEAKE, L.D. Comparative Histology. An introduction to the microscopic structure of animals. **Academic Press**, Londres, p. 738, 1975.

LEE, K. L; NALLATHAMBY, P. D; BROWNING, L. M; OSGOOD, C. J; XU, X. H.N. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. **ACS Nano**, v. 1, p. 133–143. 2007.

LINS, J. A. P. N; KIRSCHNIK, P. G; QUEIROZ, V. S. CÍRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LITTLE, E.E.; FAIRCHILD, J.F.; DE LONAY, A.J. Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. **American Fisheries Society Symposium** 14: 67-76. 1993.

LOCKWOOD, B; BJORKE, S; KOBAYASHI, K; GUO, S. Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 647–54, 2004.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicología aquática. In: RANZANI-PAIVA,M.J.T.; TAKEMOTO,R.M.;LIZAMA,M. de los A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, p.263-272, 2004.

LOUTRARI, H; HATZIAPOSTOLOU, M; SKOURIDOU, V; PAPADIMITRIOU, E; ROUSSOS, C; KOLISIS, F. N, PAPAPETROPOULOS, A. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, p. 568-575, 2004.

MATOS, J. M; SCHMIDT, C. M; THOMAS, H. J; CUMMINGS, O. W; WEIBKE, E. A; MADURA, J. A; PATRICK, L. J; CROWELL, P. L. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 147, p. 194-9, 2008.

MC CLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural desing principles. **Current Opinion in colloid and interface science**, v. 17, n. 5, p. 235-245, 2012.

MCGARVEY, D. J; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **Planta Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015-26, 2005.

MCGRATH, P; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discovery Today**, p. 394-401, 2008.

MEDINA, C; SANTOS-MARTINEZ, M. J; RADOMSKI, A; CORRIGAN, O. I; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552–558, 2007.

MEKKAWY, I. A. A; MAHMOUD, U. M; WASSIF, E. T; NAGUIB, M. Protective Roles of Tomato Paste and Vitamin E on Cadmium-induced Histological and Histochemical Changes of Liver of Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758). **Journal of Fisheries and Aquatic Science**. v. 7, p. 240-265, 2012.

MELETTI, P. C; ROCHA, O. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. Tese (Doutorado). São Carlos. 2003.

MIRON, D. S. et al. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfi sh, Rhamdia quelen (Heptapteridae). **Aquaculture**, v. 277, n. 3/4, p. 192-196, 2008.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment. **Environment International**, v. 32, p. 967-76, 2006.

MULLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**, p. 378, 1994.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.

NAKADA, M; NAKADA, S; DEMUTH, T; TRAN, N.L; HOELZINGER, D.mB; BERENS, M. E. Molecular targets of glioma invasion. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 64, p. 458-78, 2007

NUSSELIN-VOLHARD, C.; DAHM, R. Zebrafish a practical approach, **Oxford University Press**, New York-NY, USA, 2000.

OBERDORSTER, G; SIMEONOVA, P.P; OPOPOL, N; LUSTER, M.I. Biokinetics and Effects of Nanoparticles, in Nanotechnology. **Toxicological Issues and Environmental Safety**, pp. 15–51, 2007.

OSTERTAG, F; WEISS, J; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 388, p. 95–102, 2012.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE NORMATIZAÇÃO. **ISO 7346– 1**, 1996.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Test Guideline 203**. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test, 1992.

PACHECO, M; SANTOS, M .A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331-347, 2002.

PARNG, C; SENG, W.L; SEMINO, C; MCGRATH. P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening Assay Drug Dev. **Technology**, v. 1, p. 41–48, 2002.

POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R. & LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Fishing New Books**, Cambridge. p.339-352, 1994

POLEKSIC, V; KARAN, V. Effects of trifluralin on carp: Biochemical and Histological Evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 43, p. 213-221, 1999.

RABELO, A. F. L. **Estudo da toxicidade hepática da Trans-desidrocrotonina, um diterpeno obtido de Croton cajucara Benth, e de estratégias farmacológicas preventivas em modelos animais**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)– Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2008.

RAHMAN, M; COLQUE-NAVARRO, P; KHAN, I; HUYS, G; SWINGS, J; MULLBY, R. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. Applied and **Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.650-655, 2002.

RAJESH, D; STENZEL, R. A; HOWARD, S. P. Perillyl Alcohol as a Radio-Chemosensitizer in Malignant Glioma. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 35968-35978, 2003.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Washington, D.C.**: Hemisphere, 1985.

RIBEIRO, L. C. **Investigação do efeito ictiotóxico do extrato etanólico da raiz de *Spilanthes acmella* (jambu) em zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental.** 61 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. 2013.

RIGOLIN-SÁ, O. **Toxicidade do herbicida Roundup (glifosato) e do acaricida Omite (propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhandia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes).** 307f. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

ROBERTS, R. J. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: RIBELIN, W. E.; MIGALI, G. The pathology of fishes. Madison: University of Wisconsin Press. p. 399-428, 1975.

RODRIGUES, C. J. F; ALMEIDA, C. C. A; ANJOS, G. C; (PG), CARVALHO, G. G; MOURA, L. S. A; MACIEL, M. A. M. Biodisponibilização de vegetais pelo uso de nanoformulações do tipo microemulsão contendo óleo de soja. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). **29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (sd).**

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathology of fish Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan after acute exposure to sublethal level of the organophosphorate Dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 2, p. 441-450, 1998.

RUBINSTEIN, A. L. Zebrafish assays for drug toxicity screening Expert Opin. **Drug Metabolism Toxicology Journals**, p. 231–240, 2006.

RUDNICKI, C. A. M. **Análise qualitativa e quantitativa das histopatológicas causadas pelo organofosforado azodrin® 400 sobre o tecido branquial do peixe de água doce *piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887) após exposição subletal.** Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná CURITIBA 2004.

SALAZAR, M. D. A; SILVA, R. F; FONSECA, C. O; LAGROTA-CANDIDO, J; QUIRICO-SANTOS, T. Intranasal administration of perillyl alcohol activates peripheral and bronchusassociated immune system in vivo. **Manuscript Draft.** (s/d).

SCHOLZ, S; FISCHER, S; GÜNDL, U; KÜSTER, E; LUCKENBACH, T; VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394-404, 2008.

SCHRECK, C.B. Fish, Stress in. In: Fink, G. (Ed.), Encyclopedia of Stress, vol. 2. Academic Press, San Diego, p. 68–72, 2007.

SCHWAIGER,J; WANKE, R; ADAM, S; PAWERT, M; HONNEN, W; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6: 75-86, 1997.

- SERBEDZIJA, G.N; FLYNN, E; WILLETT, C.E. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. **Angiogenesis**, v. 3, n. 4, p. 353-359, 1999.
- 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, p.1551–1553, 1999.
- SHARMA, H. S. Nanoneuroscience: emerging concepts on nanoneurotoxicity and nanoneuroprotection. **Nanomedicine (Lond)**, v. 2, n. 6, p. 753–758, 2007.
- SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish Prochilodus lineatus exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 1, p. 112-120, 2008.
- SLOMAN, K. A.; SCOTT, G. R.; DIAO, Z.; ROULEAU, C.; WOOD, C. M.; MCDONALD, D. G. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**, v.65, p.171-185, 2003.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O; SIMONNET, J. T; L'ALLORET, F. NANOEMULSIONS: A New Vehicle for Skincare Products. **Advances in Colloids and Interface Science**, p. 108-109, 2004.
- SPENCE, R; GERLACH, G; LAWRENCE, C; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v.83, p.12-34, 2008.
- SRIVASTAVA, N; GUPTA, P. Effects of sub-lethal concentrations of zinc on histological changes and bioaccumulation of zinc by kidney of fish *Channa punctatus* (Bloch). **Journal of Environmental Biology**, v. 27, n. 2, p. 211-215, 2006.
- STERN, H. M; ZON, L. I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, p.533-9, 2003.
- TADROS, T; IZQUIERDO, P; ESQUENA, J; SOLANS, C. Formation and Stability of Nanoemulsions. **Advances in Colloids and Interface Science**, p. 108-109: 303-318, 2004.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An Atlas of Fish Histology – Normal and Pathological Features. **Kodansha Ltd.**, Tóquio. p. 195, 1995.
- TAYLOR, M. R; HURLEY, J. B; VAN EPPS, H. A; BROCKERHOFF, S. E. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 101, p. 4584-4589, 2004.
- TON, C; PARNG, C. The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. **Hearing Research**, p. 79-88, 2005.

VALERIE E. F. E; FURGESON, D. Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 478–486, 2009.

VOSYLIEN, Z. **Acta Zoologica Lituanica**, v. 17, p. 3–15, 2007.

XIONG, D; FANG, T; YU, L; SIMA, X; ZHU, W. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Science of the Total Environment**. v. 409, n. 8, p. 1444–1452, 2011.

XU, M; FLOYD, H. S; GRETH, S. M; CHANG, W. L; LOHMAN, K; STOYANOVA, R; KUCERA, G. L; KUTE, T. E; WILLINGHAM, M. C; MILLER, M. S. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 232–246, 2004.

YERUVA, L; PIERRE, K. J; ELEGBEDE, A; WANG, R. C; CARPER, S. W. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, v. 257, p. 216–226, 2007.

YILMAZ, E; BORCHERT, H. H. Design of a phytosphingosine-containing, positively charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, p. 91–98, 2005.

YURI, T; DANBARA, N; TSUJITA-KYUTOKU, M; KIYOZUKA, Y; SENZAKI, H; SHIKATA, N; KANZAKI, H; TSUBURA, A. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 84, p. 251-60, 2004.

ZHANG, W. X. Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. **Journal of Nanoparticle Research**, v.5, p.323-332, 2003.

ZHANG, H; JI, Z; XIA, T; MENG, H; LOW-KAM, C; LIU, R; POKHREL, S; LIN, S; WANG, X; LIAO, Y; WANG, M; LI, L; RALLO, R; DAMOISEAUX, R; TELESCA, D; MADLER, L; COHEN, Y; ZINK, J. I; NEL, A. E. Use of Metal Oxide Nanoparticle Band Gap To Develop a Predictive Paradigm for Oxidative Stress and Acute Pulmonary Inflammation. **ACSnano**. (2012)

ZHU, X; ZHU, L; LI, Y; DUAN, Z; CHEN, W; ALVAREZ, P. J. J. Developmental toxicity in zebrafish (*danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: buckminsterfullerene aggregates (nc60) and fullerol. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 26, N. 5, p. 976–979, 2007.

ZHU, X; JIANGXIN, W; XUEZHI, Z; CHANG, Y; CHEN, Y. The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Nanotechnology**, 2009.

ZHU, X; TIAN, S; CAI, Z. Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Early Life Stages. **PLOS ONE**. v.7, 2012.

WAGNER, D. S; MULLINS, M. C. Modulation of BMP Activity in Dorsal-Ventral Pattern Formation by the Chordin and Ogon Antagonists. **Developmental Biology**. P.109–123, 2002.

WANG, Y ; SEEBALD, J. L; SZETO, D. P; IRUDAYARAJ, J. Biocompatibilidade e Biodistribution de superfície melhorada Raman Scattering nanossondas em embriões Zebrafish: In vivo e Multiplex Imagem. **ACSnano**, p. 4039-4053. 2010,

WANG, W, ZHU, X; ZHANG, X; ZHAO, Z; LIU, H; GEORGE, R; WILSON-RAWLS, J; CHANG, A. Y; CHEN, Y. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Chemosphere**, p. 461–467, 2011.

WEINSTEIN, D. A; BIRK, E. M. The effects of chemicals on the structure of terrestrial ecosystems: mechanisms and patterns of change. 181-209. In: LEVIN, S.A.; HARWELL, M.A.; KELLY, J.R.; KIMBALL, K.D. (1989). Ecotoxicology: problems and approaches. **Springer-Verlag**, New York. p. 547, 1989.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). **University of Oregon Press**. 2000.

WISEMAN, D. A; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol, Geraniol, and Farnesol Is Mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, p. 320, n. 3, p. 1163–1170, 2007.