



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

SAULO CARDOSO CARVALHO

**“NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA
FLUORESCENTES CONTENDO ALBENDAZOL:
ESTUDO TEÓRICO E ESTABILIDADE”**

BELÉM - PA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**“NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA
FLUORESCENTES CONTENDO ALBENDAZOL:
ESTUDO TEÓRICO E ESTABILIDADE”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará em cumprimento as exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Autor: Saulo Cardoso Carvalho

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseane Maria Ribeiro Costa

BELÉM - PA

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)**

C268n Cardoso Carvalho, Saulo.
 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA
FLUORESCENTES CONTENDO ALBENDAZOL: ESTUDO
 TEÓRICO E ESTABILIDADE / Saulo Cardoso
Carvalho. —2022.
 45 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof^ª. Dra. Roseane Maria Ribeiro
 Costa Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
 Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2022.

 1. Nanopartículas de quitosana; albendazol; estudo
 teórico; estabilidade.. I. Título.

CDD 341.64098

FOLHA DE APROVAÇÃO

SAULO CARDOSO CARVALHO

**“NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA FLUORESCENTES CONTENDO
ALBENDAZOL: ESTUDO TEÓRICO E ESTABILIDADE”**

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

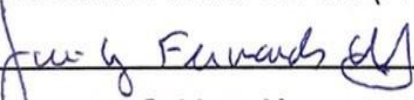
Aprovado em __/ 03/06/2022

BANCA EXAMINADORAProfª Drª **Roseane Maria Ribeiro Costa** (orientadora)


Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Assinatura: Profª Drª **José Luís Fernandes Vieira**

Instituição: Universidade Federal do Pará (PPGCF\UFPA)

Assinatura: Profª Drª **Taís Vanessa Gabbay Alves**

Instituição: Universidade da Amazônia

Assinatura: 

Dedico este trabalho, em especial a minha mãe Olicea Maria Cardoso Carvalho, família e a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe Olicea Maria Cardoso Carvalho, minha segunda mãe Judite Cardoso Carvalho e minha avó Nilcea Maria Cardoso Carvalho, por todo apoio incondicional e dedicação disponibilizada durante toda a minha vida para caminhar no caminho certo.

Agradeço aos familiares que de alguma maneira contribuíram para minha formação tanto pessoal como profissional.

A minha namorada Geise Faro da Silva, pela amizade, momentos de descontração, carinho e apoio durante toda a fase de construção deste trabalho. À professora orientadora Dr^a. Roseane Maria Ribeiro Costa, pelas oportunidades desde a iniciação científica, pelo convívio, pelo incentivo, revisão, paciência e compreensão.

A professora Dr^a. Lilian Lund Amado e a toda sua equipe do Laboratório de Ecotoxicologia, do Instituto de Geocências da Universidade Federal do Pará, pela disponibilidade, por me introduzir no âmbito do manejo dos peixes-zebra e possibilitar o aprendizado de processamento para análise de biomarcadores.

Aos amigos do Laboratório Nanofarma, do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da UFPA.

Aos participantes da banca examinadora por disponibilizarem seu valioso tempo, contribuindo com seus conhecimentos para a melhoria deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFPA).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

“Prefiro ser essa metamorfose ambulante
Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante
Do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo
Do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo
Eu quero dizer agora o oposto do que eu disse antes
Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante
Do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo
Do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo”

(Raul Seixas)

RESUMO

A nanotecnologia vem ganhando espaço no cenário mundial como ferramenta promissora para o agronegócio, por trazer benefícios a saúde animal. Entretanto, o desenvolvimento desses novos produtos gera uma preocupação a nível biológico e ambiental, faz-se então, necessárias pesquisas de toxicidade a fim do seu uso seguro e eficaz. Nesse contexto, o presente trabalho propôs-se a obter nanopartículas de quitosana fluorescentes contendo albendazol, aplicar e avaliá-las frente ao efeito de exposição aguda em peixe-zebra (*Danio rerio*), modelo proeminente que mostra vantagens como método econômico e rápido de alta compatibilidade para estudos toxicológicos de nanocompostos. Aplicou-se as ferramentas da química computacional para realizar o estudo teórico de interação intermolecular pelo método de docagem, o que demonstrou a quitosana como um transportador capaz de encapsular espontaneamente as moléculas de albendazol, fármaco modelo, devido as forças de ligações do hidrogênio. As nanopartículas de quitosana fluorescentes por gelatinização ionotrópica foram desenvolvidas com o fármaco (F1) e sem o fármaco (FB), e caracterizadas por tamanho médio, índice de polidispersividade, carga superficial e estudo de estabilidade por noventa dias. A F1 apresentou tamanho médio ($174,8 \pm 1,097$), índice de polidispersividade ($0,219 \pm 0,009$) e carga superficial ($29,7 \pm 1,15$) e FB tamanho médio ($448,8 \pm 98,66$), índice de polidispersividade ($0,544 \pm 0,073$) e carga superficial ($27,8 \pm 3,48$). Com isso, as nanopartículas de quitosana fluorescentes contendo albendazol obtidas por gelatinização ionotrópica apresentaram propriedades físicas: tamanho médio, índice de polidispersividade e carga superficial promissoras para estudos de aplicação em banhos terapêuticos.

Palavras chaves: Nanopartículas de quitosana; albendazol; estudo teórico; estabilidade.

ABSTRACT

Nanotechnology has been gaining ground on the world stage as a promising tool for agribusiness, as it brings benefits to animal health. However, the development of these new products raises a biological and environmental concern, so toxicity research is necessary in order to ensure their safe and effective use. In this context, this work has aimed to obtain fluorescent chitosan nanoparticles containing albendazole, then apply and evaluate them against the effect of acute exposure in zebrafish (*Danio rerio*), a prominent model that shows advantages as an economical and fast method of high compatibility for toxicological studies of nanocompounds. Computational chemistry tools were applied to carry out the theoretical study of intermolecular interaction by the docking method, which has shown chitosan as a carrier that is able to spontaneously encapsulate albendazole molecules, a model drug, due to hydrogen bonding forces. Fluorescent chitosan nanoparticles by ionotropic gelatinization were developed, both with the drug (F1) and without the drug (FB) and characterized by average size, polydispersity index, surface charge and stability study for ninety days. F1 showed average size (174.8 ± 1.097), polydispersity index (0.219 ± 0.009) and surface charge (29.7 ± 1.15), and FB showed average size (448.8 ± 98.66), polydispersity index (0.544 ± 0.073) and surface charge (27.8 ± 3.48). Therefore, the fluorescent chitosan nanoparticles containing albendazole obtained by ionotropic gelatinization showed physical properties: average size, polydispersity index and surface charge as promising for application studies in therapeutic baths.

Keywords: Chitosan nanoparticles; albendazole; theoretical study; stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema da formação da ligação covalente QTS-FITC
- Figura 2.** Visualização 3D 1 monômero de CS fazendo ligação covalente ao isotiocianato de fluoresceína (CS/FITC). Estrutura química otimizada MM²
- Figura 3.** Esquema preparação das nanopartículas fluorescente de quitosana contendo Albendazol.
- Figura 4.** Estrutura derivada do cálculo com o método B3LYP/6-31 G (d,p) monômero de Quitosana
- Figura 5.** Estrutura derivada do cálculo com o método B3LYP/6-31 G (d,p) molécula Albendazol
- Figura 6.** Estrutura derivada do cálculo com o método B3LYP/6-31 G (d,p) monômero do QTS-FITC.
- Figura 7.** Mapa do Potencial Eletrostático (MPE) do ABZ derivado do cálculo B3LYP/6-31 G (d,p).
- Figura 8.** Mapa do Potencial Eletrostático (MPE) da QTS derivado do cálculo B3LYP/6-31 G (d,p).
- Figura 9.** Modelos 9, resultante da docagem molecular. ABZ ao centro e QTS-FITC
- Figura 10.** Modelo 17, resultante da docagem molecular. ABZ ao centro e QTS-FITC
- Figura 11.** Modelo 6, resultante da docagem molecular. ABZ ao centro e QTS-FITC

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Três sistemas coloidais.

Tabela 2. Peso total das brânquias em cada réplica e volume final para homogeneizar as amostras.

Tabela 3. Energias das moléculas otimizadas pelo método DFT utilizando o híbrido B3LYP

Tabela 4. Modelos obtidos com a Docagem Molecular.

Tabela 5. Resultados tamanho médio (nm), PDI e Carga superficial (F1).

Tabela 6. Resultados tamanho médio (nm), PDI e Carga superficial (F2).

Tabela 7. Resultados tamanho médio (nm), PDI e Carga superficial (F3).

Tabela 8. NP-QTS/ABZ obtidas, utilizando bureta (50mL) sem conta gotas.

Tabela 9. NP-QTS/ABZ obtidas, utilizando bureta (50mL) com conta gotas.

Tabela 10. Formulação contendo fármaco: tamanho, índice de polidispersividade e carga superficial.

Tabela 11. Formulação sem fármaco: tamanho, índice de polidispersividade e carga superficial.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Análise da piscicultura no Brasil e no mundo	14
2.2 Alternativas terapêuticas para aplicação no tratamento de patologias na piscicultura	16
2.3 Nanotecnologia farmacêutica: Sistemas de Liberação Controlada para aplicação na piscicultura	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
3.2.1 Seção computacional	21
3.2.2 Seção experimental	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Materiais	22
4.2 Métodos	22
4.2.1 Seção computacional	22
4.2.1.1 Modelos estruturais	22
4.2.1.2 Mapa do Potencial Eletrostático (MPE)	23
4.2.1.3 Método de Docagem Molecular	23
4.2.2 Seção experimental	24
4.2.2.1 Marcação da quitosana com isotiocionato de fluoresceína (FITC)	24
4.2.2.2 Preparação das nanopartículas contendo albendazol pelo método Gelatinização Ionotrópica	25
4.2.2.3 Determinação da mobilidade eletroforética e tamanho médio das nanopartículas	27
4.2.2.4 Tratamento estatístico	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Seção computacional	27
5.1.1 Otimização das estruturas	28

5.1.2 Mapa do potencial eletrostático (MEP)	29
5.1.3 Docagem molecular	30
5.2. Seção experimental	33
6 CONCLUSÃO	38
7 REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes de proteína bem como uma alimentação mais saudável vem crescendo no Brasil e no mundo. Segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe Br), em 2020, a cadeia de produção de peixes cultivados atingiu 802 mil toneladas, uma receita de 8 bilhões. Dentre as espécies mais cultivadas tem-se o Tambaqui (*Colossoma macropomum*), um peixe de água doce com potencial econômico tanto no cenário nacional quanto na região Amazônica por apresentar, além da palatabilidade da carne, um alto valor comercial. Conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), desde 2020 o estado do Pará está entre os quatro maiores produtores brasileiros de Tambaqui, atingindo uma produção de 8 mil toneladas. Entretanto, as parasitoses comumente encontradas em ambientes de cultivo representam fator limitante para sua criação, gerando perdas para os piscicultores (SANTOS et al. 2013; LOPES et al., 2016; FERNANDES et al., 2018).

O Albendazol (ABZ), da classe dos benzimidazóis, é um fármaco utilizado para o tratamento anti-helmíntico de uso comum na medicina humana e veterinária (PRANZO et al., 2010). Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BSC), o ABZ é classificado como Tipo II, com alta permeabilidade e baixa solubilidade aquosa, comprometendo assim a absorção e, conseqüentemente, apresenta baixa biodisponibilidade (LIU et al., 2013; IBRAHIM et al., 2014). Assim, para solucionar esse problema, estudos relatam a aplicação da nanotecnologia para melhorar as características farmacocinéticas do ABZ (KANG et al., 2017; MANSURI et al., 2016; DUMAN; KAYA 2016; ZHU et al., 2015).

Nesse contexto, a nanomedicina vem ganhando espaço com o surgimento de um novo campo de pesquisa, criando diferentes formas de aplicação, avaliação e terapêutica, bem como monitoramento de sistemas biológicos quando expostos aos nanomateriais. Para garantir o desenvolvimento da nanotecnologia, é necessário avaliar a nanotoxicidade in vivo e explorar os mecanismos biológicos que são desencadeados (JIA, HAO-RAN et al. 2019; LU, J., TANG, M., & ZHANG, T., 2019). Dentre os polímeros utilizados para desenvolvimento de nanopartículas para

aplicação humana e veterinária, a quitosana vem se destacando por apresentar propriedades físico-químicas interessantes. Os sistemas nanoestruturados para fins de liberação controlada de fármaco destacam ainda mais a necessidade de realizar os estudos de nanotoxicidade. Na literatura, foram realizadas investigações e estabeleceu-se a toxicidade de diversos nanocompostos, dentre estes, nanopartículas etálicas, nanomateriais de carbono, nanopartícula de sílica e nanopartículas de quitosana (WANG, BING, et al., 2013; CHEN, YU, HANGRONG CHEN, AND JIANLIN HI., 2013; WANG, HAIFANG, et al., 2013; SUN, YUN, et al., 2015).

O desenvolvimento de nanopartícula polimérica de origem natural como a quitosana vem ganhando destaque no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados devido suas propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e alta disponibilidade na natureza (ZARGAR, ASGHARI, & DASHTI, 2015; YA-XUAN, et al., 2018). Características como facilidade de modificação química, tamanho e cargas superficiais controláveis e boa estabilidade, fazem esses nanomateriais se tornarem uma importante estratégia para produção de nanomedicamentos (BANIK, B. L., FATTAHI, P., & BROWN, J. L. (2016); ZHU, YA-XUAN, et al., 2018), fazendo necessária a investigação desses sistemas em estudos *in vivo* para segurança e eficácia dos mesmos (ALBANESE, A., TANG, PS, & CHAN, WC (2012); BOBO, DANIEL, et al. 2016).

No intuito de avaliar a nanotoxicidade dos sistemas desenvolvidos, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo proeminente e mostra vantagens como método econômico e rápido de alta compatibilidade para estudos toxicológicos de nanocompostos (HILL, ADRIAN J., et al., 2005; SHULL, AUSTIN Y., CHIEN-NA A. HU, AND YONG TENG. 2017; HAQUE, E., & WARD, A. C. 2018). A versatilidade do peixe-zebra pode ser empregue como uma ferramenta para elucidar a liberação controlada de fármacos e explicar a biodistribuição, bem como avaliações alternativas terapêuticas (SIEBER, SANDRO, et al., 2019). A busca pelo desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para fins de liberação controlada de fármaco está em ascensão, entretanto, os estudos relacionados sobre nanotoxicidade dos mesmos são poucos. Em investigações da literatura foram encontrados utilizando como modelo embriões de peixe-zebra em sistemas de escala nanométrica como lipossomas, nanopartícula poliméricas e nanopartículas de sílica (SIEBER, SANDRO, et al., 2019; LEE, KEON YONG, et al., 2017).

O presente trabalho propõe a obtenção de nanopartículas de quitosana fluorescentes contendo albendazol (NP QTS/ABZ), avaliar a capacidade de encapsulação da matriz polimérica com o fármaco através do estudo teórico e estudo de estabilidade para posterior aplicação e avaliá-las frente ao efeito de exposição aguda em biomarcadores do peixe-zebra (*Danio rerio*).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Análise da piscicultura no Brasil e no mundo

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2019), a produção de pescados é dividida entre a pesca extrativa e a aquicultura. A pesca é a atividade que se baseia na retirada do alimento do ambiente natural, e a aquicultura é o cultivo, normalmente em um espaço confinado e controlado (tanques), de organismos aquáticos, tais como peixes (piscicultura), crustáceos, moluscos, algas, e qualquer outra forma de vida aquática de interesse econômico.

A piscicultura faz parte de um conjunto de atividades de cultivos da vida aquática em regime de confinamento e vem sendo apontada como a próxima fronteira mundial na produção de alimentos, devido o crescimento populacional,

que se preocupa com o consumo de carnes mais saldáveis, bem como fontes de proteínas e o interesse em relação à sustentabilidade ambiental, estão entre os principais desafios serem enfrentados pelos produtores para as próximas décadas (FAO, 2018; 2019).

Segundo a FAO (2019) a produção mundial atingiu 205 milhões de toneladas, desse total, 54,5% foram da aquicultura. Entre 1961 e 2019, o consumo de pescado no mundo aumentou, tendo sido superior ao crescimento da população e do consumo de carne (FAO, 2019). O Brasil produziu 561mil toneladas, ocupando o 13º lugar no *ranking* geral dos maiores produtores de pescado. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), com uma taxa de crescimento de 1,5% em relação do ano seguinte. Estes resultados para um país como o Brasil com

características hídricas em abundância, clima favorável e produção ainda incipiente vem apresentando potencial para um maior desenvolvimento da atividade com destaque no cenário internacional.

A Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe Br) através do anuário (2020) divulga o balanço da piscicultura brasileira em 2019, a produção cresceu 4,9% em relação ao ano anterior e atinge 758 mil toneladas. A Tilápia lidera no cenário nacional com 57% da produção, outras espécies crescem e contribuem com 5% do total. Dentre elas destaca-se o cultivo do Tambaqui, segundo a Embrapa (2017), as espécies mais cultivadas no país, por região, são: I) tambaqui, pirarucu e pirapitinga na região Norte; II) tilápia e camarão marinho no Nordeste; III) tambaqui, pacu e pintado no Centro-Oeste; IV) tilápia, pacu e pintado no Sudeste; e V) carpa, tilápia, jundiá, ostra e mexilhão na região Sul. Em relação ao percentual de participação de cada estado, o nordeste apresentou a maior participação no mercado do país, com 26,8%, logo após a região norte, com 25,7%; a região sul, com 24,2%; a região centro-oeste, com 12,6%; e o sudeste, com 10,7%.

Com relação ao consumo de peixes, o brasileiro consumiu em média 9,6 kg/ano (FAO, 2019). Conforme o estudo de Lopes, de Oliveira e Ramos (2016), o consumo de peixes pela população brasileira é ainda incipiente, por questões de preferências alimentares, visto que mesmo entre as pessoas com maior poder aquisitivo, existe a preferência pelo consumo de outros tipos de carnes. Os autores expõem a necessidade de divulgação para o conhecimento da atividade pela população.

A procura crescente de carnes de peixes no Brasil para inclusão na dieta alimentar é motivada por estas serem ricas em ômega 3, 6, 9 e por serem fontes proteicas mais saudáveis e sustentáveis. A produção da aquicultura é considerada cada vez mais como resposta às questões de segurança alimentar em todo o mundo (FAO, 2019). Nesse sentido, a piscicultura surge como atividade zootécnica capaz de contribuir para o consumo de carnes mais saudáveis. É nesse cenário que o tambaqui (*Colossoma macropomum*), peixe tropical nativo dos rios Amazonas e Orinoco, pertence à classe *Osteichthyes*, ordem *Characiformes* e família *Serrasalminidae*, é o segundo maior peixe de escamas de água doce da América do Sul e vem sendo amplamente difundido em diversas regiões do país e do continente sul-americano devido a palatabilidade da carne, crescimento rápido e alto valor comercial. (MENDONÇA et al., 2009; DAIRIKI et al., 2011).

Contudo, ao longo dos anos o Brasil vem se destacando, devido suas grandes vantagens territoriais bem como recursos hídricos para o desenvolvimento dessa atividade. Possui cerca de 10 milhões de hectares de água doce em represas, rios e lagos. (RORIZ et al., 2017; BARONE et al., 2017). A piscicultura tem se mostrado promissora para os investidores e vem firmando seu produto no cenário mundial com alta qualidade, aprimorando técnicas de cultivos, e assim difundindo tecnologia de criação de peixes em cativeiro (ASCHE, 2008; FUENTES-SANTOS et al., 2015).

2.2 Alternativas terapêuticas para aplicação no tratamento de patologias na piscicultura

A expansão da piscicultura no Brasil passa por uma fase de consolidação, a partir da intensificação da criação surge a exigência de maiores conhecimentos sobre o manejo adequado de modo a promover melhoria nas condições de saúde dos peixes, bem como entregar ao consumidor final um produto de qualidade com alto teor de proteínas e ácidos graxos. Nesse sentido, a busca por substâncias tanto de origem vegetal como sintéticas com atividade eficaz para o tratamento de patologias na piscicultura vem ganhando espaço na comunidade científica. Entretanto, o estresse, que conseqüentemente acarreta patologias que acometem os animais no regime de confinamento acaba gerando perdas econômicas significativas ao produtor. Alguns problemas que os produtores tem enfrentado devido manejo inadequado são: alta densidade de peixes em áreas pequenas, baixa qualidade da água, alimentação inadequada e infecções parasitárias (TAVARES-DIAS et al., 2006; FAO, 2016).

Infecções parasitárias são um dos fatores que limitam a piscicultura, e podem estar relacionadas por implicações ambientais, genéticas e nutricionais (TAVARES-DIAS et al., 2006). As doenças não infecciosas são controladas por boas práticas de manejo e higiene nos ambientes de cultivo (OWENS, 2012; LUCAS; SOUTHGATE, 2012). Já as doenças infecciosas são as mais estudadas, pois o tratamento exige cuidados mais refinados do manejo com aplicações de medicamentos para o controle da disseminação e recuperação dos animais infectados.

A utilização de substâncias químicas para o controle de patologias na piscicultura iniciou com uso de banhos com cloreto de sódio para o controle de ectoparasitas, outras substâncias muito conhecidas são a formalina e os desinfetantes com cobre, eficazes para o controle de protozoários que infectam espécies de água doce, dentre outros (BRAVO, 2005; PICÓN-CAMACHO et al., 2012).

As parasitoses são responsáveis por alta mortalidade na piscicultura em regime de confinamento (tanques) devido os parasitas alimentarem-se de sangue, podendo causar lesões severas e com nível alto de contágio, provocando altos índices de mortalidade. O grau de infestação das brânquias, por exemplo, dificulta a respiração dos peixes, causando a morte por asfixia (DIAS et al., 2016). As parasitoses comumente encontradas no ambiente de cultivo são da classe dos Monogenea, ectoparasitos com ciclo de vida direto (EIRAS et al., 2010; NOGA, 2010), ou seja, em apenas um hospedeiro, o que o torna um dos parasitas mais problemáticos para a piscicultura de Tambaqui (SANTOS et al., 2013), devido a sua capacidade de proliferação no corpo e brânquias dos peixes.

Alguns fármacos já são bastante utilizados para o tratamento de parasitoses na piscicultura, dentre os ativos utilizados estão a formalina, o sulfato de cobre, o cloreto de sódio, o permanganato de potássio, o levamisol, albendazol e praziquantel com eficácia comprovada de 65% para monogenéticos. Entretanto, existem relatos de efeitos tóxicos e acúmulo de resíduos na musculatura oferecendo risco para o consumidor e para o meio ambiente (ONAKA et al. 2003; KATHARIOS et al. 2006; MACIEL, 2009).

Nos Estados Unidos da América (EUA), a *Food and Drug Administration (FDA)* restringe bastante o uso de fármacos em peixes, pois podem causar resistência dos parasitas, bem como a geração de resíduos no meio ambiente. As indústrias da piscicultura são obrigadas a vigiar os fatores de riscos, no intuito de minimizar a incidência de doenças. Os fármacos aprovados pela FDA nos EUA são a formalina, o sulfadimetoxina/ormetoprim, o sulfamerazina, o oxitetraciclina, o metassulfanato de tricafina e operóxido de hidrogênio (GONZÁLEZ-MANTILLA, 2010).

No Brasil, compostos de baixa prioridade são empregados em condições específicas, tais como, ácido acético, óxido de cálcio, cloreto de sódio, potássio e cálcio, iodo e bicarbonato de sódio. A natureza química destes compostos é de baixa complexidade e fácil biotransformação no organismo e meio ambiente. Uma

grande parte dos fármacos é solúvel em água e também podem ser adicionados no alimento e outros são aplicados por vacinas (GONZÁLEZ-MANTILLA, 2010).

O uso de substâncias químicas na piscicultura pode ser prejudicial na cadeia alimentar e para o meio ambiente. Desta forma, tem-se buscado métodos alternativos para o controle de doenças em organismos aquáticos. Dentre estas novas alternativas, destaca-se o uso de produtos de origem vegetal, pois apresenta alta disponibilidade, eficácia no controle de patógeno e baixa toxicidade (DE QUEIROZ; DE ALMEIDA, 2013). Alguns trabalhos encontrados na literatura utilizam extrato aquoso de folhas de amendoeira (*Terminalia catappa*) por exemplo, foi evidenciada no controle dos monogenéticos ectoparasitas *Gyrodactylus* spp. e *Dactylogyrus* spp. (CHANSUE; TANGTRONGPIROS, 2005; SANTOS, 2013).

Alguns fitoterápicos bastante estudados efetivos para o uso em piscicultura são extraídos de plantas como, alho (*Allium sativum*), e tem como principais propriedades imunoestimulantes, antibacteriano e antifúngico (Pereira, 2015). Cominho-negro (*Nigella sativa*), tem como propriedades aumentar a atividade das células de defesa e células T, inibir crescimento bacteriano e bons resultados contra parasitoses (TAVECHIO, 2009), Equináceas (*Echinacea* spp.), Manjerona (*Origanum marjorana*) e folhas de Nim ou Neem (*Azadirachta indica*) (DIAB et al., 2008; JOHN et al., 2007; MESALHY et al., 2007; CHITMANAT et al., 2005 a e b; CRUZ, 2005). Banhos profiláticos com sal, formol ou permanganato de potássio, bem como evitar estressar os animais, pois é uma das causas que deixa os peixes susceptíveis a parasitoses, devido a alta concentração de cortisol no sangue.

Neste sentido, a busca por novas alternativas terapêuticas para controle de parasitoses e melhoramento do manejo, diminuindo com isso os custos de produção e agregando maior valor ao produto final, está levando os pesquisadores em busca de alternativas para melhorar a qualidade de vida destes animais em seus ambientes de cultivos (tanques).

2.3 Nanotecnologia farmacêutica: Sistemas de Liberação Controlada para aplicação na piscicultura

A expansão da piscicultura no Brasil passa por uma fase de consolidação, a partir da intensificação da criação surge a necessidade de maiores domínios sobre o monitoramento da água, qualidade da ração, prática do manejo e saúde dos animais, para poder promover assim um produto final de qualidade com alto teor de proteínas e ômega, para fins de potencializar o agronegócio no país (Anuário Peixe Br, 2020). Nos últimos anos a produção nacional avançou significativamente e posicionou o Brasil entre os maiores produtores de Tilápia do mundo. O mercado interno aumentou o consumo de pescados (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2018).

Os maiores problemas advindo dos peixes criados em cativeiro enfrentado pelos produtores são devido ao manejo inadequado como: alta densidade de peixes em áreas pequenas, baixa qualidade da água, alimentação inadequada e infecções parasitárias (TAVARES-DIAS et al., 2006; FAO, 2016). O comportamento desses animais pelo estresse e, conseqüentemente, as patologias que os acometem no regime de confinamento acabam gerando perdas econômicas significativas ao produtor, levando a utilização de substâncias químicas de forma indiscriminada no setor da piscicultura. Esse fato causa risco de toxicidade para os consumidores do produto e poluição ao meio ambiente por algumas destas substâncias não serem biodegradáveis e/ou de fácil eliminação natural.

Busca-se, então, novas alternativas como desenvolvimento de formulações atóxicas, biodegradáveis e seguras para os animais e o meio ambiente (GONZALEZ et al., 2014). Baseada nesse contexto, a nanotecnologia vem ganhando espaço na comunidade científica como potencial ferramenta no desenvolvimento de formulações contendo substância ativa de interesse para o tratamento de patologias voltada para aplicação na piscicultura.

O emprego da nanotecnologia relacionada ao sistema de liberação controlada (SLC) de princípio ativo proporciona algumas vantagens em relação aos sistemas convencionais, dentre elas: liberação controlada e prolongada da ação do fármaco, administração mais segura (menor número de doses) com diminuição de efeitos tóxicos e aumento do índice terapêutico (BARBUCCI, 2002; AZEVEDO, 2003; KAH, M. et al., 2015).

Na preparação desses sistemas nanocarreadores, vários são os tipos de polímeros empregados para sua obtenção, podendo ser de origem natural ou sintético, com destaque para o polímero quitosana (QTS), amplamente utilizado em formulações farmacêuticas com aplicação na medicina humana e veterinária, devido

as suas características de baixo custo, atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesão (KUMAR, 2008; GÜNBEYZA et al, 2010; NIU et al. 2013). Os principais objetivos da nanoencapsulação são: auxílio na proteção frente à degradação por agentes externos, como temperatura e umidade, melhorar a solubilidade aquosa e conseqüentemente a biodisponibilidade, aumentando assim, a eficácia terapêutica. (DUMAN, F.; KAYA, M. 2016).

O fármaco modelo, Albendazol (ABZ) (5- (propiltio) -1-H-benzimidazol- 2-il carbâmico) (Figura 5), é um dos agentes anti-helmínticos de amplo espectro mais efetivo, bastante conhecido na medicina humana e veterinária. É identificado como classe II do sistema biofarmaceutico devido a sua baixa solubilidade em água (RAI et al., 2000; KORADIA et al., 2012). Essa propriedade relacionada com a baixa solubilidade aquosa compromete a absorção e conseqüentemente a biodisponibilidade (LIU et al., 2013; IBRAHIM et al., 2014). Segundo a literatura (PRANZO et al 2010; FLORES, 2010), para o ABZ são reportadas duas formas polimórficas (I e II). A forma I é considerada polimorfo metaestável à temperatura ambiente, por apresentar maior solubilidade que a forma polimórfica II.

A busca por nanoformulações de interesse na piscicultura é uma alternativa para carrear ativos em sistemas de liberação controlada, dentre os sistemas estudados encontra-se na literatura nanocápsulas poliméricas devido a sua capacidade de interagir com a mucosa e aumentar a permeação de drogas pela pele e brânquias dos peixes (TORCHILIN, VLADIMIR P (2014); CHARLIE-SILVA, IVES et al. 2020).

O uso de nanopartículas para carrear antígenos se associa ao desenvolvimento de vacinas a fim de prevenir e controlar doenças infecciosas na piscicultura. Nesse sentido, encontra-se na literatura vários tipos de nanopartículas para administração de vacinas para peixes, incluindo polímeros biodegradáveis, nanolipossomas, nanotubos e complexos imunoestimulantes (poli ácido láctico-co-glicólico) e a quitosana são formas de nanosistemas mais estudadas (BRUDESETH et al., 2013; VINAY, THARABENAHALLI NAGARAJU et al. 2018).

Diante do avanço da piscicultura no Brasil nas últimas décadas, esse trabalho segue a vertente pela busca de uma alternativa terapêutica inovadora empregando as nanopartículas de quitosana fluorescentes contendo albendazol como sistemas de liberação de fármaco para sanidade de tambaquis Amazônicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obter nanopartículas de quitosana marcadas com isotiocianato de fluoresceína contendo albendazol, avaliar a capacidade de encapsulação da matriz polimérica com o fármaco através do estudo teórico e estudo de estabilidade para posterior aplicação e avaliá-las frente ao efeito de exposição aguda em biomarcadores do peixe-zebra (*Danio rerio*).

3.2. Objetivos específicos

3.2.1 SEÇÃO COMPUTACIONAL

- Otimizar as estruturas tridimensionais da Quitosana (QTS), Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) e Albendazol (ABZ) a nível de mecânica quântica utilizando o funcional híbrido B3LYP no software Gaussian 09;
- Elucidar as interações intermoleculares entre as QTS-FITC e ABZ através de Docagem Molecular;
- Obter Mapa do potencial eletrostático das moléculas em estudo.

3.2.2 SEÇÃO EXPERIMENTAL

- Obter as nanopartículas de quitosana marcadas com isotiocianato de fluoresceína contendo Albendazol (NP QTS|ABZ);
- Caracterizar NP QTS|ABZ em tamanho médio, índice de polidispersividade e carga superficial;

- Realizar estudo de estabilidade das nanopartículas em 90 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os reagentes e solventes utilizados são de grau analítico com alta pureza. Os reagentes: quitosana (QTS) grau de desacetilação 85%; Baixo peso molecular; Substância Químicas de Referência, Albendazol; Tripolifosfato de sódio (TPP); Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) todos obtidos pelo fabricante Sigma. Os solventes utilizados: Ácido acético P.A; Álcool etílico P.A. e Metanol desidratado P.A todos com grau de 99% de pureza e obtidos pelo fabricante Synth.

4.2 Métodos

4.2.1 SEÇÃO COMPUTACIONAL

4.2.1.1 Modelos estruturais

As estruturas dos constituintes da formulação QTS, FITC e ABZ foram obtidas em 2D do banco de dados *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e posteriormente desenhadas tridimensionalmente e minimizadas através da mecânica clássica MM 2+ no programa *CHEM 3D ULTRA 12.2.0* (Cambridge Soft Corporation, Cambridge, MA). A partir das estruturas minimizadas foram realizados cálculos para otimização da energia usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de funções de base 6-31G (d,p) no programa *Gaussian 09* (FRISCH et al, 2009) . Em seguida, desenhou-se a quitosana marcada com FITC (QTS-FITC) segundo o trabalho de (ZHAO et al 2006), posteriormente, foi aplicado o cálculo para

otimização da estrutura. A visualização das moléculas otimizadas foi realizada com o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY et al., 1996).

4.2.1.2 Mapa do Potencial Eletrostático (MPE)

Foi calculado o Mapa do Potencial Eletrostático (MPE) para QTS e ABZ. As superfícies de MPE foram descritas como ponto de carga, e derivadas do método B3LYP/6-31G (d,p) calculados no programa *Gaussian 09* (FRISCH et al, 2009) e geradas pelo programa *Molekel Visualization* (PORTMANN et al., 2000). Essas superfícies correspondem a um valor de isodensidade igual a 0,05 a.u.

4.2.1.3 Método de Docagem Molecular

Com objetivo de compreender e quantificar as interações entre QTS-FITC e o ABZ, foi realizado o estudo de Docagem Molecular, onde é possível visualizar as interações moleculares (Ligação de Hidrogênio, Dipolo-Dipolo ou Van Der Waals) no programa *Autodock Vina* (TROTT, Oleg; OLSON, Arthur, 2010). Neste estudo, foi adotada QTS-FITC como ligante e ABZ como receptor fixo. O processo de Docagem Molecular foi realizado por predição de afinidade em um complexo receptor-ligante, pelo método da função de pontuação, fundamentada no método estocástico de Monte Carlos.

O estudo de Docagem Molecular foi realizado com o software *AutoDock 4.2* para QTS-FITC e o ABZ, utilizando precisão regular com um máximo de 100 conformações por candidato. As cargas de Kollman e os hidrogênios necessários para o cálculo foram adicionados na molécula de QTS-FITC. As ligações rotativas do ligante foram automaticamente ajustadas e os seus hidrogênios não polares foram removidos. As conformações foram classificadas utilizando a função de pontuação ‘*scoring*’ e o algoritmo Lamarckiano Genético. Após a localização de sítios de ligação, as conformações do complexo estabelecido foram otimizadas utilizando o algoritmo *steepest decent* para convergência com um máximo de 10 interações.

Além dos estudos de docagem molecular, que viabilizaram a compreensão das interações entre QTS e ABZ, outra ferramenta da química computacional utilizada para assegurar a agregação molecular, sistema de encapsulação e definição de estabilidades de formulações, está pautada na utilização dos estudos de dinâmica molecular aplicados ao polímero de QTS (RAZMIMANESH, AMJAD-IRANAGH, 2015; SANYAKAMDHORN et al., 2013; WANG et al., 2013).

As formulações foram desenvolvidas em duas etapas: na primeira etapa, marcou-se o polímero de quitosana com a fluoresceína e posteriormente o desenvolvimento da nanoformulação contendo o ativo (ABZ). A caracterização de tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e carga superficial foram realizadas no equipamento ZetasizerNano (Malvern).

4.2.2 Seção experimental

4.2.2.1 Marcação da quitosana com isotiocionato de fluoresceína (FITC)

Inicialmente, uma solução de FITC (100 mg) foi preparada em 150 mL de metanol desidratado. Em seguida, esta solução adicionada a um volume de 100 mL de solução de QTS (1 %) em ácido acético 0,1 M, permanecendo essa reação em repouso durante 24 horas protegida da luz, tempo necessário para ocorrer a ligação entre o grupo isotiocianato da fluoresceína e o grupo amino da QTS (COSTA, AC da S., et al. 2015; ZHAO, Jiayin; WU, Jianmin 2006; MA; LIM, 2003)

A QTS marcada com FITC (QTS/FITC) foi precipitada por elevação do pH do meio (pH 2,35 para pH 9) com solução de hidróxido de sódio 0,5M. A precipitação tem objetivo de separar a fração de FITC não ligada à cadeia polimérica da QTS. Em seguida fez-se a remoção do FITC não ligado por ciclos de lavagem utilizando água destilada e centrifugação (11.000 rpm/ 15 min), até que a não fluorescência seja detectada no sobrenadante por espectrofotometria (a 490 nm e 520 nm). Por fim, a QTS marcada foi congelada e liofilizada (ZHAO, Jiayin; WU, Jianmin, 2006; MA; LIM, 2003). A reação a baixo ilustra a ligação covalente do FITC com a QTS.

FITC QTS

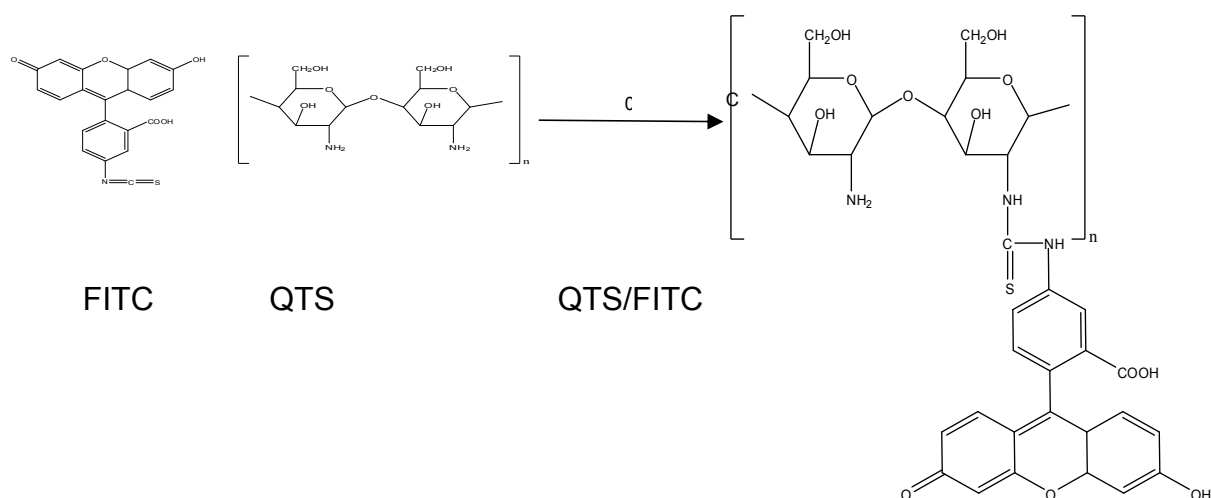


Figura 1. Esquema da formação da ligação covalente QTS-FITC. Fonte: Zhao, J., & Wu, J. (2006), com adaptações.

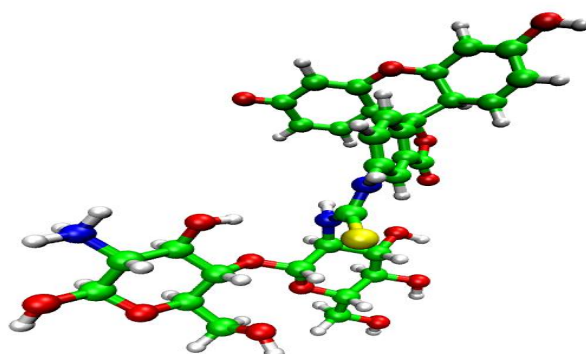


Figura 2. Visualização 3D 1 monômero de CS fazendo ligação covalente ao isotiocianato de fluoresceína (CS/FITC). Estrutura química otimizada MM². Fonte: Próprio autor (Visual Molecular Dynamics - VMD).

4.2.2.2 Preparação das nanopartículas contendo albendazol pelo método Gelatinização Ionotrópica

As nanopartículas fluorescentes de QTS/FITC reticulada com tripolifosfato de sódio (NP QTS/ABZ) foram preparadas através da metodologia de Calvo *et al* (1997) com adaptações. As NP QTS/ABZ foram preparadas em duas etapas: primeiro,

preparação das soluções reagentes de QTS/FITC e Albendazol (ABZ). Na segunda etapa, agitação mecânica e adição do agente reticulante (TPP).

Primeiro 1g de QTS/FITC foi solubilizada sob agitação em 500 mL de solução de ácido acético (0,2%; 0,6%; 1% v/v). Destas soluções, foi retirada uma alíquota de 167mL e adicionado 0,6g do agente espessante (Polaxame 188) para obter as nanopartículas contendo ABZ (LIU, Yang, et al. 2013).

Na segunda etapa, foram preparadas três soluções do fármaco, 0,2g de ABZ solubilizado em 50mL de ácido acético P.A e diluindo com 40mL de álcool etílico P.A. com tempo de repouso (30 minutos) (Farmacopeia, 5ed. 2010), com adaptações. Estas soluções foram misturadas e levadas a agitação mecânica (1000 rpm) sob gotejamento de 20mL com vazão de 10mL/min do agente reticulante TPP utilizando uma bomba peristáltica. (LIU, Yang, et al., 2013). O fluxograma (Figura 3 a baixo) perpassa pelo processo de obtenção das NP QTS/ABZ. Na Tabela 1 estão os pesos em gramas de cada substância presente na formulação.

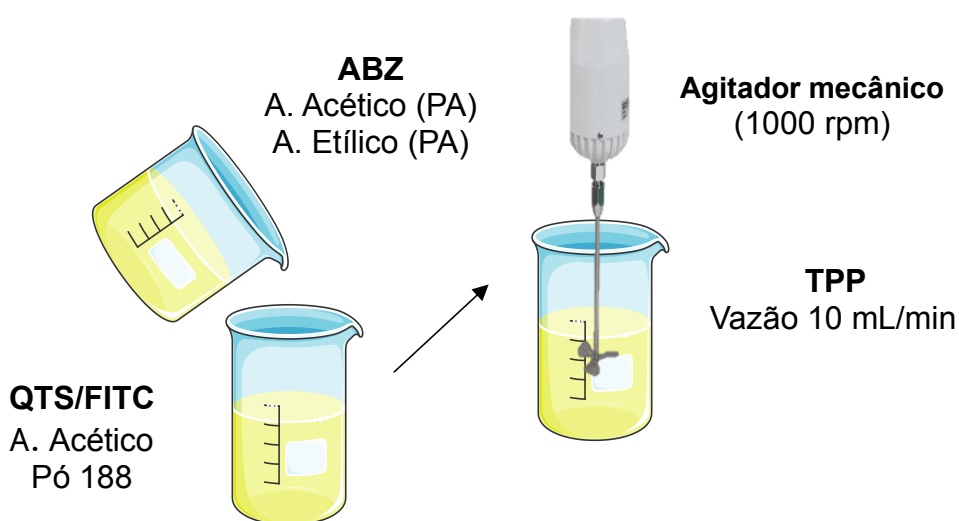


Figura 3. Esquema preparação das nanopartículas fluorescente de quitosana contendo Albendazol. Fonte: Próprio autor.

Tabela 1. Três sistemas coloidais.

Solvente	QTS/FITC	Pó 188	ABZ	TPP
CH ₃ COOH 0,2%	1 g	0,6 g	0,2g	1mg/mL
CH ₃ COOH 0,6%	1 g	0,6g	0,2g	1mg/mL
CH ₃ COOH 1%	1 g	0,6g	0,2g	1mg/mL

4.2.2.3 Determinação da mobilidade eletroforética e tamanho médio das nanopartículas

As NP QTS/ABZ em forma de coloide foram primeiramente dispersas em água ultra-pura com proporção (1:100) e em seguida, o tamanho do raio hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (PDI) e carga superficial das nanopartículas foram determinadas através do Zetasizer (Malvern Instruments) com periodicidade de análises dia 0, 7, 15, 22 e 142 dias. Estas formulações permaneceram armazenadas em temperatura entre 2 - 8°C (geladeira), apenas retiradas no dia da análise para atingir temperatura ambiente (25°C).

4.2.2.4 Tratamento estatístico

Os resultados foram avaliados com os testes de ANOVA seguido de teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seção computacional

5.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS

Após à otimização das estruturas de QTS, ABZ e QTS-FITC (Figuras 4, 5 e 6), respectivamente, pelo método Teoria do Funcional de Densidade (TFD) (MORGON et al., 1995), obtiveram-se os valores mínimos de energia para cada molécula, estas apresentadas na Tabela 3. As estruturas otimizadas foram visualizadas no programa VMD.

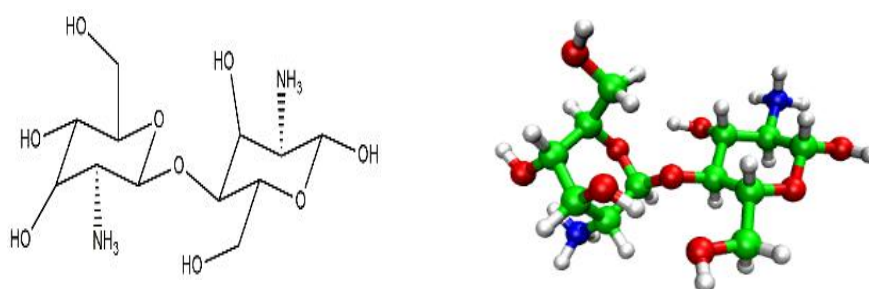


Figura 4. Estrutura derivada do cálculo com o método B3LYP/6-31 G(d,p) monômero de Quitosana.

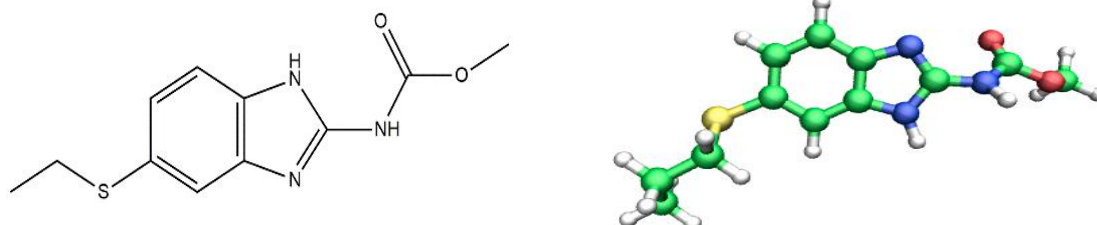


Figura 5. Estrutura derivada do cálculo com o método B3LYP/6-31 G(d,p) molécula Albendazol.

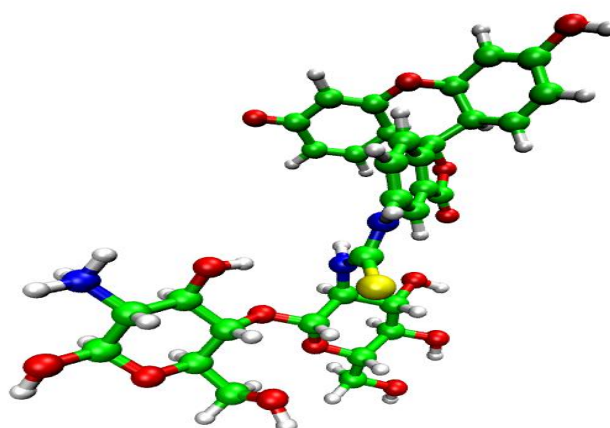


Figura 6. Estrutura derivada do cálculo com o método B3LYP/6-31 G(d,p) monômero do QTS-FITC.
Fonte: Autor.

Tabela 3. Energias das moléculas otimizadas pelo método DFT utilizando o híbrido B3LYP

Moléculas	Energias (HF)
QTS	-1258.8982 Há
ABZ	-1173.8215 Há
QTS-FITC	-2895.3846 Há

5.1.2 MAPA DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO (MEP)

A partir das estruturas otimizadas foi realizado o cálculo da carga superficial (MPE) para determinar as regiões dos orbitais de fronteira da QTS e ABZ. Nas Figuras 7 e 8, respectivamente, pode-se observar as regiões eletrofílicas em azul (potencial eletrostático positivo) e regiões nucleofílicas em vermelho (potencias eletrostático negativo).

O MPE é uma ferramenta da química computacional informativa para distribuição de cargas de uma molécula. Tem sido amplamente aplicado em estudos biológicos e na definição de reatividade (CUBERO et al., 1998). Neste trabalho, o método foi aplicado para elucidar as interações intermoleculares entre moléculas aqui estudadas. A partir da distribuição de carga de uma molécula, pode-se determinar as regiões com maior densidade de elétrons (em inglês Highest Occupied Molecular Orbital - HOMO) e regiões com menor densidade eletrônica (em inglês lowest Unoccupied Molecular Orbital - LUMO).

No MEP do ABZ Figura 7, as regiões eletrofílicas podem ser identificadas em torno dos hidrogênios ligados aos nitrogênios dos grupos amino. As regiões nucleofílicas do ABZ de maior intensidade são visualizadas no nitrogênio do anel aromático e regiões de menor intensidade, no oxigênio da ligação cetonas, ao longo do anel imidazólico e ao redor do enxofre. Vale ressaltar, que o nitrogênio do grupo farmacofórico do ABZ é um importante sítio de interação com a QTS, em que ocorrem as interações, principalmente, as ligações de hidrogênio como observado

no estudo de Docagem Molecular. O orbital molecular ocupado de maior energia, HOMO= -0,20959 e o orbital ocupado de menor energia, LUMO= - 0,02094.

No monômero de QTS Figura 8 pode-se evidenciar as regiões eletrofílicas em torno dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxílicos e regiões nucleofílicas de maior intensidade em torno dos átomos de oxigênio e de menor intensidade no grupo pirano do anel de quitosana e nas ligações 0- acetil. Os valores do orbital molecular ocupado de maior energia são (HOMO = -0,20959) e orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO= - 0,02094).

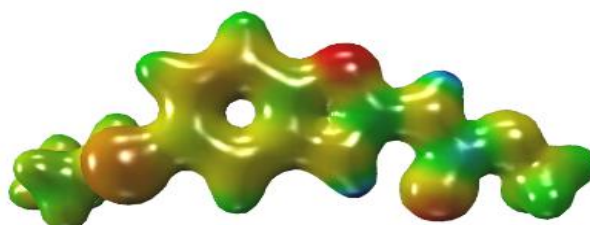


Figura 7. Mapa do Potencial Eletrostático (MPE) do ABZ derivado do cálculo B3LYP/6-31 G(d,p).

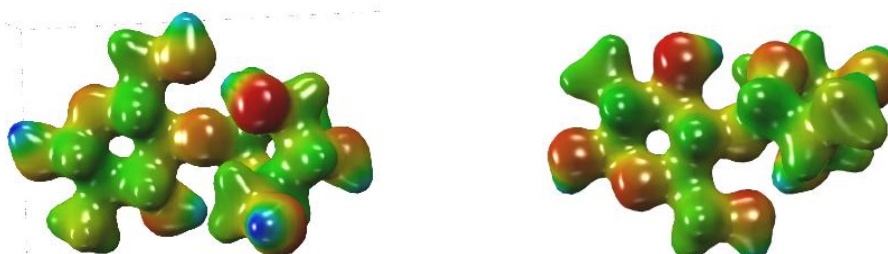


Figura 8. Mapa do Potencial Eletrostático (MPE) da QTS derivado do cálculo B3LYP/6-31 G(d,p).

5.1.3 DOCAGEM MOLECULAR

A partir das estruturas otimizadas e obtenção do MPE foi realizado o estudo de Docagem Molecular com objetivo de entender as interações intermoleculares

entre QTS-FITC e ABZ. Neste trabalho, a QTS-FITC foi tratada como ligante e o ABZ receptor fixo.

Foram gerados 19 modelos com seus respectivos valores de energia de afinidade e desvio médio quadrático (RMSD), apresentados na Tabela 4. Os modelos obtidos mais representativos do estudo de Docagem foram visualizados no programa VMD para elucidar as interações estabelecidas entre QTS-FIT e o ABZ.

Dentre os modelos obtidos, os modelos 9 e 17 revelaram valores de energia de afinidade mais estável de -2,3 Kcal/mol e -2,0 Kcal/mol, respectivamente. A estabilidade dos sistemas está relacionada com as ligações de hidrogênio estabelecidas.

A partir dos resultados da Docagem Molecular foi possível observar as forças intermoleculares presentes, principalmente, as ligações de hidrogênio. Na Figura 9 (modelo 9), pode-se observar interações entre o átomo de hidrogênio do grupo amino da QTS e o átomo de Oxigênio da carboxila do ABZ no valor de 3,04 Å. Outra interação neste modelo ocorre entre o átomo de hidrogênio polar do grupamento farmacofórico do ABZ com o átomo de oxigênio do anel pirano da QTS no valor de 2,78 Å.

A Figura 10 (modelo 17) mostra novamente a ligação de hidrogênio entre átomo de hidrogênio polar do ABZ com o átomo de oxigênio da QTS com um valor de 3,75 Å. Outra interação ocorre entre o átomo de oxigênio do grupo carboxila do ABZ com átomo de hidrogênio do grupo hidroxílico da QTS no valor de 2,28 Å.

Esses resultados evidenciam que o polímero de QTS pode ser utilizado como possível carreador na formação das nanopartículas devido às ligações de hidrogênios estabelecidas. Segundo Wang e colaboradores (2013), o processo de encapsulação é conduzido principalmente por ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas, de Van der Waals e Interações eletrostáticas.

A análise dos resultados de docagem molecular também foi baseada no desvio médio quadrático das posições dos átomos (RMSD – Root Mean Square Deviation). Segundo Warren e colaboradores (2006), o valor padrão de RMSD utilizado para considerar estruturas que foram corretamente preditas é de 2,0 Å, embora uma distância de até 2,5 Å, também seja considerado um bom resultado.

Assim, o estudo de Docagem revelou que o modelo 6, ilustrado na Figura 11 foi o menos estável em relação aos modelos obtidos, ou seja, com um maior valor de energia -2,4 Kcal/mol e RMSD de 11.709 Å. Neste modelo não ocorre interação

entre as moléculas de QTS e ABZ. Em contrapartida, o modelo 9 apresentou melhor estabilidade, com energia de afinidade de -2,3 Kcal/mol e RMSD 1,889. Esta estabilidade pode estar relacionada com as ligações de hidrogênios estabelecidas.

Tabela 4. Modelos obtidos com a Docagem Molecular

Modelos	Energia de afinidade (Kcal/mol)	Distância RMSD (Å)	Melhor modelo RMSD (Å)
1	-2.5	0.000	0.000
2	-2.4	4.317	8.603
3	-2.4	4.520	8.252
4	-2.4	1.607	4.176
5	-2.4	2.257	8.284
6	-2.4	7.431	11.709
7	-2.3	4.756	8.895
8	-2.3	2.157	8.111
9	-2.3	1.553	1.889
10	-2.3	3.197	5.587
11	-2.3	2.796	8.780
12	-2.1	2.875	8.556
13	-2.1	2.226	8.558
14	-2.1	2.701	8.865
15	-2.1	3.143	5.798
16	-2.0	6.335	12.369
17	-2.0	1.787	2.320
18	-2.0	6.154	9.456
19	-2.0	2.860	4.780

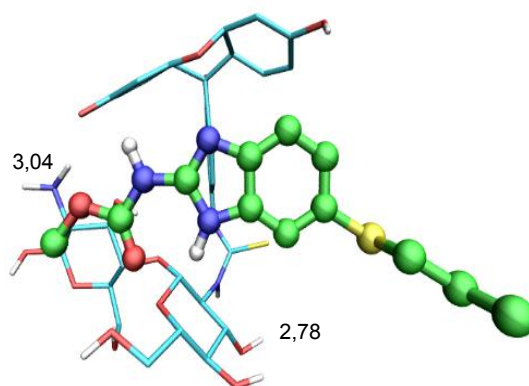


Figura 9. Modelos 9, resultante da Docagem Molecular. ABZ ao centro e QTS-FITC.

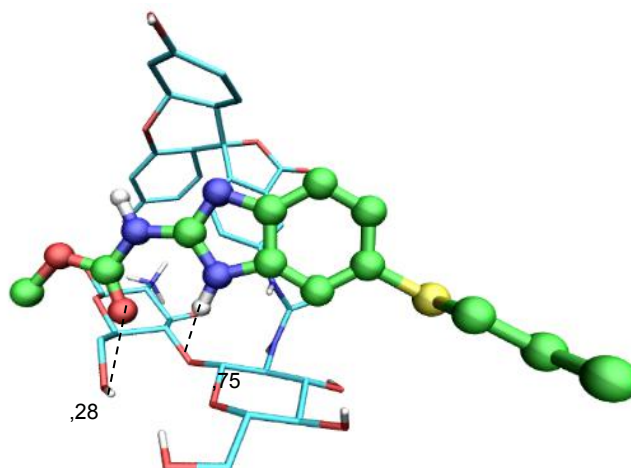


Figura 10. Modelo 17, resultante da docagem molecular. ABZ ao centro e QTS-FITC

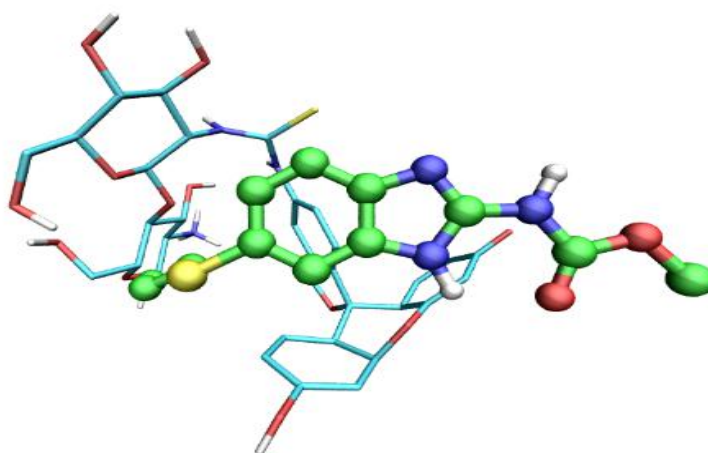


Figura 11. Modelo 6, resultante da Docagem Molecular. ABZ ao centro e QTS-FITC.

5.2. Seção experimental

Os sistemas coloidais nanoestruturados feitos neste trabalho foram obtidos por gelatinização ionotrópica, em que se observou que o grau de desacetilação do polímero de quitosana foi determinante no tamanho das partículas devido

grupamento amino (-NH₂) presente na cadeia polimérica interagir por meio de forças intermoleculares com o solvente por ligações de hidrogênio e interações de Wan der Waals promovendo a solubilização da QTS/FITC. Entretanto, o marcador orgânico (FITC) empregado fez ligação covalente com os grupamentos aminos protonados da quitosana, e com isso, o FITC diminui a quantidade de grupamentos aminos livres na cadeia polimérica responsáveis pela solubilização da QTS/FITC. Por conseguinte, preparou-se três formulações no sentido de investigar a concentração do solvente ideal para obter NP QTS/ABZ a serem aplicadas em banhos terapêuticos.

As formulações obtidas apresentaram tamanho médio de 227 nm. Segundo a literatura, estudos com nanopartículas de QTS para aplicação em Tambaquis o tamanho médio ideal para alcançar os tecidos alvos citados é de 220 nm (COSTA AC da S. et. al., 2015). Os resultados referentes a PDI (Tabela 5, 6 e 7) indicam uma polidispersão média entre os sistemas coloidais nanoestruturados com valores de 0,397; 0,253 e 0,368, formulação 0,2%, 1% e 2%, respectivamente. O PDI reflete diretamente na estabilidade das formulações nanoestruturadas, pois é através deste índice que se determina a estabilidade da partícula pela caracterização do tamanho médio. Quando o PDI se apresenta muito elevado tem-se uma tendência a aglomeração das partículas, o que pode deixar o sistema com heterogeneidade relacionada a tamanho. Em relação à carga superficial das nanopartículas, ela reflete a estrutura do polímero de QTS por apresentar características catiônicas, com isso, observa-se nas Tabelas 5, 6 e 7 uma média na carga +20,28; +19,62 e +17,06, respectivamente. Este resultado é um indicativo que o ABZ foi encapsulado e, provavelmente, esteja no interior da matriz polimérica, uma vez que o referido fármaco apresenta carga negativa sendo evidenciado nas formulações cargas da superfície positiva, propriedade do polímero de quitosana.

O estudo de estabilidade das nanopartículas foi realizado em geladeira com tempo de análise em torno de 140 dias e temperatura entre 2 - 8°C. Com isso, pode-se observar que o tamanho médio após o tempo citado foi de 150,1 nm; 158,08 nm e 219,04 nm, respectivamente Tabelas 5, 6 e 7. Os resultados determinados neste trabalho corroboram com a literatura, uma vez que estão dentro do padrão para alcançar o órgão de interesse para avaliação em banhos terapêuticos (LIU, YANG, et al., 2013; COSTA AC da S. et. al., 2015).

Contudo, a investigação feita para avaliar as diferentes concentrações utilizadas de ácido acético no preparo da solução de QTS\FITC, segundo o estudo

estatístico de ANOVA, determinou-se com 95% de confiança que a concentração do solvente (ácido acético) não leva a mudanças significativas nesses parâmetros analisados (tamanho médio, PDI e carga superficial) das NP QTS/ABZ, ou seja, a concentração é nula quando comparada aos parâmetros aqui estudados. A partir deste resultado, o desenvolvimento da nanopartícula foi realizado com a solução na concentração de 0,2%, visando a menor probabilidade residual de solvente no produto final.

Tabela 5. Resultados tamanho médio (nm), PDI e Carga superficial (F1).

NP QTS/ABZ CH₃COOH [0,2%]	Tamanho (nm)	PDI	C (mV)
Dia 0	251,2 ± 11,31	0,310 ± 0.010	23,7 ± 1.12
Dia 7	174,0 ± 2.593	0,276 ± 0.026	30,1 ± 2.54
Dia 15	179,0 ± 4.911	0,387 ± 0.052	25,2 ± 4.05
Dia 22	172,6 ± 3.987	0,314 ± 0.024	14,5 ± 4.16
142	150,9 ± 0.6557	0,248 ± 0.007	7,9 ± 0.946

Tabela 6. Resultados tamanho médio (nm), PDI e Carga superficial (F2).

NP QTS/ABZ CH₃COOH [1%]	Tamanho (nm)	PDI	C (mV)
Dia 0	231,0 ± 7.418	0,325 ± 0.045	24,4 ± 3.65
Dia 7	146,2 ± 1.539	0,222 ± 0.033	25,3 ± 1.13
Dia 15	131,4 ± 3.632	0,182 ± 0.011	17,7 ± 2.26
Dia 22	133,9 ± 6.841	0,302 ± 0.030	18,8 ± 2.54
142	147,9 ± 5.556	0,236 ± 0.013	11,9 ± 1.31

Tabela 7. Resultados tamanho médio (nm), PDI e Carga superficial (F3).

NP QTS/ABZ CH₃COOH [2%]	Tamanho (nm)	PDI	C (mV)
Dia 0	198,8 ± 14.80	0,348 ± 0.075	22 ± 1.65
Dia 7	215,6 ± 10.75	0,384 ± 0.023	21,6 ± 0.665
Dia 15	204,7 ± 4.397	0,498 ± 0.013	11,6 ± 0.929
Dia 22	202,9 ± 4.278	0,357 ± 0.015	10,2 ± 0.920

142	273,2 ± 7.824	0,227 ± 0.188	19,9 ± 3.44
-----	---------------	---------------	-------------

A partir da determinação da concentração ideal do solvente preparou-se as NP QTS/ABZ. A Tabela 8 mostra os primeiros resultados em relação a tamanho de partículas, PDI e carga superficial, após determinação da concentração ideal para solubilizar QTS/FITC. Vale ressaltar nesses resultados uma pequena alteração no procedimento de gotejamento do agente reticulante (Tripolifosfato de sódio) devido uma intercorrência no processo, pois a vazão utilizada deveria ser 10mL/min realizada por uma bomba peristáltica, mas o equipamento foi danificado ao longo do uso. Com isso, foi necessário adaptar o gotejamento contínuo utilizando a bureta (50mL).

A Tabela 8 apresenta o tamanho médio das nanopartículas, após 8 dias de armazenamento em geladeira sob temperatura entre 2 a 8 °C, as quais ficaram em um padrão acima dos resultados obtidos anteriormente (quando se utilizou a bomba peristáltica), o que nos leva a compreender a importância da vazão para obtenção de nanopartículas com tamanho médio abaixo de 220 nm. Em relação ao índice de polidispersividade também se nota uma polidispersão de alta para média após 8 dias. A carga superficial como esperado apresentou-se catiônica caracterizando a encapsulação do ativo pela QTS.

Na Tabela 9, o procedimento foi realizado após calcular a quantidade de gotas necessárias para estabelecer a vazão de 10mL/min. Após obtenção da relação de gotas com a vazão, obteve-se as nanopartículas, como se pode observar (Tabela 9) o tamanho médio ao término do oitavo dia em observação permaneceu abaixo do tamanho (220nm), ideal para avaliação em banhos terapêuticos.

Tabela 8. NP-QTS/ABZ obtidas, utilizando bureta (50 mL) sem conta gotas.

NP-CS/FITC CH₃COOH [0,2%]	Tamanho (nm)	PDI	C (mV)
Dia 0	688,2 ±	0,783 ±	+22,7 ±
Dia 8	323,1 ±	0,321 ±	+20,8 ±

Tabela 9. NP-QTS/ABZ obtidas, utilizando bureta (50mL) com conta gotas

NP-CS/FITC CH₃COOH [0,2%]	Tamanho (nm)	PDI	C (mV)
Dia 0	199,6 ±	0,532 ±	+23,3 ±
Dia 8	212,2 ±	0,393 ±	+12,6 ±

Por conseguinte, padronização do desenvolvimento e adaptação do método para preparação das nanopartículas que foram avaliadas em relação a tamanho ideal, obteve-se dois sistemas: - Formulação 1 (F1) - onde contém o fármaco Albendazol e Formulação branca - sem fármaco (FB). Nas Tabelas 10 e 11 estão postos os resultados referentes as características físicas das nanopartículas bem como a estabilidade no período de 90 dias.

Tabela 10. Formulação contendo fármaco: tamanho, índice de polidispersividade e carga superficial.

F1 (0,2g ABZ)	T (nm)	PDI	C (mV)
Dia 0	174,8 ± 1,097	0,219 ± 0,009	29,7, ± 1,15
24 h	208,9 ± 7,410	0,260 ± 0,041	29,8 ± 2,71
Dia 7	199 ± 2,166	0,236 ± 0,011	41,2 ± 1,07
Dia 14	237,2 ± 3,995	0,227 ± 0,004	24,4 ± 1,05
Dia 21	241,4 ± 0,5686	0,237 ± 0,006	23,2 ± 2,76
Dia 28	245,9 ± 1,872	0,230 ± 0,005	29,2 ± 1,46
Dia 60	267,7 ± 8,114	0,272 ± 0,026	27,6 ± 2,07
Dia 90	307,6 ± 21,15	0,262 ± 0,030	28,6 ± 0,833

Tabela 11. Formulação sem fármaco: tamanho, índice de polidispersividade e carga superficial

FB (Branca)	T (nm)	PDI	C (mV)
Dia 0	448,8 ± 98,66	0,544 ± 0,073	27,8 ± 3,48
24 h	356,9 ± 31,52	0,567 ± 0,054	27,9 ± 3,46
Dia 7	368,3 ± 6,706	0,546 ± 0,143	12,5 ± 6,10
Dia 14	355,9 ± 8,195	0,518 ± 0,126	44,4 ± 6,72
Dia 21	248,3 ± 0,433	0,433 ± 0,104	23,2 ± 3,49

Dia 28	201,1 ± 7,108	0,630 ± 0,124	15,1 ± 235
Dia 60	325,7 ± 50,06	0,507 ± 0,084	9,68 ± 3,23
Dia 90	289,3 ± 114,1	0,537 ± 0,136	25,4 ± 2,71

As caracterizações físicas das partículas realizadas neste trabalho são fundamentais para avaliar os efeitos agudo de exposição a NP QTS\ABZ visto que, a toxicidade de nanopartículas pode ser afetada pelo tamanho. Em tese, a literatura reporta que nanopartículas menores apresentam uma tendência de maior penetração celular e, conseqüentemente, maior toxicidade devido a maior área superficial, promovendo maior interação entre as nanopartículas e os sistemas biológicos (DURÁN, NELSON et al., 2019).

Assim, como objetivos futuros de avaliar os efeitos de exposição aguda das NP QTS/ABZ serão utilizados peixes adultos (peixe-zebra). Os nanomateriais à base de quitosana estão entre os biopolímeros promissores, sintetizados para diferentes aplicações, devido às suas características, biodegradabilidade e não toxicidade (RIZEQ, BALSAM R., et al., 2019; FLORES, P. T. 2021). Embora o uso de nanomateriais a base de quitosana seja promissor, as pesquisas atuais sobre a segurança não são suficientes para determinar as aplicações biomédicas. Estudos mostram citotoxicidade das nanopartículas a base de quitosana *in vitro* e *in vivo* (YU, HAIJUN et al., 2007; HU, YU-LAN et al., 2011; WANG, YANBO, et al., 2016; YOUNES, NADIN et al., 2019; ABOU-SALEH, HAISSAM et al., 2019).

Entretanto, faz-se necessário aprofundar os estudos de nanotoxicidade dos materiais a base de quitosana a fim de determinar os mecanismos desencadeados pela aplicação destes sistemas. Nesse contexto, a avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo são excelentes fontes de informações para avaliar a toxicidade de nanomateriais visto a especificidade das respostas, bem como contribuir para gerar ainda mais estudos de caracterização e aplicação de nanopartículas *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

O estudo teórico de interação intermolecular pelo método de docagem demonstram a quitosana como um transportador capaz de encapsular

espontaneamente as moléculas de albendazol devido às interações de ligações de hidrogênio.

As nanopartículas de quitosana fluorescentes contendo albendazol obtidas por gelatinização ionotrópica apresentaram propriedades físicas: tamanho médio, índice de polidispersividade e carga superficial promissoras para estudos de aplicação em banhos terapêuticos.

O tamanho médio e o índice de polidispersividade das nanopartículas avaliadas em diferentes concentrações do solvente indicou a concentração de 0,2% do solvente ideal para obtenção dos sistemas nanoestruturados.

Com isso, estudos da nanotoxicidade aguda *in vivo* utilizando peixe-zebra como modelo de exposição as nanopartículas de quitosana fluorescentes contendo albendazol são necessários para avaliar a segurança das nanopartículas.

7 REFERÊNCIAS

A.J. Hill, H. Teraoka, W. Heideman, R.E. Peterson **Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity** *Toxicol. Sci.*, 86 (2005), pp. 6-19

A.Y. Shull, C.A.A. Hu, Y. Teng **Zebrafish as a model to evaluate peptide-related cancer therapies** *Amino Acids*, 49 (2017), pp. 1907-1913

Abou-Saleh, H., Younes, N., Rasool, K., Younis, M. H., Prieto, R. M., Yassine, H. M., ... & Nasrallah, G. K. (2019). **Impaired liver size and compromised neurobehavioral activity are elicited by chitosan nanoparticles in the zebrafish embryo model.** *Nanomaterials*, 9(1), 122.

Abou-Saleh, H.; Younes, N.; Rasool, K.; Younis, M.H.; Prieto, R.M.; Yassine, H.M.; Mahmoud, K.A.; Pintus, G.; Nasrallah, G.K. **Impaired Liver Size and Compromised Neurobehavioral Activity are Elicited by Chitosan**

AJUN, W. et al. **Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study.** *Carbohydrate Polymers*, v. 75, n.4, p. 566-574, 2009

ALBANESE, Alexandre; TANG, Pedro S.; CHAN, Warren CW. **O efeito do tamanho, forma e química da superfície das nanopartículas em sistemas biológicos.** *Revisão anual da engenharia biomédica*, v. 14, p. 1-16, 2012.

AL-HUSSINEE, L.; SUBRAMANIAM, A. K.; AHASAN, M. S.; KELEHER, B.; WALTZEK, T. B. **Complete Genome Sequence of a Tilapia Lake Virus Isolate Obtained from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Genome Announcements*, Washington, v. 6 Issue 26, 2018, 2 p. e00580-18 p. 1-2.

Alves, C. M. G., Nogueira, J. N., Barriga, I. B., Dos Santos, J. R., Santos, G. G., & Tavares-Dias, M. (2019). **Albendazole, levamisole and ivermectin are effective against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae).** *Journal of fish diseases*, 42(3), 405-412.

ASCHE, F. **Farming the sea.** *Marine Resource Economics*, Chicago, v. 23, n. 4, p. 527-547, 2008.

B.L. Banik, P. Fattahi, J.L. Brown **Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine** *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.*, 8 (2016), pp. 271-299

BARONE, R. S. C.; LORENZ, E. K.; SONODA, D. Y.; CYRINO, J. E. P. **Fish and fishery products trade in Brazil, 2005 to 2015: A review of available data and trends.** *Scientia Agricola*, Piracicaba. v.74, n.5, p. 417-424, 2017.

Bobo, D., Robinson, KJ, Islam, J., Thurecht, KJ, & Corrie, SR (2016). **Medicamentos à base de nanopartículas: uma revisão de materiais e ensaios clínicos aprovados pela FDA até o momento.** *Pharmaceutical research*, 33 (10), 2373-2387.

Bobo, K.J. Robinson, J. Islam, K.J. Thurecht, S.R. Corrie **Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date** *Pharm. Res.*, 33 (2016), pp. 2373-2387

Brudeseth, BE, Wiulsrød, R., Fredriksen, BN, Lindmo, K., Løkling, KE, Bordevik, M., ... & Gravningen, K. (2013). **Status e perspectivas futuras de vacinas para piscicultura industrializada.** *Imunologia de peixe e marisco*, 35 (6), 1759-1768.

C. Jeuniaux, M. F. Voss-Foucart, M. Poulícek, J. C. Bussert. Chitin and Chitosan, G. Skjåk-Bræk, T. Anthonsen, P. Sandford (Eds.). Elsevier Applied Science, London, 1989, p. 3.

CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. **Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.153, p.41-50, 19

Costa, A. D. S., BRANDAO, H. D. M., Da Silva, S. R., Bentes-Sousa, A. R., DINIZ JUNIOR, J. A. P., Pinheiro, J., ... & Ribeiro-Costa, R. M. (2015). **Mucoadhesive nanoparticles: a new perspective for fish drug application.** *Embrapa Gado de Leite-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)*.

Charlie-Silva, I., Feitosa, NM, Gomes, JMM, Hoyos, DCDM, Mattioli, CC, Eto, SF, ... & Fraceto, LF (2020). **Potencial de nanocápsulas mucoadesivas na liberação de drogas e toxicologia em peixe-zebra.** *Plos um*, 15 (9), e0238823.

Chen, Y., Chen, H., & Shi, J. (2013). **In vivo bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles.** *Advanced Materials*, 25(23), 3144-3176.

Chou, C. M., Mi, F. L., Horng, J. L., Lin, L. Y., Tsai, M. L., Liu, C. L., ... & Cheng, C. H. (2020). **Characterization and toxicology evaluation of low molecular weight chitosan on zebrafish.** *Carbohydrate Polymers*, 240, 116164.

CROISIER, Florence; JÉRÔME, Christine. **Chitosan-based biomaterials for tissue engineering.** *European polymer journal*, v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013.

E. Haque, A.C. Ward **Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity** *Nanomaterials*, 8 (2018), p. 561

da Silva Costa, A. C., Carvalho, S. C., de Farias Silva, N., do Nascimento-Júnior, A. E. S., Cruz, J. N., de Jesus Chaves Neto, A. M., ... & Ribeiro-Costa, R. M. (2020). **Effect of chitosan/albendazole nanocarriers' solvation by molecular dynamics.** *Theoretical Chemistry Accounts*, 139(7), 1-15.

SOUZA, Kely Viviane de. **Desenvolvimento de espécies de ferro imobilizadas em matrizes poliméricas e sua utilização na remediação de resíduos industriais.** 2009. 192 f. Dissertação (Doutorado em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DOMARD, Alain; DOMARD, Monique. **Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications**. *Polymeric biomaterials*, v. 9, p. 187-212, 2002.

Durán, N., Rolim, WR, Durán, M., Fávaro, WJ, & Seabra, AB (2019). **Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos**. *Química Nova*, 42, 206-213.

FAO, Nanoparticles in the Zebrafish Embryo Model. *Nanomaterials* 2019, 9, 122.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2018**. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/publications/sofia/es/>>.

FAO, ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. FAO. **Fisheries and Aquaculture Department. Statistics**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>>.

FAO, ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. FAO. **Aquaculture Sector Overview. Brazil. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets**. Text by Suplicy, F.M. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online].

FAO, ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the Sustainable Development Goals**. Rome. 2018, p. 210.

FUENTES-SANTOS, L.; CUBILLO, A. M.; LABARTA, U. **A bioeconomic approach to optimize mussel culture production**. *Reviews in Aquaculture*, Richmond, 0 (2015), p. 1- 16, 10.1111/raq.12108.

ROBERTS, George AF; ROBERTS, George AF. **Chitin chemistry**. London: macmillan, 1992.

GRAVES JR, Joseph L. **Principles and Applications of Antimicrobial Nanomaterials**. Elsevier, 2021.

GÜNBEYAZA, M; et al. **Chitosan based delivery systems for mucosal immunization against bovine herpesvirus 1 (BHV-1)**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, p. 531–545, 2010.

H.R. Jia, Y.X. Zhu, K.F. Xu, X.Y. Liu, F.G. Wu **Plasma membrane-anchorable photosensitizing nanomicelles for lipid raft-responsive and light-controllable intracellular drug delivery** *J. Control. Release*, 286 (2018), pp. 103-113

Hu, Y. L., Qi, W., Han, F., Shao, J. Z., & Gao, J. Q. (2011). **Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model**. *International journal of nanomedicine*, 6, 3351.

Jia, H. R., Zhu, Y. X., Duan, Q. Y., Chen, Z., & Wu, F. G. (2019). **Nanomaterials meet zebrafish: toxicity evaluation and drug delivery applications.** *Journal of Controlled Release*, 311, 301-318.

KUMAR, S. R; et al. **Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lateolabrax niloticus*) to protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*.** *Fish & Shellfish Immunology*, v. 25, p.47- 56, 2008

LOPES, I. G.; OLIVEIRA, R. G.; RAMOS, F. B.. **Perfil do consumo de peixes pela população brasileira.** *Biota Amazônia*, v.6, n.2, 2016.

Lu, J., Tang, M., & Zhang, T. (2019). **Review of toxicological effect of quantum dots on the liver.** *Journal of Applied Toxicology*, 39(1), 72-86.

MAURO C. M. LARANJEIRA; VALFREDO T. DE FÁVERE. **Quitosana: biopolímero modificada quimicamente.** *Revista Ibero americana de Polímeros*, v. 7, p. 232 – 246,2006.

Mohebbi S., Nezhad M.N., Zarrintaj P., Jafari S.H., Gholizadeh S.S., Saeb M.R., Mozafari M. **Chitosan in Biomedical Engineering: A Critical Review.** *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2019;14:93–116. doi: 10.2174/1574888X13666180912142028.

Muzzarelli, R. A., & Pariser, E. R. (1978). **Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan.**

PRABAHARAN, M. **Review Paper: Chitosan Derivatives as Promising Materials for Controlled Drug Delivery.** *Journal of Biomaterials Applications*, 2008

Rizeq, B. R., Younes, N. N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). **Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles.** *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5776.

RORIZ, G. D.; DELPHINO, M. K. V. C.; GARDNER, I. A.; GONÇALVES, V. S. P. **Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil.** *Aquaculture Reports*, Amsterdam. v. 6 (1-68) ; 2017, p. 43-48

S. Sieber, P. Grossen, J. Bussmann, F. Campbell, A. Kros, D. Witzigmann, J. Huwyler **Zebrafish as a preclinical in vivo screening model for nanomedicines** *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2019), 10.1016/j.addr.2019.01.001

Sanandiya, N. D., Lee, S., Rho, S., Lee, H., Kim, I. S., & Hwang, D. S. (2019). **Tunichromeinspired pyrogallol functionalized chitosan for tissue adhesion and hemostasis.** *Carbohydrate Polymers*, 208, 77–85.

Schulter, E. P., & Vieira Filho, J. E. R. (2018). **Desenvolvimento e potencial da tilapicultura no Brasil.** *Revista de Economia e Agronegócio*, 16(2), 177-201.

SKJÅK-BRÆK, Gudmund; ANTHONSEN, Thorleif; SANDFORD, Paul (Ed.). **Chitin and chitosan.** London: Elsevier applied science, 1989.

Stine, J. S., Harper, B. J., Conner, C. G., Velev, O. D., & Harper, S. L. (2021). **In Vivo Toxicity Assessment of Chitosan-Coated Lignin Nanoparticles in Embryonic Zebrafish (*Danio rerio*)**. *Nanomaterials*, 11(1), 111.

Sun, Y., Feng, W., Yang, P., Huang, C., & Li, F. (2015). **The biosafety of lanthanide upconversion nanomaterials**. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1509-1525.

TORCHILIN, Vladimir P. **Sistemas nanoparticulados multifuncionais sensíveis a estímulos para liberação de fármacos**. *Nature reviews Drug discovery*, v. 13, n. 11, pág. 813-827, 2014.

Villacis, R.A.R.; Filho, J.S.; Pina, B.; Azevedo, R.B.; Pic-Taylor, A.; Mazzeu, J.F.; Grisolia, C.K. **Integrated assessment of toxic effects of maghemite (g-Fe₂O₃) nanoparticles in zebrafish**. *Aquat. Toxicol.* 2017, 191, 219–225.

VIMAL et al, **Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish**. *Aquaculture*, p. 358 –359, 2012.

Vinay, TN, Bhat, S., Gon Choudhury, T., Paria, A., Jung, MH, Shivani Kalappa, G., & Jung, SJ (2018). **Avanços recentes na aplicação de nanopartículas na entrega de vacinas em peixes**. *Comentários em Fisheries Science & Aquaculture* , 26 (1), 29-41.

Wang, B., Feng, W., Zhao, Y., & Chai, Z. (2013). **Metallomics insights for in vivo studies of metal based nanomaterials**. *Metallomics*, 5(7), 793-803.

Wang, H., Yang, S. T., Cao, A., & Liu, Y. (2013). **Quantification of carbon nanomaterials in vivo**. *Accounts of chemical research*, 46(3), 750-760.

Wang, Y., Zhou, J., Liu, L., Huang, C., Zhou, D., & Fu, L. (2016). **Characterization and toxicology evaluation of chitosan nanoparticles on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio***. *Carbohydrate polymers*, 141, 204-210.

Y. Lee, G.H. Jang, C.H. Byun, M. Jeun, P.C. Searson, K.H. Lee **Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications** *Biosci. Rep.*, 37 (2017), Article BSR20170199

Younes, N., Pintus, G., Al-Asmakh, M., Rasool, K., Younes, S., Calzolari, S., ... & Nasrallah, G. K. (2019). **“Safe” chitosan/zinc oxide nanocomposite has minimal organ-specific toxicity in early stages of zebrafish development**. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(1), 38-47.

Yu, H., Chen, X., Lu, T., Sun, J., Tian, H., Hu, J., ... & Jing, X. (2007). **Poly (L-lysine)-graft-chitosan copolymers: synthesis, characterization, and gene transfection effect**. *Biomacromolecules*, 8(5), 1425-1435.

Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). **A review on chitin and chitosan polymers: Structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications**. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226.