



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI - LIKA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**THAMIRIS PINHEIRO SANTOS**

**EFEITOS TÓXICOS DE MOLÉCULAS COM ATIVIDADE TIREOIDIANA SOBRE  
OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS EM *ZEBRAFISH* E DESENVOLVIMENTO DE  
ALTERNATIVAS NANOTECNOLÓGICAS COM ESTAS MOLÉCULAS**

Recife

2022

THAMIRIS PINHEIRO SANTOS

**EFEITOS TÓXICOS DE MOLÉCULAS COM ATIVIDADE TIREOIDIANA SOBRE  
OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS EM *ZEBRAFISH* E DESENVOLVIMENTO DE  
ALTERNATIVAS NANOTECNOLÓGICAS COM ESTAS MOLÉCULAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Ribeiro Sales Cadena

Recife

2022

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Thamiris Pinheiro

Efeitos tóxicos de moléculas com atividade tireoidiana sobre os parâmetros biológicos em *Zebrafish* e desenvolvimento de alternativas nanotecnológicas com estas moléculas / Thamiris Pinheiro Santos. - 2022.

156 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Coorientadora: Profa. Dra. Marília Ribeiro Sales Cadena.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndices.

1. Glândula tireoide. 2. Hormônios tireoidianos. 3. Nanotecnologia. I. Cadena, Pabyton Gonçalves (orientador). II. Cadena, Marília Ribeiro Sales (coorientadora). III. Título.

616.07

CDD (22.ed )

UFPE/CB-2022-088

THAMIRIS PINHEIRO SANTOS

**EFEITOS TÓXICOS DE MOLÉCULAS COM ATIVIDADE TIREOIDIANA SOBRE  
OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS EM *ZEBRAFISH* E DESENVOLVIMENTO DE  
ALTERNATIVAS NANOTECNOLÓGICAS COM ESTAS MOLÉCULAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Data de defesa: 23/02/2022

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Orientador)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior (1° Titular)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Maria Adélia Borstelmann de Oliveira (2° Titular)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Fabricio Oliveira Souto (3° Titular)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Paulo Eleuterio Roberto de Souza (4° Titular)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

À Deus, aos meus pais Jailson e Flávia, ao meu irmão Thiago e a minha avó M<sup>a</sup> Luiza, pelo  
suporte em todos os momentos desta jornada,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Não poderia ser de forma diferente que dirijo meu primeiro e maior agradecimento a Deus, por ter sido o alvo primordial da minha existência e persistência no decorrer de toda essa jornada, dando-me forças para lutar e passar por cima de todos os obstáculos já encontrados no caminho.

Aos meus pais Jailson e Flávia, por terem me incentivado em todos os momentos. Sou grata por terem passado momentos difíceis ao meu lado e por muito terem renunciado dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Eis que estou aqui dando valia a tudo que abdicaram por mim.

Imprescindível agradecimento ao meu irmão Thiago, homem de grande caráter e muita inteligência. O grande espelho da minha vida acadêmica e profissional, que me apoiou e incentivou todas as minhas erguidas de cabeça para que nunca desistisse dos estudos.

À minha avó paterna Maria Luiza, grande guerreira, que no auge dos seus 79 anos de idade vive sã, aplaudindo orgulhosa a minha conquista.

À minha bizavó paterna Maria do Carmo e ao meu avô materno Paulo Roberto, que lá de cima ao lado do Pai, devem estar maravilhados, pois sempre diziam que ver os netos formados era o maior sonho... Infeliz ou felizmente isso não pode ser realizado em vida, mas jamais poderia deixar de dedicar isto também a vocês. Saudades!

Ao meu namorado Gilson, pelo apoio e paciência com minha falta de tempo e o estresse na fase corrida dessa caminhada.

À minha cadelinha Yucca, por todo o amor e carinho concebido. Por ser agente transformador dos meus momentos de desânimo e tristeza.

Aos tios, tias, primos, primas, madrinha, padrinho, que ficaram felizes desde a minha aprovação no vestibular até a pós-graduação.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelos belos sete anos de uma 'maternidade' bem aproveitada e que vêm me dando valiosos frutos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, pela confiança orientação e apoio com a ciência.

A minha co-orientadora Prof. Dr<sup>a</sup> Marília Ribeiro Sales Cadena, por todas as conversas, apoio, confiança e principalmente pelos conhecimentos compartilhados.

A todos que compõem o LECA, em especial Paulo, Marília, Jadson, André, Matheus, Renata Meireles, Renatta Priscilla, Amanda e Tiago pela ajuda constante. Sem deixar de citar Stephannie, ex companheira de laboratório, ausente fisicamente, mas que independente de distância sempre apoiou e se fez presente ajudando quando possível.

Aos colaboradores deste trabalho, Rafaela do LARNANO, Marcílio e Carol do LPNBio, que embora sejam de outros laboratórios abdicaram de suas ocupações e descanso para realização de algumas análises deste trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora pelo aceite ao convite e sugestões para melhoria da nossa pesquisa.

À CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro dado para que essa pesquisa fosse desenvolvida.

Gratidão a todos!

Muita gente me ajudou chegar aqui  
Foi aos trancos e barrancos que eu consegui  
Minha família, meus amigos, minha fé  
A vocês devo tudo

Canela russa eu andava por aí  
Procurando um anjo bom pra me ouvir  
Eu jamais engoli sapo sem sorrir  
Suportei absurdos

Conquistando amizades, ganhei confiança  
Esse público amado me deu esperança  
Eu sou feliz demais  
Quando olho pra trás, só consigo sentir

Gratidão  
Pela força que não me deixou desistir  
Por ter sido escolhida para essa missão  
Obrigada meu Deus por você existir  
Sempre me deu a mão

Gratidão  
Não há dinheiro que pague não posso esquecer  
Se eu fugir das origens eu perco meu chão  
Obrigado, meu povo, por fortalecer  
Beijos no coração

Gratidão

Xande de Pilares

## RESUMO

Os efeitos tóxicos de moléculas com atividade tireoidiana sobre os parâmetros biológicos em modelo animal foram avaliados, e uma proposta de desenvolvimento de alternativas nanotecnológicas com estas moléculas associadas a óleos essenciais para o tratamento do hipotireoidismo foi lançada. Os testes toxicológicos propostos nesta tese foram realizados em *zebrafish* (*Danio rerio*) e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFRPE. Foram avaliados os efeitos tóxicos da tiroxina, levotiroxina e amiodarona isoladamente em concentrações dez, cem e mil vezes maiores que aquelas encontradas em ecossistemas aquáticos. Além disso, também foram avaliados os efeitos tóxicos das interações entre esses compostos. Em seguida, foram formuladas nanoemulsões óleo/água (O/A) à base levotiroxina associada a óleos essenciais com atividade antioxidante por um processo de emulsificação sob agitação. Também foi proposto um desenho industrial de um dispositivo portátil para determinação da capacidade natatória de peixes. As concentrações ambientais de tiroxina, levotiroxina e amiodarona isoladas mostraram um baixo risco em relação aos parâmetros estudados, com área de coagulação e edema do saco vitelino sendo os efeitos teratogênicos observados na fase embrionária, enquanto na fase larval a ausência da bexiga natatória foi a mais observada, seguida de deformação da coluna vertebral. No entanto, a porcentagem de animais afetados teve um aumento significativo nos grupos experimentais expostos as concentrações de 100 e 1000 vezes maiores que a ambiental. Entretanto, nas combinações foram detectados efeitos antagônicos relacionados a toxicidade sendo menor do que os compostos individuais, uma vez que os indivíduos afetados foram inferiores a 25%. As nanoemulsões apresentaram tamanho entre 218,5 e 489,2 nm, índice de polidispersão entre 0,113 e 0,478, e potencial de zeta entre -12,5 e -39,1 mV. Estas tiveram atividade antioxidante entre 204.3 e 288.5 para DPPH, e entre 156.6 e 194.9 para ABTS. Os resultados do teste toxicológico em *D. rerio* sugeriram que os surfactantes utilizados nas formulações podem estar relacionados à toxicidade observada. Por fim, o desenho industrial foi concedido. Além disso, se faz importante também investigar a possível eficácia de novos produtos nanotecnológicos para tratamento de disfunções tireoidianas. O *zebrafish* se fez um bom modelo para estudos de farmacologia e toxicologia ambiental baseado em nossos resultados. Podemos concluir que as concentrações ambientais mostraram um baixo risco para os parâmetros estudados, mas considerando a possibilidade de concentrações mais altas causadas por um acidente, liberando grandes quantidades desses compostos, um risco significativo é possível. Efeitos subletais e teratogênicos nos estágios embrionário e larval produziram

alterações na frequência cardíaca e mortalidade do embrião. Ainda, os resultados toxicológicos das nanoemulsões sugeriram que os surfactantes podem ser relacionados à toxicidade em *zebrafish*, demonstram a necessidade de estudos adicionais e fundamentais para entender os efeitos desses surfactantes em nanoemulsões contendo óleos essenciais.

Palavras-chave: Hormônios tireoidianos; Tireoide; Levotiroxina; Amiodarona; Óleos essenciais; Nanoemulsão; *Danio rerio*; Capacidade natatória.

## ABSTRACT

The toxic effects of molecules with thyroid activity on biological parameters in an animal model were evaluated, and a proposal to develop nanotechnological alternatives with these molecules associated with essential oils for the treatment of hypothyroidism was launched. The toxicological tests proposed in this thesis were performed on zebrafish (*Danio rerio*) and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at UFRPE. The toxic effects of thyroxine, levothyroxine, and amiodarone alone were evaluated at concentrations ten, one hundred, and one thousand times greater than those found in aquatic ecosystems. In addition, the toxic effects of interactions between these compounds were also evaluated. Then, oil/water (O/W) nanoemulsions based on levothyroxine associated with essential oils with antioxidant activity were formulated by an emulsification process under agitation. An industrial design of a portable device to determine the swimming ability of fish was also proposed. The environmental concentrations of thyroxine, levothyroxine and amiodarone alone showed a low risk in relation to the parameters studied, with coagulation area and yolk sac edema being the teratogenic effects observed in the embryonic stage, while in the larval stage the absence of the swim bladder was the most observed, followed by deformation of the spine. However, the percentage of affected animals had a significant increase in the experimental groups exposed to concentrations of 100 and 1000 times greater than the environmental one. However, in the combinations, antagonistic effects related to toxicity were detected, being lower than the individual compounds, since the affected individuals were less than 25%. The nanoemulsions had a size between 218.5 and 489.2 nm, a polydispersity index between 0.113 and 0.478, and a zeta potential between -12.5 and -39.1 mV. These had antioxidant activity between 204.3 and 288.5 for DPPH, and between 156.6 and 194.9 for ABTS. The results of the toxicological test in *D. rerio* suggested that the surfactants used in the formulations may be related to the observed toxicity. Finally, industrial design was granted. In addition, it is also important to investigate the possible effects of new nanotechnological products for the treatment of thyroid dysfunctions. Zebrafish have become a good model for environmental pharmacology and toxicology studies based on our results. We can conclude that ambient concentrations showed a low risk for the parameters studied, but considering the possibility of higher concentrations caused by an accident, releasing large amounts of these compounds, a significant risk is possible. Sublethal and teratogenic effects in the embryonic and larval stages produced changes in heart rate and embryo mortality. Furthermore, the toxicological results of the nanoemulsions suggested that surfactants may be

related to toxicity in zebrafish, demonstrating the need for additional and fundamental studies to understand the effects of these surfactants in nanoemulsions containing essential oils.

Keywords: Thyroid hormones; Thyroid; Levothyroxine; Amiodarone; Essential oil; Nanoemulsion; *Danio rerio*; Swimming ability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de literatura

- Figura 1 -** *Danio rerio* adulto criado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – UFRPE (Fonte: Própria autora, 2019).... 36
- Figura 2 -** Ovos de *Danio rerio* adulto após fecundação de 5 casais, no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – UFRPE. Ovos brancos são coagulados (inviáveis), e, portanto, não utilizados nos testes experimentais (Fonte: Própria autora, 2021).... 37
- Figura 3 -** Diferenciação entre fêmea (A) e macho (B) de *Danio rerio* adultos (Fonte: Própria autora, 2021)..... 38

### Artigo 1

- Figure 1 -** Typical teratogenic effects observed in zebrafish exposed to thyroxine (T<sub>4</sub>), levothyroxine (L-T<sub>4</sub>), and amiodarone (AM) in the highest concentration tested for each compound compared with normal animal (control group). Arrows and abbreviations indicate main teratogenic effects as yolk sac edema (YSE), spine deformation (SD), pigmentation (P), pericardial edema (PE), absence of the swim bladder (ASB), yolk sac deformation (YSD), area of coagulation (AC)..... 77
- Figure 2 -** Percentage of affected animals (A) after 24, 48, 72, and 96 h (post-fertilization) in single and joint toxicities tests. The reduction in the percentage of affected animals was considered significant when \* = p < 0.05. Legend: T<sub>4</sub> - thyroxine; L-T<sub>4</sub> - levothyroxine; AM – amiodarone.... 78
- Figure 3 -** Morphometry of zebrafish (*Danio rerio*) larvae with 96 hpf exposed to single compounds with concentrations of thyroxine (0.064, 0.640, 6,400, and 64,000 µg/L), levothyroxine (0.347, 3.470, 34.700, and 347,000 µg/L), and amiodarone (0.555, 5,550, 55,500, and 555,000 µg/L), and exposed to experiments of mixtures of compounds with concentrations of thyroxine (0.640 µg/L), levothyroxine (3.470 µg/L), and amiodarone (5,550 µg/L) in equivalent concentration test and equitoxic ratio test. Morphometric analysis measures: body length (µm), ocular distance (µm) (Altenhofen et al., 2017), eye diameter, head-width (midbrain) (µm), and head length (µm). \*Indicates statistically significant difference from control (p < 0.05) by Tukey test..... 79
- Figure 4 -** Optical microscopy of embryos and larvae exposed to mixtures in the equivalent concentration test (A) and equitoxic ratio test (B) at 24, 48, 72 and 96 h (post-fertilization). Arrows and abbreviations indicate main

teratogenic effects as absence of the swim bladder (ASB), malformation of heart (Mh), malformation of otoliths (MO), pigmentation (P), pericardial edema (PE), spine deformation (SD), tail deformation (TD), Yolk sac deformation (YSD), and yolk sac edema (YSE)..... 80

**Artigo 2**

**Figure 1 -** Percentage of affected animals after 24, 48, 72, and 96 h (post-fertilization) in toxicity test. The reduction in the percentage of affected animals was considered significant when  $* = p < 0.05$ . Legend: L-T<sub>4</sub> - levothyroxine; ECC - Empty *C. carvi* nanoemulsion; CCH - *C. carvi* nanoemulsion (4444x dilution); CCL - *C. carvi* nanoemulsion (3200x dilution); ECS - Empty *C. sinensis* nanoemulsion; CSH - *C. sinensis* nanoemulsion (4444x dilution); CSL - *C. sinensis* nanoemulsion (3200x dilution); EPA - Empty *P. aduncum* nanoemulsion; PAH - *P. aduncum* nanoemulsion (4444x dilution); PAL - *P. aduncum* nanoemulsion (3200x dilution)..... 106

**Figure 2 -** The thigmotaxis test (A) showed that the empty nanoemulsion, as well as the levothyroxine, did not affect the thigmotaxis response, but the empty *C. carvi* nanoemulsions affect the touch sensitivity response (B). The response for each group was compared to the control group by one-way ANOVA followed by Tukey's test (thigmotaxis ( $F(10, 732) = 1.15$ ,  $p < 0.05$ ); touch sensitivity response ( $F(10, 732) = 2.81$ ,  $p < 0.05$ ).  $* = p < 0.05$ . Legend: L-T<sub>4</sub> - levothyroxine; ECC - Empty *C. carvi* nanoemulsion; CCH - *C. carvi* nanoemulsion (4444x dilution); CCL - *C. carvi* nanoemulsion (3200x dilution); ECS - Empty *C. sinensis* nanoemulsion; CSH - *C. sinensis* nanoemulsion (4444x dilution); CSL - *C. sinensis* nanoemulsion (3200x dilution); EPA - Empty *P. aduncum* nanoemulsion; PAH - *P. aduncum* nanoemulsion (4444x dilution); PAL - *P. aduncum* nanoemulsion (3200x dilution)..... 106

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de literatura

<b>Tabela 1 -</b>	Propriedades Físico-Químicas da Levotiroxina.....	29
<b>Tabela 2 -</b>	Classificação das drogas antiarrítmicas segundo Vaughn-Williams (1970).....	32
<b>Tabela 3 -</b>	Propriedades Físico-Químicas da Amiodarona.....	34
<b>Tabela 4 -</b>	Classificação científica de <i>C. carvi</i> .....	42
<b>Tabela 5 -</b>	Classificação científica de <i>C. sinensis</i> .....	43
<b>Tabela 6 -</b>	Classificação científica de <i>P. aduncum</i> .....	44
<b>Tabela 7 -</b>	Classificação científica de <i>S. terebinthifolius</i> .....	45
<b>Tabela 8 -</b>	Descrição prévia das metodologias de alta energia ou metodologias de baixa energia utilizadas na formulação de nanoemulsões.....	52

### Artigo 1

<b>Table 1 -</b>	Concentrations of the individual compounds used in the acute toxicity test.....	81
<b>Table 2 -</b>	Concentrations of binary and ternary mixtures used in equivalent concentration test and equitoxic ratio test.....	81

### Artigo 2

<b>Table 1 -</b>	Two-level 3 x 2 <sup>2</sup> full experimental designs of nanoemulsions of each essential oil associated with levothyroxine.....	107
<b>Table 2 -</b>	The dilution ratio of the chemical compounds used in the experimental groups for the acute toxicity test. Legend: 4444x represent the high (H) dilution and 3200x represents the low (L) dilution. ....	107
<b>Table 3 -</b>	Chemical composition of essential oils of <i>P. aduncum</i> , <i>C. carvi</i> , and <i>C. sinensis</i> .....	108
<b>Table 4 -</b>	Effect of variables stirring speed (g) and stirring time (h) in the physicochemical parameters of nanoemulsions of each essential oil associated with levothyroxine. Bold values indicate significant results by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). ....	109
<b>Table 5 -</b>	Antioxidant activity of the essential oil of species of <i>Carum carvi</i> , <i>Citrus sinensis</i> , and <i>Piper aduncum</i> . Legend: Ascorbic acid and TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were used as reference antioxidants.....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEs	Disruptores endócrinos
T <sub>3</sub>	Triiodotironina
T <sub>4</sub>	Tiroxina
L-T <sub>4</sub>	Levotiroxina
AM	Amiodarona
hpf	Hora pós-fertilização
dpf	Dia pós-fertilização
I <sup>-</sup>	Iodeto plasmático
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
MIT	3-moniodo-L-tirosina
DIT	3,5-diodo-L-tirosina
TSH	Hormônio liberador da tireotrofina
HTs	Hormônios tireoidianos
OMS	Organização Mundial de Saúde
HIA	Hipotireoidismo induzido por amiodarona
TIA	Tireotoxicose induzida por amiodarona
ETA	Do inglês, European Thyroid Association
I <sup>131</sup>	Iodo radioativo da tireoide
DAT	Drogas antitireoidianas
TDI	Transtorno da deficiência de iodo
CIU	Concentração de iodo urinário
SLCs	Sistemas de Liberação Controlada
SLMs	Sistemas de liberação modificadas
SLRs	Sistemas de liberação retardada
SLSs	Sistemas de liberação sustentada
CGTases	CD glicosiltransferases
NEs	Nanoemulsões
O/A	Óleo-em-água
A/O	Água-em-óleo
A1/O/A2	Água-em-óleo-em-água
O1/A/O2	Óleo-em-água-em-óleo
MBs	Baixa energia
MAs	Alta energia

TR	Do inglês, Thyroid hormone receptors
EDs	Do inglês, Endocrine disruptors
AOP	Do inglês, Advanced oxidative process
ASB	Do inglês, Absence of the swim bladder
AC	Do inglês, Area of coagulation
BC	Do inglês, Heartbeat/blood circulation
AHR	Do inglês, Abnormal heart rate
P	Do inglês, Pigmentation
PE	Do inglês, Pericardial edema
ASM	Do inglês, Absence of spontaneous movement
YSE	Do inglês, Yolk sac edema
B	Do inglês, Bradycardic
T	Do inglês, Tachycardic
DE	Do inglês, Deformation of eyes
FS	Do inglês, Formation of somites
GR	Do inglês, Growth retardation
MH	Do inglês, Malformation of the heart
MTH	Do inglês, Malformation of the head
MO	Do inglês, Malformation of otoliths
SD	Do inglês, Spine deformation
TD	Do inglês, Tail deformation
YSD	Do inglês, Yolk sac deformation
CG	Do inglês, Coagulation
LH	Do inglês, Lack of hatching
NHB	Do inglês, No heartbeat
NSF	Do inglês, No somite formation
TND	Do inglês, Tail not detached
TRH	Hormônio liberador da tireotrofina
ABTS	2,2-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
CS	<i>Citrus sinensis</i>
PA	<i>Piper aduncum</i>
ST	<i>Schinus terebinthifolius</i>
CC	<i>Carum carvi</i>
HM	Homogênea

HT	Heterogênea
FL	Fluido
PE	Pouco espesso
E	Espesso
ME	Muito espesso
TR	Translúcido
PO	Pouco Opaco
O	Opaco
PR	Presença
AU	Ausente
MO	Modificado
LM	Levemente modificado
SA	Sem alteração
PDI	Índice de polidispersão / Polydispersion index
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons padrão
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EOs	Do inglês, Essential oils
FAO	Do inglês, Food and Agriculture Organization of the United Nations
NE	Do inglês, Nanoemulsion
FDI	Do inglês, Flame ionization detector
GC-MS	Do inglês, Gas Chromatography-Mass Spectrometry
OP	Do inglês, Oily phase
WP	Do inglês, Water phase
PCS	Do inglês, Photon correlation spectroscopy
LPNBio	Laboratório de Produtos Naturais Bioativos
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
LECA	Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal
FET	Do inglês, Fish Embryo Acute Toxicity
TH Test	Do inglês, Thigmotaxis
TS Test	Do inglês, Touch sensitivity test
HLB	Do inglês, Hydrophilic-Lipophilic Balance
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
2.1	GLÂNDULA TIREOIDE E OS HORMÔNIOS TIROXINA (T <sub>4</sub> ) E TRIIODOTIRONINA (T <sub>3</sub> ).....	24
2.2	DISFUNÇÕES TIREOIDIANAS: HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO ..	27
2.3	LEVOTIROXINA.....	29
2.4	AMIODARONA.....	32
2.5	O <i>ZEBRAFISH</i> COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS.....	36
2.6	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	39
<b>2.6.1</b>	<b><i>Carum carvi</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>2.6.2</b>	<b><i>Citrus sinensis</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>2.6.3</b>	<b><i>Piper aduncum</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>2.6.4</b>	<b><i>Schinus terebinthifolius</i>.....</b>	<b>45</b>
2.7	NANOTECNOLOGIA.....	46
<b>2.7.1</b>	<b>Sistemas de Liberação Controlada (SLCs).....</b>	<b>47</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Nanoemulsões como SLC.....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
	SINGLE AND JOINT TOXIC EFFECTS OF THYROID HORMONE, LEVOTHYROXINE AND AMIODARONE ON EMBRYO-LARVAL STAGES OF <i>ZEBRAFISH</i> ( <i>DANIO RERIO</i> ).....	54
	DEVELOPMENT OF NANOEMULSION FROM THE ESSENTIAL OILS ASSOCIATED WITH LEVOTHYROXINE AND ITS TOXICITY IN <i>ZEBRAFISH</i> AS A NON-TARGET ORGANISM.....	82
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>113</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>114</b>
	<b>APÊNDICE A - DESENHO INDUSTRIAL: CONFIGURAÇÃO APLICADA A/EM DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM PEIXES.....</b>	<b>124</b>
	<b>APÊNDICE B - PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA.....</b>	<b>131</b>
	<b>APÊNDICE C - THYROXINE, LEVOTHYROXINE, AND THYROXINE</b>	

COMPLEXED INTO CYCLODEXTRIN CHANGED ANIMAL BEHAVIOR, OXYGEN CONSUMPTION, AND PHOTOPIC ELECTRORETINOGRAM OF <i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i> .....	151
APÊNDICE D - THYROXINE AND LEVOTHYROXINE PRESENTS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT CHANGED THE EMBRYOLOGICAL PARAMETERS OF THE <i>ZEBRAFISH (DANIO RERIO)</i> .....	152
APÊNDICE E - AMIODARONA COMO DISRUPTOR ENDÓCRINO E SEUS EFEITOS NOS PARÂMETROS EMBRIOLÓGICOS DO ZEBRAFISH ( <i>DANIO RERIO</i> ) .....	153
APÊNDICE F – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	154
APÊNDICE G - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	155
APÊNDICE H – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SisGen) .....	156

## 1 INTRODUÇÃO

Os hormônios, dentre eles os tireoidianos, quando presentes no ambiente aquático podem atuar como disruptores endócrinos (DEs) uma vez que influenciam nos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e comportamentais dos animais, sobretudo em peixes, por estarem em contato direto e contínuo com essas substâncias. Hormônios também podem estar presentes em produtos farmacológicos de uso humano e veterinário, e os princípios ativos desses fármacos podem ser liberados pelas fezes e urina dos usuários ou animais, sendo esta a principal fonte de contaminação ambiental (FENT et al., 2006), além de resíduos industriais e de embalagens descartadas incorretamente.

Hormônios tireoidianos (HTs) que são utilizados para o tratamento de disfunções da tireoide, como a tiroxina ( $T_4$ ), já foram quantificados em efluentes com valores 64 e 20 ng/L em águas de esgoto bruto e água tratadas, respectivamente (SVANFELT et al., 2010). Ainda, a forma sintética deste hormônio, a Levotiroxina ( $L-T_4$ ), também já quantificada na concentração de 347 ng/L (FICK et al., 2010). Se tratando de medicamentos que são utilizados para outros acometimentos, quando presentes no ambiente aquático fazem parte desta gama de DEs, como a amiodarona (AM), uma droga antitireoidiana que foi quantificada em ambiente aquático na concentração de 555 ng/L (OVERTUF et al., 2012).

Compostos individuais mesmo que presentes em pequenas quantidades no ambiente aquático interferem na saúde animal, e os efeitos tóxicos induzidos por misturas às vezes não são levados em consideração ao tirar conclusões sobre os perigos desses compostos tóxicos. Uma vez que muitos tipos de hormônios e drogas podem coexistir no ecossistema aquático, podendo ainda potencializar o efeito destes, é importante investigar suas interações para avaliar completamente o risco ecológico, já que os efeitos dessa soma são diferentes da análise dos compostos isolados (WANG et al., 2017).

A indústria farmacêutica vem produzindo fármacos com sistema de liberação controlada (SLC) permitindo melhorar a biodisponibilidade de medicamentos, uma vez que esse tipo de sistema possibilita o retardo e sustenta a liberação do fármaco após a administração. Além disso, há o controle do local de liberação do fármaco, o que dá margem para a diminuição da dose terapêutica dos medicamentos durante o tratamento,

e conseqüentemente levando a redução dos efeitos colaterais e tóxicos aos pacientes (BATISTA; PEPE, 2014).

Dentre os sistemas de liberação controlada de fármacos, as nanoemulsões (NEs) são cada vez mais relatadas na literatura com enfoque nas pesquisas farmacêuticas. Elas são constituídas de duas fases e produzidas a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis (geralmente utiliza-se óleo e água), estabilizada pela adição de um surfactante adequado aos compostos utilizados, e assim se mostram um modelo eficiente por fornecer estabilidade física ao sistema (SINGH et al., 2017).

Se tratando do hipotireoidismo, apesar da maior parte do tratamento ser feito com a administração da L-T<sub>4</sub>, uma parte do fármaco não é completamente absorvido pelo organismo. Além disso, há produção acelerada de radicais livres e baixa disponibilidade de antioxidantes gerando um desequilíbrio entre eles, surgindo o estresse oxidativo (CHAKRABARTI et al., 2016; MANCINI et al., 2016). Isto pode estar relacionado a insatisfação de muitos pacientes que fazem monoterapia com L-T<sub>4</sub> por apresentarem sintomas de depressão e bem-estar mental prejudicado, levando ao questionamento se o tratamento com o hormônio sintético é suficiente ou se podem ser adotadas terapias alternativas que diminuam esses sintomas indesejados (CHACKER et al., 2017). Neste caso, a nanotecnologia pode possibilitar a utilização de estratégias para o tratamento de diversas enfermidades superando os obstáculos farmacológicos dos tratamentos já utilizados (ROJAS-AGUIRRE et al., 2016).

Ainda, o uso de tratamento natural a base de extratos de plantas culturalmente é utilizada, e se faz uma boa alternativa. Diante da condição de estresse oxidativo, alguns óleos essenciais são relatados como bons oxidantes, como *Citrus sinensis* (SCHNEIDER et al., 2020; XU et al., 2013), *Piper aduncum* (POHLIT et al., 2006), *Carum carvi* (TRIFAN et al., 2016). Todavia, na literatura, não foi encontrado nenhum estudo com a associação de L-T<sub>4</sub> e óleos essenciais para tratamento de hipotireoidismo. O que torna uma alternativa para potencializar o tratamento de paciente com esta enfermidade.

O peixe-zebra tornou-se um modelo animal bem estabelecido para a triagem farmacológica de novos medicamentos, bem como para a toxicologia ambiental devido a características como curto ciclo de vida, desenvolvimento externo, alta fecundidade e corpos opticamente transparentes que facilitam observações ao longo do desenvolvimento, apresenta 70% de similaridade dos seus genes com os de humanos

(WANG et al., 2017; SPIRITA; AHILA, 2015; ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013). E por estes motivos, foi o escolhido para análises durante estes estudos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GLÂNDULA TIREOIDE E OS HORMÔNIOS TIROXINA (T<sub>4</sub>) E TRIIODOTIRONINA (T<sub>3</sub>)

A glândula tireoide, uma das maiores glândulas endócrinas em seres humanos adultos (AIRES, 2012), é o órgão responsável por sintetizar e secretar os hormônios triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tetra-iodotironina ou tiroxina (T<sub>4</sub>), mas também secreta calcitonina (RAVEN; JOHNSON, 2002). A secreção dos hormônios T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> é controlada principalmente pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH), que é secretado pela hipófise anterior (GUYTON, 2003). Em humanos saudáveis, a T<sub>4</sub> é excretada na urina numa média de 1820 pmol/ 24 horas (FABER et al., 1981), enquanto que nas fezes é encontrada na concentração de  $1,03 \pm 0,65$  nmol/g (TALWAR; SRIVASTAVA, 2006).

A tireoide é um órgão bilobulado, situado imediatamente abaixo da laringe, à frente da traqueia. No sexo feminino, essa glândula geralmente aumenta na segunda metade do ciclo menstrual, durante a gravidez e lactação. É uma glândula bem vascularizada, recebendo em torno de 4 a 6 mL/min de sangue. As células secretoras de hormônio estão dispostas nesse órgão nos chamados folículos tireoidianos. Em cada folículo, as células epiteliais cuboide circundam um lúmen, cheio por coloide, consistido principalmente de uma glicoproteína, a tireoglobulina, de 660 kDa sintetizada e secretada pelo retículo endoplasmático e aparelho de golgi, contendo 140 aminoácidos tirosina que, juntamente com o iodo, são os substratos dos hormônios ativos: triiodotironina ou liotironina - T<sub>3</sub> e tiroxina - T<sub>4</sub> (LARSEN et al., 2003). As funções desses hormônios são iguais, porém a velocidade e intensidade de ação são diferentes. Segundo Schmidt-Nielsen (2010) em humanos a T<sub>3</sub> é quatro vezes mais potente que a T<sub>4</sub>, porém sua presença no sangue é menor, persistindo então por um período mais curto que a T<sub>4</sub>. A T<sub>3</sub> é produzida predominantemente fora do parênquima tireoidiano, secundária à deiodinação tecidual periférica da T<sub>4</sub>, com < 20% sendo secretado diretamente da tireoide. A T<sub>3</sub> sérica é notavelmente estável durante períodos de dias, semanas ou meses em indivíduos adultos saudáveis, apesar de apresentar uma meia-vida relativamente curta: aproximadamente 12 - 18 h (ABDALLA; BIANCO, 2014). A meia vida da T<sub>4</sub> é de 6 - 8 dias em indivíduos eutireoidianos, 3 - 4 dias em hipertireoidianos e 9 - 10 dias em hipotireoidianos (BRENT; KOENIG, 2012).

A primeira etapa na produção de hormônios tireoidianos envolve a captação de iodeto plasmático ( $I^-$ ) pela tireoide. A membrana basal das células da tireoide tem a capacidade de transportar o iodeto ativamente para o interior da célula, esse processo é conhecido como sequestro de iodo ou bomba de iodeto. No interior da glândula, o iodeto passa por um processo de oxidação, se transformando em  $I_3^-$ , estando então apto para se complexar aos resíduos de tirosina, formando as iodotirosinas (3-moniodo-L-tirosina [MIT] e 3,5-diiodo-L-tirosina [DIT]), através da ação da peroxidase e seu peróxido de hidrogênio. A peroxidase localiza-se na membrana apical da célula ou fixa-se a ela fornecendo o iodo oxidado onde surge a molécula de tireoglobulina pelo aparelho de golgi. O iodo oxidado, mesmo na forma molecular, liga-se de modo direto, porém lento, à tirosina. Para acelerar esse processo, a molécula oxidada encontra-se associada à enzima iodinase (GUYTON, 1997). A síntese de  $T_4$  exige a fusão de duas moléculas de DIT para que seja produzida a estrutura definitiva com dois anéis iodados, enquanto a síntese da  $T_3$  dá-se com a junção do MIT e DIT. Os hormônios derivados desse processo permanecem armazenados no coloide e, quando necessário, são liberados como iodotironinas hormonalmente ativas (LARSEN et al., 2003). A reação de oxidação, assim como a de acoplamento são catalizadas pela enzima peroxidase tireoidiana (TAUROG et al., 1996).

Para haver a liberação da  $T_3$  e  $T_4$  na corrente sanguínea a partir da tireoide, os hormônios são inicialmente clivados da molécula de tireoglobulina. A superfície apical da célula tireoidea emite extensões na forma de pseudópodos, que se fecham em torno de pequenas porções do coloide formando vesículas pinocíticas. A seguir, os lisossomos fundem-se a essas vesículas promovendo então a digestão desse coloide. Enzimas de caráter digestivo como as proteinases digerem a tireoglobulina, liberando o  $T_3$  e o  $T_4$  que se difundem através da base da célula tireoidea para os capilares circundantes, liberando esses hormônios no sangue. Durante o processo de digestão da tireoglobulina para a liberação dos hormônios tireoidianos, tirosinas iodetadas que não se converteram em  $T_3$  e  $T_4$  também são liberadas das células tireoidenas, todavia não são secretadas no sangue. O iodo é clivado pela enzima deiodinase, disponibilizando o mesmo para reciclagem no interior da glândula (GUYTON, 1997). As desiodases tipo 1 e 2, são secretadas na maioria das espécies (ESCOBAR-MORREALE et al., 2005; MARELLI; PERSANI, 2017).

Embora ambas as moléculas possam desencadear efeitos biológicos, a  $T_3$  é considerada o hormônio tireoidiano biologicamente ativo que se liga aos receptores,

enquanto a  $T_4$  é um hormônio que deve ser convertido em  $T_3$  para iniciar a sinalização e ganhar atividade biológica. A sinalização do hormônio tireoideano é iniciada pela ligação da  $T_3$  a uma de suas isoformas no receptor da tireoide:  $TR\alpha$  ou  $TR\beta$ , afetando a expressão de genes dependentes de hormônios tireoidianos. Isso também é conhecido como efeito genômico do hormônio tireoideano e explica as ações biológicas do hormônio nos vários órgãos / sistemas, isto é, desenvolvimento, crescimento, controle metabólico e cognição. O fato de que a concentração plasmática (e presumivelmente a concentração intracelular) de  $T_4$  livre e  $T_3$  livre é semelhante (5-10 pM) e que a afinidade do receptor para  $T_3$  é aproximadamente 10 vezes maior que  $T_4$ , faz da triiodotironina o hormônio tireoideano mais potente (ABDALLA; BIANCO, 2014).

A liberação dos hormônios tireoidianos é regulada pela secreção hipofisária de TSH, um hormônio glicoproteico e adeno-hipofisário que aumenta a secreção de  $T_3$  e  $T_4$ , especificamente atuando no aumento da proteólise da tireoglobulina, aumento da atividade da bomba de iodeto, aumento do processo de iodetação da tirosina e acoplamento, dentre outros efeitos (GUYTON, 1997). A  $T_3$  e  $T_4$ , por sua vez exercem *feedback* negativo no controle da secreção: à medida que ocorre um aumento na secreção de  $T_3$  e  $T_4$ , o metabolismo celular aumenta. Este aumento promove, no hipotálamo, redução na secreção de TSH – hormônio liberador da tireotrofina - provocando uma redução na secreção de TSH pela adeno-hipófise e, redução de  $T_3$  e  $T_4$  pela tireoide, reduzindo o metabolismo basal celular (MILHORANSA; SOARES, 2009).

Os hormônios tiroideanos (HTs) são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos de vertebrados (NUNES, 2003). Os peixes não possuem um órgão compacto como a glândula tireoide dos humanos, apresentando então folículos tireoidianos ao redor do coração, baço, rins e outros órgãos em algumas espécies (SANTOS et al., 2019; DOLOMATOV et al., 2013). HTs são essenciais para o desenvolvimento normal do cérebro, fígado, coração, intestino, sangue e ossos, durante todos os estágios da vida do peixe, inclusive antes e depois do nascimento (TONYUSHKINA et al., 2014). Além disso, em peixes, os HTs têm efeitos sobre o crescimento somático, controle da osmorregulação, pigmentação da pele, pós-eclosão, metamorfose, reprodução, comportamento (YU et al., 2013; NUGEGODA; KIBRIA, 2017; ARBOGAST et al., 2016; AJAY, 2013; MADER; CAMERON, 2006) e no desenvolvimento embrionário estão envolvidos na formação de órgãos sensoriais, como os olhos (ODUM, 2015).

## 2.2 DISFUNÇÕES TIREOIDIANAS: HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO

As doenças da tireoide podem se manifestar com sintomas evidentes ou de forma insidiosa. As patologias que podem afetar a glândula incluem o hipertireoidismo e o hipotireoidismo (RIVKEES, 2018). O termo tireotoxicose se refere ao estado clínico resultante de altos níveis de hormônios tireoideanos nos tecidos e a ação dos mesmos nesses casos. O hipertireoidismo pode, portanto, ser tratado como uma das etiologias da tireotoxicose (ROSS et al., 2016).

O hipertireoidismo se denomina como o aumento da síntese e liberação dos hormônios tireoideanos (MAIA et al., 2013). O bócio multinodular tóxico e o adenoma tóxico solitário são causas comuns dessa patologia. Causas menos comuns incluem tireotoxicose induzida por tirotropina e tumores trofoblásticos, nos quais os receptores de TSH são estimulados por excesso de TSH e gonadotrofina coriônica humana, respectivamente. Quando há captação normal ou alta de iodo radioativo da tireoide ( $I^{131}$ ), por administração, temos um quadro de tireotoxicose com hipertireoidismo ou hipertireoidismo verdadeiro. A tireotoxicose sem hipertireoidismo é causada por fontes extratireoidianas do hormônio tireoideano ou pela liberação de hormônios tireoideanos pré-formados na circulação, com baixa captação de iodo radioativo na tireoide. O hipertireoidismo pode ser evidente ou subclínico. Quando evidente, apresenta baixas concentrações séricas de TSH e elevadas concentrações séricas dos hormônios tireoideanos: tiroxina, triiodotironina ou ambos. O hipertireoidismo subclínico é caracterizado por baixo nível sérico de TSH, mas concentrações séricas normais de  $T_4$  e  $T_3$ . A causa mais comum do hipertireoidismo em áreas suficientes de iodo é a doença de Graves (bócio difuso tóxico). Acredita-se que a mesma esteja relacionada à perda de imunotolerância e de desenvolvimento de autoanticorpos, os quais estimulam as células foliculares da tireoide pela ligação ao receptor de TSH, podendo ocorrer também sob predisposição genética. A maior ocorrência é no sexo feminino e fatores de risco não genéticos como estresse psicológico e tabagismo contribuem também para o desenvolvimento da doença (DELEO et al., 2016).

A sintomatologia de pacientes com tireotoxicose/hipertireoidismo incluem: taquicardia sinusal, hipertensão arterial sistólica, fibrilação atrial pode estar presente, principalmente em idosos. Sinais oculares como retração palpebral, olhar fixo ou assustado e sinal de *lid-lag* são decorrentes da hiperatividade adrenérgica e podem ser

observados em qualquer quadro de tireotoxicose, a pele geralmente é quente e úmida. Achados comuns também abrangem tremor fino de extremidades, fraqueza muscular proximal e hiperreflexia. O controle do excesso de hormônios tireoideanos envolve o uso de drogas antitireoidianas (DAT) para inibição da síntese, destruição do tecido tireoideano com iodo radioativo ou tireoidectomia total (MAIA et al., 2013).

O hipotireoidismo diz respeito à deficiência na produção do hormônio tireoideano que, se não tratada, pode levar a uma série de complicações até a morte do paciente. Devido à grande variação na apresentação clínica e ausência geral de sintomas específicos, a definição de hipotireoidismo é predominantemente bioquímica. **O hipotireoidismo primário ou clínico primário é definido quando concentrações de TSH estão acima do intervalo de referência e as concentrações de tiroxina também estão acima deste intervalo.** O hipotireoidismo leve ou subclínico, que é comumente considerado como um sinal de falência tireoidiana precoce é definido pelas concentrações de TSH acima da faixa de referência e pelas concentrações de tiroxina livre dentro da faixa normal. A reposição de hormônio tireoideano com levotiroxina é o tratamento padrão para pacientes com hipotireoidismo, no entanto uma proporção substancial de pacientes tratados com levotiroxina têm apresentado queixas persistentes, o que levou à questão se o tratamento com esse hormônio sintético é suficiente para todos os pacientes ou se terapias alternativas, por exemplo, combinação com preparações de liotironina, podem ser adotadas (CHAKER et al., 2017).

A causa mais frequente do hipotireoidismo é a tireoidite autoimune crônica (tireoidite de Hashimoto). No entanto, a tireoidite também pode resultar do tratamento do hipertireoidismo com cirurgia, radiação com  $I^{131}$  ou após o uso de drogas antitireoidianas. Várias formas de tireoidite, tais como pós-parto, subaguda, silenciosa ou tireoidite induzida por citocinas, também podem causar hipotireoidismo permanente ou transitório. Menos frequentemente, pode ser uma consequência de doenças infiltrativas ou infecciosas, radioterapia externa, disgenesias da tireoide, defeitos funcionais na biossíntese e liberação dos hormônios tireoideanos ou defeitos congênitos na biossíntese dos hormônios da tireoide. Tanto a deficiência como o excesso de iodo são causas bem reconhecidas de hipotireoidismo primário, como também é o uso de certos fármacos, que incluem agentes antitireoideanos: lítio; químicos bociogênicos, naturais e sintéticos; inibidores da tirosina-quinase; a interleucina-2 ou interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), etc. (BRENTA et al., 2013).

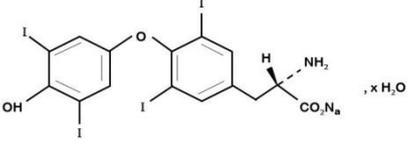
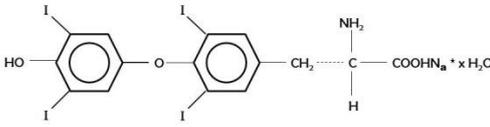
Depois de reconhecido o déficit de iodo como principal etiologia do bócio, a América Latina na década de 1940, começou a introduzir o uso do sal iodado. Reconhecido como um problema de saúde pública, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tratou o bócio como uma questão endêmica e estudos foram desenvolvidos de forma a estabelecer um acompanhamento permanente e contribuir positivamente na prevenção desta doença à nível continental. Em 1980, todas as consequências da falta de iodo, variando de bócio ao retardo mental, estavam reunidas sob o termo “transtornos” da deficiência de iodo (TDI) e a mensuração dos níveis da concentração de iodo urinário (CIU) se tornou a melhor ferramenta para monitorar o estado de deficiência do mesmo na população. Em 1994, em uma tentativa de reduzir a prevalência de deficiência de iodo em todo o mundo, a OMS recomendou a eliminação dos TDI por meio da iodação de todo o sal para consumo humano (FELD; BUSALA, 2010). A partir de 2005, a OMS determinou que cada país deveria fazer seus próprios relatórios sobre a situação da deficiência de iodo a cada 3 anos (CAMARGO et al., 2008).

### 2.3 LEVOTIROXINA

A levotiroxina sódica (L-T<sub>4</sub>), o isômero sintético da L tiroxina, é um fármaco de reposição hormonal empregado no tratamento de hipotireoidismo, de qualquer etiologia (exceto hipotireoidismo transitório, durante a fase de recuperação de tireoidite subaguda); supressão do TSH hipofisário no tratamento e prevenção de vários tipos de bócios eutireoidianos ou como agente diagnóstico nos testes de supressão, auxiliando no diagnóstico da suspeita de hipertireoidismo leve ou de glândula tireoide autônoma. No mercado brasileiro, este fármaco está disponível sob diversos nomes, tais como: Synthroid®, Levoid®, Levotroid®, Tiroidin®, Euthyrox®, Puran T4® (BRASIL, 2013). As formulações orais de L-T<sub>4</sub> comercialmente disponíveis e farmacocineticamente distintas são: comprimidos, cápsulas de gelatina mole e solução oral (GERONIMO et al., 2018). Na tabela 1, é possível observar as características físico-químicas deste composto.

**Tabela 1** - Propriedades Físico-Químicas da Levotiroxina.

Nome comum	Levotiroxina
Nome comercial do produto	Puran T <sub>4</sub> , Synthroid, Euthyrox, Levoid

Estrutura química	 <p>(MHRA, 2013)</p>
Fórmula estrutural	 <p>(FDA, 2016)</p>
Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> N NaO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O (FDA, 2016)
Peso molecular	798,86 g/mol (anidro) (FDA, 2016)
Solubilidade em água	Inferior a 1,5 mg/ml (MHRA, 2013)
Taxa de dissolução	~ 0,0002 mg/min/cm <sup>2</sup> - lento (MHRA, 2013)
Estabilidade	Fisicamente estável na sua forma pentaidratada abaixo de 50 ° C (MHRA, 2013)
Decomposição	A altas temperaturas, quando exposta ao ar, sofre desidratação rápida, seguida por degradação (MHRA, 2013)

A indicação e dosagem de L-T<sub>4</sub> para pacientes com idade inferior a 50 anos é de 1,7 µcg/kg/dia, o que equivale a 100/150 µcg/dia. Para idosos ou cardiopatas as doses devem ser menores e respeitando intervalos de 4 a 6 semanas, enquanto para recém-nascidos, lactantes e adolescentes as doses devem ser superiores a 1,7 µcg/kg/dia (COLUCCI et al., 2013). Ainda, encontram-se estudos relatando que a dosagem típica para reposição ambulatorial em pacientes menores de 60 anos é de 1,6 a 1,8 µcg/kg/dia (LARSEN; DAVIES, 2003) o que resulta na prescrição de aproximadamente 75 a 112 µcg/dia para mulheres e 125 a 200 µcg/dia para homens. Alguns pacientes podem necessitar de doses mais altas ou mais baixas do que as geralmente utilizadas, devido às variações individuais na absorção e muitas outras condições associadas que possam alterar as necessidades de L-T<sub>4</sub>, como doenças gastrintestinais, suplementos dietéticos (VINAGRE; SOUZA, 2011) e algumas drogas que podem interferir com a absorção de L-T<sub>4</sub> tais como os anticoagulantes orais, antidiabéticos orais e insulina, indutores enzimáticos, amiodarona (inibe a conversão periférica da L-T<sub>4</sub> para T<sub>3</sub> resultando em

redução da concentração sérica de  $T_3$  e aumento do nível de TSH sérico) e glicocorticoides, inibidores da protease, inibidores da tirosina quinase, salicilatos e estrógenos, furosemida, bem como inibidores da bomba de prótons e modificadores da motilidade intestinal (GERONIMO et al., 2018). Tendo em vista este quadro, o monitoramento de pacientes é recomendado (BULA PURAN T4). Ainda, outros fatores que também devem ser considerados incluem: idade, disfunção na absorção, alimentação, gestação e administração de outros fármacos (BALOCH et al., 2003).

Considerando o fato de que para se estudar alterações da biodisponibilidade de  $T_4$  foi necessária a criação de um método para mensurar a absorção do hormônio, o que vem sendo feito desde 1960. Um modelo foi desenvolvido por Hays e Nielsen (1994), baseado nos parâmetros de transporte gastrointestinal. Com relação a L- $T_4$ , sua absorção foi localizada no duodeno, jejuno e íleo, sendo 80% da administração oral absorvido. Nas primeiras poucas horas após a ingestão oral, o L- $T_4$  distribui-se principalmente para o leito vascular e órgãos esplâncnicos antes da circulação para os tecidos periféricos, com um pico em 2 a 4 horas (MANDEL et al., 1993). Assim, o incremento sérico do  $T_4$  total deve ser proporcional a quantidade de  $T_4$  absorvido em vários momentos durante as primeiras seis horas depois da ingestão (VINAGRE; SOUZA, 2011).

A absorção da levotiroxina é variável, girando em torno de 50% a 80% das doses administradas. A sua meia-vida no plasma normal é de 6 a 7 dias. Essa meia-vida diminui no hipertireoidismo e aumenta no hipotireoidismo. Sua deiodinação ocorre em vários locais como o fígado, rins e outros tecidos. Diariamente, cerca de 70% de levotiroxina metabolizada é deiodinada (BULA PURAN T4).

O tratamento à base de levotiroxina deve ser monitorado através da medição dos níveis de TSH e  $T_4$  livre, 6 a 8 semanas após cada ajuste de dose, para evitar sub ou supertratamento sustentado. Deve-se levar-se em consideração a meia-vida do hormônio, a distribuição da L- $T_4$  e a retroalimentação pituitária. Ao atingir o estado eutireoidiano, o intervalo de acompanhamento pode ser aumentado para 6 meses e depois anualmente. O monitoramento ao longo de toda a vida do paciente é recomendado para verificação da dosagem e a adesão ao tratamento, analisando também as variedades nas necessidades desse fármaco (BALOCH et al., 2003).

O anuário estatístico do mercado farmacêutico relata que a L- $T_4$  em 2016 alcançou o décimo segundo lugar no ranking dos princípios ativos e associações mais comercializadas, gerando um faturamento anual entre 250 a 500 milhões de reais (ANVISA, 2017). Em 2015 o Puran T4®, uma das apresentações comerciais da L- $T_4$ ,

figurou em quarto lugar na lista das 10 moléculas mais comercializadas no país, em suas versões de referência, genéricos e similares (CORREIO POPULAR, 2015).

## 2.4 AMIODARONA

A amiodarona (AM) é um fármaco que foi sintetizado em 1962 com o objetivo de tratar a angina de peito (SINGH, 2006). Suas propriedades físico-químicas podem ser observadas na tabela 3. Vasconcelos et al. (2003) relatam que esta droga é classificada como classe III (tabela 2), de acordo com a categorização realizada por Vaughn – Williams em 1970. Ela atua como um elevador dos limiares de desfibrilação ventricular. A particularidade dessa substância reside no fato dela se caracterizar como uma exceção dentro da classe, uma vez que os agentes antiarrítmicos do tipo III, conhecidos como bloqueadores de potássio, aparentemente reduzem os limiares de desfibrilação ventricular. Este fármaco não é um agente bloqueador “puro” dos canais de potássio, pois, além de possuir uma ação antiadrenérgica, possui propriedades das classes I e IV, por ser também um bloqueador dos canais de sódio e cálcio, sendo esta possivelmente a razão dos seus efeitos diferenciados sobre os limiares de desfibrilação, quando comparados aos de outros agentes da classe III.

**Tabela 2** - Classificação das drogas antiarrítmicas segundo Vaughn-Williams (1970) apud Vasconcelos et al. (2003).

Droga	
Classe I	Disopiramida
	Quinidina
	Procainamida
	Lidocaína
	Mexiletine
	Moricizine
	Encainida
	Flecainida
	Propafenona
	Classe II
propranolol	

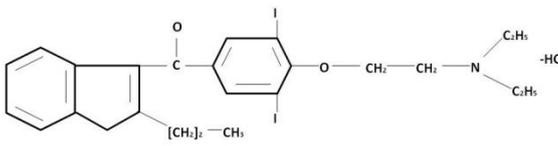
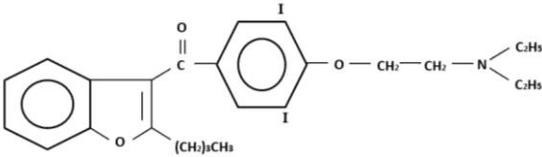
Classe III	Amiodarona
	Azimilide
	Dofetilide
	Ibutilide
	Sotalol
Classe IV	Diltiazem
	Verapamil

É um fármaco benzofurânico iodado (contém dois átomos de iodo por molécula, sendo estruturalmente semelhante a tiroxina), empregado no manejo de arritmias supraventriculares e usualmente administrada na dose diária de 200 mg (BOGAZZI et al., 2010). Devido ao seu alto teor de iodo (cerca de 37% em peso, com uma taxa de dissociação diária de iodo da droga de cerca de 10%) e propriedades farmacológicas (inibição da monodiodinação periférica da tiroxina), a droga causa alterações nos testes de função tireoidiana e pode ser responsável por disfunções na glândula (BARTALENA et al., 2018). A dose diária, pode chegar a 600 mg por dia liberando por diodinação de 7 a 21 mg de iodeto. Esse valor, por sua vez, é muito superior à ingestão diária de iodo recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que é de 0,15 a 0,3 mg/dia. (TAVARES et al., 2016).

Durante os primeiros dias do tratamento o princípio ativo deste produto se acumula em quase todos os tecidos, especificamente no adiposo (BULA AMIORON, 2015) incluindo fígado, pulmão e, em menor alcance, também chega aos rins, coração, músculo esquelético, tireoide e cérebro (MARTINO et al., 2001).

A administração da amiodarona pode ser realizada via intravenosa (aguda - curto prazo) ou via oral (crônica - longo prazo), apresentando a biodisponibilidade por via oral variável entre 22-86% (valor médio 50%) entre os indivíduos (VASSALLO; TROHMAN, 2007), onde o pico de concentração plasmática é atingido em 3 a 7 horas após dose oral única. É altamente lipofílica e ligada a proteínas (96-99%), tendo a albumina como principal (62,1%), seguida por pequenas quantidades de lipoproteína beta (33,5%), o que resulta em grande volume de distribuição (66 L/kg) (PUNNAM et al., 2010). A longa meia-vida deste fármaco varia consideravelmente interpaciente de 20 a 100 dias, sendo esta característica correspondente ao fato de que a atividade e os efeitos desta droga persistem meses depois de ser suspenso o seu uso (AMIORON, 2015; CAMPOS, 2004).

**Tabela 3** - Propriedades Físico-Químicas da Amiodarona.

Nome comum	Amiodarona
Nome comercial do produto	1. Cordarone, Parcerone, Cloridrato de amiodarona, Amiodarex, Ancoron, Amioron
Nome da IUPAC	2. (2-butil-1-benzofuran-3-il) - [4- [2-(dietilamino) etoxi] -3,5-diiodofenil] metanona
Estrutura química	 <p>(MARTINO et al., 2001)</p>
Fórmula estrutural	 <p>(LOH, 2000)</p>
Fórmula molecular	$C_{25}H_{29}I_2NO_3$
Peso molecular	645,32 g/mol
Solubilidade em água	Baixa (700 mg/l a 25 °C)
Solúvel em: a 25 °C (g/100 ml)	Clorofórmio 44,51; Cloreto de metileno 19,20; Metanol 9,98; Etanol 1,28; Benzeno 0,65; Tetrahidrofurano 0,60; Acetonitrilo 0,32; 1-octanol 0,30; Éter 0,17; 1-Propanol 0,13; Hexano 0,03; Éter de petróleo 0,001; Pouco solúvel em isopropanol; Ligeiramente solúvel em acetona, dioxano e tetracloreto de carbono
Taxa de dissolução	Baixa (RUBIM et al., 2015)
pKa (constante de dissociação)	6,56
Ponto de fusão	156 °C
pH	3,4 a 3,9 (5%)
Cor	Pó cristalino; Cristais de acetona
Estabilidade	<u>Cloridrato de amiodarona</u> a 0,6 mg/ml em dextrose a 5% em água é estável durante cinco dias à

	temperatura ambiente. As soluções que contêm menos de 0,6 mg/ml de cloridrato de amiodarona em dextrose a 5% em água são instáveis e não devem ser utilizadas.
--	--

O uso deste fármaco, por pacientes que estão sob tratamento de arritmias cardíacas, pode causar efeitos colaterais, o que inclui fotosensibilidade, microdepósitos da córnea, toxicidade pulmonar, hepatotoxicidade e neuropatia periférica (LOH, 2000). Estudos ainda relatam a indução de dislipidemia (JIANG et al., 2016) e aumento do risco de câncer (SU et al., 2013). De 15 a 20% dos pacientes tratados com amiodarona desenvolvem disfunções da tireoide – tireotoxicose induzida por amiodarona (TIA), a qual representa um desafio diagnóstico e terapêutico e o hipotireoidismo induzido por amiodarona (HIA), que não representa um problema tão grande quanto o anterior. Existem duas formas de TIA: o tipo 1 que é um hipertireoidismo induzido por iodo e o tipo 2, que é uma tireoidite induzida por drogas. Formas mistas também estão presentes e podem ser causados por ambos os mecanismos patogênicos. O TIA tipo 1 geralmente ocorre em glândulas tireoidianas anormais enquanto o tipo 2 acomete glândulas tireoidianas aparentemente normais, o que caracteriza o bócio atóxico ou simples. (BOGAZZI et al., 2010).

As incertezas quanto ao diagnóstico, classificação e manejo da TIA são relacionadas às evidências limitadas neste campo fornecidas por ensaios clínicos randomizados. Em abril de 2017, a European Thyroid Association (ETA) contratou uma força-tarefa para fornecer diretrizes práticas para o controle dessa disfunção tireoidiana (BARTALENA et al., 2018). Não foram identificados preditores específicos da ocorrência de disfunção tireoidiana associada à amiodarona (AHMED et al., 2011), embora o sexo feminino e os anticorpos antitireoperoxidase pareçam prever a HIA (TRIP et al., 1991).

As drogas antitireoidianas são usadas no tratamento de TIA do tipo I, mas com sucesso variado. A descontinuação da amiodarona é recomendada, se possível. O tipo II é tratado com prednisona e o uso da amiodarona pode ser continuado. Desconhece-se a existência de fatores de risco para o desenvolvimento de disfunção tireoidiana associada à amiodarona (AHMED et al., 2011).

## 2.5 O ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

O *Danio rerio* (Figura 1) é um peixe é um teleósteo tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae, conhecido como *zebrafish* mas no Brasil é comumente chamado de paulistinha, vem sendo utilizado como organismo modelo para testes laboratoriais (SCHNEIDER et al., 2009). Sua ocorrência perpassa as regiões no Norte, Nordeste e ainda o Oeste da Índia (ENGESZER et al., 2007), encontrado em afluentes do rio Ganges no sudeste da Ásia (NAGEL, 2002), tendo como habitat as águas dulciaquícolas e lânticas, como áreas de várzea.



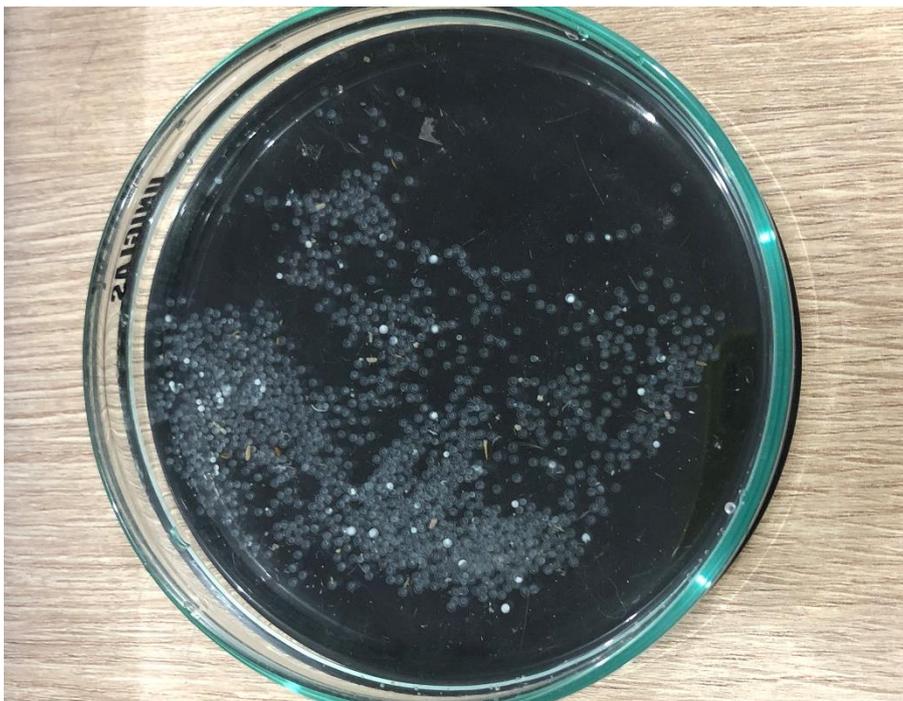
**Figura 1** - *Danio rerio* adulto criado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – UFRPE (Fonte: Própria autora, 2019).

Os *zebrafish* são animais onívoros, não apresentam estômago verdadeiro, mas possuem um intestino longo com grande área de absorção. Quando em hábito natural *D. rerio* consomem grande variedade de bentônicos e crustáceos planctônicos, vermes e larvas de insetos, e quando em cativeiro podem ser alimentados com dieta artificial ou presas vivas, como artêmia e rotíferos, por exemplo, ou ainda a mistura de ambos (ULLOA et al., 2011).

São fáceis de criar e as fêmeas podem colocar centenas de ovos em uma semana. Em Yang et al. (2009) encontramos relato de que o *zebrafish* passou a ser introduzido nas pesquisas há aproximadamente três décadas, como um modelo animal para o estudo do desenvolvimento e da neurobiologia.

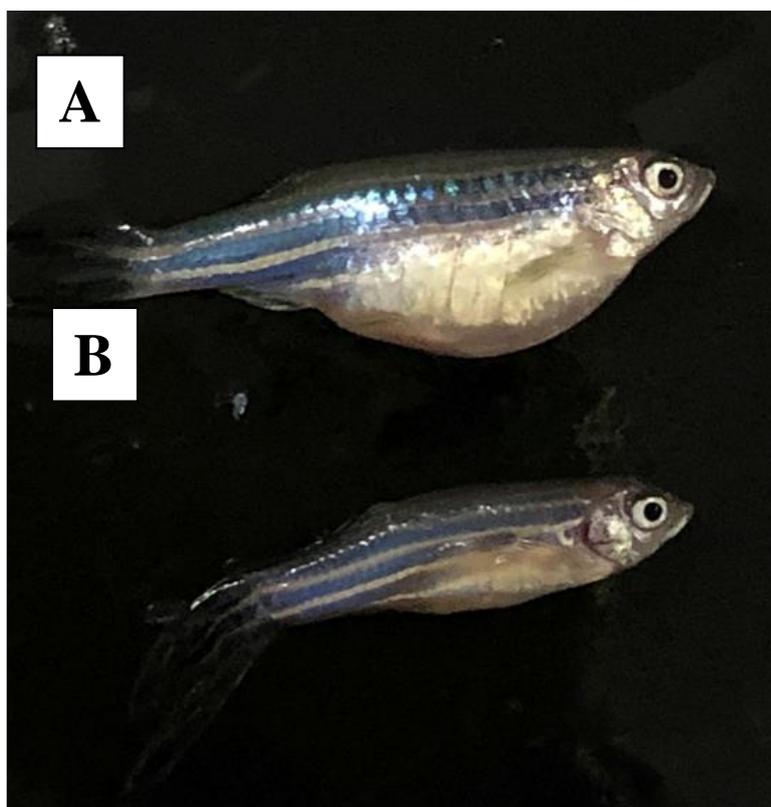
Características importantes que mostram a importância e facilidade de usar esse animal em testes laboratoriais perpassam o seu tamanho reduzido, a fecundação ser externa e ainda o desenvolvimento ocorre inteiramente fora do corpo da mãe, o acesso aos embriões ser facilitado, a manipulação e observação. Um casal de peixes adultos é capaz de colocar 200 a 300 ovos em uma única manhã (Figura 2) e, a depender da sua manutenção, podem fornecer a mesma quantidade de ovos por prole a cada 5 a 7 dias, porém é indicado que para maximizar este efeito sejam usados peixes recém maturados (entre 3 e 6 meses de idade) (HILL et al., 2005).

Seus ovos são grandes se comparados a outros peixes (0,7 milímetros de diâmetro na fecundação), são opticamente transparentes podendo ser monitorado todo o seu desenvolvimento com a utilização de um microscópio (SPIRITA; AHILA, 2015). E quanto ao desenvolvimento, por ser muito rápido, resumidamente Yang et al. (2009) relata que a gastrulação é completada por aproximadamente 10 horas pós-fertilização (hpf), e segue-se de imediato para a fase de segmentação (formação dos somitos). A somitogênese é completada por 24 hpf e órgãos ainda rudimentares são estabelecidos. Nessa fase os embriões são móveis, e 5 dias pós fertilização (dpf) começam a se alimentar comprovando que a maioria atingiu o estado funcional.



**Figura 2** - Ovos de *Danio rerio* adulto após fecundação de 5 casais, no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – UFRPE. Ovos brancos são coagulados (inviáveis), e, portanto, não utilizados nos testes experimentais (Fonte: Própria autora, 2021).

O *zebrafish* apresenta um padrão de listras pretas e brancas ao longo de todo o corpo, como também nas nadadeiras dorsais e caudal. Essa é a característica da qual marca o seu nome como *zebrafish*, pelas listras lembrarem a zebra. Os peixes adultos possuem cinco listras pretoazuladas alternadas com listras amarelo-prateadas (DAMMSKI, 2011). A diferenciação entre *zebrafish* macho e fêmea está basicamente relacionada a coloração e conformidade do corpo. Os machos adultos geralmente apresentam o corpo mais delgado e escuro que as fêmeas. Ainda, é possível e notório observar a protuberância abdominal das fêmeas em período reprodutivo (Figura 3).



**Figura 3** - Diferenciação entre fêmea (A) e macho (B) de *Danio rerio* adultos (Fonte: Própria autora, 2021).

É um peixe que apresenta 70% de similaridade dos seus genes com os de humanos (ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013), sendo comumente utilizado como modelo biológico pela sua eficácia e vantagens para o estudo de toxicidade em meio aquático (LIU et al., 2016; SELDERSLAGHS et al., 2012). Com ele pode-se avaliar os efeitos causados pelos disruptores endócrinos (DEs), pois suas características vantajosas permitem pontuar facilmente os efeitos teratogênicos e embriotóxicos, como também é uma alternativa eficaz, representando ainda um avanço em direção ao objetivo do

princípio dos 3Rs, ao reduzir e refinar o uso de animais em pesquisas (YANG et al., 2009).

*Zebrafish* tornou-se o modelo animal mais importante no estudo da biologia do desenvolvimento de vertebrados (NAGEL, 2002) por o seu processo de desenvolvimento ser altamente conservado, tornando-se grande parte comparável à dos mamíferos (NISHIMURA et al., 2016). Segundo Nagel (2002) os animais adultos do *zebrafish* medem cerca de 3-5 centímetros de comprimento em adultos. Isso facilita a realização de estudos por tem a vantagem de reduzir o espaço habitacional bem como os custos de manejo (KALUEFF, 2014), como por exemplo as baixas quantidades de soluções necessárias (químicos experimentais, drogas, poluentes) e consequentemente menores volumes de resíduos para descarte. Além disso, é válido apontar a minimização de reagentes laboratoriais e produtos químicos para manter peixes vivos e para realizar os variados ensaios (HILL et al., 2005).

Em habitat natural, os animais adultos reproduzem entre os meses de abril a agosto, o que pode variar de acordo com a latitude, altitude e condições climáticas (ENGESZER et al., 2007). Para produzir os ovos, que seguirão para ensaios, um plantel de peixes adultos saudáveis, colocados separadamente em aquário de vidro na proporção de 1:2 fêmea/macho. Para tanto, as condições do ambiente devem ser de temperatura  $26 \pm 1$  °C, (NAGEL, 2002), regime de luz claro/escuro de 14/10 horas (OECD, 2013), alimentados duas vezes por dia e *ad libitum* com ração, e uma vez por dia larvas de artemia (NAGEL, 2002). No sistema para reprodução, deverá existir malhas ou telas, afim de evitar que os ovos sejam canibalizados pelo animal adulto. Estima-se que desova irá ocorrer dentro de 30 minutos após a luz ser acesa pela manhã (ou pelo aparecimento da luz do dia – natural), podendo os ovos serem recolhidos de 30 a 60 minutos após a desova (NAGEL, 2002).

Apontadas as vantagens para o uso do *zebrafish* como modelo animal em experimentos laboratoriais, especialmente na área toxicológica, é possível observar o crescente número de publicações usando este organismo modelo atualmente.

## 2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais (OEs) são líquidos voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, podendo sua síntese ser realizada por todos os órgãos da planta, principalmente as partes aéreas com folhas e folhos, mas também de botões, cascas,

sementes, raízes, frutos, galhos, caule ou tronco (BILIA et al., 2014; PEDRO et al., 2013). São lípidos, e por isso raramente apresentam coloração. Seus constituintes são metabólitos vegetais secundários lipofílicos e altamente voláteis. OEs são geralmente misturas complexas de compostos orgânicos, produzidos como metabólitos secundários que incluem hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres fenólicos, cetonas, lactonas, aldeídos e fenóis) (BILIA et al., 2014). Essas misturas complexas tem a função de proteger o organismo vegetal de diversos patógenos, e para isso são capazes de repelir insetos que atuam como vetores de pragas, e também reduzir o apetite de algumas espécies herbívoras por conferir sabor desagradável à planta. Por outro lado, OEs também facilitam a reprodução de uma planta por atrair insetos específicos que favorecem a dispersão de pólenes e sementes, já que os insetos têm forte sensibilidade a cheiros (PEDRO et al., 2013).

OEs contêm cerca de 20-60 componentes, podendo chegar a ter até mais de 100 substâncias em concentrações diferentes. Geralmente apresentam dois ou três componentes principais em concentrações altas variando de 20 a 70%. Esses componentes principais na maioria dos casos são responsáveis por determinar as propriedades biológicas dos OEs (BILIA et al., 2014). São utilizados desde a antiguidade, e a sua grande aceitação pelos consumidores está relacionada ao seu status seguro (GRUMEZESCU, 2013), e também por ser considerado um produto natural.

Há mais de 2.000 anos aconteceu a primeira destilação de óleos essenciais na Índia e Pérsia, sendo esta técnica aprimorada pelos árabes no século IV. Apenas no século XIII é que os OEs passaram a ser produzidos por farmácias, tendo os seus efeitos farmacológicos relatados em farmacopeias. O século XX proporcionou quase inteiramente que os OEs fossem utilizados em perfumes, cosméticos e aromas alimentares, ao invés de preparações farmacêuticas, muito devido a sua característica aromática. Eles representam uma potência comercial para vários ramos como indústrias cosmética, de perfumaria, farmacêutica, alimentícia, agrônômica e sanitária (BILIA et al., 2014).

A relevante lista de atividades biológicas dos OEs pode estar relacionada à complexidade e variabilidade da composição de seus produtos químicos, e são vários os fatores que podem afetar a composição final, como: I. a extração do óleo poder ser feita através de diversas partes da planta, uma vez que cada parte da planta é composta por diferentes sistemas e linhagens celulares e portanto cada uma dela tem diferentes e extensas vias metabólicas envolvidas; II. a variação sazonal do ambiente ao qual foi

colhida a planta para extração do óleo, pois as condições da natureza durante o ano são diferentes; III. os nutrientes disponíveis para e durante o crescimento da planta define reações bioquímicas importantes nas organelas vegetais, como também exposição à luz, a temperatura ambiente e o fornecimento de água; IV. os diferentes métodos de extração também podem fornecer OEs com composições diferentes (PEDRO et al., 2013).

Das técnicas para extração de OE duas são mais antigas: o vapor e a hidrodestilação. Nessas técnicas, o OE liberado do material vegetal por aquecimento é transportado por vapor e, após a condensação mútua, ocorre a separação entre as fases aquosa e oleosa. Especificamente, a hidrodestilação consiste em colocar a planta em contato com a água fervente, podendo ela estar completamente imersa ou apenas flutuando (BUSATO et al., 2014). Mas, ainda existem técnicas de extração mediadas por solventes orgânicos. Contudo, a depender do estudo a ser realizado, é importante considerar o possível potencial tóxico destes solventes (PEDRO et al., 2013).

A grande bioatividade dos OEs já foi analisada em diversos estudos confirmando seu potencial efeito antibacteriano, antiinflamatório, antifúngico, antiviral, anticarcinogênico, antimutagênico, antioxidante, ansiolítica, entre outras. No entanto, estudos vem sendo realizados para investigar as suas propriedades biológicas desses OEs, principalmente quanto à sua atividade antioxidante. Na literatura são relatados óleos essenciais com a proposta de serem ricos em antioxidantes, como *Cymbopogon citratus* (GUIMARÃES et al., 2011), *Rhodostemonodaphne parvifolia* (ALCÂNTARA et al., 2010), *Schinus terebinthifolius* (VELÁZQUEZ et al., 2003), *Citrus sinensis* (SINGH et al., 2010) e *Piper aduncum* (POHLIT et al., 2006).

### **2.6.1 *Carum carvi***

*Carum carvi* L., planta utilizada para a extração do óleo essencial de cominho, é encontrada na Europa, Sibéria, Cáucaso, Oriente Próximo, Himalaia, Mongólia e Marrocos. Na América do Norte é encontrada apenas após a sua introdução (SACHAN et al., 2016). Também é conhecida como cominho persa ou alcarávia, é uma planta bienal e aromática, que cresce de 20 a 30 cm. A planta tem flor em forma de guarda-chuva, nas cores branca ou rosa. Seus frutos são aquênios em forma de meia lua, com cerca de 2 mm de comprimento, sendo semente madura e seca, apresentando um aspecto aromático, quente e gosto forte com um odor característico (MIRAJ e KIANI, 2016; KHAN et al., 2016). Sua classificação científica é descrita na tabela 4.

*Carum carvi* L. tem uma longa história de uso em fitoterapia devido aos seus efeitos farmacológicos (espasmolítico, antiespumante, galactagogo e antimicrobiano), também como condimentado e aromatizante em produtos alimentícios. Os frutos secos contêm óleo essencial (3-7%), com carvona (40-65%) e limoneno (30-45%) como constituintes principais (TRIFAN et al., 2016).

O cominho é utilizado para problemas digestivos, o que inclui azia, inchaço, cólicas gastrointestinais e sensação de saciedade, bem como para incômodos nervosos gástrico-cardíacos, flatulência, estômago irritável, indigestão, falta de apetite, dispepsia em adultos, no alívio de cólicas em bebês, bem como na melhora da lactação em lactantes. Além disso, também é utilizado como tranquilizante, diurético, emenagogo e gástrico estimulante, afrodisíaco, adstringente, no tratamento de enjoos matinais, dor de cabeça, para melhorar a função hepática, em doenças broncopulmonares, tosse e como analgésico. As mulheres usam óleo de cominho para iniciar a menstruação e aliviar as cólicas menstruais. Ainda, o vapor das sementes do cominho era usado para aliviar dores lombares e reumatismo. Suas sementes também eram utilizadas no tratamento da sarna. O óleo essencial do cominho era utilizado como constituinte em enxaguatórios bucais e aditivos para banho e em perfumaria, e como parasiticida. Também era comumente utilizado como aromatizante em sorvetes, doces, condimentos, carnes, queijos, refrigerantes e bebidas alcoólicas (SACHAN et al., 2016; MIRAJ e KIANI, 2016). As folhas picadas finas são usadas na preparação de sopas e sementes na padaria e indústria de confeitaria (KHAN et al., 2016).

**Tabela 4** - Classificação científica de *Carum carvi*.

<b>Classificação Científica</b>	
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae
Ordem	Apiales
Família	Apiaceae
Gênero	<i>Carum</i>

Espécie	<i>carvi</i> L.
---------	-----------------

### 2.6.2 *Citrus sinensis*

*Citrus sinensis*, popularmente conhecida como laranja, é uma espécie arbórea nativa da Ásia e posteriormente difundida por todo o Pacífico e regiões de clima quente. É uma árvore que pode atingir entre 9 a 10 metros de altura, apresentando folhas morfologicamente variando entre elíptico, oblongo e oval, com pecíolos alados (3-5 mm de largura, 6,5-15 cm de comprimento). As flores são constituídas por 5 pétalas brancas com 20-25 estames amarelos. A fruta, globosa ou oval, é formada por duas regiões distintas: o pericarpo (casca) e o endocarpo (polpa). Representa o maior grupo de plantas cultivadas e consumidas em escala mundial, sendo uma boa fonte de compostos com potencial farmacológico (FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016). Sua classificação taxonômica é descrita na tabela 5.

O fruto da *C. sinensis* pode ser consumido in natura ou na forma de suco, da casca pode ser extraído o óleo essencial e as folhas são utilizadas no preparo de chá. Tradicionalmente é empregada no tratamento de prisão de ventre, cólicas, diarreia, bronquite, tuberculose, tosse, resfriado, obesidade, hipertensão, ansiedade, depressão e estresse (MILIND; DEV, 2012; FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016). As espécies pertencentes à família *Rutaceae*, como a laranja, possuem componentes bioativos que conferem a esses espécimes propriedades antitumorais (ROMAGNOLO; SELMIN, 2013), atividades citotóxicas (ALI; ÇELIK, 2020) e antioxidantes (LAGHA-BENAMROUCHEA; MADANI, 2013).

**Tabela 5** - Classificação científica de *C. sinensis*.

Classificação científica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sub-classe	Sapindales
Ordem	Rosidae
Família	Rutaceae
Sub-família	Aurantioideae

Gênero	<i>Citrus</i>
Espécie	<i>Citrus sinensis</i>

### 2.6.3 *Piper aduncum*

*Piper aduncum* L. é um arbusto que pode atingir de 7 a 8 metros de altura, com folhas alternadas e flores pontiagudas (MAMOOD et al., 2017). É uma espécie de ampla distribuição tropical e de ocorrência em solos areno-argilosos, sendo conhecido popularmente como "pimenta-de-macaco" e "aperta-ruão". Considerada uma planta oportunista, invade áreas desflorestadas após exploração de madeira. Apresenta alta rusticidade e elevada resistência às mudanças climáticas (SOUZA et al., 2008). Sua classificação taxonômica é descrita na tabela 6.

O óleo essencial de *P. aduncum* exibe excelente rendimento (2,5 a 3,5%) e é rico em dilapiol (31,5 a 91,1%), um éter fenílico com elevado padrão de oxigenação (MAIA et al., 1998; CORRAL, 2018). É empregado no uso terapêutico contra fungos, dores no estômago, reumatismo, febre e infecção geral (MGBEAHURUIKE et al. 2017). Efetivo também contra parasitas protozoários (DAL PICOLO et al., 2014) e apresenta ação repelente (MAMOOD et al., 2017). Na aquicultura é utilizada no tratamento de doenças parasitárias em peixes (CORRAL, 2018). Possui ação bactericida, antitumoral (PARMAR et. al., 1997), e antioxidante (RODRÍGUEZ et al., 2013).

**Tabela 6** - Classificação científica de *P. aduncum*.

Classificação científica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Piperales
Família	Piperaceae
Gênero	<i>Piper</i>
Espécie	<i>Piper aduncum</i>

#### 2.6.4 *Schinus terebinthifolius*

*Schinus terebinthifolius*, também conhecida como aroeira vermelha, aroeirinha, ou aroeira-pimenteira, é uma espécie nativa da América do Sul, ocorrendo desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais, sendo mais comum em beiras de rio (CERUKS et al., 2007). É caracterizada como uma árvore perene que pode atingir de 3 a 7 metros de altura. Possui a copa larga com a folhagem, do tipo pinada, concentrada no dossel. As folhas são alternadamente organizadas em galhos que variam de 8 a 17 centímetros de comprimento. As flores são pequenas, dioicas e produzidas em panículas piramidais com 2 a 11 centímetros de comprimento, as quais surgem das axilas de folhas perto das extremidades do caule. Os frutos são drupas na cor vermelha, muito atrativas para pássaros e mamíferos (FERRITER, 1997).

*S. terebinthifolius* é usada popularmente através de chás, infusões ou tinturas e empregada no tratamento de doenças do sistema urogenital, contra inflamações e como antisséptico devido à presença de taninos em sua composição (MEDEIROS et al., 2007). Também mostra efetividade no combate a gastrite e úlceras (CARLINI et al., 2010). É considerada uma espécie invasora devido a sua plasticidade fenotípica para colonizar ambientes previamente danificados artificial ou naturalmente (WILLIAMS et al., 2007). Os extratos de *S. terebinthifolius* são ricos em terpenos (LLYOD et al., 1997), polifenóis, mostram efeitos antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos e antialérgicos (ROSAS et al., 2015). Sua classificação taxonômica é apresentada na tabela 7.

**Tabela 7** - Classificação científica de *S. terebinthifolius*.

Classificação científica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Sapindales
Família	Anacardiaceae
Gênero	<i>Schinus</i>

Espécie	<i>Schinus terebinthifolius</i>
---------	---------------------------------

## 2.7 NANOTECNOLOGIA

Com o crescente avanço no início do século XXI, a nanotecnologia é um campo científico em que seu princípio de atuação é através da manipulação e fabricação de produtos com tamanho em escala, no qual o tamanho nanométrico proporciona vantagens em diversas aplicações, como agricultura, medicina, têxtil, construção, engenharia, dentre outros.

No início dos anos 2000 a aplicação da nanotecnologia para a medicina foi tratada pelas grandes potências mundiais, como os EUA e Europa, com bastante interesse e altos investimentos (FREITAS, 2005). Essa aplicação da nanotecnologia para tratamento, diagnóstico, prevenção, monitoramento e controle dos sistemas biológicos foi definida pela National Institute of Health nos Estados Unidos como nanomedicina (PIMENTEL, 2007). Adicionalmente, a nanomedicina foi definida pela The European Science Foundation como sendo a aplicação da nanotecnologia ao diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e, conseqüentemente, à compreensão dos processos fisiopatológicos que interferem na origem e no curso de determinada doença (ROJAS-AGUIRRE et al., 2016).

A nanomedicina entra no ranking mundial como o 4º viés de aplicação nanotecnológica mais explorado, ficando atrás das indústrias cosmética, têxtil e construtora, respectivamente. A nanomedicina conta com um total de 441 companhias e 45 países, que dispõe de recursos e que estão explorando esse viés, nos quais são explorados 210 tipos de diferentes de aplicações (STATNANO, 2021). Estima-se que até 2024 este seja um ramo que irá mover 80 bilhões de dólares ao redor do mundo, o que confirma o potencial promissor do ramo bem como demonstra uma possibilidade de haver rentabilidade, uma vez que produtos desenvolvidos na área podem ser passíveis de proteção intelectual e patenteamento, o que garante retorno financeiro para seus inventores (RESEARCH AND MARKETS, 2020; FERREIRA et al., 2009).

Na nanomedicina, um dos vieses de exploração mais fortes é o farmacêutico. Dentro dessa indústria, o foco é o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas e produtos com capacidade farmacológica que auxiliem tanto no processo de diagnóstico como de tratamento, sanando as dificuldades encontradas pelas limitações das terapias

convencionais (ROJAS-AGUIRRE et al., 2016). Atualmente vem sendo utilizada, principalmente nos países desenvolvidos, para patologias conhecidas, mas de difícil tratamento como o câncer, HIV, diabetes e insuficiência renal (ÁVILA; PASTRANA, 2007; LESO et al., 2019).

Nesse contexto, busca-se construir nanopartículas que sejam bioativas ou sistemas nanométricos capazes de encapsular fármacos, visando a liberação gradativa dessas substâncias, e proporcionando seu carreamento até o seu sítio alvo, o que poderá maximizar os efeitos esperados do fármaco, minimizando a dosagem necessária para se atingir a dose terapêutica e diminuindo os efeitos colaterais. Tais vantagens podem ser úteis quando levada em consideração por exemplo, a quimioterapia, onde os fármacos utilizados nesse processo terapêutico trazem diversos efeitos colaterais para os pacientes devido sua alta dosagem (MORAES JR., 2008a; BATISTA; PEPE, 2014).

Os sistemas nanotecnológicos, dentro da nanomedicina, possuem diversas vias de administração, sendo as principais a administração tópica, oral e respiratória. Devido sua estrutura especializada em aumentar a área de absorção, o epitélio do trato intestinal é o mais importante para absorção de macro e micromoléculas, tornando-o o mais adequado e conseqüentemente o mais utilizado para a absorção destes sistemas nanotecnológicos (HOET et al., 2004).

### **2.7.1 Sistemas de Liberação Controlada (SLCs)**

Os sistemas de carreamento e liberação de fármacos é um setor onde há um grande potencial de aplicação para melhoramento da eficácia terapêutica, o conjunto de técnicas utilizadas para realizar essa liberação são denominados sistemas de liberação modificadas (SLMs) (LIMA., 2010; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2014). De acordo com Bastos et al. (2016), nos tratamentos terapêuticos convencionais, quando há administração de um fármaco pouco tempo depois sua concentração aumenta, atinge o ápice e logo depois é reduzida. Dessa forma, cada substância ativa obtém uma faixa de ação terapêutica que fica entre um valor máximo e um mínimo, quando superior à essa faixa se torna tóxica, e quando inferior, se torna ineficiente. Com a utilização dos SLMs de fármacos é possível manter a concentração do medicamento dentro dessa faixa terapêutica ao modificar de diferentes maneiras algumas variáveis importantes para a ação do composto.

Os SLMs, são divididos em: sistemas de liberação retardada (SLRs), sistemas de liberação sustentada (SLSs) e sistemas de liberação controlada (SLCs). Cada um desses sistemas possui características únicas, atuando com diferentes variáveis para proporcionar uma melhor entrega do fármaco para o organismo, havendo vantagens e desvantagens em cada uma. Os SLRs, são caracterizados pela utilização de uma forma farmacêutica, mas com a necessidade repetitiva de administração do fármaco. Os SLSs, inclui qualquer sistema de liberação de fármaco que proporcione sua liberação lenta e gradativa no organismo, a exemplo, os adesivos dérmicos. Já os SLCs, são caracterizados por direcionar o fármaco diretamente ao sítio específico de ação, mantendo as concentrações efetivas (LIMA, 2010).

Alguns dos pontos positivos dos SLCs são a possibilidade de sua produção a partir de material biodegradável, não antigênicos, possuir boa solubilidade, fácil preparação e baixo custo. Além disso, as SLCs reduzem a frequência de reposição do medicamento, bem como aumentam a biodisponibilidade do fármaco no organismo, o que pode proporcionar uma melhora significativa do quadro patológico a ser tratado. As SLCs atuam a partir de diferentes processos físico-químicos: Difusão, Dissolução e Osmose. A difusão é mais frequente em SLCs do tipo reservatório, no qual o fármaco estará encapsulado por um filme ou membrana, e em SLCs do tipo matricial, no qual o fármaco estará disperso em uma matriz. Na Dissolução ou Erosão, a matriz que envolve o fármaco estará sendo dissolvida, sendo a liberação do fármaco controlada a partir da escolha do polímero e da interação deste com outras substâncias.

Existem diversos tipos de SLCs, cada um com suas vantagens e desvantagens, a exemplo: lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, entre outros (LIMA, 2010; LOPES, et al., 2005). No entanto, tais mecanismos possuem limitações, como biocompatibilidade dos produtos selecionados para a produção, incômodo para o paciente, diferenças na taxa de absorção, dentre outros. Nesse contexto, sistemas nanotecnológicos podem ser um viés interessante de produção de SLCs, à exemplo das nanoemulsões, micelas, lipossomas, nanopartículas poliméricas, ciclodextrinas e dendrímetros (BRUXEL, et al., 2012).

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em nanocapsulas e nanoesferas, sendo a primeira um sistema onde o fármaco encontra-se em um núcleo, sendo este revestido por uma membrana polimérica ou parede permeável. Já a segunda, consiste na incorporação homogênea do princípio ativo em um ou mais polímeros, que

podem ter composições variadas ou não (BIZERRA, A., SILVA., V. 2016). As ciclodextrinas, são complexos polissacarídeos, produzidos a partir da interação de enzimas denominadas de CD glicosiltransferases (CGTases) com o amido. Tais complexos atuam no processo de incorporação de fármacos, uma vez que formam estruturas não específicas, possibilitando a adequação de princípios ativos para utilização terapêutica (VENTURINI et al., 2008). Os dendrímeros são polímeros químicos com grandes ramificações em sua estrutura, o que permite que o fármaco possa se ligar de forma espontânea às suas estruturas funcionais ou que o fármaco seja capturado por essas estruturas (FIGUEIRAS et al., 2014).

As Micelas são estruturas formadas em meio aquoso, a partir da união espontânea de moléculas que possuem em sua estrutura uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica, formando um núcleo hidrofóbico, onde fármacos com a mesma característica podem ser incorporados. Os lipossomas são esferas caracterizadas por duas fazes, uma hidrofílica e uma hidrofóbica, formadas por uma bicamada que possui uma alta eficácia na melhora dos parâmetros farmacocinéticos de princípios ativos (FIGUEIRAS et al., 2014). As nanoemulsões são sistemas formados a partir da união das fases aquosas e oleosas pela adição de um surfactante, e/ou um co-surfactante, formando gotículas dispersas que auxiliam na diminuição da toxicidade de fármacos e aumentam a biodisponibilidade do mesmo (JAISWAL et al., 2014).

Os sistemas nanotecnológicos que atuam como mecanismos de liberação modificada de fármacos, além das vantagens farmacológicas citadas, abrem muitas possibilidades para novas investigações e descobertas dentro da área, o que irá contribuir para o avanço da medicina e da ciência.

### **2.7.2 Nanoemulsões como SLC**

As nanoemulsões (NEs), também conhecidas como emulsões submicrônicas e miniemulsões, consistem em um tipo de sistema coloidal, sendo produzidas a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis, geralmente composta por hidrocarbonetos (óleos) - fase oleosa e apolar -, e uma fase polar, geralmente composta por água - fase aquosa, estabilizados através da adição de um surfactante apropriado para os compostos utilizados, que vai atuar diminuindo a tensão superficial entre os líquidos imiscíveis, proporcionando sua mistura, podendo também, haver a adição de um co-surfactante (ALMEIDA, 2014; SINGH et al., 2017).

Existem dois tipos de emulsões: uma denominada óleo-em-água (O/A) onde a fase oleosa, apolar, fica dispersa na fase aquosa e o outro tipo, denominada água-em-óleo (A/O) onde a aquosa fica dispersa na fase apolar. Adicionalmente, há situações em que podemos encontrar emulsões múltiplas do tipo água-em-óleo-em-água (A1/O/A2) ou óleo-em-água-em-óleo (O1/A/O2) (BASTOS et al., 2016).

Independentemente do tipo de NE a ser produzida, é possível a utilização de diferentes substâncias para a sua produção. Conforme citado anteriormente, é necessário a utilização de uma fase oleosa, uma fase aquosa, um surfactante, e se necessário, um co-surfactante. Com relação a fase oleosa, na literatura encontramos diferentes produtos utilizados nessa fase, como: Óleo de Peixe (GARCÍA-MÁRQUEZ, et al., 2017); Óleo essencial (PEDRO et al., 2013); Fosfolípidios (BAI et al., 2016). O surfactante e o co-surfactante são substâncias essenciais para a produção das NEs, pois sua adição ao sistema, diminui a tensão superficial entre as fases oleosas e aquosas, o que possibilita a formação das vesículas. Tais substâncias atuam como substâncias emulsificantes, e podem ser classificadas em 3 tipos: Surfactantes aniônicos (Carga negativa), Surfactante catiônicos (carga positiva), Surfactantes iônicos (sem carga). Já a fase aquosa pode ser composta simplesmente por água, ou por água deionizada, etc... É de suma importância que durante o processo de formulação das NEs as características físico-químicas dos componentes sejam levadas em consideração, como por exemplo: Viscosidade, densidade, equilíbrio hidrófilo-lipofílico, polaridade, pH, índice de refração, tempo de meia vida, dentre outras características (SINGH et al., 2017; AZMI et al., 2019).

As nanoemulsões podem ter aplicações nas mais diversas áreas: Industrial; Agropecuária; Farmacêutica; Veterinária; Cosmética. Contudo, sua aplicação dentro da indústria farmacêutica vem sido bastante explorada nos últimos anos. Nesse âmbito, elas possuem propriedades farmacológicas, atuando como SLC. Nesse sentido, um fármaco ou princípio ativo pode ser incorporado durante sua formulação, para então desempenhar seu papel farmacológico na saúde humana. Por possuir fases tanto lipídica como aquosa, as NEs são capazes de guardar fármacos que são tanto lipofílicos como hidrofílicos, o que aumenta a gama de possibilidades para a incorporação de substâncias com potencial terapêutico nas NEs. (AZMI, et al., 2019)

Elas apresentam suas propriedades físico-químicas e estabilidade diretamente influenciadas pela qualidade e quantidade de seus componentes, bem como suas condições de preparo. Adicionalmente, elas também podem ser classificadas de acordo

com o tamanho de suas vesículas, que podem ser obtidas dependendo dos métodos de preparação (SINGH et al., 2017). As nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, mas devido ao seu pequeno tamanho de vesículas (entre 20 e 50 nm) podem parecer transparentes, e resistir a ação da gravidade, evitando a sedimentação ou a formação de creme, oferecendo, portanto, maior estabilidade (PENGON et al., 2018; MCCLEMENTS, 2011).

O grau de estabilidade das nanoemulsões produzidas é determinado a partir de características físico-químicas como Tamanho, Carga (Potencial Zeta) e Índice de polidispersão das vesículas. Quanto ao tamanho da vesícula, durante a formulação, o tempo de homogeneização bem como a intensidade vão interferir gradativamente no tamanho das vesículas, podendo esta característica interferir no mecanismo de atuação da nanoemulsão. Quanto a carga, devido as emulsões serem sistemas que possuem tensoativos carregados em sua composição (surfactantes que geralmente são Tween e/ou Span), as partículas ganham carga positiva ou negativa, a depender do tipo de tensoativo e da proporção utilizada em sua composição, o que pode fazer com que as vesículas presentes na nanoemulsão se agreguem caso possuam carga próxima de zero (BILIA et al., 2014; MCCLEMENTS, 2011).

Além das características físico-químicas, a estabilidade das nanoemulsões sofre influência do método escolhido para sua produção. Os métodos para a produção nas NEs podem ser agrupados em dois grandes grupos: Métodos de baixa energia (MBs) e Método de alta energia (MAs). Os métodos de alta energia consistem na liberação de energia, a partir de mecanismos físicos, para o sistema que irá formar a NE, no qual tais energias podem ser: Cisalhamento ou pressão. Os métodos de baixa energia consistem na utilização da energia química dos componentes que formarão as NE, sem a aplicação externa de energias para o sistema. As MAs apresentam maior efetividade no processo de diminuição da vesícula, uma vez que as energias utilizadas contribuem drasticamente para esse processo, contudo, as MBs também possibilitam resultados promissores na diminuição da vesícula, contudo, por dependerem das características físico-química dos compostos utilizados para a formulação, acabam se tornando limitados, pois os compostos precisam interagir entre si, caso o contrário, não a NE será formada (SINGH, et al., 2017). Tanto as MAs como as MBs estão representadas na tabela 8.

**Tabela 8** - Descrição prévia das metodologias de alta energia ou metodologias de baixa energia utilizadas na formulação de nanoemulsões.

<b>Métodos de Alta Energia (MAs)</b>	<b>Força utilizada</b>	<b>Métodos de Baixa Energia (MBs)</b>	<b>Força utilizada</b>
Ultrasonificação	Cisalhamento	Emulsificação	
Microfluidização	Pressão	espontânea	
Agitação	Cisalhamento		Interação química
Homogeneização por alta pressão	Pressão	Mistura por Solvente	entre os componentes da formulação
Emulsificação de Membrana	Pressão	Inversão de fase por temperatura	

Fonte: Adaptado de SINGH et al., (2017).

Devido a versatilidade no processo de sua produção, as NEs trazem para os cientistas diversas possibilidades de produção e aplicação. De forma que novas e inovadoras formulações podem ser criadas de forma única, o que seria um dos primeiros critérios que possibilitam a proteção intelectual desses produtos pelos seus investidores e idealizadores. Garantindo os devidos direitos e regulando a exploração desses produtos, possibilitando a geração de retorno financeiro para seus investidores à medida que traz benefícios para os indivíduos que podem fazer uso desses produtos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos tóxicos de moléculas com atividade tireoidiana sobre os parâmetros biológicos em modelo animal e propor o desenvolvimento de alternativas nanotecnológicas com estas moléculas associadas a óleos essenciais para o tratamento do hipotireoidismo.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um dispositivo portátil para determinação da capacidade natatória em peixes;
2. Avaliar toxicidades simples e conjuntas com concentrações equivalentes e proporções equitóxicas de T<sub>4</sub>, L-T<sub>4</sub> e AM nos estágios embrio-larvais de *D. rerio*;
3. Descrever um processo de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) produzidas por um processo de emulsificação sob agitação;
4. Analisar a toxicidade de nanoemulsões contendo levotiroxina associada a óleos essenciais com atividade antioxidante em *zebrafish* (*Danio rerio*).

1 **Artigo submetido à Fish Physiology and Biochemistry**

2 **Fator de Impacto 2.794 (2020)**

3  
4 **Single and joint toxic effects of thyroid hormone, levothyroxine, and amiodarone**  
5 **on embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*)**

6  
7 **Abstract**

8 This study aimed to evaluate both single and joint toxicities of thyroid hormone (T<sub>4</sub>),  
9 levothyroxine (L-T<sub>4</sub>), and amiodarone (AM) on the embryo-larval stages of *Danio rerio*.

10 Environmental toxicity of these commonly used drugs should be studied to evaluate  
11 effects on the development of aquatic and other organisms. Single toxicity experiments  
12 were carried out in concentrations based on the environmental concentration and  
13 increasing concentrations of 10, 100, and 1000 times the commonly detected  
14 environmental concentration. Joint toxicity experiments were conducted to evaluate  
15 whether toxicity of the mixtures of compounds. Acute toxicity tests were performed based  
16 on OECD test guideline 236 (2013) modified. The toxic effects were examined during  
17 zebrafish embryonic development, and the parameters analyzed were apical sublethal and  
18 teratogenicity endpoints. Analysis of the results showed that the environmental  
19 concentrations for all 3 compounds had low risk in relation to the parameters studied,  
20 such as teratogenic effects and morphometric analysis. T<sub>4</sub> exhibited the highest toxicity.  
21 The larvae were more affected than embryos and by the higher concentrations in all  
22 experiments, possibly due to the absence of the chorion. No differences in effects were  
23 observed in the joint toxicity test, but a possible antagonistic effect was demonstrated.  
24 So, it was possible to conclude that the environmental concentrations showed a low risk  
25 for the parameters studied and the mixtures produced an antagonistic effect. However,

26 high concentrations led to conclusions concerning the hazards of these toxic compounds  
27 for fish development.

28 **Keywords:** Thyroid hormones, Ecotoxicology, Teratogenicity, Aquatic animals,  
29 Zebrafish.

30

## 31 **1. Introduction**

32       Levothyroxine (L-T<sub>4</sub>) is a common prescribed drug in the United States and  
33 Brazil. It is used in the treatment of hypothyroidism and to replace the thyroxine hormone  
34 (T<sub>4</sub>) when the thyroid gland presents dysfunction in production and secretion. L-T<sub>4</sub> is used  
35 as a drug to replace a hormone missing in the thyroid, however other drugs, such as  
36 amiodarone (AM) can interfere in this organ, even though it is not the organ target of the  
37 drug. Due to the structural similarity with T<sub>4</sub>, AM competes with T<sub>4</sub> in the enzyme active  
38 site of deiodinase, which is responsible for the conversion of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub>. When T<sub>3</sub> is reduced,  
39 the hypothyroid state is caused by the elevation of TSH level (Elnaggar et al., 2018).  
40 Therefore, thyroid dysfunction induced by amiodarone occurs through inhibition of  
41 peripheral monodeiodination of T<sub>4</sub> (Bartalena et al., 2018), or inhibition of T<sub>3</sub> binding to  
42 thyroid hormone receptors (TR)  $\alpha$  and  $\beta$  through competition (Liu & Chan, 2002). AM  
43 may cause several adverse effects, including hypothyroidism (Bartalena et al., 2018). This  
44 inhibitory action persists for several months after treatment, explaining the decreased T<sub>3</sub>  
45 concentrations in plasma and tissue (Loh, 2000). However, amiodarone-induced  
46 hypothyroidism can be easily controlled by supplementation with L-T<sub>4</sub> without requiring  
47 the discontinuation of treatment (Kinoshita et al., 2016). Incorrect disposal of these drugs  
48 can cause environmental issues as concentrations of 64 ng/L T<sub>4</sub> (Svanfelt et al., 2010),  
49 347 ng/L L-T<sub>4</sub> (Fick et al., 2010) and 555 ng/L AM (Overturf et al., 2012) have been  
50 detected in water bodies.

51 L-T<sub>4</sub>, AM, and T<sub>4</sub> are examples of drugs that are excreted in their native form, and  
52 these compounds can act as endocrine disruptors (EDs), which are detected in the aquatic  
53 environment. EDs rarely occur as individual chemicals in the aquatic ecosystem, usually  
54 being present as mixtures at relatively low levels. Therefore, it is necessary to analyze  
55 their single and joint toxicity to aquatic organisms. Aquatic organisms, like fish, are used  
56 to study human diseases or to test effects on environmental health (Law, 2003; Silva et  
57 al., 2019). Previous studies from our research group have used fish as an animal model to  
58 assess the single toxicity of EDs, such as T<sub>4</sub>, and their complexed form with cyclodextrin  
59 (Santos et al., 2019), progesterone, estradiol (Silva et al., 2019), metformin and  
60 glibenclamide (Souza et al., 2019). The presence of these chemical compounds in the  
61 environment represents a potential risk to aquatic animals since they can mimic or  
62 interfere with the binding and action of natural hormones, affecting the physiological  
63 processes (Abdallah, 2016). These compounds can enter the aquatic ecosystem through  
64 different pathways, and there are limitations in the removal of drugs by water treatment  
65 systems (Fent et al., 2006; Svanfelt et al., 2010). These toxic compounds and their  
66 mixtures may compromise fish development.

67 Zebrafish (*Danio rerio*) represents an ideal model for studies of pharmacology  
68 and environmental toxicology (Nowik et al., 2015; Wang et al., 2017), including the study  
69 of thyroid dysfunctions. They offer advantages and can overcome limitations associated  
70 with using traditional animal models, like rodents (Marelli & Persani, 2017). A short  
71 lifecycle, external development, high fecundity, and optically transparent bodies facilitate  
72 observations throughout development are some advantages of using zebrafish embryos  
73 and larvae in toxicology investigations (Spirita & Ahila, 2015; Wang et al., 2017).  
74 Zebrafish can be affected by antithyroid drugs such as AM, because the pathways  
75 involved in human thyroid development are conserved in the zebrafish model, and its

76 function and feedback regulation occur by the hypothalamus-pituitary-thyroid axis  
77 (Jomaa et al., 2014).

78 The thyroid hormones are involved in growth, skin pigmentation, central nervous  
79 system development, development of sensory organs such as the eyes, otolith formation,  
80 swim bladder inflation, somite formation, and heartbeat in fish (Arbogast et al., 2016;  
81 Kumar et al., 2013; Odum, 2015; Stinckens et al., 2016; Yu et al., 2013). Moreover, AM  
82 is involved in embryonic hypothyroidism and heart development (Chen et al., 2012;  
83 Pandya et al., 2016). The current study helps us understand the possible toxic interactions  
84 of these chemical compounds. In this framework, our objective was to evaluate both  
85 single and joint toxicities with equivalent concentrations and equitoxic proportions of T<sub>4</sub>,  
86 L-T<sub>4</sub>, and AM on the embryo-larval stages of *D. rerio*. The toxic effects on the fish  
87 development evaluated were seen in apical sublethal, teratogenicity, lethal and  
88 morphometric endpoints.

## 89 **2. Material and methods**

### 90 *2.1. Management*

91 The protocols used in this study were approved by the Ethics Committee in the  
92 use of animals of the same University, protocol number 091/2018. The experiments were  
93 carried out in the *Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal* - LECA,  
94 *Universidade Federal Rural de Pernambuco* - UFRPE. The adult zebrafish were obtained  
95 from a commercial supplier and maintained in quarantine to detect and confirm the  
96 absence of pathogens or diseases before experiments.

### 97 *2.2. Reagents and chemicals*

98 Thyroxine (T<sub>4</sub>) (lot # BCBL8063V, CAS number 51-48-9, purity of  $\geq 98\%$  and  
99 HPLC grade) was purchased from Sigma (St. Louis MO, USA). Commercial  
100 levothyroxine (L-T<sub>4</sub>) (composition: L-T<sub>4</sub> (37.5  $\mu\text{g}$ ), mannitol, maize starch,

101 microcrystalline cellulose, butyl-hydroxyanisole, and magnesium stearate), and  
102 amiodarone (AM) (composition: lactose monohydrate, starch, povidone, silicon dioxide,  
103 magnesium stearate, red dye FDC n° 40 aluminum lacquer) were used. All other reagents  
104 utilized were of analytical grade.

### 105 *2.3. Preparation of stock solutions*

106 Fresh stock solutions of T<sub>4</sub> and AM were made by dissolution in absolute ethanol.  
107 Next, the solutions were diluted with distilled water for the evaporation of alcohol,  
108 obtaining the final nominal concentrations of 40 µg/L and 200 µg/L. The stock solution  
109 of L-T<sub>4</sub> was prepared by dissolution in distilled water, obtaining the final nominal  
110 concentration of 250 µg/L. The solutions prepared were stored under refrigeration (4°C)  
111 until further use. Any residue generated by these drugs was treated by the advanced  
112 oxidative process (AOP) in a reactor using photo-oxidation UV (16w) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Silva et  
113 al., 2019).

### 114 *2.4. Embryo production for toxicity tests*

115 Adult male/female fish with a 2:1 ratio (Maharajan et al., 2018) were housed in  
116 crossing chambers (Patent BR 20 2016 017042 2). After fish crossing, spawning was  
117 stimulated by the onset of light (Maharajan et al., 2018). The embryos and larvae  
118 remained in an incubator (Patent BR 10 2018 0150 4) in a light-dark cycle of 14:10 h.

### 119 *2.5. Fish embryo-larval zebrafish acute toxicity test*

120 The acute toxicity test was performed according to OECD 236 (OECD, 2013) and  
121 (Silva et al., 2019). Briefly, after spawning (see section 2.4), the embryos were collected  
122 and washed with distilled water in Petri dishes. Healthy fertilized embryos were used to  
123 form the groups. Embryos were maintained in sterile polystyrene test chambers (80 mL)  
124 and incubated at a controlled temperature of  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  and pH of  $7.5 \pm 0.5$ . The study used  
125 a control group and experimental groups with animals exposed to T<sub>4</sub>, L-T<sub>4</sub>, and AM with

126 ten animals (with triplicates) per group. The drug exposure started at 1-h post-fertilization  
127 (hpf).

## 128 *2.6. Single toxicity experiments*

129 The concentrations used in the tests were based on the environmental  
130 concentration described in the literature, as shown in Table 1. Moreover, increasing  
131 concentrations (10, 100, and 1000 times greater than the environmental concentration)  
132 for each compound were used, simulating possible high concentrations caused by an  
133 accident releasing a high amount of these compounds. During all experiments, water  
134 renewal was performed daily with the replacement of drug concentrations (OECD, 2013).

## 135 *2.7. Joint toxicity experiments*

136 The mixtures of the compounds (T<sub>4</sub>, L-T<sub>4</sub>, and AM) were carried out according to  
137 the methodology modified from Wang et al. (Wang et al., 2017). The concentration of  
138 binary and ternary mixtures used in the equivalent concentration and equitoxic ratio tests  
139 was ten times the environmental concentration, considering that the environmental  
140 concentration can have low toxicity in exposed animals. In addition, we assume that  
141 concentrations found in the aquatic environment will be higher in the near future. The  
142 tests were performed in triplicate.

### 143 *2.7.1. Equivalent concentration test*

144 The test was assayed using a protocol modified from Wang et al. (Wang et al.,  
145 2017). Briefly, the concentration of binary and ternary mixtures (1:1 or 1:1:1) was  
146 maintained as the same than used previously used in the joint tests with ten times the  
147 environmental concentration of each compound. The study used a control group, three  
148 experimental groups with animals exposed to the concentrations of binary mixtures, and  
149 one group with animals exposed to the concentration of the ternary mixture, as shown in  
150 Table 2.

### 151 2.7.2. *Equitoxic ratio test*

152 The equitoxic ratio test was assayed using a protocol modified from Wang et al.  
153 (Wang et al., 2017), modified. The binary and ternary mixtures were prepared at the ratio  
154 of 1:1 (50% of each compound corresponding to environmental concentration or 5 times  
155 greater) and 1:1:1 (33.3% of each compound corresponding to environmental  
156 concentration or 3.33 times greater), respectively. Although the total concentration of  
157 each mixture was changed, the above-mentioned ratios were constant. This study, as well  
158 as the test above (see section 2.7.1.) used a control group, three experimental groups with  
159 animals exposed to the mixtures, as shown in Table 2.

### 160 2.8. *Embryonic development*

161 The embryos were rinsed and checked under an optical microscope BIO2B SSI  
162 with an LED bulb. Photographic records of the embryos were used to identify toxic  
163 effects during the experiments, as presented in the results. Apical sublethal, teratogenicity  
164 and lethal endpoints were evaluated at 24-, 48-, 72-, and 96-hours post-fertilization (hpf).

#### 165 2.8.1. *Apical sublethal and teratogenicity endpoints*

166 The apical endpoints for the assessment of acute chemical toxicity were analyzed  
167 in two categories, according to Lammer et al. (2009), OECD 236 (2013), Silva et al.  
168 (2019), and (Cadena et al., 2020) modified: Sublethal endpoints (non-permanent) and  
169 teratogenicity endpoints (malformations). Sublethal endpoint effects analyzed were  
170 absence of the swim bladder (ASB), area of coagulation (AC), heartbeat/blood circulation  
171 (BC), abnormal heart rate (AHR), pigmentation (P), pericardial edema (PE), absence of  
172 spontaneous movement (ASM), and yolk sac edema (YSE). The number of heartbeats of  
173 the embryos was also measured manually by counting the number under an optical  
174 microscope (Silva et al., 2019). Animals were considered bradycardic (identified by B)  
175 when the heartbeat was below 2 standard deviations of the mean, and tachycardic

176 (identified by T) when the heartbeat was above 2 standard deviations of the mean (Huttner  
177 et al., 2013) compared to the control (normocardic, identified by N). Endpoints of  
178 teratogenicity effects analyzed were deformation of eyes (DE), formation of somites (FS),  
179 growth retardation (GR), malformation of the heart (MH), malformation of the head  
180 (MTH), malformation of otoliths (MO), spine deformation (SD), tail deformation (TD),  
181 and yolk sac deformation (YSD). The results of the endpoints were presented on an  
182 ordinal scale, as described in section 2.8.3.

### 183 *2.8.2. Apical lethal endpoints*

184 The mortality rate was observed daily, with the apical lethal endpoints indicating  
185 the cause of death. The lethal endpoint effects analyzed were coagulation (CG), lack of  
186 hatching (LH), no heartbeat (NHB), no somite formation (NSF), and tail not detached  
187 (TND), according to OECD 2036 (2013). The data on mortality were presented in  
188 percentages (%), and score determination of the lethal endpoints was presented on an  
189 ordinal scale as described in section 2.8.3.

### 190 *2.8.3. Morphometric analysis*

191 The potential teratogenicity of T<sub>4</sub>, L-T<sub>4</sub>, AM, and their mixtures was estimated by  
192 monitoring morphometry ( $\mu\text{m}$ ) at 96 hpf larvae under microscopy. The parameters  
193 studied were: Body length, distance from the larval mouth to the pigmented tip of the tail  
194 ( $\mu\text{m}$ ); Ocular distance ( $\mu\text{m}$ ), using the distance between the inner edge of the two eyes  
195 (similar to the inner intercanthal distance in humans) (Altenhofen et al., 2017); Eye  
196 diameter (Kawahara & Hayashi, 2016); Head-width (Nakayama et al., 2015); And head  
197 length (Balow et al., 2013), anterior tip to the pectoral fins measurement. Digital images  
198 were made of the top view position of surviving larvae. The images were captured using  
199 a Hayear Mod. HY-2307 digital camera microscope and S-EYE 1.4.2.474 software. We

200 calibrated and took measurements from the images using Image J software (version  
201 v1.52k, 2019, National Institutes of Health, MD).

## 202 2.9. Statistical analysis

203 All data were shown as mean  $\pm$  SD. ANOVA was used to analyze data, and the  
204 means were compared by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses were carried out  
205 using the Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab. Northampton, MA USA).

## 206 3. Results

### 207 3.1. Effects of thyroxine on embryonic development of zebrafish

208 The effects observed in the embryo and larval stages of *D. rerio* exposed to the  
209 studied concentrations of T<sub>4</sub> are shown in Figure 1. Sublethal and teratogenicity endpoints  
210 revealed wide-ranging effects that are observed starting at 48 hpf, including the area of  
211 coagulation, yolk sac edema, absence of the swim bladder, and spine deformation, but the  
212 absence of the swim bladder is the only toxic effect observed in the environmental  
213 concentration. The percentage of affected animals had a significant increase in the  
214 experimental groups exposed to 64 and 6.400 ng/L at 96 hpf, and 64.000 ng/L starting at  
215 48 hpf compared to control (Figure 2). Regarding the heart rate, embryos exposed to T<sub>4</sub>  
216 in the highest concentration presented bradycardia from 48 hpf. Animals exposed to T<sub>4</sub>  
217 had no increase in mortality rate at the embryo stage, and only those exposed to 64.000  
218  $\mu\text{g/L}$  of T<sub>4</sub> presented a larger proportion of effects in the larvae stage, with mortality rate  
219 increased only in this concentration (13,3%). Additionally, T<sub>4</sub> exposure reduced the  
220 morphometric parameters, including body length, head length, head-width, and eye  
221 diameter at the highest exposure concentrations (Figure 3). In summary, few toxic effects  
222 were observed in zebrafish when exposed to environmental concentrations of T<sub>4</sub>. Several  
223 teratogenic effects were observed at a concentration of 1.000 times greater than the  
224 environmental concentration (64.000  $\mu\text{g/L}$ ).

### 225 3.2. *Effects of levothyroxine on embryonic development of zebrafish*

226 The typical sublethal and teratogenic effects observed in the studied  
227 concentrations of L-T<sub>4</sub> are shown in Figure 1. The most obvious observed sublethal effect  
228 was modification in the pigmentation, but the animals also displayed pericardial edema  
229 and absence of the swim bladder in the higher concentrations. The teratogenicity endpoint  
230 revealed spine deformation, tail deformation, and yolk sac deformation at 96 hpf.  
231 However, the percentage of affected animals had a significant increase in the  
232 experimental groups exposed to 34,700 and 347,000 ng/L starting at 72 hpf compared to  
233 control (Figure 2). Regarding the heart rate, no differences were observed when animals  
234 were exposed to L-T<sub>4</sub>. The animals exposed to L-T<sub>4</sub> had no increased mortality above  
235 10%. Morphometric parameters affected when fish were exposed to L-T<sub>4</sub> were head-  
236 width and eye diameter at all concentrations. The body length and head length were only  
237 affected in the highest concentrations (Figure 3). Based on our results, L-T<sub>4</sub> showed low  
238 toxicity in the environmental concentration and AM the lowest toxicity when comparing  
239 the three studied compounds.

### 240 3.3. *Effects of amiodarone (AM) on embryonic development of zebrafish*

241 The effects observed in the embryo and larval stages of *D. rerio* exposed to AM  
242 are shown in Figure 1. The results show that AM is the least toxic compound studied at  
243 48 hpf. Area of coagulation and yolk sac edema were the effects observed in the embryo  
244 stage. While in the larval stage, absence of the swim bladder was most often observed,  
245 followed by spine deformation. Regarding the heart rate, animals exposed to AM had  
246 tachycardia at 96 hpf in the concentration of 1,000 times greater than environmental  
247 concentration. Toxicity endpoints revealed transitory effects in the embryo stage,  
248 including area of coagulation, pericardial edema, yolk sac edema. Larvae stage fish had  
249 permanent defects, including spine and tail deformations. There was no increased

250 mortality in animals exposed to the amiodarone concentrations. The typical sublethal and  
251 teratogenic effects observed in embryo and larvae stages exposed to AM are shown in  
252 Figure 1. Finally, the animals exposed to AM showed a statistically significant reduction  
253 in the larva-morphological parameters analyzed, except ocular distance (Figure 3).

#### 254 *3.4. Effects of joint toxicity tests on embryonic development of zebrafish*

255 The results of the equivalent concentration test are shown in Figure 2. There was  
256 no significant difference in any endpoint analyzed. Regarding heart rate, animals  
257 exhibited tachycardia at 96 hpf in the binary mixtures. In the ternary mixtures,  
258 bradycardia was observed until 72 hpf, followed by tachycardia at 96 hpf. The animals  
259 displayed pericardial edema when exposed to all mixtures after 24 hpf. In addition,  
260 modification in the pigmentation was seen in the ternary mixture after 72 hpf. The animals  
261 displayed heart malformation and yolk sac deformation at 48 hpf when exposed to the  
262 T<sub>4</sub>+AM mixture. When animals were exposed to the binary mixture T<sub>4</sub>+L-T<sub>4</sub> and ternary  
263 mixture, they exhibited more teratogenic effects, including spine deformation, tail  
264 deformation, yolk sac deformation, and malformation of otoliths. The toxicity of mixtures  
265 was lower than single compounds since the affected individuals were less than 25%. The  
266 mortality rate was less than 10% in the test (Figure 2), and mixtures did not affect  
267 morphometric parameters (Figure 3); this was the opposite of the single toxicity  
268 experiments. The typical sublethal and teratogenic effects observed in the embryo and  
269 larval stages exposed in equivalent concentration tests are shown in Figure 4A.

270 The results of the equitoxic ratio test are shown in Figure 2. The animals exhibited  
271 bradycardia when exposed to all mixtures at 24 hpf, and tachycardia was seen at 48 hpf  
272 in groups exposed to T<sub>4</sub>+L-T<sub>4</sub> mixture and ternary mixture. Sublethal endpoints revealed  
273 that animals were affected mainly in the larval stage. The endpoints observed were  
274 absence of the swim bladder, area of coagulation, pericardial edema, and absence of

275 spontaneous movement. The teratogenicity endpoints showed effects in the larvae stage,  
276 including spine deformation and yolk sac deformation, but less than 25% of individuals  
277 were affected. The results of the equitoxic ratio test revealed that these mixtures had low  
278 toxicity compared to the tests using equivalent concentration mixtures or single  
279 compounds. The mortality rate was less than 10% in the equitoxic ratio test (Figure 2),  
280 and the mixtures did not affect morphometric parameters (Figure 3). This was the  
281 opposite of the single toxicity experiments. The observed effects in the embryo and larval  
282 stages in the equitoxic ratio test are shown in Figure 4B.

#### 283 **4. Discussion**

284 Our results from measurements at embryo and larval stages of zebrafish revealed  
285 that T<sub>4</sub> exhibited the highest toxicity, followed by L-T<sub>4</sub>, and AM showed the lowest  
286 toxicity. No additional defects were observed in the joint toxicity tests, as compared to  
287 the single toxicity test. However, the single compounds were more toxic than the  
288 mixtures, suggesting antagonism (see below). The larvae were more affected than  
289 embryos in all experiments. The absence of the chorion in the larval stage may explain  
290 the increase in the observed toxic effects at this stage. The chorion functions to protect  
291 the embryo against environmental influences, such as chemical exposure (Kim &  
292 Tanguay, 2014), and when it ruptures, the fish are more readily exposed to pollutants that  
293 are present. We found that the toxic effects of exogenous T<sub>4</sub> were first observed in the  
294 embryonic stage. In zebrafish, the thyroid starts to form around 40 hpf (Liu & Chan,  
295 2002). The synthesis of the hormones becomes detectable between 70 and 80 hpf in the  
296 free-swimming larva, a rapid rise in whole-body T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> content is seen (Spaan et al.,  
297 2019). The hormone receptors appear before hormone synthesis (Marelli et al., 2016).  
298 The exogenous T<sub>4</sub> interfered with development, producing toxic effects like an absence  
299 of the swim bladder, coagulation, pericardial edema, reduction in pigmentation, spine

300 deformation, tail deformation, yolk sac deformation, and yolk sac edema in the two  
301 highest concentrations (Figure 1). Reduced pigmentation was probably caused by the  
302 reduction in melanophore density, as reported by Jomaa et al. (Jomaa et al., 2014), who  
303 studied zebrafish exposed to 500  $\mu\text{M}$  of  $\text{T}_3$ , a concentration 6,000 times higher than used  
304 in the current study. The same authors observed similar toxic effects, including a  
305 reduction in melanophore density, absence of the swim bladder, and spine deformation.  
306 Thyroid hormones modulate every component of the cardiovascular system necessary for  
307 normal cardiovascular development and function (Grais & Sowers, 2014). Interestingly,  
308 our results revealed bradycardia in zebrafish with the highest concentration of  $\text{T}_4$ . Since  
309 the function of the heart, the blood vessels, and the blood are affected by thyroid  
310 hormones (Grais & Sowers, 2014), the highest concentration of  $\text{T}_4$  used in our work  
311 appeared to be cardiotoxic.

312         The presence of AM in the aquatic environment may produce endocrine  
313 disruption. In our study, AM was toxic to zebrafish, causing effects in sublethal and  
314 teratogenic endpoints. These include area of coagulation, yolk sac edema, pericardial  
315 edema, spine deformation, tail deformation, and an absence of the swim bladder. These  
316 morphology defects can reduce swimming capacity, directly affecting feeding behavior  
317 and predator avoidance, which could result in lower survival probability and population  
318 decline. The failure of the swim bladder to inflate would increase oxygen and energy  
319 demand, leading to slighter growth of the animals (Stinckens et al., 2018). The zebrafish  
320 swim bladder arises around 96-120 hpf, as a single chamber. Our findings demonstrated  
321 the absence or inability to inflate this organ at 96 hpf, suggesting toxicity at the  
322 concentrations used. Jomaa et al. (Jomaa et al., 2014) also observed that zebrafish exposed  
323 to AM at 10  $\mu\text{M}$  had uninflated swim bladders. Our findings corroborate with these  
324 authors using concentrations that were much smaller. Chen et al. (Chen et al., 2012)

325 reported that zebrafish embryos exposed in 12 hpf to 15  $\mu$ M of AM had smaller heads,  
326 delayed development, tail shrinkage, pericardial edema, reduced heart rate, and abnormal  
327 heart development. Our findings also corroborate these authors, except we observed  
328 increased heart rate. The developmental time and concentrations for drug exposure used  
329 by Chen et al. (Chen et al., 2012) were different from our experiments, but we detected  
330 similar AM toxicity. Our results demonstrated that AM caused tachycardia. Some authors  
331 report that bradycardia occurred in animals exposed to AM (Lin et al., 2018; Wen et al.,  
332 2012) due to a decrease in cardiomyocyte excitability due to drug effects on ion channels.  
333 This was not observed in our experiments. Perhaps the AM effects are biphasic, inducing  
334 tachycardia at lower concentrations and bradycardia at higher concentrations. This could  
335 be explored in future studies.

336 Our results also reveal that L-T<sub>4</sub> was the least toxic compound compared to the  
337 other studied compounds. Environmental studies evaluating L-T<sub>4</sub> toxicity are scarce. L-  
338 T<sub>4</sub> is a drug categorized as class III according to the Biopharmaceutical Drug Disposition  
339 Classification System due to high solubility but low permeability (Skelin et al., 2017).  
340 Low permeability may explain the low toxicity of the drug. In an earlier study, our group  
341 evaluated the toxic effects of L-T<sub>4</sub> on the biological parameters of tambaqui (*Colossoma*  
342 *macropomum*). The results revealed that the animals had significantly reduced swimming  
343 at slow rates and increased frequency in being motionless, and L-T<sub>4</sub> reduced the  
344 photoreceptor response to visual stimuli. In contrast, L-T<sub>4</sub> did not affect larva spontaneous  
345 movements in the present study. This may be explained by differences in the age of the  
346 fish: juvenile tambaqui vs larvae zebrafish.

347 Thyroid hormones are important for the growth of fish (Kumar et al., 2013). Our  
348 morphological findings at 96 hpf revealed that T<sub>4</sub> and L-T<sub>4</sub> at the highest concentrations  
349 reduced growth (Figure 1). This indicates that morphological effects of high doses of

350 thyroid EDs produce expected defects in thyroid function. Thyroid hormones also  
351 regulate normal eye development (Arbogast et al., 2016). AM caused eye size defects,  
352 which are expected responses.

353 The toxic effects of single compounds may be modified by the presence of other  
354 compounds in the environment. Aquatic animals are continually exposed to mixtures of  
355 environmental factors like the EDs studied in our study. The experiments showed that in  
356 the equivalent concentration test the animals produced more effects than in the equitoxic  
357 ratio test (Table 1). These results were expected because the amount of each compound  
358 is higher in the equivalent concentration test than in the equitoxic ratio test (Table 2). This  
359 result may show some antagonistic effect between the compounds, possibly caused by  
360 AM binding to the same thyroid hormone receptors and interfering with T<sub>4</sub> or L-T<sub>4</sub>  
361 binding (Elnaggar et al., 2018). A low mortality rate and no morphological alterations  
362 were observed in the joint toxicity tests, suggesting an antagonistic effect. In addition to  
363 antagonistic responses, possible additive effects of the mixtures were also observed,  
364 including the appearance of tachycardia and heart malformation. Lee et al. (Lee et al.,  
365 2015) and Chen et al. (Chen et al., 2012) reported that AM acts to inhibit cardiac valve  
366 formation. We did not detect this effect in the fish exposed to AM. However, the animals  
367 exposed to a binary mixture of T<sub>4</sub>+AM in equivalent concentration showed heart defects.

## 368 **5. Conclusion**

369 The concentrations used in the acute toxicity tests with single compounds were  
370 ten, one hundred, and one thousand times higher than those typically found in aquatic  
371 ecosystems, which produced toxic effects. The environmental concentrations showed a  
372 low risk for our studied parameters, but if you consider the possibility of higher  
373 concentrations caused by an accident, releasing large amounts of these compounds, a  
374 significant risk is possible. Sublethal and teratogenic effects in the embryo and larval

375 stages produce changes in embryo heart rate and mortality. The absence of the chorion in  
376 the larval stage may explain an increase in the observed toxic effects. Joint toxic tests  
377 revealed antagonistic morphological effects. Since many types of hormones and drugs  
378 may coexist in the aquatic ecosystem, it is important to investigate their interactions to  
379 fully assess the ecological risk. Aquatic animals are continually exposed to mixtures of  
380 contaminants, and the toxic effects induced by mixtures are sometimes not taken into  
381 account when making conclusions concerning the hazards of these toxic compounds.

## 382 **6. Acknowledgments**

383 The authors would like to thank the *Universidade Federal Rural de Pernambuco*. The  
384 authors also thank James Marrs at IUPUI to help in the preparation of the manuscript.

## 385 **7. Author Declarations**

### 386 *Funding*

387 The authors would like to thank the *Universidade Federal Rural de Pernambuco*,  
388 *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES* to the  
389 scholarship to Thamiris P. Santos and fellowship for Pabyton G. Cadena (PRInt  
390 #88887.364263/2019-00), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e*  
391 *Tecnológico – CNPq* for the scholarship to Paulo E. S. Bastos and productivity grant to  
392 Pabyton G. Cadena (Grant 310401/2017-8), *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia*  
393 *de Pernambuco – FACEPE* (Grant APQ-0933-2.08/15) and *Pró-Reitoria de Pesquisa e*  
394 *Pós-Graduação* of UFRPE – PRPPG (Grant PRPPG 05/2018) for financial support.

### 395 *Competing Interests*

396 The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

### 397 *Ethics approval*

398 The protocols used in this study were approved by the Ethics Committee in the use of  
399 animals of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* - Brazil, protocol number  
400 091/2018.

401 *Consent to participate*

402 Not applicable.

403 *Consent for publication*

404 Not applicable.

405 *Availability of data and material*

406 The data and material used in this study are available from the corresponding author on  
407 request.

408 *Code availability*

409 Not applicable.

410 *Author Contributions*

411 Details of each author with their contribution in this paper: Conceptualization,  
412 methodology, validation, formal analysis, Investigation, data curation, writing - original  
413 draft, writing - review and editing, visualization were performed by Thamiris Pinheiro  
414 Santos. Investigation and data Curation also were performed by Paulo Eduardo da Silva  
415 Bastos. Authors Stefânia Maria de Medeiros Vieira, Marília Cordeiro Galvão da Silva,  
416 Renata Meireles Oliveira Padilha and Amanda Rodrigues dos Santos Magnabosco  
417 performed investigation. Authors Jadson Freitas da Silva and André Lucas Corrêa de  
418 Andrade performed investigation and formal analysis. Co-supervision, project  
419 administration, writing - original draft, writing - review & editing were performed by  
420 Marília Ribeiro Sales Cadena. Conceptualization, methodology, validation, formal  
421 analysis, resources, data curation, writing - original draft, writing - review, and editing,

422 visualization, supervision, project administration, funding acquisition were performed by  
 423 Pabyton Gonçalves Cadena. All authors read and approved the final manuscript.

## 424 8. References

- 425 Abdallah MAM (2016) Endocrine disruptors as pollutants in marine ecosystem: a case  
 426 study in Egypt. *The Open Biotechnology Journal* 10.
- 427 Altenhofen S, Nabinger DD, Wiprich MT, Pereira TCB, Bogo MR & Bonan CD (2017)  
 428 Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in  
 429 larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180: 483-490.  
 430 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.029>.
- 431 Arbogast P, Flamant F, Godement P, Glösmann M & Peichl L (2016) Thyroid Hormone  
 432 Signaling in the Mouse Retina. *PLoS One* 11: e0168003.  
 433 doi:10.1371/journal.pone.0168003.
- 434 Balow SA, Pierce LX, Zentner GE, Conrad PA, Davis S, Sabaawy HE, McDermott BM  
 435 & Scacheri PC (2013) Knockdown of *fbx110/kdm2bb* rescues *chd7* morphant  
 436 phenotype in a zebrafish model of CHARGE syndrome. *Developmental Biology*  
 437 382: 57-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.07.026>.
- 438 Bartalena L, Bogazzi F, Chiovato L, Hubalewska-Dydejczyk A, Links TP & Vanderpump  
 439 M (2018) 2018 European Thyroid Association (ETA) Guidelines for the  
 440 Management of Amiodarone-Associated Thyroid Dysfunction. *European Thyroid*  
 441 *Journal* 7: 55-66. doi:10.1159/000486957.
- 442 Cadena PG, Cadena MRS, Sarmah S & Marrs JA (2020) Folic acid reduces the ethanol-  
 443 induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish  
 444 (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD).  
 445 *Reproductive Toxicology* 96: 249-257.  
 446 doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.07.013>.
- 447 Chen Y-H, Lee H-C, Hsu R-J, Chen T-Y, Huang Y-K, Lo H-C, Hu S-C, Harn H-J, Jeng  
 448 J-R, Sun C-K, Lin S-Z & Tsai H-J (2012) The toxic effect of Amiodarone on valve  
 449 formation in the developing heart of zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology*  
 450 33: 233-244. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.12.008>.
- 451 Elnaggar MN, Jbeili K, Nik-Hussin N, Kozhippally M & Pappachan JM (2018)  
 452 Amiodarone-Induced Thyroid Dysfunction: A Clinical Update. *Exp Clin*  
 453 *Endocrinol Diabetes* 126: 333-341.
- 454 Fent K, Weston AA & Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals.  
 455 *Aquatic Toxicology* 76: 122-159.  
 456 doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>.
- 457 Fick J, Lindberg RH, Tysklind M & Larsson DGJ (2010) Predicted critical environmental  
 458 concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and*  
 459 *Pharmacology* 58: 516-523. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.025>.
- 460 Grais IM & Sowers JR (2014) Thyroid and the heart. *The American journal of medicine*  
 461 127: 691-698. doi:10.1016/j.amjmed.2014.03.009.
- 462 Huttner IG, Trivedi G, Jacoby A, Mann SA, Vandenberg JI & Fatkin D (2013) A  
 463 transgenic zebrafish model of a human cardiac sodium channel mutation exhibits  
 464 bradycardia, conduction-system abnormalities and early death. *Journal of*  
 465 *Molecular and Cellular Cardiology* 61: 123-132.  
 466 doi:<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.06.005>.
- 467 Jomaa B, Hermsen SA, Kessels MY, Van Den Berg JH, Peijnenburg AA, Aarts JM,  
 468 Piersma AH & Rietjens IM (2014) Developmental toxicity of thyroid-active

- 469 compounds in a zebrafish embryotoxicity test. *ALTEX-Alternatives to animal*  
470 *experimentation* 31: 303-317.
- 471 Kawahara G & Hayashi YK (2016) Characterization of Zebrafish Models of Marinesco-  
472 Sjögren Syndrome. *PLoS One* 11: e0165563. doi:10.1371/journal.pone.0165563.
- 473 Kim K-T & Tanguay RL (2014) The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in  
474 the embryonic zebrafish assay. *Environ Anal Health Toxicol* 29: e2014021-  
475 2014020. doi:10.5620/eht.e2014021.
- 476 Kinoshita S, Hayashi T, Wada K, Yamato M, Kuwahara T, Anzai T, Fujimoto M, Hosomi  
477 K & Takada M (2016) Risk factors for amiodarone-induced thyroid dysfunction  
478 in Japan. *Journal of Arrhythmia* 32: 474-480.  
479 doi:<https://doi.org/10.1016/j.joa.2016.03.008>.
- 480 Kumar A, Shanthi M & Parameswari R (2013) The effect of L-thyroxine on metabolic  
481 parameters in newly diagnosed primary hypothyroidism. *Clin Exp Pharmacol* 3:  
482 1-4.
- 483 Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE & Braunbeck T (2009) Is  
484 the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential  
485 alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and*  
486 *Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149: 196-209.  
487 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>.
- 488 Law JM (2003) Issues Related to the Use of Fish Models in Toxicologic Pathology:  
489 Session Introduction. *Toxicologic Pathology* 31: 49-52.  
490 doi:10.1080/01926230390174922.
- 491 Lee H-C, Lo H-C, Lo D-M, Su M-Y, Hu J-R, Wu C-C, Chang S-N, Dai M-S, Tsai CT &  
492 Tsai H-J (2015) Amiodarone Induces Overexpression of Similar to Versican b to  
493 Repress the EGFR/Gsk3b/Snail Signaling Axis during Cardiac Valve Formation  
494 of Zebrafish Embryos. *PLoS One* 10: e0144751.  
495 doi:10.1371/journal.pone.0144751.
- 496 Lin M-H, Chou H-C, Chen Y-F, Liu W, Lee C-C, Liu LY-M & Chuang Y-J (2018)  
497 Development of a rapid and economic in vivo electrocardiogram platform for  
498 cardiovascular drug assay and electrophysiology research in adult zebrafish.  
499 *Scientific Reports* 8: 15986. doi:10.1038/s41598-018-33577-7.
- 500 Liu Y-W & Chan W-K (2002) Thyroid hormones are important for embryonic to larval  
501 transitory phase in zebrafish. *Differentiation* 70: 36-45.  
502 doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700104.x>.
- 503 Loh K-C (2000) Amiodarone-induced thyroid disorders: a clinical review. *Postgraduate*  
504 *Medical Journal* 76: 133. doi:10.1136/pmj.76.893.133.
- 505 Maharajan K, Muthulakshmi S, Nataraj B, Ramesh M & Kadirvelu K (2018) Toxicity  
506 assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*):  
507 A multi biomarker study. *Aquatic Toxicology* 196: 132-145.  
508 doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.010>.
- 509 Marelli F, Carra S, Agostini M, Cotelli F, Peeters R, Chatterjee K & Persani L (2016)  
510 Patterns of thyroid hormone receptor expression in zebrafish and generation of a  
511 novel model of resistance to thyroid hormone action. *Molecular and Cellular*  
512 *Endocrinology* 424: 102-117. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.020>.
- 513 Marelli F & Persani L (2017) How zebrafish research has helped in understanding thyroid  
514 diseases [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 6.  
515 doi:10.12688/f1000research.12142.1.
- 516 Nakayama T, Al-Maawali A, El-Quessny M, Rajab A, Khalil S, Stoler Joan M, Tan W-  
517 H, Nasir R, Schmitz-Abe K, Hill RS, Partlow Jennifer N, Al-Saffar M, Servattalab  
518 S, LaCoursiere Christopher M, Tambunan Dimira E, Coulter Michael E, Elhosary

- 519 Princess C, Gorski G, Barkovich AJ, Markianos K, Poduri A & Mochida  
520 Ganeshwaran H (2015) Mutations in *PYCR2*, Encoding Pyrroline-5-  
521 Carboxylate Reductase 2, Cause Microcephaly and Hypomyelination. The  
522 American Journal of Human Genetics 96: 709-719.  
523 doi:10.1016/j.ajhg.2015.03.003.
- 524 Nowik N, Podlasz P, Jakimiuk A, Kasica N, Sienkiewicz W & Kaleczyc J (2015)  
525 Zebrafish: an animal model for research in veterinary medicine. Pol J Vet Sci 18:  
526 663-674. doi:10.1515/pjvs-2015-0086.
- 527 Odum J (2015) Disrupters of thyroid hormone action and synthesis: Endocrine disruption  
528 and human health (ed. Elsevier, pp. 91-109.
- 529 OECD TN (2013) 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for  
530 the Testing of Chemicals, Section 2.
- 531 Overturf MD, Overturf CL, Baxter D, Hala DN, Constantine L, Venables B & Huggett  
532 DB (2012) Early Life-Stage Toxicity of Eight Pharmaceuticals to the Fathead  
533 Minnow, *Pimephales promelas*. Archives of Environmental Contamination and  
534 Toxicology 62: 455-464. doi:10.1007/s00244-011-9723-6.
- 535 Pandya M, Patel D, Rana J, Patel M & Khan N (2016) Hepatotoxicity by acetaminophen  
536 and amiodarone in zebrafish embryos. Journal of Young Pharmacists 8: 50.
- 537 Santos TP, Soares PRL, da Silva MCG, da Silva S, de Andrade ALC, Dos Santos AR, da  
538 Silva JF, da Silva Oliveira EG, da Silva Souza EHL, de Sá FB, Cadena MRS &  
539 Cadena PG (2019) Thyroxine, levothyroxine, and thyroxine complexed into  
540 cyclodextrin changed animal behavior, oxygen consumption, and photopic  
541 electroretinogram of *Colossoma macropomum*. Fish Physiol Biochem 45: 1177-  
542 1187. doi:10.1007/s10695-019-00630-9.
- 543 Silva MCGd, Silva JFd, Santos TP, Silva NPCd, Santos ARd, Andrade ALCd, Souza  
544 EHLdS, Sales Cadena MR, Sá FBd, Silva Junior VAd & Cadena PG (2019) The  
545 complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the  
546 biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 214: 330-340.  
547 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.116>.
- 548 Skelin M, Lucijanić T, Amidžić Klarić D, Rešić A, Bakula M, Liberati-Čizmek A-M,  
549 Gharib H & Rahelić D (2017) Factors Affecting Gastrointestinal Absorption of  
550 Levothyroxine: A Review. Clinical Therapeutics 39: 378-403.  
551 doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.01.005>.
- 552 Souza E, Bittencourt T, Ferreira R, Oliveira E, Silva N, Silva S, Cadena M & Cadena P  
553 (2019) Exposição crônica ao cloridrato de metformina e à glibenclamida causa  
554 alterações comportamentais, glicêmicas e de mortalidade em *Hemigrammus*  
555 *caudovittatus* e *Danio rerio*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e  
556 Zootecnia 71: 1582-1590.
- 557 Spaan K, Haigis A-C, Weiss J & Legradi J (2019) Effects of 25 thyroid hormone  
558 disruptors on zebrafish embryos: A literature review of potential biomarkers.  
559 Science of The Total Environment 656: 1238-1249.  
560 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.071>.
- 561 Spirita SV & Ahila AJ (2015) Stages of Embryonic Development of the Zebrafish *Danio*  
562 *rerio* (Hamilton). Biotechnology and Bioscience 3: 6-11.
- 563 Stinckens E, Vergauwen L, Ankley GT, Blust R, Darras VM, Villeneuve DL, Witters H,  
564 Volz DC & Knapen D (2018) An AOP-based alternative testing strategy to predict  
565 the impact of thyroid hormone disruption on swim bladder inflation in zebrafish.  
566 Aquatic Toxicology 200: 1-12.  
567 doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.009>.

- 568 Stinckens E, Vergauwen L, Schroeder AL, Maho W, Blackwell BR, Witters H, Blust R,  
569 Ankley GT, Covaci A, Villeneuve DL & Knapen D (2016) Impaired anterior  
570 swim bladder inflation following exposure to the thyroid peroxidase inhibitor 2-  
571 mercaptobenzothiazole part II: Zebrafish. *Aquatic Toxicology* 173: 204-217.  
572 doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.023>.
- 573 Svanfelt J, Eriksson J & Kronberg L (2010) Analysis of thyroid hormones in raw and  
574 treated waste water. *Journal of Chromatography A* 1217: 6469-6474.  
575 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.032>.
- 576 Wang Y, Lv L, Yu Y, Yang G, Xu Z, Wang Q & Cai L (2017) Single and joint toxic  
577 effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*).  
578 *Chemosphere* 170: 61-67.  
579 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>.
- 580 Wen D, Liu A, Chen F, Yang J & Dai R (2012) Validation of visualized transgenic  
581 zebrafish as a high throughput model to assay bradycardia related cardio toxicity  
582 risk candidates. *Journal of Applied Toxicology* 32: 834-842.  
583 doi:<https://doi.org/10.1002/jat.2755>.
- 584 Yu L, Chen M, Liu Y, Gui W & Zhu G (2013) Thyroid endocrine disruption in zebrafish  
585 larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. *Aquatic Toxicology*  
586 138-139: 35-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.001>.
- 587
- 588

589 **Captions for figures**

590

591 **Figure 1:** Typical teratogenic effects observed in zebrafish exposed to thyroxine ( $T_4$ ),  
592 levothyroxine ( $L-T_4$ ), and amiodarone (AM) in the highest concentration tested for each  
593 compound compared with normal animal (control group). Arrows and abbreviations  
594 indicate main teratogenic effects as yolk sac edema (YSE), spine deformation (SD),  
595 pigmentation (P), pericardial edema (PE), absence of the swim bladder (ASB), yolk sac  
596 deformation (YSD), area of coagulation (AC).

597

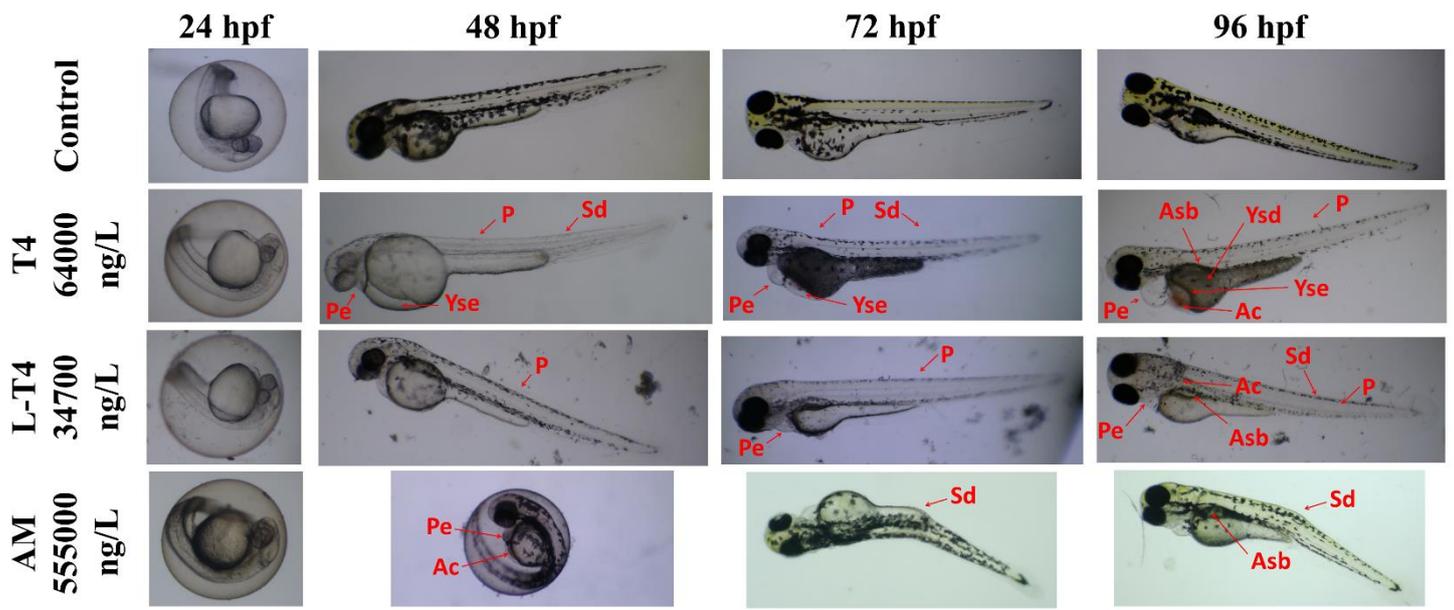
598 **Figure 2:** Percentage of affected animals (A) after 24, 48, 72, and 96 h (post-fertilization)  
599 in single and joint toxicities tests. The reduction in the percentage of affected animals was  
600 considered significant when  $* = p < 0.05$ . Legend:  $T_4$  - thyroxine;  $L-T_4$  - levothyroxine;  
601 AM - amiodarone.

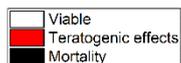
602

603 **Figure 3:** Morphometry of zebrafish (*Danio rerio*) larvae with 96 hpf exposed to single  
604 compounds with concentrations of thyroxine (0.064, 0.640, 6,400, and 64,000  $\mu\text{g/L}$ ),  
605 levothyroxine (0.347, 3.470, 34.700, and 347,000  $\mu\text{g/L}$ ), and amiodarone (0.555, 5,550,  
606 55,500, and 555,000  $\mu\text{g/L}$ ), and exposed to experiments of mixtures of compounds with  
607 concentrations of thyroxine (0.640  $\mu\text{g/L}$ ), levothyroxine (3.470  $\mu\text{g/L}$ ), and amiodarone  
608 (5,550  $\mu\text{g/L}$ ) in equivalent concentration test and equitoxic ratio test. Morphometric  
609 analysis measures: body length ( $\mu\text{m}$ ), ocular distance ( $\mu\text{m}$ ) (Altenhofen et al., 2017), eye  
610 diameter, head-width (midbrain) ( $\mu\text{m}$ ), and head length ( $\mu\text{m}$ ). \*Indicates statistically  
611 significant difference from control ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.

612

613 **Figure 4:** Optical microscopy of embryos and larvae exposed to mixtures in the  
614 equivalent concentration test (A) and equitoxic ratio test (B) at 24, 48, 72 and 96 h (post-  
615 fertilization). Arrows and abbreviations indicate main teratogenic effects as absence of  
616 the swim bladder (ASB), malformation of heart (Mh), malformation of otoliths (MO),  
617 pigmentation (P), pericardial edema (PE), spine deformation (SD), tail deformation (TD),  
618 Yolk sac deformation (YSD), and yolk sac edema (YSE).

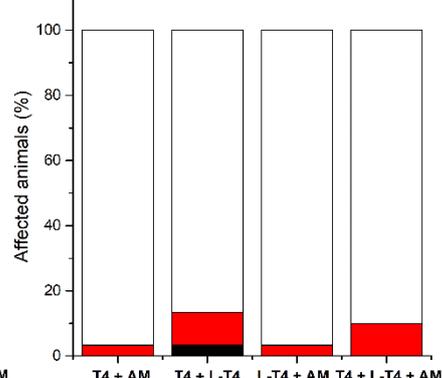
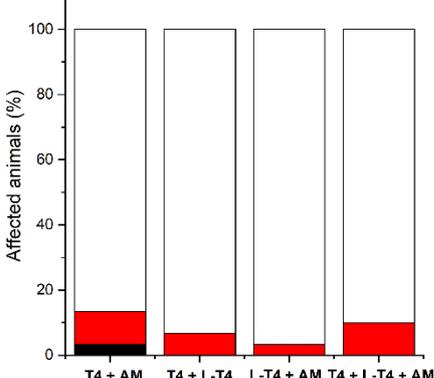
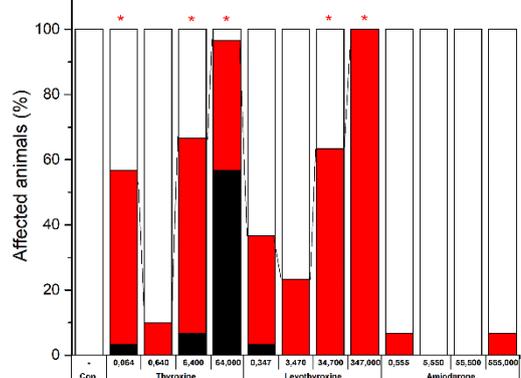
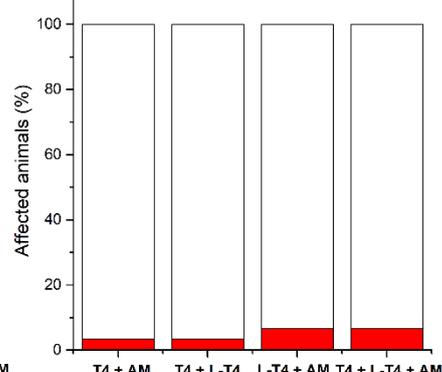
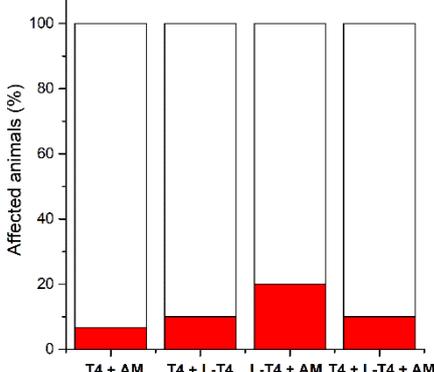
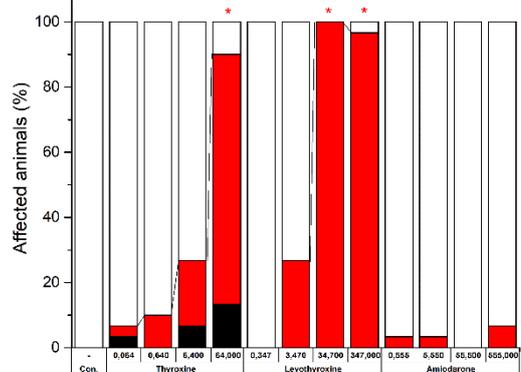
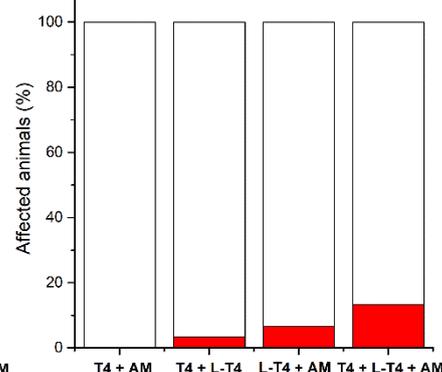
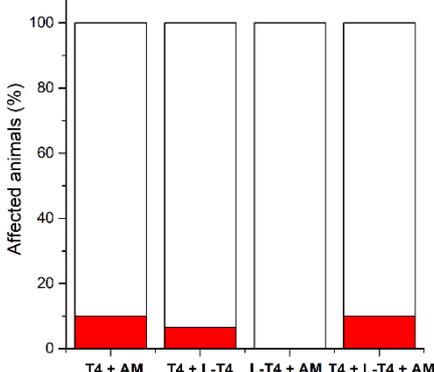
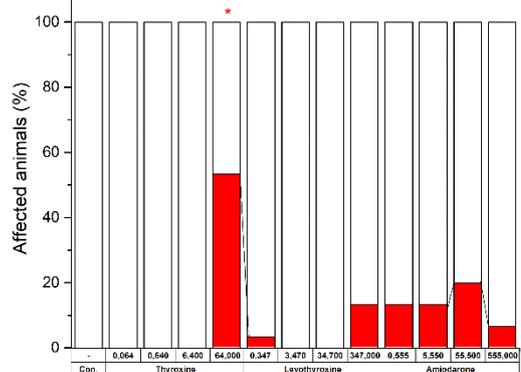
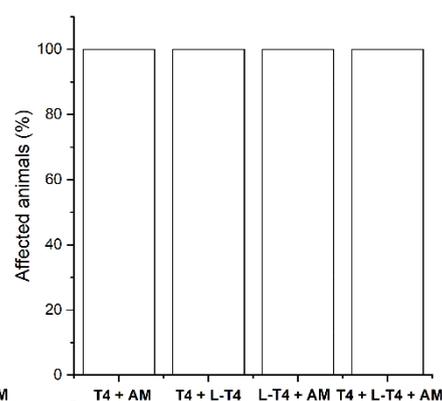
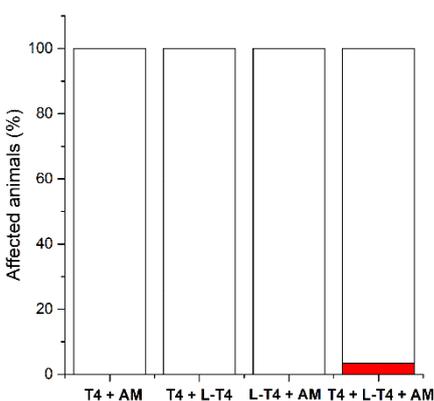
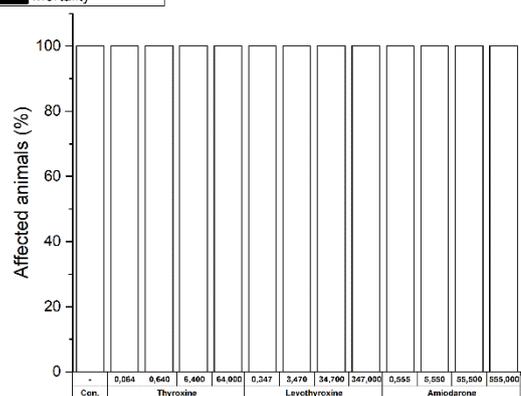




Single toxicity experiments

Equivalent concentration test

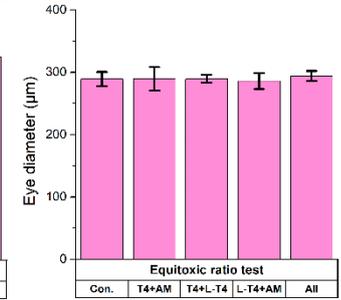
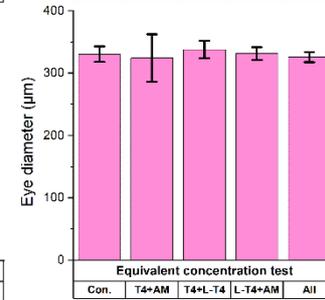
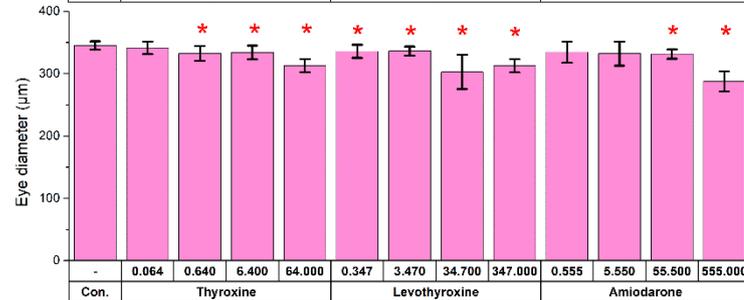
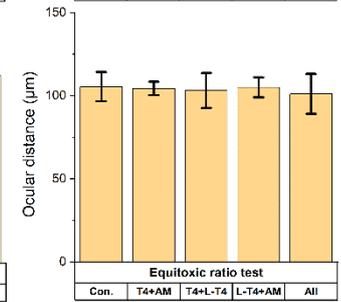
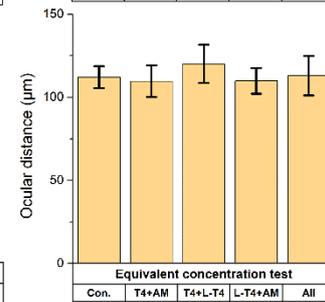
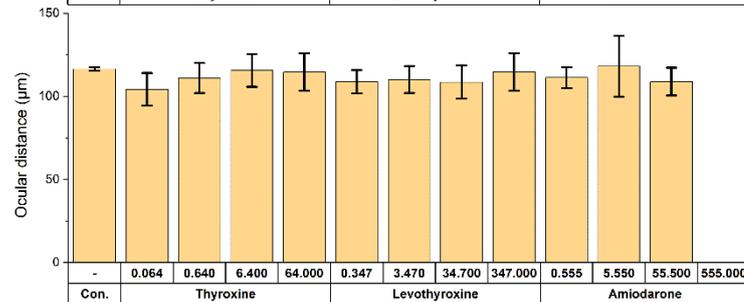
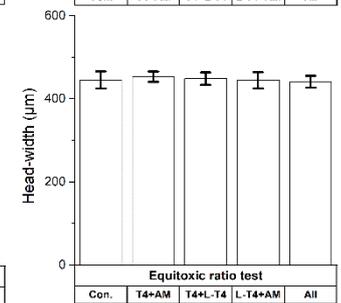
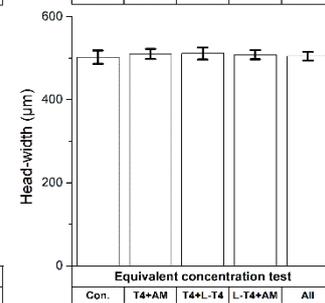
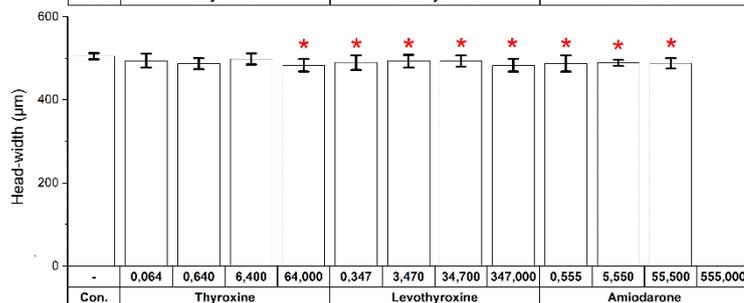
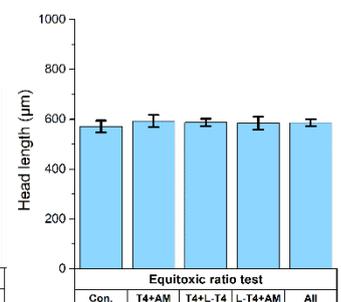
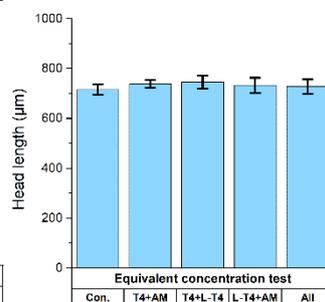
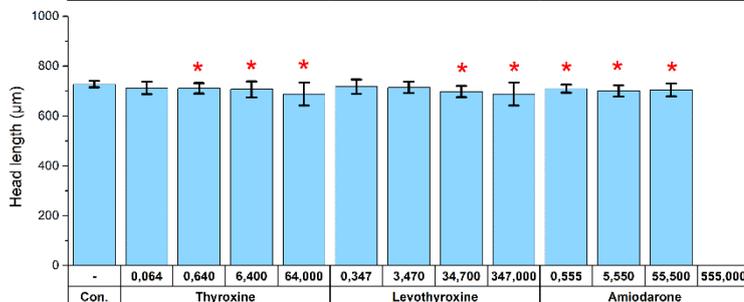
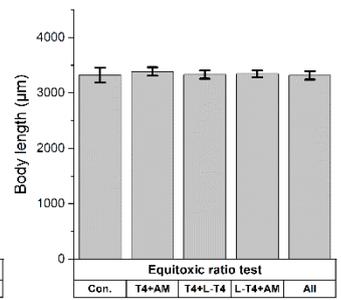
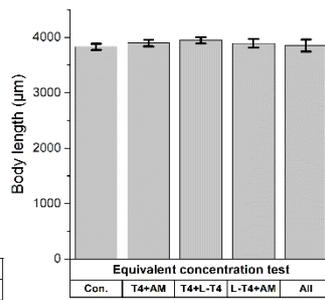
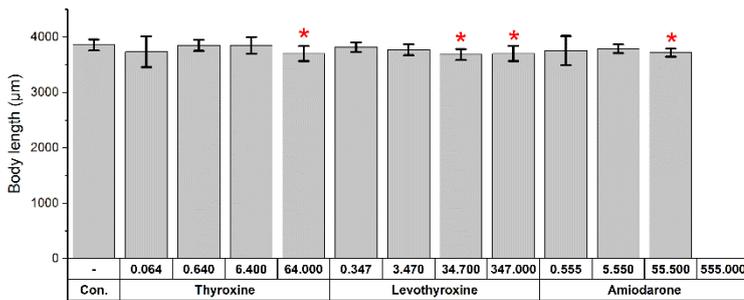
Equitoxic ratio test



Single toxicity experiments

Equivalent concentration test

Equitoxic ratio test



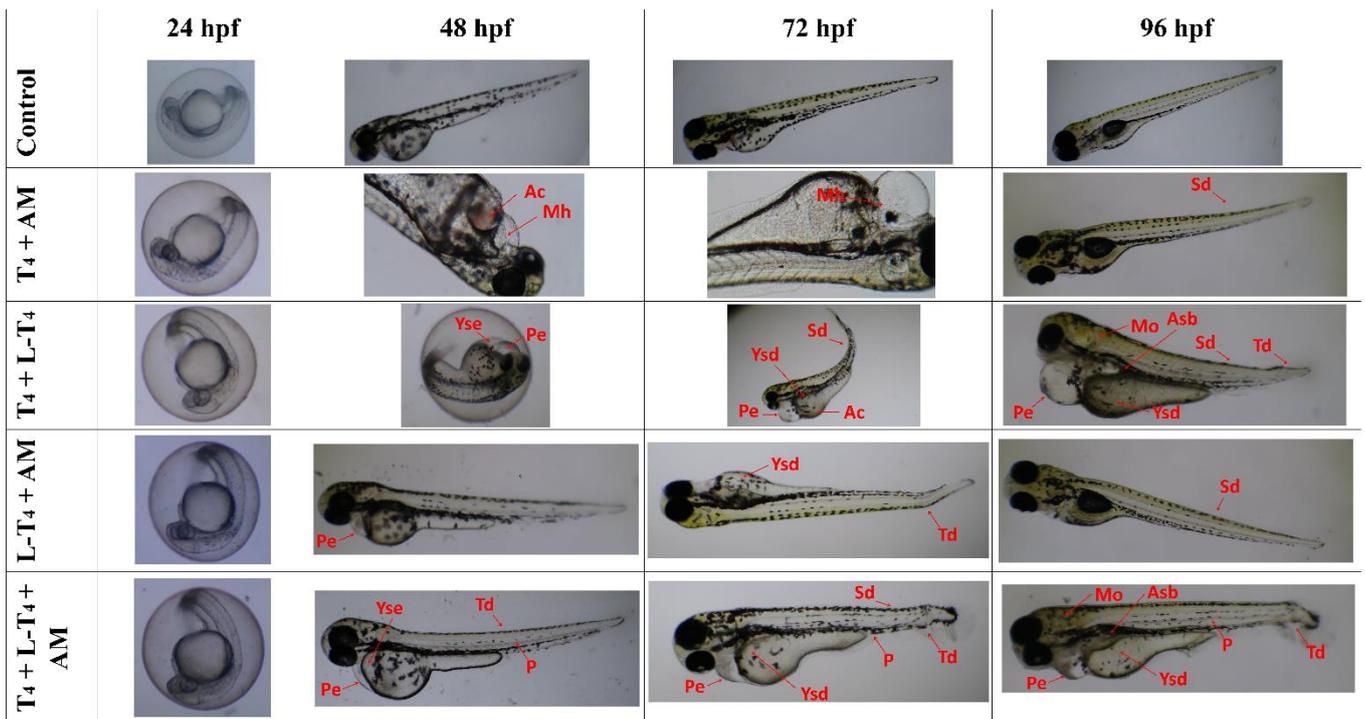
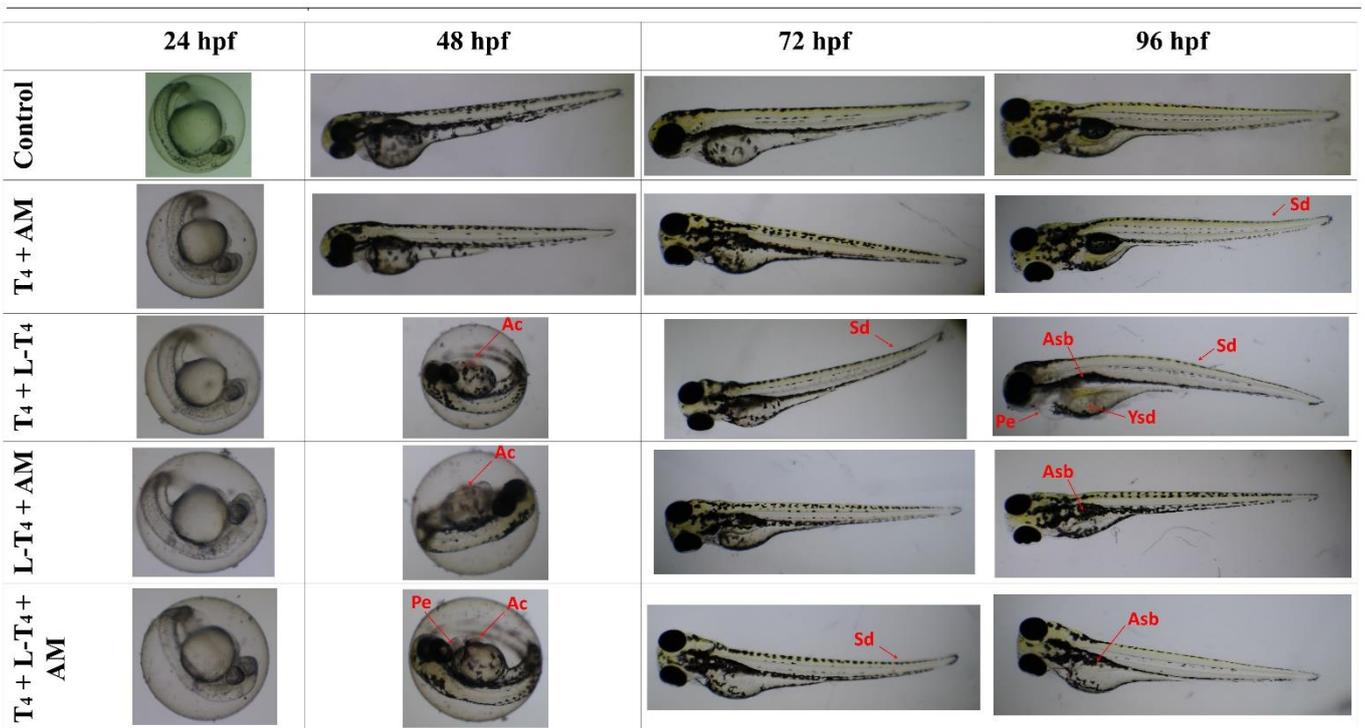
**A****B**

Table 1. Concentrations of the individual compounds used in the acute toxicity test.

Compounds	Environmental concentrations	Concentrations 10 times greater	Concentrations 100 times greater	Concentrations 1000 times greater
Thyroxine	0.064 µg/L (Svanfelt et al., 2010) (0.00008 µM)	0.640 µg/L (0.00082 µM)	6.400 µg/L (0.00823 µM)	64.000 µg/L (0.08238 µM)
Levothyroxine	0.347 µg/L (Fick et al., 2010) (0.00446 µM)	3.470 µg/L (0.04466 µM)	34.700 µg/L (0.44666 µM)	347.000 µg/L (4.4666 µM)
Amiodarone	0.555 µg/L (Overtuf et al., 2012) (0.00086 µM)	5.550 µg/L (0.00860 µM)	55.500 µg/L (0.08600 µM)	555.000 µg/L (0.86004 µM)

Table 2. Concentrations of binary and ternary mixtures used in equivalent concentration test and equitoxic ratio test.

	Equivalent concentration test	Equitoxic ratio test
Binary mixtures	0.640 µg/L T <sub>4</sub> : 5.550 µg/L AM (0.000082 µM T <sub>4</sub> : 0.000860 µM AM) 0.640 µg/L T <sub>4</sub> : 3.470 µg/L L-T <sub>4</sub> (0.000082 µM T <sub>4</sub> : 0.00446 µM L-T <sub>4</sub> ) 3.470 µg/L L-T <sub>4</sub> : 5.550 µg/L AM (0.00446 µM L-T <sub>4</sub> : 0.000860 µM AM)	0.320 µg/L T <sub>4</sub> : 2.775 µg/L AM (0.000412 µM T <sub>4</sub> : 0.004300 µM AM) 0.320 µg/L T <sub>4</sub> : 1,735 µg/L L-T <sub>4</sub> (0.000412 µM T <sub>4</sub> : 0.002233 µM L-T <sub>4</sub> ) 1.735 µg/L L-T <sub>4</sub> : 2.775 µg/L AM (0.002233 µM L-T <sub>4</sub> : 0.004300 µM AM)
Ternary mixture	0.640 µg/L T <sub>4</sub> : 3.470 µg/L L-T <sub>4</sub> : 5.550 µg/L AM (0.000082 µM T <sub>4</sub> : 0.00446 µM L-T <sub>4</sub> : 0.000860 µM AM)	0.213 µg/L T <sub>4</sub> : 1.155 µg/L L-T <sub>4</sub> : 1.848 µg/L AM (0.00041191 µM T <sub>4</sub> : 0.002233 µM L-T <sub>4</sub> : 0.000430 µM AM)

**Development of nanoemulsion from the essential oils associated with levothyroxine  
and its toxicity in zebrafish as a non-target organism**

Thamiris Pinheiro Santos<sup>1,2</sup>, Paulo Eduardo da Silva Bastos<sup>3</sup>, Matheus Victor Viana de Melo<sup>1</sup>, André Lucas Corrêa de Andrade<sup>1,2</sup>, Tiago Queiroz da Mota Bittencourt<sup>1</sup>, Renata Meireles Oliveira Padilha<sup>1</sup>, Renatta Priscilla Ferreira Silva<sup>1,2</sup>, Niely Priscila Correia da Silva<sup>1</sup>, Carolina Alves de Araujo<sup>4</sup>, Marcilio Martins de Moraes<sup>4</sup>, Cláudio Augusto Gomes da Câmara<sup>4</sup>, Marília Ribeiro Sales Cadena<sup>3</sup>, Pabyton Gonçalves Cadena<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n 50780-901 Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Biologia (DB), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Química (DQ), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil.

\*To whom correspondence should be addressed:

Prof. Dr. Pabyton G. Cadena, Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil.

Phone number: + 55 81 3320.6393, Fax: +55 81 3320.6057.

E-mail: pabyton.cadena@ufrpe.br

ORCID: 0000-0003-2297-5872

## Abstract

The study aimed at the development of nanoemulsions containing levothyroxine associated with essential oils with antioxidant activity and their toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) as a non-target organism. Essential oils of the *Piper aduncum*, *Citrus sinensis*, and *Carum carvi* were characterized by qualitative and quantitative gas chromatography (GC-MS and GC-FID). The oil/water nanoemulsions were prepared using a high-energy emulsification method by magnetic stirring. The study of the effect of time and stirring speed in the preparations of nanoemulsions was carried out by a two-level  $3 \times 2^2$  full experimental design. The mean size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of nanoemulsions were used as the response variables of the design study. Antioxidant activity was analyzed by DPPH $\cdot$  and ABTS $^{+\cdot}$  radicals. Toxicity tests with non-target organisms were performed using zebrafish as an animal model based on the OECD 236 testing guideline was response variables of mortality, teratogenic effects, and behavioral tests like thigmotaxis and touch sensitivity. The GC-MS analysis of *C. carvi*, *C. sinensis*, and *P. aduncum* allowed the identification of 6, 16, and 13 compounds being carbon (60.44  $\pm$  0.80%), limonene (90.13  $\pm$  1.11%), and dilapiol (78.41  $\pm$  0.98%) the major constituent of each oil, respectively. Nanoemulsions were successfully developed with the mean size of vesicles of 218.5 e 489.2 nm, PDI of 0.113 e 0.478, and zeta potential of -12,5 e -39,1 mV. Experimental designs revealed that the higher agitation speed promotes more negative zeta potential for the *C. carvi* nanoemulsions, the higher stirring speed reduces the size of the vesicles for the *C. sinensis* nanoemulsions, and shorter the stirring time induces the smaller PDI values for *P. aduncum* nanoemulsions. All oils were shown to be active in antioxidant tests with the antioxidant activity being  $EC_{50} = 204.3$  to 288.5  $\mu\text{g/mL}$  for DPPH, and  $EC_{50} = 156.6$  to 194.9  $\mu\text{g/mL}$  for ABTS. The results of the toxicity tests revealed that the animals exposed to all nanoemulsions

presented teratogenic effects as pericardial and yolk sac edemas, mostly in the larval stage. Only *C. carvi* nanoemulsion affected the behavioral tests. These nanoemulsions could be a good alternative to overcome the monotherapy with levothyroxine in the therapeutic of hypothyroidism which can show the potential of new nanotechnological products with essential oils as new herbal medicines.

**Keywords:** *Carum carvi*, *Citrus sinensis*, *Piper aduncum*, Levothyroxine, *Danio rerio*.

## 1. Introduction

Essential oils (EOs) are part of the spices used since antiquity, much due to their medicinal properties, and the wide acceptance by consumers is related to your safe status (1) being considered a natural product. EOs are volatile liquids, lipid-soluble and soluble in organic solvents, with their synthesis being able to can be by all plant organs, such as flowers, leaves, and barks (1, 2). Its constituents are highly volatile and lipophilic secondary plant metabolites (3), understanding monoterpenes, sesquiterpenes, and phenylpropanoids.

*Citrus* is the genus that includes one major the world's major fruit cultivated species, the *Citrus sinensis* (sweet orange), and Brazil has been the world's main producer of this fruit (4). According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), in Brazil, the total production of this fruit was 16.713.534 tons in 2018. Antibacterial, antifungal, and antioxidant properties are reported for *C. sinensis* essential oil (5). Popular utilization ranges from improving the appearance of the skin and promoting detoxification of the body to pharmacological actions to relieve anxiety, agitation, stress, challenging behaviors, and insomnia (6).

*Piper* is a genus of the Piperaceae family, widely distributed in subtropical regions. *Piper aduncum* is popularly known as long pepper, and *monkey pepper* among others (7, 8). In Brazil is used due to activities such as bactericide, leishmanicide action,

fungicide, antioxidant, cytotoxic, anticancer, larvicide, insecticide, antiplatelet, molluscicides, and antiviral (7, 8).

*Carum carvi*, also known as caraway and black zeera, is a plant from the Apiaceae family, grown in Northern Africa, western Asia, and Europe. Recently, was implanted in other regions of the world like Russia, Iran, Iraq, Indonesia, and North America. Its potential biological effects include antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-obesity, anti-spasmodic, anti-asthmatic, anti-microbial, anti-hemolytic, anti-foaming, and galactagogue actions (9, 10). In addition, the essential oil of *Carum Carvi* is a potent agent for the treatment of hypothyroidism (9).

In hypothyroidism, there is an accelerated production of free radicals and low availability of antioxidants (11), which are substances with the capacity of eliminating free radicals. As a result of this biological condition of unbalance between free radicals and antioxidant defense, oxidative stress arises, which is implicated as a pathophysiological mechanism of different diseases including hypothyroidism (11). Thyroid hormones are necessary for the physical and mental health of humans, and many processes of development and metabolism are regulated by them, just like in fish (12). Levothyroxine monotherapy is the standard treatment for patients with hypothyroidism. However, some unresolved issues exist concerning patients who are biochemically well-controlled but unsatisfied with their treatment outcome. A substantial proportion of patients treated with levothyroxine have persistent complaints, as symptoms of depression and impaired mental wellbeing. Such a condition raised the question of whether treatment with this synthetic hormone is sufficient for all patients or whether alternative therapies can be adopted to minimize these adverse effects (13). Due to this problem, the formulation of product-based nanoemulsions containing levothyroxine

associated with essential oils with antioxidant activity can become a good alternative to overcome these limitations.

Nanotechnology applied to the pharmaceutical industry is seen as an opening for the use of treatment strategies that overcome the obstacles of conventional therapies (14). Therefore, controlled release systems have been widely investigated by enabling the delay and sustaining the drug release after administration, besides controlling the site of drug release and reducing the amount of drug required for the treatment (15). Among the controlled drug release systems, nanoemulsions are well reported in the literature for pharmaceutical research. Nanoemulsion is produced from the mixture of two immiscible liquids (oil and water are usually used), stabilized by the addition of a surfactant suitable for the compounds used, which will act by decreasing the surface tension between the immiscible liquids (15). Sometimes, is necessary for the combination of surfactants to ensure the formation and stabilization of nanoemulsions (16). Nanoemulsions offer a better bioavailability in the drug liberation system due to vesicle size, which is usually < 500 nm, giving it a clear or hazy appearance (3, 15). NEs can be used in various forms such as liquids, creams, and sprays, and can be administered by various routes from oral to intravenous. For administration orally, the small size of vesicles provides an increased rate of dissolution and systemic bioavailability of the drug (15). Physicochemical and functional properties of nanoemulsion produced can be determined by characteristics such as mean size, surface charge (zeta potential), and vesicles polydispersity index (PDI).

Emulsification processes are commonly used for essential oils due to the protection of their volatile compounds, which are easily decomposed under exposure to some environmental factors such as heat, light, oxygen, and humidity (2, 3), besides being

a viable economic alternative for the pharmacology. Emulsification of the *C. sinensis* essential oil is described in the literature (17), as well *P. aduncum* (8).

*In silico*, *in vitro*, and *in vivo* are conventional methods that are indicated to evaluate the toxicity of nanoemulsions, because the nanoscale could change their toxicity. *In silico* and *in vitro* methods are beneficial for the preliminary toxicological assessment of nanoemulsions. However, animal tests are still needed. Zebrafish have become a well-established animal model for the toxicological and pharmacological screening of new drugs. In addition, the expressed results in animal models could reveal the benefit/risk of the use of new products, while these nanotechnological products acquire a different dimension to the pharmacological/toxicological profile of traditional drugs (18). When zebrafish are used to evaluate the toxicity of new drugs at the pre-clinical stage, this can make it easier to discard or modify the profile of these new drugs for the use of safer alternatives (19, 20).

In addition, the zebrafish embryo model is an effective model system for studying the toxicological effects of a broad spectrum of herbal medicines (19). Firstly, zebrafish present fertilization externally, and their eggs are optically transparent during early life stages allowing real noninvasive observations throughout the entire embryonic development (20). The zebrafish genome owns 87% like human genes, sharing similar pathological mechanisms (19). Besides, zebrafish features a homolog gene for 82% of human genes that are associated with disease (20), and 91% of homology of the thyroid receptors with humans (21). This allows for the strategic use of this animal model for the study of human diseases, like hypothyroidism. Because of all the advantages, it is suggested the evaluation of drug toxicity using *D. rerio* in pre-clinical studies, thus avoiding the wear of drugs in clinical, but, principally, to develop safer drugs (19).

In subclinical hypothyroidism symptoms such as memory deficit, despondency, and symptoms of depression and anxiety are frequently in the patients (22). Thigmotaxis is a commonly used behavioral endpoint measured in preclinical studies being used as an index of anxiety like-behavior in the zebrafish (23, 24). This endpoint can be applied in hypothyroidism studies. Zebrafish larvae with thigmotaxis prefer to stay near the wall of multi-well plates and showed thigmotaxis at 5 days post fertilization (24). The sensibility touch test is an indicator of the integration of sensory and motor function. This test evaluates the behavior of zebrafish larvae in response to a tactile stimulus given to the head or tail (23).

For the reasons described above, in the present study, we produced, characterized, and analyze the antioxidant activity of the nanoemulsions of essential oils associated with levothyroxine. Finally, the toxicity of these produced nanoemulsions was evaluated in zebrafish (*Danio rerio*) as non-target organisms. The toxic effects on the fish development evaluated were seen in mortality, teratogenic effects, and animal behavior with the thigmotaxis and touch sensitivity tests. Additionally, the analysis of behavior in zebrafish data as a non-target organism model, associated with the physicochemical characterization can provide insights into the potential usability of these nanoemulsions.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Collection of plant material*

Fresh leaves of the *P. aduncum* (8°01'10.1"S 34°56'50.4"W) was collected in the *Mata de Dois Irmãos*, in *Recife, Pernambuco*, Brazil. Leaf collections for specimens were performed at around 9:00 am in the dry season, in February 2019. The plants were identified by botanist Dra. Ângela Maria de Miranda Freitas (*Universidade Federal Rural de Pernambuco*). Vouchers specimen was mounted and deposited in the *Sérgio Tavares Herbarium* of the UFRPE under numbers HST 18177. Fruits of the *C. sinensis* were

collected in *Sítio Cigarra*, in the municipality of *Santana do Mundaú*, Alagoas-AL, in May of 2019. Fruits collections for specimen was performed at around 11:00 am in the dry season. The plant was identified by Dra. *Suzene Izídio da Silva* from the Biology Department of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* (UFRPE). Vouchers specimen was deposited in the *Vasconcelos Sobrinho* Herbarium of the UFRPE, under the number: 48735, *C. sinensis* Osbeck var. *pear*). Oil of the *Carum carvi* was acquired from local commerce.

## 2.2. Isolation, chemical analysis, identification, and quantification of the essential oil

The essential oils from fresh leaves of *Piper aduncum*, and shells of the fruit of *Citrus sinensis* (100 g) were separately isolated using a modified Clevenger-type apparatus and hydrodistillation for 2h. The oil layers were separated and dried over anhydrous sodium sulfate, stored in hermetically sealed glass containers, and kept at a low temperature (-5 °C) until analysis. Total oil yields were expressed as percentages (g/100 g of fresh plant material). All experiments were carried out in triplicate. For the *Carum carvi* oil was acquired from local commerce (LASZLO, Brazil). Quantitative GC analysis was carried out using a PerkinElmer Clarus 500 GC apparatus equipped with a flame ionization detector (FID) and a non-polar DB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness) (J & W Scientific). The oven temperature was programmed from 60 to 240 °C at a rate of 3 °C/min. Injector and detector temperatures were 260 °C. Hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min in split mode (1:30). The injection volume was 0.5 µL of diluted solution (1/100) of oil in n-hexane. The amount of each compound was calculated from GC-FID peak areas in the order of DB-5 column elution and expressed as a relative percentage of the total area of the chromatograms. Analyses were carried out in triplicate. The qualitative Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis was carried out using a Varian

220-MS IT GC system with a mass selective detector, a mass spectrometer in EI 70 eV with a scan-interval of 0.5 s, and fragments from 40 to 550 Da. fitted with the same column and temperature program as that for the GC-FID experiments, with the following parameters: carrier gas = helium; flow rate = 1 mL/min; split mode (1:30); injected volume = 1  $\mu$ L of diluted solution (1/100) of oil in n-hexane. Identification of the components was based on GC-MS retention indices with reference to a homologous series of C8-C40 n-alkanes calculated using the Van der Dool and Kratz equation (25) and by computer matching against the mass spectral library of the GC-MS data system (NIST 14 and WILEY 11th) and co-injection with authentic standards as well as other published mass spectra (26). Area percentages were obtained from the GC-FID response without the use of an internal standard or correction factors.

### *2.3. Preparation of levothyroxine stock solution*

Commercial levothyroxine (L-T<sub>4</sub>) (composition: L-T<sub>4</sub> (37,5  $\mu$ g), mannitol, maize starch, microcrystalline cellulose, butyl-hydroxyanisole, and magnesium stearate) was used in the experiments. The stock solution of L-T<sub>4</sub> was prepared by dissolution in distilled water, obtaining the final nominal concentration of 250  $\mu$ g/L, and was stored under refrigeration (4°C) until further use.

### *2.4. Preparation of nanoemulsions*

The oil/water (O/W) nanoemulsions were prepared using a high-energy emulsification method by magnetic stirring from an oily phase (OP) produced from a mixture of 10-20% (w/w) of each essential oil (*Carum carvi*, *Citrus sinensis*, *Piper aduncum*), 10-20% (w/w) of sorbitan monooleate (Tween 80) and/or 10% polysorbate 80 (Span 80). The OP was first homogenized using a magnetic stirrer for 30 min at 635 g at room temperature (25  $\pm$  2 °C). Simultaneously in another container, water phase (WP) was prepared with or without (empty) levothyroxine diluted in 43.75 mL of phosphate

buffer 100 mM, pH 7.4. Finally, 70% of the WP was dripped (flow of 3.5 mL/min) using a burette into the OP under magnetic stirring according to Duarte et al. (27). The prepared nanoemulsions were identified from the initials of each essential oil: *Carum carvi* – CC; *Citrus sinensis* – CS; and *Piper aduncum* - PA.

### 2.5. Experimental designs

A two-level  $3 \times 2^2$  full experimental design was carried out to study the effect of time and stirring speed in the preparations of nanoemulsions. Factors (stirring speed and stirring time) of each formulation that mainly influenced the physicochemical parameters were evaluated at two levels and a central point (Table 1) in authentic triplicate. The mean size, polydispersity index (PDI), and zeta potential ( $\zeta$  mV) of nanoemulsions were used as the response variables of the design study.

### 2.6. Physicochemical characterization

The nanoemulsions were diluted (50x) in double-distilled water before analysis for reducing the turbidity before being subjected to analysis of microscopic characteristics. The average size (nm), polydispersity index (PDI), and zeta potential (mV) of the oil vesicles were evaluated using the standard photon correlation spectroscopy (PCS) technique fixed at  $90^\circ$  to  $25^\circ\text{C}$  using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) (28). The analysis was performed at *Laboratórios Associados em Rede de Nanotecnologia* (LARnano) of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). The data were measured in triplicate.

### 2.7. Antioxidant Activity of the nanoemulsions

Antioxidant activity was analyzed by DPPH $\cdot$  and ABTS $^{+\cdot}$  radicals. The experiments were performed at *Laboratório de Produtos Naturais Bioativos* (LPNBio) of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* (UFRPE). The antioxidant activity of the nanoemulsions was performed against the free radical DPPH following the

methodology of Araujo et al. (29). Stock solutions were prepared from the extracts and methanol fraction at several concentrations (0.1 to 5.0 mg/mL). Through preliminary analysis, appropriate quantities of stock solutions of the samples and 450  $\mu$ L of the solution of DPPH $\cdot$  (23.6 mg/mL in EtOH) were transferred to 0.5 mL Eppendorf tubes and the volume was completed with EtOH, following homogenization. Samples were sonicated for 30 min and the amount of DPPH $\cdot$  was recorded on a UV-vis (Biochrom EZ Read 2000) device at a wavelength of 517 nm in a 96-well plate. Ascorbic acid was used as a positive control. The determination of the antioxidant activity of the nanoemulsions against the radical cation ABTS $^{+\cdot}$  was carried out following the methodology described by Araujo et al. (29), in a UV-vis (Biochrom EZ Read 2000) device, using Trolox as the standard compound. The starting concentrations of the solutions of the samples were 0.1–1.0 mg/mL, with the addition of 450  $\mu$ L of the radical ABTS $^{+\cdot}$  solution to give final concentrations of 2.5–100.0  $\mu$ g/mL samples. Samples were protected from light and sonicated for 6 min. The absorbance of the samples and the positive control were measured at a wavelength of 734 nm using a microplate of 96 wells. In the two tests each concentration was tested in triplicate, and the percentage of free radical scavenging activity of DPPH $\cdot$  or ABTS $^{+\cdot}$  was calculated by the equation: %SA = 100 x (Abs<sub>control</sub> – Abs<sub>sample</sub>) / Abs<sub>control</sub>, where Abs<sub>control</sub> is the absorbance of the control containing only the ethanol solution of DPPH $\cdot$  or ABTS $^{+\cdot}$  and Abs<sub>sample</sub> is the absorbance of the radical in the presence of the sample or standard ascorbic acid. The antiradical efficiency was established using linear regression analysis and the 95% confidence interval (p < 0.05) obtained using the statistical program GraphPad Prism 5.0.

### 2.8. Fish husbandry, crossing, and toxicity test

Toxicity tests with non-target organisms were performed using zebrafish (*Danio rerio*; WT strain; 7-months-old) as an animal model. The experiments were assayed at

*Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)*. Adults' zebrafish used in the experiments were obtained from a commercial supplier and put in quarantine to detect and confirm the absence of pathogens or diseases. The protocols used in this study were approved by the Ethics Committee in the use of animals of the same University, protocol number 2008150721. Adult male/female zebrafish were isolated in spawning aquariums (Alesco Zebclean) with a 2:1 ratio (30) for fish crossing (40 min). The eggs were collected and washed with distilled water in Petri dishes. Healthy fertilized eggs (normal development of the blastula) were used to form the experimental groups.

The experiments were conducted with 5 x 15 animals per experimental group (a total of 825 animals). The assay was based on the OECD guidelines on the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (31) and Silva et al. (32). The toxicity test was started at 1-hour post-fertilization (hpf). Embryos were maintained in sterile polystyrene test chambers (80 mL) and maintained in an incubator (Patent BR 10 2018 0150 4) in a light-dark cycle of 14:10 h, controlled temperature of  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  and pH of  $7.5 \pm 0.5$ . Daily water renewal was performed with the replacement of the nanoemulsions. The study used a control group and experimental groups that were described in Table 2 with two dilution rates where 4444x represents the high (H) dilution and 3200x represents the low (L) dilution. These dilution ratios were chosen based on previous studies (data not shown) where most of the animals survived at 96 hpf. The final nominal concentration of L-T<sub>4</sub> in all experimental groups was the same. The exposure to nanoemulsions started at 1-h post-fertilization (hpf) being renewed daily at 96 hpf according to OECD 236 (31). Any residue generated by these compounds during the experiments was treated by the advanced oxidative process (AOP) in a reactor using photo-oxidation UV (16w) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (32, 33).

### *2.9. Analysis of the embryonic development*

Mortality data were observed at 24, 48, 72- and 96-hours post-fertilization (hpf). The determination of embryo lethality was assayed according to OECD 236 (31). Determination of mortality as coagulation, tail not detached, no somite formation, absence of heartbeat, and lack of hatching. Teratogenic effects were evaluated according to OECD 236 (31), Silva et al. (32), and Cadena et al. (23). The studied teratogenic effects were spine deformation, tail deformation, yolk sac edema, and pericardial edema. The effects were identified by images in lateral and dorsal views *in vivo*. The images were captured using a Hayear Mod. HY-2307 digital camera microscope and S-EYE 1.4.2.474 software. We consider larvae affected when at least, mortality or one teratogenic effect was observed under a microscope (23). These results were presented as a percentage of affected animals per experimental group.

#### 2.10. Animal behavior

Behavioral tests were used as a method to study the effects of nanoemulsions in zebrafish (*Danio rerio*). The thigmotaxis (TH Test) is the tendency of an animal to move towards the edge or periphery of plates that are introduced. Therefore, this animal avoids the center of this environment. This parameter evaluates the anxiety like-behavior in zebrafish (24). Thigmotaxis test was realized at 144 hpf, according to Cadena et al. (23). The larvae were left at 10 min of acclimatization in 48-well plates (48 larvae per experimental group) in a light environment, and when remained near the wall of plates, the response was recorded. The touch sensitivity test (TS Test) was performed according to Cadena et al. (23). This test evaluated the larval response to mechanical stimuli. Therefore, at 144 hpf, with the aid of a pipette, the larvae were touched on the tail or head. The response was recorded if the larva exhibited swim behaviors (slow or fast), similar to escape.

#### 2.11. Statistical analysis

All data were shown as mean  $\pm$  SD. ANOVA was used to analyze data, and the means were compared by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses were carried out using the Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab. Northampton, MA USA) and GraphPad Prism 5.0.

### 3. Results

#### 3.1. Isolation, chemical analysis, identification, and quantification of the essential oil

The chemical composition of essential oils from the leaves of *P. aduncum*, *C. carvi*, and *C. sinensis* are presented in Table 3. Hydrodistillation of *P. aduncum* leaves provided a yellowish oil. The extraction of the oil revealed a yield of  $2.52 \pm 0.10\%$ . Moreover, for *C. sinensis* the hydrodistillation provided a colorless citrus-scented oil. The extraction of the oil revealed a yield of  $1.4 \pm 0.13\%$ . The GC-MS analysis of *P. aduncum* oils allowed the identification of 13 compounds, representing a total of  $98.53 \pm 1.01\%$  of the oil. The oil revealed the presence of compounds belonging to the class of monoterpenes ( $4.03 \pm 0.05\%$ ), sesquiterpenes ( $16.09 \pm 0.10\%$ ), and phenylpropanoid ( $78.41 \pm 0.98\%$ ). The phenylpropanoid dilapiol ( $78.41 \pm 0.98\%$ ) was characterized as a major constituent in the oil. For *C. carvi* oil the GC-MS analysis allowed the identification of 6 compounds, representing a total of  $98.37 \pm 0.82\%$  of the oil. The oil revealed a predominance of compounds belonging to the monoterpene class ( $98.37 \pm 0.82\%$ ), having as main constituent carbon ( $60.44 \pm 0.80\%$ ) followed by limonene ( $34.14 \pm 0.64\%$ ). Finally, *C. sinensis*, the analysis by GC-MS allowed the identification of 16 compounds, representing a total of  $97.47 \pm 1.22\%$  of the oil. The oil revealed the presence of compounds belonging to the class of monoterpenes ( $96.39 \pm 1.08\%$ ) and sesquiterpenes ( $1.09 \pm 0.01\%$ ). For this oil, limonene ( $90.13 \pm 1.11\%$ ) was characterized as a major constituent in the oil.

#### 3.2. Physicochemical characterization of nanoemulsions

The results of the physicochemical characterization of nanoemulsions were shown in Table 4 (A and B). Our data revealed significant results in the zeta potential for the *C. carvi* nanoemulsion suggesting that the higher agitation speed promotes more negative zeta potential. For the *C. sinensis* nanoemulsion, a significant result was observed only in the size of the vesicles, demonstrating that the higher stirring speed reduces the size of the vesicles. In addition, a significant result in PDI values observed in the *P. aduncum* nanoemulsions suggested that the shorter stirring time induces the smaller PDI values. Finally, the *C. carvi* nanoemulsions were produced using high stirring speed and short stirring time (1129 g / 1 h), *C. sinensis* nanoemulsion was produced using short stirring speed, and short stirring time (282 g / 1 h) and *P. aduncum* nanoemulsions produced using short stirring speed and high stirring time (282 g / 2 h) were chosen for the next experiments. Our choice was based on the best physicochemical parameters for industrial production and used in the next experiments.

### 3.3. Antioxidant activity of the nanoemulsions (DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>)

The antioxidant activity of nanoemulsions from the leaves of *P. aduncum*, *C. carvi*, and *C. sinensis* associated with levothyroxine is presented in Table 5. According to our results, all nanoemulsions were shown antioxidant activity. In the DPPH test, higher antioxidant activity was observed for the *C. carvi* nanoemulsion ( $EC_{50} = 204.3 \mu\text{g/mL}$ ). In the test with the radical ABTS, the *P. aduncum* nanoemulsion ( $EC_{50} = 156.6 \mu\text{g/mL}$ ) showed the best antioxidant activity.

### 3.4. Effects of levothyroxine and nanoemulsions on zebrafish embryonic development

Toxicity tests were carried out with zebrafish non-target organisms to evaluate the toxicity of the nanoemulsions. The results of the embryo and larval stages of zebrafish exposed to L-T<sub>4</sub> and nanoemulsions of each essential oil with different dilution ratios are shown in Figure 1. Mortality was the only effect observed at 24 hpf with significant

results in the animals exposed to *P. aduncum* nanoemulsion in the low dilution ratio (PAL). Teratogenic effects were first observed still in the presence of the chorion in the embryo stage. However, toxic effects were most commonly observed after 72 hpf in the larvae stage in the following groups ECS, CSL, EPA, PAH, and PAL with *P. aduncum* nanoemulsion being the most toxic. While at 96 hpf, significant teratogenic effects were observed in groups exposed to all nanoemulsions. Yolk sac edema is the most toxic effect presented followed by the pericardial edema in zebrafish larvae.

### 3.5. Animal behavior

The results of the thigmotaxis test (TH test) and touch sensitivity response (TS test) are shown in Figures 2A and 2B. The data in the TH test was collected by observation of the animals moving towards the edge or periphery of plates. We did not observe toxic effects in this test when larvae were exposed to L-T<sub>4</sub> and all nanoemulsions (Figure 2A). TS test was also performed by the mechanical stimuli to evaluate if L-T<sub>4</sub> or nanoemulsions exposure affects the swimming activity of the larvae. According to our results (Figure 2B), this parameter was affected in the larvae exposed only to empty *C. carvi* nanoemulsion.

## 4. Discussion

Essential oils are used since their ancestors in popular culture as therapeutic agents for the treatment of various diseases. Its chemical constituents presented high volatility. As a result, nanoencapsulation of these oils has been proposed in drug delivery systems once this technique has the capability of improving the solubility, stability, and bioavailability of formulations. Among them, nanoemulsions are being broadly studied in the last years with formulations produced from essential oils (2). Through the present study, GC-MS and GC-FID identified 16 chemical constituents in *Citrus sinensis* essential oil. Limonene was found to be the main constituent with 90.13%. Rezende et al.

(4) also stated that essential oil from *C. sinensis* had high contents of limonene (91.4%), a fact that corroborates with data in this study reported. In addition, traces of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene ( $1.25 \pm 0.07$ ,  $1.87 \pm 0.10$ , respectively), and phellandrene are also present, as also the portion that consists of the aldehyde (E)-Isocitral ( $0.22 \pm 0.03$ ), that is characteristic of the odor present in this essential oil, as related by Ali et al. (6). In *Piper aduncum* essential oil was identified with 13 chemical constituents, and dillapiole was the main constituent (78.41%), corroborating with data in studies reported by Pino et al. (34) and Maia et al. (35). Finally, *Carum carvi* essential oil presents 6 constituents, but the main ones are carvone ( $60.44 \pm 0.80$ ) and limonene ( $34.14 \pm 0.64$ ). This dataset corroborates the findings by Obeid et al. (9) and Trifan et al. (10).

The increase of the therapeutic potential of the essential oil is possible through nanoencapsulation (3). The emulsification technique was successfully used to develop three different nanoemulsions produced from essential oils in our study. In addition, the formulation of nanoemulsions was affected by the stirring speed and stirring time. Our formulations were characterized as nanoemulsions since their vesicle sizes were less than 300 nm (15). For the polydispersion index (PDI), a measure that characterizes the homogeneity of the size of the vesicles, it is preferable that the values are below 0.2 (36), as it indicates high size homogeneity (37). However, PDI values can vary more or less depending on the technique used to produce nanoemulsions. The results obtained in our study corresponded to expected with PDI values varying between 0.3 and 0.4 being obtained in the best nanoemulsions demonstrating the homogeneity of the formulation. Additionally, the zeta potential ( $\zeta$  - mv) parameter measures the surface charge and electrostatic parameters of vesicles (38). Our data revealed that all formulations presented high negative potential indicating the stability of the nanoemulsions by repulsion forces between the vesicles, taking the absence of aggregations of the vesicles.

The use of surfactants with intermediate-high hydrophilic-lipophilic balance (HLB) (generally between 11 and 16) such as tween is the best choice to produce cheaper nanoemulsions for the dispersion of an oily phase in the aqueous phase. In addition, non-ionic surfactants are also important such as span, for presenting better toxicological safety for oral ingestion (2). According to Aziz et al. (3), it is necessary for a higher value HLB surfactant for the production of smaller vesicles in the nanoemulsions. This statement is in accordance with our results.

Nanoemulsions containing *C. carvi*, *C. sinensis*, and *P. aduncum* essential oils showed a good antioxidant activity according to our values by  $EC_{50}$  (concentration of sample required to scavenge 50% of free radicals). This data confirms findings by Trifan et al. (10), Rodríguez et al. (39), and Frassinetti et al. (5) for *C. carvi*, *P. aduncum*, and *C. sinensis*, respectively. These results can be justified because oils have a large percentage of oxygenated compounds in their compositions, such as limonene, carvone, and dilapiol, besides phenylpropanoid that present in their structure methoxy groups and methylenedioxy. Furthermore, we cannot rule out the presence of other oxygenated compounds found in lower percentages than the cited. Our findings are important to developing products that reduce the toxicity of monotherapy levothyroxine treatment (13) and we suggest a combination of them.

Keeping this in mind, this study focused on the development, characterization, and evaluation of the toxicity of the nanoemulsions produced from essential oils. We used the zebrafish (*Danio rerio*) as a non-target organism to evaluate the toxicity of the produced nanoemulsions. The ethical consideration of the use of lower vertebrates such as zebrafish to evaluate the toxicity of nanoemulsion was taken into account (19). Our results revealed that the animals exposed to all nanoemulsions presented teratogenic effects. Independent of the type of EO used, despite *P. aduncum* nanoemulsion producing

more toxicity, similar teratogenic effects were observed. This could indicate that the same chemical compound used in the formulation of nanoemulsions can be related to toxicity. We did not observe significant teratogenic effects in the L-T<sub>4</sub> solution. However, all nanoemulsions were produced with surfactants (tween 80 and span 80). These statements are supported by Yang et al. (40) found that tween 80 induced anaphylactoid reactions in zebrafish. Ginzburg et al. (41) investigated the influence of surfactants on nanoparticle biocompatibility by studying mixtures of ligand-stabilized gold nanoparticles and polysorbate 80 (span 80) in embryonic zebrafish and observed that the mixtures produced synergistic toxicity at concentrations where the individual components were benign.

The acute toxicity of polysorbate 80 on zebrafish can be explicated by the presence of the polyoxyethylene sorbitan monooleate, the theoretical target product of polysorbate 80 (42). This indicates that pharmaceutical excipients including mixtures such as polysorbate 80 have potential risks in the quality control of these nanotechnological new drugs. Because of its surfactant properties, tween 80 could be toxic to zebrafish. This can be supported by the comparably high relative toxicity of zebrafish in relation to other surfactants such as sodium dodecyl sulfate (SDS) (43). The absence of the chorion in the larval stage may explain the presence of the observed toxic effects in this study. The chorion functions to protect the embryo against chemical exposure, for example (44), and when it ruptures, the fish are more readily exposed to toxins. Generally, we found low toxic effects related to behavioral tests. This could be explained due to the animals chosen for tests did not show any morphological defects, and probably these animals are more resistant to toxic compounds present in nanoemulsions. Finally, these results support that the toxic effects found in our work are more related to morphological defects than behavioral endpoints.

## **5. Conclusion**

We developed and characterized nanoemulsions using full factorial designs using essential oils associated with levothyroxine. All nanoemulsions were active in antioxidant tests and their physicochemical characterization showed good results. These nanoemulsions could be a good alternative to overcome the monotherapy with levothyroxine in the therapeutic of hypothyroidism. However, *in vivo* tests using animal models of developmental hypothyroidism must be used to evaluate the therapeutical potential of these nanoemulsions. Teratogenic effects in the zebrafish animal model were first observed still in the presence of the chorion in the embryo stage. However, toxic effects were mostly observed in the larval stage. Probably surfactants were related to this toxicity. Nevertheless, in adult animals, or humans these surfactants are considered safe which can show the potential of new nanotechnological products with essential oils as new herbal medicines.

## 6. Acknowledgments

The authors would like to thank the Universidade Federal de Pernambuco, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES to the scholarship to Thamiris P. Santos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq for the scholarship to Paulo E. da S. Bastos, productivity scholarship to Pabyton Cadena (306947/2020-0) and financial support (423038/2018-4).

## 7. References

1. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:651593.
2. Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(1).
3. Aziz ZAA, Nasir HM, Ahmad A, Setapar SHM, Ahmad H, Noor MHM, et al. Enrichment of Eucalyptus oil nanoemulsion by micellar nanotechnology: transdermal analgesic activity using hot plate test in rats' assay. *Sci Rep.* 2019;9(1):13678.
4. Rezende JL, Fernandes CC, Costa AOM, Santos LS, Vicente Neto F, Sperandio EM, et al. Antifungal potential of essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* (lima

orange and bahia navel orange) in postharvest control of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Food Science and Technology*. 2020;40(suppl 2):405-9.

5. Frassinetti S, Caltavuturo L, Cini M, Della Croce CM, Maserti BE. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oils from Citrus spp. *Journal of Essential Oil Research*. 2011;23(1):27-31.

6. Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, Anwar F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015;5(8):601-11.

7. Pohlit AM, Pinto ACS, Mause R. Piper aduncum L.: Pluripotent Plant and Important Phytochemical Substance Source. *State of the Art*. 2006;2(1):7 - 18.

8. Silva LS, Mar JM, Azevedo SG, Rabelo MS, Bezerra JA, Campelo PH, et al. Encapsulation of Piper aduncum and Piper hispidinervum essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(2):685-95.

9. Obeid HA, Mshimesh BAR, Jasim GA. Study on the Thyrotropic Activity Of Hydroalcoholic Caraway Seeds Extract In Female Rats With Hypothyroid- Induction Model. *Biochemical and Cellular Archives*. 2020;20(2):3933-43.

10. Trifan A, Aprotosoie AC, Cioancă O, Hăcianu M, Jităreanu A, Gille E, et al. Antioxidant Activity of Essential Oil From *Carum Carvi* L. Cultivated in North-Eastern Romania. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. 2016;120(3):732-6.

11. Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, Olivieri G, Silvestrini A, Meucci E, et al. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6757154.

12. Shkil F, Siomava N, Voronezhskaya E, Diogo R. Effects of hyperthyroidism in the development of the appendicular skeleton and muscles of zebrafish, with notes on evolutionary developmental pathology (Evo-Devo-Path). *Sci Rep*. 2019;9(1):5413.

13. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *The Lancet*. 2017;390(10101):1550-62.

14. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química*. 2016;27(4):286-91.

15. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2017;252:28-49.

16. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. 2012;8(6):1719-29.

17. Velmurugan P, Ganeshan V, Nishter NF, Jonnalagadda RR. Encapsulation of orange and lavender essential oils in chitosan nanospherical particles and its application in leather for aroma enrichment. *Surfaces and Interfaces*. 2017;9:124-32.

18. Pensado-Lopez A, Fernandez-Rey J, Reimunde P, Crecente-Campo J, Sanchez L, Torres Andon F. Zebrafish Models for the Safety and Therapeutic Testing of Nanoparticles with a Focus on Macrophages. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(7).

19. Jayasinghe CD, Jayawardena UA. Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019:7272808.

20. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2020;33(1):95-118.

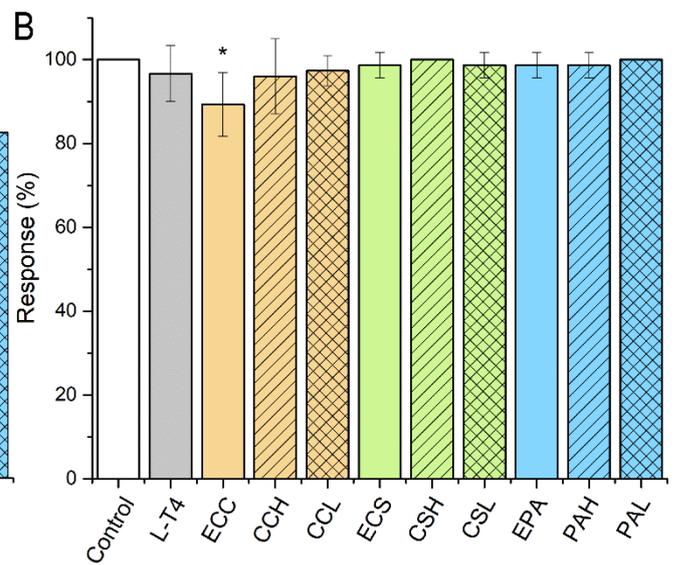
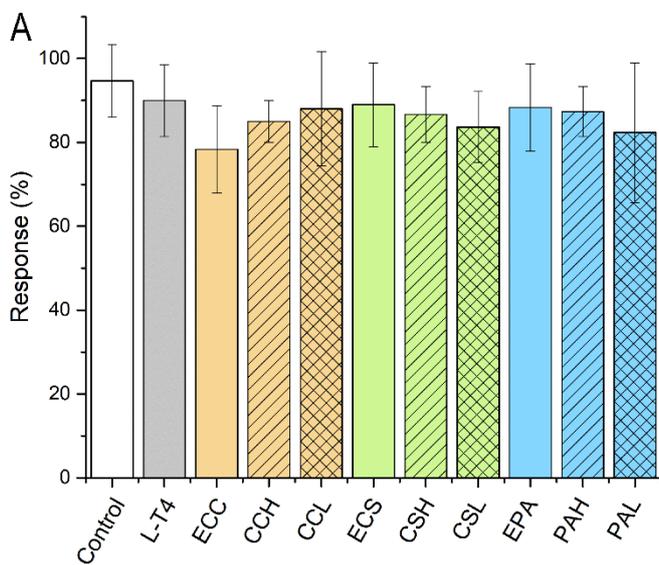
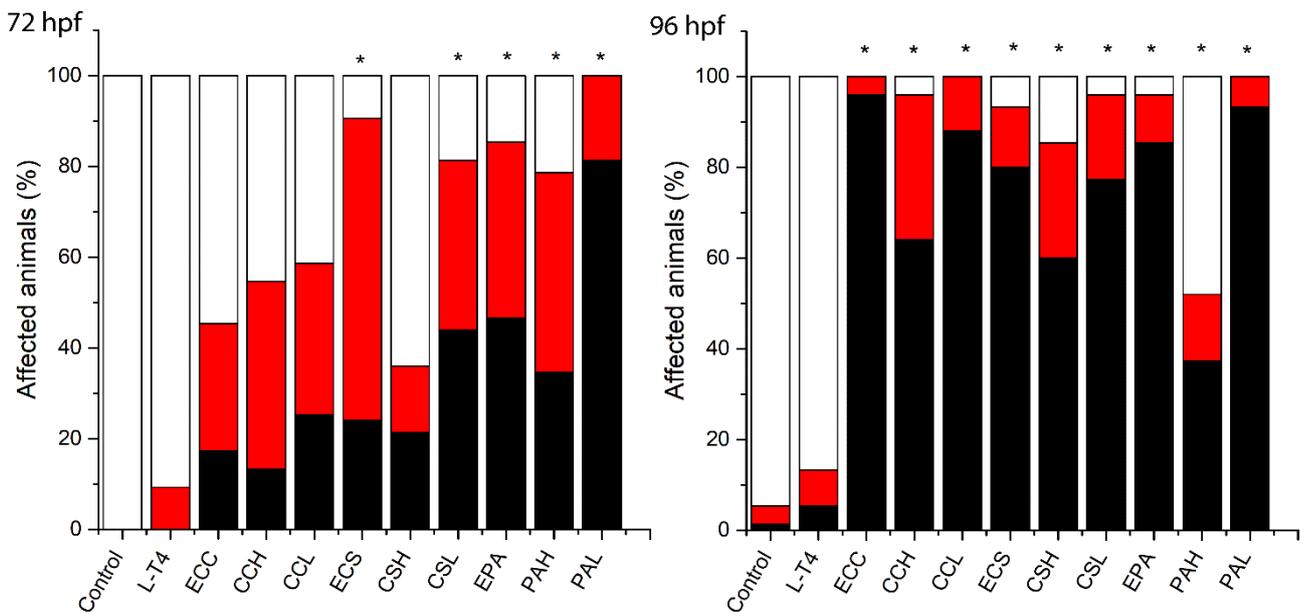
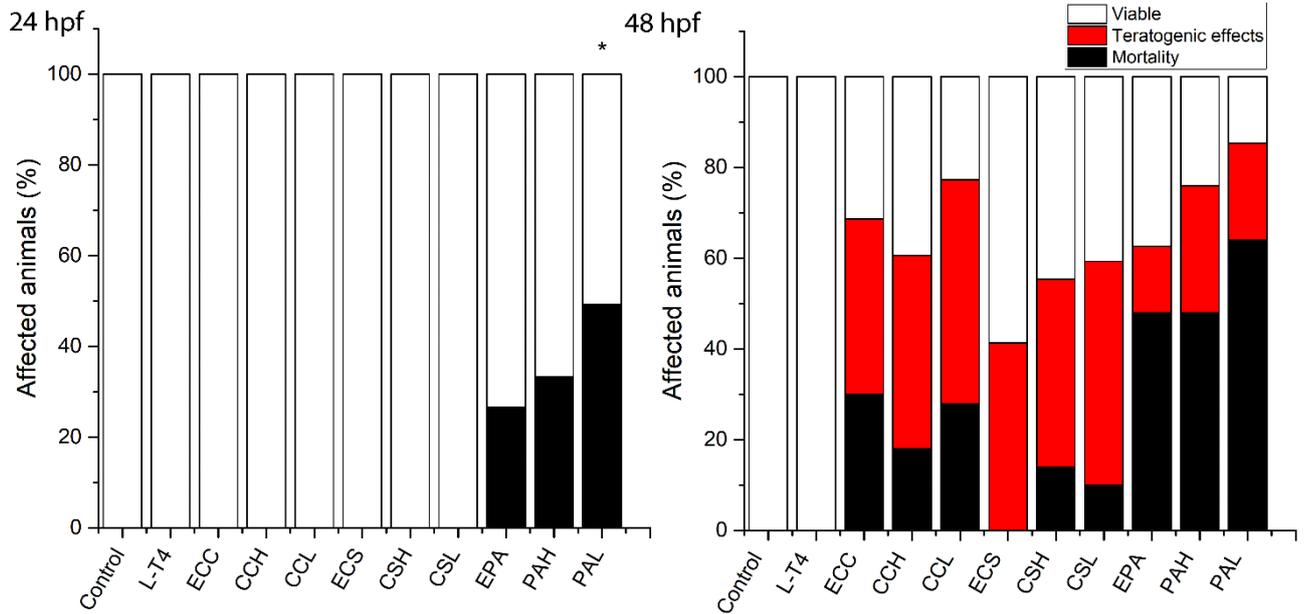
21. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(10):721-31.
22. Almeida C, Brasil MA, Costa AJL, Reis FAA, Reuters V, Teixeira P, et al. Subclinical hypothyroidism: psychiatric disorders and symptoms. *Brazilian Journal of Psychiatry.* 2007;29(2): 157 - 9.
23. Cadena PG, Cadena MRS, Sarmah S, Marrs JA. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *Reprod Toxicol.* 2020;96:249-57.
24. Basnet RM, Zizioli D, Taweedet S, Finazzi D, Memo M. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines.* 2019;7(1).
25. van Den Dool H, Dec. Kratz P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1963;11:463-71.
26. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 41 ed. Illinois: Allured Publishing Corporation: Carol Stream; 2017. 809 p.
27. Duarte JL, Amado JRR, Oliveira AEMFM, Cruz RAS, Ferreira AM, Souto RNP, et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2015;25(2):189-92.
28. Cadena PG, Pereira MA, Cordeiro RB, Cavalcanti IM, Barros Neto B, Pimentel Mdo C, et al. Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(2):309-16.
29. Araujo CA, da Camara CAG, de Moraes MM, de Vasconcelos GJN, Pereira MR, Zartman CE. Chemical composition of essential oils from four *Piper* species, differentiation using multivariate analysis and antioxidant activity. *Nat Prod Res.* 2022;36(1):436-9.
30. Westerfield M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. Eugene, OR: University of Oregon Press; 2000.
31. OECD. Education at a Glance 2013: OECD Indicators: OECD Publishing; 2013 [Available from: <http://dx.doi.org/10.1787/eag-2013-en>.
32. Silva MCG, Silva JFD, Santos TP, Silva NPC, Santos ARD, Andrade ALC, et al. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 2019;214:330-40.
33. Hansen KMS, Andersen HR. Energy Effectiveness of Direct UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Treatment of Estrogenic Chemicals in Biologically Treated Sewage. *International Journal of Photoenergy.* 2012;2012:1-9.
34. Pino JA, Marbot R, Bello A, Urquiola A. Essential Oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research.* 2004;16(2):124-6.
35. Maia JGS, Zohhbi MDGB, Andrade EHA, Santos AS, da Silva MHL, Luz AIR, et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal.* 1998;13(4):269-72.
36. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 2018;10(2).
37. Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int J Pharm.* 2008;363(1-2):183-91.
38. Grisham DR, Nanda V. Zeta Potential Prediction from Protein Structure in General Aqueous Electrolyte Solutions. *Langmuir.* 2020;36(46):13799-803.

39. Rodríguez EJ, Saucedo-Hernández Y, Heyden YV, Simó-Alfonso EF, Ramis-Ramos G, Lerma-García MJ, et al. Chemical Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of Three Piperaceae Species Growing in the Central Region of Cuba. *Natural Product Communications*. 2013;8(9):1934578X1300800935.
40. Yang R, Lao QC, Yu HP, Zhang Y, Liu HC, Luan L, et al. Tween-80 and impurity induce anaphylactoid reaction in zebrafish. *J Appl Toxicol*. 2015;35(3):295-301.
41. Ginzburg AL, Truong L, Tanguay RL, Hutchison JE. Synergistic Toxicity Produced by Mixtures of Biocompatible Gold Nanoparticles and Widely Used Surfactants. *ACS Nano*. 2018;12(6):5312-22.
42. Sun H, Yang R, Wang J, Yang X, Tu J, Xie L, et al. Component-based biocompatibility and safety evaluation of polysorbate 80. *RSC Advances*. 2017;7(25):15127-38.
43. Ali S, van Mil HG, Richardson MK. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PLoS One*. 2011;6(6):e21076.
44. Kim K-T, Tanguay RL. The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay. *Environ Health Toxicol*. 2014;29:e2014021-e.

### Captions for figures

**Figure 1.** Percentage of affected animals after 24, 48, 72, and 96 h (post-fertilization) in toxicity test. The reduction in the percentage of affected animals was considered significant when  $* = p < 0.05$ . Legend: L-T<sub>4</sub> - levothyroxine; ECC - Empty *C. carvi* nanoemulsion; CCH - *C. carvi* nanoemulsion (4444x dilution); CCL - *C. carvi* nanoemulsion (3200x dilution); ECS - Empty *C. sinensis* nanoemulsion; CSH - *C. sinensis* nanoemulsion (4444x dilution); CSL - *C. sinensis* nanoemulsion (3200x dilution); EPA - Empty *P. aduncum* nanoemulsion; PAH - *P. aduncum* nanoemulsion (4444x dilution); PAL - *P. aduncum* nanoemulsion (3200x dilution).

**Figure 2.** The thigmotaxis test (A) showed that the empty nanoemulsion, as well as the levothyroxine, did not affect the thigmotaxis response, but the empty *C. carvi* nanoemulsions affect the touch sensitivity response (B). The response for each group was compared to the control group by one-way ANOVA followed by Tukey's test (thigmotaxis ( $F(10, 732) = 1.15, p < 0.05$ ); touch sensitivity response ( $F(10, 732) = 2.81, p < 0.05$ ).  $* = p < 0.05$ . Legend: L-T<sub>4</sub> - levothyroxine; ECC - Empty *C. carvi* nanoemulsion; CCH - *C. carvi* nanoemulsion (4444x dilution); CCL - *C. carvi* nanoemulsion (3200x dilution); ECS - Empty *C. sinensis* nanoemulsion; CSH - *C. sinensis* nanoemulsion (4444x dilution); CSL - *C. sinensis* nanoemulsion (3200x dilution); EPA - Empty *P. aduncum* nanoemulsion; PAH - *P. aduncum* nanoemulsion (4444x dilution); PAL - *P. aduncum* nanoemulsion (3200x dilution).



## Tables

**Table 1.** Two-level  $3 \times 2^2$  full experimental designs of nanoemulsions of each essential oil associated with levothyroxine.

Run	Stirring speed (g)	Stirring time (h)	Essential oil (g)	Tween 80 (g)	Span 80 (g)	Phosphate-buffered + Levothyroxine (250 µg/L)
1	282 g	1 h	0.5 ( <i>Carum carvi</i> )	1	0	3.5
2	1129 g	1 h	0.5 ( <i>Carum carvi</i> )	1	0	3.5
3	282 g	2 h	0.5 ( <i>Carum carvi</i> )	1	0	3.5
4	1129 g	2 h	0.5 ( <i>Carum carvi</i> )	1	0	3.5
5 (CP)	635 g	1 h 30 min	0.5 ( <i>Carum carvi</i> )	1	0	3.5
6	282 g	1 h	1.0 ( <i>Citrus sinensis</i> )	1	0	3.0
7	1129 g	1 h	1.0 ( <i>Citrus sinensis</i> )	1	0	3.0
8	282 g	2 h	1.0 ( <i>Citrus sinensis</i> )	1	0	3.0
9	1129 g	2 h	1.0 ( <i>Citrus sinensis</i> )	1	0	3.0
10 (CP)	635 g	1 h 30 min	1.0 ( <i>Citrus sinensis</i> )	1	0	3.0
11	282 g	1 h	0.5 ( <i>Piper aduncum</i> )	0.5	0.5	3.5
12	1129 g	1 h	0.5 ( <i>Piper aduncum</i> )	0.5	0.5	3.5
13	282 g	2 h	0.5 ( <i>Piper aduncum</i> )	0.5	0.5	3.5
14	1129 g	2 h	0.5 ( <i>Piper aduncum</i> )	0.5	0.5	3.5
15 (CP)	635 g	1 h 30 min	0.5 ( <i>Piper aduncum</i> )	0.5	0.5	3.5

Legend: Runs 1 to 5 are *Carum carvi* samples with a central point (CP – run 5); 6 to 10 are *Citrus sinensis* samples with a central point (CP – run 10); 11 to 15 are *Piper aduncum* samples with a central point (CP – run 15).

**Table 2.** The dilution ratio of the chemical compounds used in the experimental groups for the acute toxicity test. Legend: 4444x represent the high (H) dilution and 3200x represents the low (L) dilution.

Experimental groups	Abbreviations	Dilution ratio
Control	C	-
Levothyroxine	L-T <sub>4</sub>	320x
Empty (E) <i>Carum carvi</i> (CC) nanoemulsion (0.5 g oil, 1.0 g tween, 3.5 g of phosphate buffer) diluted	ECC	3200x
<i>Carum carvi</i> (CC) nanoemulsion (0.5 g oil, 1.0 g tween, 3.5 g of phosphate buffer with levothyroxine) diluted	CCH	4444x
<i>Carum carvi</i> (CC) nanoemulsion (0.5 g oil, 1.0 g tween, 3.5 g phosphate buffer with levothyroxine) diluted	CCL	3200x
Empty (E) <i>Citrus sinensis</i> (CS) nanoemulsion (1.0 g oil, 1.0 g tween, 3.0 g phosphate buffer) diluted	ECS	3200x
<i>Citrus sinensis</i> (CS) nanoemulsion (1.0 g oil, 1.0 g tween, 3.0 g phosphate buffer with levothyroxine) diluted	CSH	4444x
<i>Citrus sinensis</i> (CS) nanoemulsion (1.0 g oil, 1.0 g tween, 3.0 g phosphate buffer with levothyroxine) diluted	CSL	3200x
Empty <i>Piper aduncum</i> (PA) nanoemulsion (0.5 g oil, 0.5 g tween, 0.5 g spam, 3.5 g of phosphate buffer) diluted	EPA	3200x
<i>Piper aduncum</i> (PA) nanoemulsion (0.5 g oil, 0.5 g tween, 0.5 g spam, 3.5 g of phosphate buffer with levothyroxine) diluted	PAH	4444x
<i>Piper aduncum</i> (PA) nanoemulsion (0.5 g oil, 0.5 g tween, 0.5 g spam, 3.5 g of phosphate buffer with levothyroxine) diluted	PAL	3200x

**Table 3.** Chemical composition of essential oils of *Piper aduncum*, *Carum carvi*, and *Citrus sinensis*.

Compounds	RI <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	<i>P. aduncum</i>	<i>C. carvi</i>	<i>C. sinensis</i>	Method of identification
$\alpha$ -Thujene	921	924	-	-	0.16±0.00	RI, MS
$\alpha$ -Pinene	928	932	-	0.33±0.02	1.25±0.07	RI, MS, CI
Sabinene	966	969	-	-	0.95±0.03	RI, MS
$\beta$ -Pinene	971	974	0.11±0.00	0.13±0.01	1.87±0.10	RI, MS, CI
iso-Sylvestrene	1005	1007	0.45±0.02	-	-	RI, MS
<i>p</i> -Cymene	1018	1020	-	2.14±0.08	-	RI, MS, CI
Limonene	1023	1024	-	34.14±0.64	90.13±1.11	RI, MS, CI
$\beta$ -Phellandrene	1025	1025	-	-	0.11±0.00	RI, MS, CI
( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimene	1031	1032	-	-	0.28±0.01	RI, MS
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	1040	1044	1.01±0.05	-	-	RI, MS
$\gamma$ -Terpinene	1055	1054	-	-	0.35±0.02	RI, MS
Terpinolene	1088	1086	0.13±0.00	-	0.38±0.01	RI, MS
Linalool	1094	1095	-	-	0.22±0.01	RI, MS, CI
<i>cis</i> - $\beta$ -Terpineol	1143	1140	-	-	0.36±0.01	RI, MS
Citronellal	1145	1148	-	-	0.11±0.00	RI, MS
Terpinen-4-ol	1174	1174	0.50±0.01	-	-	RI, MS, CI
( <i>E</i> )-Isocitral	1175	1177	-	-	0.22±0.03	RI, MS
Dill ether	1180	1184	-	1.19±0.10	-	RI, MS
$\alpha$ -Terpineol	1189	1186	1.83±0.03	-	-	RI, MS, CI
$\delta$ -Elemene	1340	1335	0.75±0.04	-	-	RI, MS
Carvone	1235	1239	-	60.44±0.80	-	RI, MS
$\beta$ -Caryophyllene	1415	1417	3.20±0.09	-	0.08±0.00	RI, MS, CI
$\alpha$ - <i>trans</i> -Bergamotene	1431	1432	-	-	0.11±0.01	RI, MS
$\alpha$ -Humulene	1456	1452	8.32±0.34	-	-	RI, MS, CI
$\gamma$ -Gurjunene	1474	1475	-	-	0.9±0.00	RI, MS
$\gamma$ -Muurolene	1477	1478	0.55±0.02	-	-	RI, MS
$\gamma$ -Himachalene	1488	1481	1.93±0.06	-	-	RI, MS
Germacrene B	1555	1559	1.34±0.09	-	-	RI, MS
Dillapiole	1620	1620	78.41±0.98	-	-	RI, MS, CI
Total			98.53±1.01	98.37±0.82	97.47±1.22	
Monoterpenes			4.03±0.05	98.37±0.82	96.39±1.12	
Sesquiterpenes			16.09±0.10	-	1.09±0.01	
Phenylpropanoids			78.41±0.98	-	-	

Legend: RI<sup>a</sup> = Retention indices calculated from retention times in relation to those of a series C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> of n-alkanes on a 30m DB-5 capillary column. RI<sup>b</sup> = Retention indices from the literature. SD = Standard deviation. RI = retention indices, MS = mass spectroscopy and CI = Co-injection with authentic compounds.

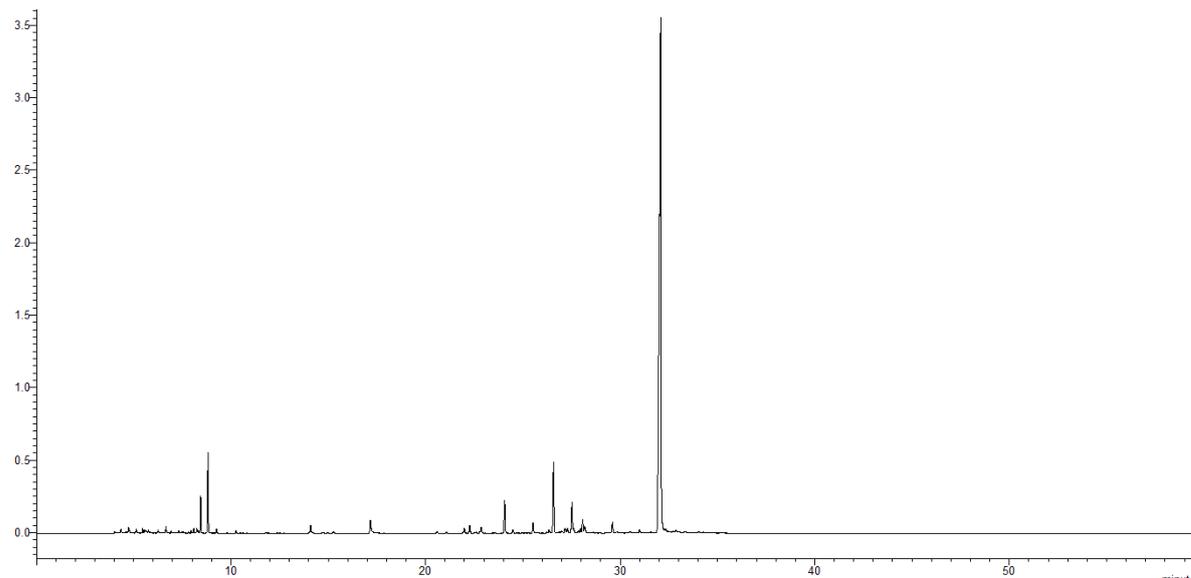
**Table 4.** Effect of variables stirring speed (g) and stirring time (h) in the physicochemical parameters of nanoemulsions of each essential oil associated with levothyroxine. Bold values indicate significant results by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

A) Size, polydispersity index (PDI), and zeta potential data for each nanoemulsion					
<i>Emulsion formulations (g/h)</i>	<i>Mean size (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i><math>\zeta</math> (mV)</i>		
<i>Carum carvi</i> 282 g / 1 h	384.7 ± 4.9	0.333	-12.5 ± 0.6		
<i>Carum carvi</i> 1129 g / 1 h	277.1 ± 2.5	0.304	-22.7 ± 0.4		
<i>Carum carvi</i> 282 g / 2 h	408.6 ± 7.8	0.409	-15.1 ± 0.4		
<i>Carum carvi</i> 1129 g / 2 h	259.0 ± 12.0	0.323	-14.6 ± 0.4		
<i>Carum carvi</i> 635 g / 1 h 30 min	218.5 ± 4.4	0.315	-12.8 ± 0.5		
<i>Carum carvi</i> 635 g / 1 h 30 min	223.1 ± 3.3	0.317	-13.3 ± 0.9		
<i>Carum carvi</i> 635 g / 1 h 30 min	225.8 ± 6.3	0.257	-14.6 ± 0.6		
<i>Citrus sinensis</i> 282 g / 1 h	287.3 ± 20.5	0.226	-21.3 ± 2.6		
<i>Citrus sinensis</i> 1129 g / 1 h	401.9 ± 45.5	0.113	-18.5 ± 0.3		
<i>Citrus sinensis</i> 282 g / 2 h	325.3 ± 3.7	0.424	-16.9 ± 0.7		
<i>Citrus sinensis</i> 1129 g / 2 h	391.8 ± 35.7	0.223	-20.9 ± 1.6		
<i>Citrus sinensis</i> 635 g / 1 h 30 min	200.2 ± 7.4	0.339	-12.9 ± 0.3		
<i>Citrus sinensis</i> 635 g / 1 h 30 min	235.2 ± 6.0	0.460	-16.0 ± 0.3		
<i>Citrus sinensis</i> 635 g / 1 h 30 min	224.9 ± 10.2	0.235	-18.5 ± 2.0		
<i>Piper aduncum</i> 282 g / 1 h	489.1 ± 78.1	0.234	-32.2 ± 0.3		
<i>Piper aduncum</i> 1129 g / 1 h	445.9 ± 298.0	0.299	-36.8 ± 0.3		
<i>Piper aduncum</i> 282 g / 2 h	326.9 ± 15.7	0.406	-30.6 ± 1.3		
<i>Piper aduncum</i> 1129 g / 2 h	401.7 ± 21.1	0.478	-39.1 ± 0.4		
<i>Piper aduncum</i> 635 g / 1 h 30 min	631.3 ± 118.2	0.302	-36.1 ± 1.3		
<i>Piper aduncum</i> 635 g / 1 h 30 min	426.4 ± 42.7	0.343	-31.3 ± 1.6		
<i>Piper aduncum</i> 635 g / 1 h 30 min	489.2 ± 57.4	0.265	-35.7 ± 0.6		
B. ANOVA of 3 x 2 <sup>2</sup> full experimental design					
<i>Carum carvi</i>					
<i>Size</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	16537.96	1	16537.96	2.393784	0.219558
Stirring time	8.41	1	8.41	0.001217	0.974359
<i>PDI</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	0.003306	1	0.003306	1.011704	0.420410
Stirring time	0.002256	1	0.002256	0.690407	0.493425
<i>Zeta</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	<b>77.4400</b>	<b>1</b>	<b>77.44000</b>	<b>89.6988</b>	<b>0.010965</b>
Stirring time	1.4400	1	1.44000	1.6680	0.325658
<i>Citrus sinensis</i>					
<i>Size</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	<b>8226.49</b>	<b>1</b>	<b>8226.49</b>	<b>25.42729</b>	<b>0.037150</b>
Stirring time	198.81	1	198.81	0.61450	0.515195
<i>PDI</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	0.024649	1	0.24649	1.943876	0.297943
Stirring time	0.023716	1	0.023716	1.870298	0.304843
<i>Zeta</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	0.36000	1	0.36000	0.045743	0.850467
Stirring time	1.00000	1	1.00000	0.127065	0.755588
<i>Piper aduncum</i>					
<i>Size</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	249.64	<b>1</b>	249.64	0.022653	0.894171
Stirring time	10650.24	1	10650.24	0.966443	0.429218
<i>PDI</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	0.004692	1	0.004692	3.08228	0.221235
Stirring time	<b>0.030800</b>	<b>1</b>	<b>0.030800</b>	<b>20.23226</b>	<b>0.046039</b>
<i>Zeta</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Stirring speed	42.90250	1	42.90250	6.048285	0.133109
Stirring time	0.12250	1	0.12250	0.017270	0.907475

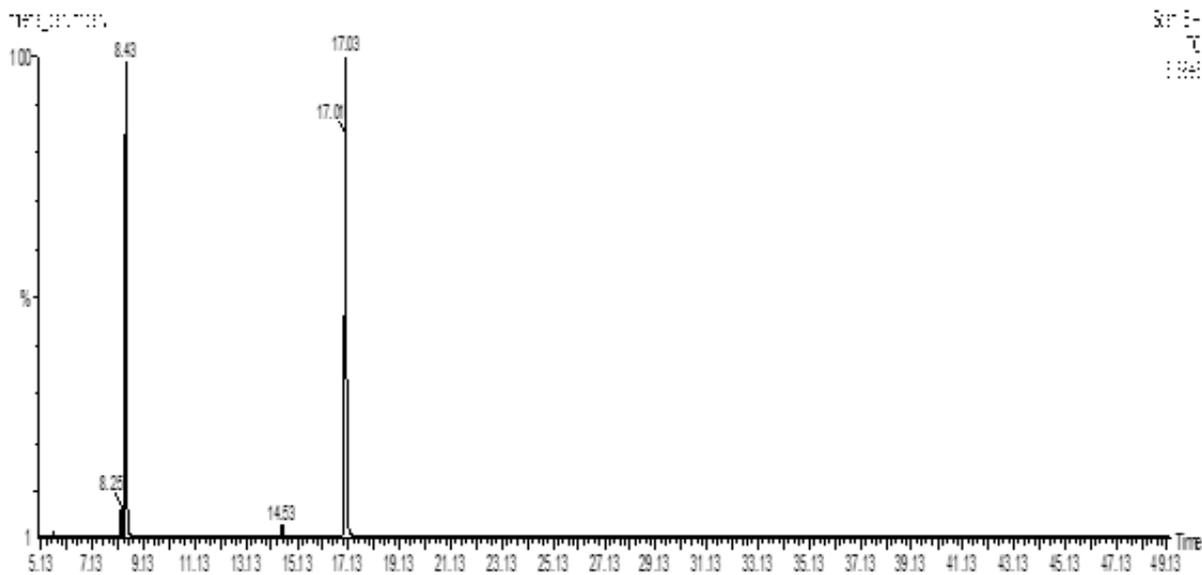
**Table 5.** Antioxidant activity of the essential oil of species of *Carum carvi*, *Citrus sinensis*, and *Piper aduncum*. Legend: Ascorbic acid and TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were used as reference antioxidants.

<i>Chemicals</i>	<i>DPPH</i>	<i>ABTS</i>
	<i>EC<sub>50</sub> μg/mL (Confidence interval)</i>	<i>EC<sub>50</sub> μg/mL (Confidence interval)</i>
<i>C. carvi</i>	204.3 (199.4-208.2)	194.9 (190.4-199.4)
<i>C. sinensis</i>	288.5 (280.8-295.1)	191.5 (186.7-196.3)
<i>P. aduncum</i>	266.5 (261.4-272.0)	156.6 (151.4-161.8)
Ascorbic acid	1.6 (1.4-1.8)	-
TROLOX	-	4.1 (3.7-5.8)

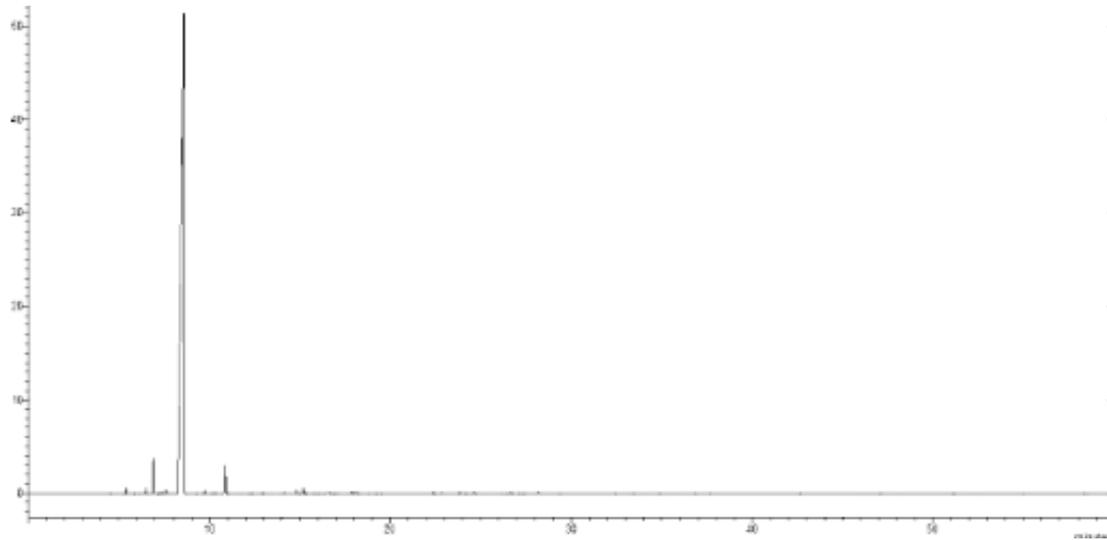
## Supplementary material



**Figure 1.** Chromatogram of the essential oil of *Piper aduncum*.



**Figure 2.** Chromatogram of the essential oil of *Carum carvi*.



**Figure 3.** Chromatogram of the essential oil of *Citrus sinensis*.

## 5 CONCLUSÕES

- O desenho industrial pode ser utilizado na determinação da capacidade natatória sob diferentes parâmetros físico-químicos, presença de fármacos ou outros produtos químicos com aplicação no desenvolvimento de medicamentos ou testes toxicológicos;
- As concentrações ambientais dos compostos analisados mostraram baixo risco para os parâmetros avaliados no estudo, mas quando analisada a junção de desses compostos foram detectados efeitos morfológicos antagônicos;
- As nanoemulsões compreendem a formulação de vesículas com tamanhos inferiores a 500 nm, e o produto final a partir destas nanoemulsões podem ser utilizados na terapêutica humana e animal;
- Todas as nanoemulsões mostraram-se ativas nos testes antioxidantes, mas efeitos teratogênicos foram observados em *D. rerio*, sugerindo que os surfactantes podem estar relacionados à toxicidade provocada uma vez que todas as formulações apresentaram os mesmos efeitos teratogênicos.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, S. et al. Determinants and outcome of amiodarone-associated thyroid dysfunction. **Clinical Endocrinology**, v. 75, n. 3, p. 388–394, 2011.
- AIRES, M. M. Fisiologia. **Guanabara Koogan**, p. 1055-1078, 2012.
- AJAY, K. N. The effect of L–thyroxine on metabolic parameters in newly diagnosed primary hypothyroidism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 3, p. 2 – 4, 2013.
- ALCÂNTARA, J. M.; et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 567 – 572, 2010.
- ALI, O.; ÇELIK, T. A. Cytotoxic effects of peel extracts from *Citrus limon* and *Citrus sinensis*. **Caryologia**, v. 60, n. 1-2, p. 48-51, 2007.
- ANVISA. **Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico**, 2016. Brasília, 2017.
- ARBOGAST, P. et al. Thyroid hormone signaling in the mouse retina. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1 – 20, 2016.
- ÁVILA, A., PASTRANA, H. F., 2007. Nanomedicina: estado del arte. **Revista de ingeniería Universidad de Los Andes**. v. 25, p. 60 – 69, 2007.
- AZMI, N. A. N., et al. Nanoemulsions: factory for food, pharmaceutical and cosmetics. **Processes**. v. 7, n. 9, p.617, 2019.
- ABDALLA, M. S.; BIANCO, C. A. Defending plasma T<sub>3</sub> is a biological priority. **Clin Endocrinol (Oxf)**. v. 81, n. 5, p. 633–641, 2014.
- BULA AMIORON**. Geolab Indústria Farmacêutica S/A. 2015.
- BULA PURAN T4**. Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. 2016.
- BALOGH, Z. W. et al. Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. **Thyroid**, v. 13, n. 1, p. 3 – 3, 2003.
- BAI, L.; HUAN, S.; GU, J.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, V. 61, p. 703 – 711, 2016.
- BARTALENA, L. et al. 2018. European Thyroid Association (ETA) guidelines for the management of amiodarone-associated thyroid dysfunction. **European Thyroid Journal**, v. 7, n. 2, p. 55 – 66, 2018.

- BATISTA, A. J. S.; PEPE, V. L. E. Os desafios da nanotecnologia para a vigilância sanitária de medicamentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 7, p. 2105 – 2114, 2014.
- BILIA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1 – 14, 2014.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. *Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA*, v. 3, n. 2, p. 1 – 12, 2016.
- BOGAZZI, F. et al. Approach to the patient with amiodarone-induced thyrotoxicosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 6, p. 2529 – 2535, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica** N° 332, 2013.
- BRENT, G. A.; KOENIG, R. J. **Tireoide e fármacos antitireoidianos**. In: Goodman e Gilman (eds) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. AMGH, Porto Alegre, p. 1129 – 1161, 2012.
- BRENTA, G. et al. Diretrizes clínicas práticas para o manejo do hipotireoidismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 4, p. 265 – 99, 2013.
- BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**. v. 35, n. 9, pp. 1827 – 1840, 2012.
- BUSATO, N. V. et al. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574 – 1582, 2014.
- CAMARGO, R. Y. A. et al. Thyroid and the environment: Exposure to excessive nutritional iodine increases the prevalence of thyroid disorders in São Paulo, Brazil. **European Journal of Endocrinology**, v. 159, n. 3, p. 293 – 299, 2008.
- CARLINI, E. A. et al. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (Aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 140 – 146, 2010.
- CERUKS, M. et al. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 597 – 599, 2007.
- CHAKER, L. et al. Hypothyroidism. **The lancet**, v. 390, p. 1550 – 1556, 2017.
- CHAKRABARTI, S. K. et al. Oxidative stress in hypothyroid patients and the role of antioxidant supplementation. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, p. 674 – 678, 2016.

- COLUCCI, P. et al. A Review of the Pharmacokinetics of Levothyroxine for the Treatment of Hypothyroidism. **European endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 40 – 47, 2013.
- CORRAL, A. C. T. et al. Control of *Hysterothylacium sp.* (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. **Aquaculture**, v. 494, p. 37 – 44, 2018.
- CORREIO POPULAR. **Dia nacional dos medicamentos genéricos**, 2015. Disponível em: [http://correio.rac.com.br/especiais\\_correio/genericos.pdf](http://correio.rac.com.br/especiais_correio/genericos.pdf). Acesso: 17 de junho de 2015.
- DAL PICOLO, C. R. et al. Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. **Fitoterapia**, v. 97, p. 28 – 33, 2014.
- DAMMSKI, A. P., et al. ZEBRAFISH – Manual de Criação em Biotério, Curitiba – UFPR, 2011.
- DOLOMATOV, S. et al. Role of Thyroid Hormones in Fishes. **Journal of Health Sciences**, v. 3, n.9, p. 279 – 296, 2013.
- ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21 – 40, 2007.
- ESCOBAR-MORREALE, H. F. et al. Review: Treatment of hypothyroidism with combinations of levothyroxine plus liothyronine. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 8, p. 4946 – 4954, 2005.
- FABER, J. et al. Urinary excretion of free and conjugated 3, 5'-diiodothyronine and 3, 3'-diiodothyronine. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 53, n. 3, p. 587 – 593, 1981.
- FAVELA-HERNÁNDEZ J. M. et al. Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 1 – 24, 2016.
- FELD, A.; BUSALA, A. E. Investigar y curar: conocimientos y profilaxis del bocio endémico en Argentina (1916 - 1958). **Asclepio**, v. 62, n. 2, p. 375 – 404, 2010.
- FENT K. et al. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122 – 159, 2006.
- FERREIRA, A. A., et al. Patente como instrumento competitivo e como fonte de informação tecnológica. **Gestão & Produção**. v. 16, n. 2, p. 209 – 221, 2009.
- FERRITER, A. Brazilian Peppertree Management Plan for Florida. Florida Exotic Pest Plant Council, Brazilian Peppertree Task Force. 1997.
- GARCÍA-MÁRQUEZ, E.; HIGUERA-CIAPARA, I.; ESPINOSA-ANDREWS H. Design of fish oil-in-water nanoemulsion by microfluidization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, V.40, p. 87 – 91, 2017.

- GERONIMO, A. D. E. A.; SCHMIDT, R. B.; SALVI, J. D. E. O. Aspectos Farmacológicos da Levotiroxina Sódica: Uma Breve Revisão. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 23, p. 128 – 134, 2018.
- GRUMEZESCU, A. M. 2013. Essential Oils and Nanotechnology for Combating Microbial Biofilms. *Current Organic Chemistry*, 17, 90 – 96.
- Guimarães, L. G. L.; Cardoso, M. G.; Sousa, P. E.; Andrade, J.; Vieira, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do cítra. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 2, p. 464 – 472, 2011.
- HALL, John Edward; GUYTON, Arthur C. **Tratado de fisiologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 931 – 943, 2003.
- HILL, A. J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6 – 19, 2005.
- Jaiswal, Manjit; Dudhe, Rupesh; Sharma, P. K. (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, 5(2), 123–127. doi:10.1007/s13205-014-0214-0
- JIANG, L. Q. et al. Dronedarone and Amiodarone Induce Dyslipidemia and Thyroid Dysfunction in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 2311 – 2322, 2016.
- KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70 – 86, 2013.
- KHAN, R. M. et al. Phytochemical and pharmacological properties of *Carum carvi*. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, n. 6, p. 231 – 236, 2016.
- LAGHA-BENAMROUCHE, S.; MADANI, K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis L.* and *Citrus aurantium L.*) cultivated in Algeria: Peels and leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 723 – 730. 2013.
- LARSEN, P. R.; DAVIES, T. F.; SCHLUMBERGER, M. J.; HAY, I. D. **Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders**. In: LARSEN, P. R. Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed., Copyright, Elsevier, p. 331] – 372, 2003.
- LEO, S. de.; LEE, S. Y., BAVERMAN, L. E. Hyperthyroidism. **The lancet**, v. 388, p. 906 – 918, 2016.
- LESO, V. et al. Biomedical nanotechnology: Occupational views. **Nano Today**, v. 24, p. 10 – 14, 2019.
- LIMA, R. S. C. Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: quitosana/insulina. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) –

- Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2010.
- LIU, Y. et al. Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 124 – 132, 2016.
- LLOYD H. A. et al. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1301 – 1302, 1997.
- LOH, K. C. Amiodarone-induced thyroid disorders: A clinical review. **Postgraduate Medical Journal**, v. 76, n. 893, p. 133 – 140, 2000.
- LOPES, C. M., LOBO, J. M. S. E COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, pp. 143 – 154, 2005.
- MADER, M. M.; CAMERON, D. A. Effects of induced systemic hypothyroidism upon the retina: regulation of thyroid hormone receptor alpha and photoreceptor production. **Molecular vision**, v. 12, p. 915 – 30, 2006.
- MAIA, A. L. et al. Consenso brasileiro para o diagnóstico e tratamento do hipertireoidismo: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, n.3, p. 205 – 232, 2013.
- MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 269 – 272, 1998.
- MAMOOD, S. N. et al. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. **Bulletin of the Entomological Research**, v. 107, p. 49 – 57, 2017.
- MANCINI, A. et al. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, p. 1 – 12, 2016.
- MANDEL, S. J.; G.A., B.; P.R., L. Levothyroxine therapy in patients with thyroid disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, n. 6, p. 492 – 502, 1993.
- MARELLI, F.; PERSANI, L. How zebrafish research has helped in understanding thyroid diseases. **F1000 Research**, v. 6, n. 0, p. 2137, 2017.
- MARTINO, E. et al. The Effects of Amiodarone on the Thyroid 1. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240 – 254, 2001.
- MEDEIROS, K. C. P. et al. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 23 – 28, 2007.

- Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MRHA). **Levothyroxine: a review of clinical and quality considerations**. Disponível em: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/420997/CHM\\_Review\\_for\\_MHRA\\_website\\_Levothyroxine\\_sodium\\_FINAL\\_04\\_Jan\\_2013.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/420997/CHM_Review_for_MHRA_website_Levothyroxine_sodium_FINAL_04_Jan_2013.pdf). Acesso: 29 de dezembro de 2016.
- MGBEAHURUIKE, E. E. et al. Bioactive compounds from medicinal plants: focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54 – 69, 2017.
- MILIND, P.; DEV, C. Orange: Range of benefits. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 7, p. 59 – 63, 2012.
- MILHORANSA, P.; SOARES, R. Hormônio de estimulação da tireóide (TSH) e correlações laboratoriais. **Revista Brasileira Análise de Clínicas**, vol. 41, n.2, p. 161 – 164, 2009.
- MIRAJ, S.; KIANI, S. Pharmacological activities of *Carum carvi* L. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 6, p. 135 – 138, 2016.
- NANOSTAT. Nanostat: Nanotechnology Products Database. Página inicial. Disponível em: <<https://product.statnano.com>>. Acesso em: 31 de jan. de 2022.
- NAGEL, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. **Altex**, v. 19, n. 1, p. 38 – 48, 2002.
- NISHIMURA, Y. et al. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. **Congenital anomalies**, v. 5, p. 18 – 27, 2016.
- NUGEGODA, D.; KIBRIA, G. Effects of environmental chemicals on fish thyroid function: Implications for fisheries and aquaculture in Australia. **General and Comparative Endocrinology**, v. 244, p. 40 – 53, 2017.
- NUNES, M. T. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia**, v. 47, n. 6, 2003.
- OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.
- ODUM, J. **Disrupters of thyroid hormone action and synthesis**. In: Darbre PD (ed) *Endocrine disruption and human health*. Elsevier, UK, p. 91 – 109, 2015.
- OVERTURF, M. D. et al. Early Life-Stage Toxicity of Eight Pharmaceuticals to the Fathead Minnow, *Pimephales promelas*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 455 – 464, 2012.
- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597 – 673, 1997.

PEDRO, A. S. et al. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. *Formatex*, p. 1364 – 1374, 2013.

POHLIT, A. M. et al. Piper aduncum L.: Pluripotente Plant and Important Phytochemical Substance Source. **Revista Fitos**, v. 2, n. 1, p. 7 – 18, 2006..

PUNNAM, S. R. et al. Amiodarone-A “Broad Spectrum” Antiarrhythmic Drug. **Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets**, v. 10, n. 517, p. 73 – 81, 2010.

RAVEN, P. H.; JOHNSON, G. B. *Biology*. McGraw-Hill, 6 ed, p. 1125 – 1146, 2002.

ROJAS-AGUIRRE, Y. et al. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? **Educación Química**, v. 27, n. 4, p. 286 – 291, 2016.

CAMPOS, M. V. Efeitos da amiodarona na tiroide: Aspectos actuais. *Acta Médica Portuguesa*, v. 17, p. 241 – 246, 2004.

RESEARCH AND MARKET. Global nanotechnology market outlook 2024. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4536705/global-nanotechnology-market-outlook-2018-2024>. Acessado em: 15 de outubro de 2021.

RIVKEES, S. A. Hyperthyroidism, Childhood and Adolescence. **Encyclopedia of Endocrine Diseases**, 2nd Edition, 2. ed., Elsevier, p. 3 – 2053, 2018.

RODRÍGUEZ, E. L. et al. Chemical Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of Three Piperaceae Species Growing in the Central Region of Cuba. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 9, p. 1325 – 1328, 2013.

ROMAGNOLO, D.; SELMIN, O. Flavonoids and Cancer Prevention: A Review of the Evidence. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, v. 31, n. 3, p. 206 – 238, 2012.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490 – 498, 2015.

ROSS, D. S. et al. Review of American Thyroid Association guidelines for diagnosis and management of hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis. **Clinical and experimental thyroidology**, v. 13, n. 3, p. 45 – 56, 2016.

RUBIM, A. M. et al. Amiodarone hydrochloride: Enhancement of solubility and dissolution rate by solid dispersion technique. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 957 – 966, 2015.

SACHAN, A. K. et al. Carum carvi-An important medicinal plant. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 529 – 533, 2016.

SANTOS, T. P. et al. Thyroxine, levothyroxine, and thyroxine complexed into cyclodextrin changed animal behavior, oxygen consumption, and photopic electroretinogram of *Collossoma macropomum*. **Fish Physiology and Biochemistry**. V. 45, n. 3, p. 1177 – 1187, 2019.

SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementation of a New Experimental Animal Model - Zebrafish. **Revista HCPA**, v. 29, n. 2, p. 100 – 103, 2009.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal**: adaptação e meio ambiente. 5 ed. Santos Livraria Editora, São Paulo, p. 497 – 531, 2010.

SELDERSLAGHS, I. W. T. et al. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 142 – 154, 2012.

SINGH, B. N. Amiodarone: A multifaceted antiarrhythmic drug. **Current Cardiology Reports**, v. 8, n. 5, p. 349 – 355, 2006.

SINGH, Y. et al. 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 252, 28 – 49.

SINGH, P. et al. 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 1734 – 1740.

SOUZA, E. Q. et al. Exposição crônica ao cloridrato de metformina e à glibenclamida causa alterações comportamentais, glicêmicas e de mortalidade em *Hemigrammus caudovittatus* e *Danio rerio*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.5, p.1582 – 1590, 2019.

SOUZA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 217 – 221, 2008.

SPIRITA, S.V., AHILA, A.J. Stages of embryonic development of the zebrafish *Danio rerio*. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 3, p. 6 – 11, 2015.

SU, V. Y. F. et al. Amiodarone and the risk of cancer. **Cancer**, v. 119, n. 9, p. 1699 – 1705, 2013.

SVANFELT J. et al. Analysis of thyroid hormones in raw and 593 treated waste water. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6469 – 6474, 2010.

TALWAR, G. P.; SRIVASTAVA, L.M. **Textbook of Biochemistry and Human Biology**, 3ed, New Delhi, p. 847, 2006.

TAUROG, A. et al. Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 330, n. 1, p. 24 – 32, 1996.

TAVARES, M. B. et al. Distúrbios da função tireoidiana induzidos pela amiodarona. **Salus Journal of Health Sciences**, v. 2, n. 2, p. 39 – 47, 2016.

TONYUSHKINA, K. N. et al. Embryonic exposure to excess thyroid hormone causes thyrotrope cell death. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 1, p. 321 – 327, 2014.

TRIFAN, A. et al. Antioxidant activity of essential oil from *Carum carvi* l. Cultivated in North-Eastern Romania. **Revista medico-chirurgicala a Societati de Medici si Naturalist**, v. 120, n. 3, p. 732 – 736, 2016.

TRIP, M. D. et al. Incidence, predictability, and pathogenesis of amiodarone-induced thyrotoxicosis and hypothyroidism. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 5, p. 507 – 511, 1991.

ULLOA, P. E. et al. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 649 – 666, 2011.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). **Levotiroxina - FDA prescrevendo informações, efeitos colaterais e usos**. Disponível em: <https://www.drugs.com/pro/levothyroxine.html>. Acesso: 29 de dezembro de 2016.

VASCONCELOS, J. T. M. et al. Interação entre drogas antiarrítmicas e limiares de desfibrilação em pacientes portadores de cardioversor desfibrilador implantável. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. 3, p. 336 – 339, 2003.

VASSALLO, P.; TROHMAN, R. G. Prescribing Amiodarone an evidence-based review of clinical indications. **Jama**, v. 298, n. 11, p. 1312 – 1322, 2007.

VELÁZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, n. 2, p. 91 – 97, 2003

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**. v. 31, n. 2, pp. 360 – 368, 2008.

VINAGRE, A. L. M.; SOUZA, M. V. L. Interferências na absorção de levotiroxina e dificuldades no manuseio de pacientes com hipotireoidismo na unidade de terapia intensiva: relato de dois casos e revisão de literatura. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 242 – 248, 2011.

ZORZETTO, R.; GUIMARAES, M. Um peixe modelo, **Pesquisa Fapesp**, Ed. 209, p. 16 – 21, 2013.

WANG, Y. et al. Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*). **Chemosphere**, v. 170, p. 61 – 67, 2017.

WILLIAMS, D. A. et al. Colonization Patterns of the invasive brazilian peppertree, *Schinus terebinthifolius*, in Florida. **Heredity**, v. 98, p. 284 – 293, 2007.

YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 245 – 253, 2009.

YU, L. et al. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. **Aquatic Toxicology**, v. 138 – 139, p. 35 – 42, 2013.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**  
DIRETORIA DE MARCAS, DESENHOS INDUSTRIAIS E INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS

**CERTIFICADO DE REGISTRO DE DESENHO INDUSTRIAL**  
**BR 302017005894-9**

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede, automaticamente, sem exame de mérito, o presente CERTIFICADO DE REGISTRO, que outorga ao seu titular propriedade do desenho industrial discriminado neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dele decorrentes, previstos na legislação em vigor.

A proteção conferida pelo registro de desenho industrial, em conformidade com o que estabelece o art. 95 da Lei 9.279/96, é definida exclusivamente a partir da configuração da forma plástica ornamental do objeto ou do conjunto ornamental de linhas e cores requeridos, não abarcando os dados contidos nos eventuais relatórios descritivos e reivindicações juntados ao presente certificado de registro.

**(21) Número do Depósito:** BR 302017005894-9

**(22) Data do Depósito:** 23/12/2017

**(45) Data de Concessão:** 12/06/2018

**(52) Classificação Internacional de Desenhos Industriais:** 30-02

**(30) Prioridade Unionista:**

**(54) Título:** CONFIGURAÇÃO APLICADA A/EM DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM PEIXES

**(73) Titular:** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24416174000106. Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N, RECIFE, PE, BRASIL (BR), 52171-900, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24134488000108. Endereço: AVENIDA PROFESSOR MORAES REGO, 1235, CIDADE UNIVERSITÁRIA, RECIFE, PE, BRASIL(BR), 50670-901, Brasileira

**(72) Autor:** THAMIRIS PINHEIRO SANTOS; JADSON FREITAS DA SILVA; MARILIA CORDEIRO GALVAO DA SILVA; STEPHANNIE CAROLINE BARROS LUCAS DA SILVA; PABYTON GONCALVES CADENA

**Prazo de Validade:** 10(dez) anos contados a partir de 23/12/2017, mediante o recolhimento da taxa quinquenal de manutenção (Artigos 119 e 120 da LPI) e observadas as demais condições legais.

**Registro Concedido em:** 12/06/2018

**Expedido em:** 14 de Junho de 2018

Assinado digitalmente por:  
**André Luis Balloussier Ancora da Luz**  
Diretor

**“CONFIGURAÇÃO APLICADA EM DISPOSITIVO PORTÁTIL PARA DETERMINAÇÃO  
DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM PEIXES”**

[001] O presente relatório descritivo de Pedido de Registro de Desenho Industrial, diz respeito à Configuração Aplicada em Dispositivo Portátil Para Determinação da Capacidade Natatória em Peixes constituída por um tubo alongado transparente com extremidades de entrada e saída de água, tela de proteção, bomba, tubulações, registro, reservatório de água com tampa rosqueável, sensor de medição de fluxo de água com display, base de sustentação, haste de sustentação e alça de sustentação, sendo que a combinação destes materiais e formas de utilização permite-lhe que seja portátil.

[002] O campo de aplicação desta Configuração Aplicada em Dispositivo Portátil Para Determinação da Capacidade Natatória em Peixes compreende o uso em laboratórios de pesquisa e ensino e no campo (*in situ*).

[003] Para obter uma total e completa visualização de como é constituído o objeto do presente Pedido de Registro de Desenho Industrial em questão, acompanham os sete desenhos ilustrativos anexos, aos quais se faz referências conforme segue:

[004] A FIGURA 1 representa uma vista geral, em perspectiva, do brinquedo proposto neste Pedido de Registro de Desenho Industrial;

[005] A FIGURA 2 representa a vista frontal do dispositivo;

[006] A FIGURA 3 representa a vista lateral esquerda do dispositivo;

[007] A FIGURA 4 representa a vista lateral direita do dispositivo;

2 / 2

[008] A FIGURA 5 representa a vista posterior do dispositivo;

[009] A FIGURA 6 representa a vista superior do dispositivo;

[010] A FIGURA 7 representa a vista inferior do dispositivo;

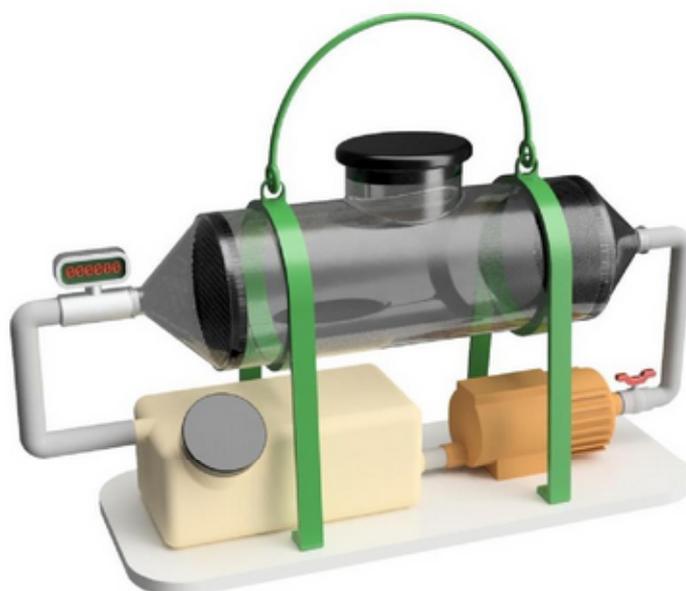
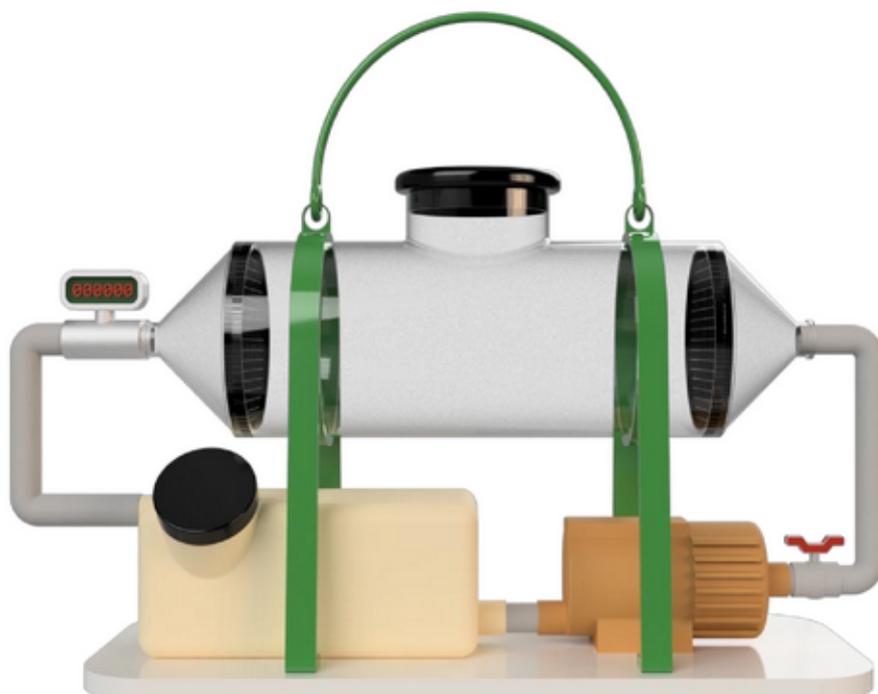
[011] Conforme se infere dos desenhos que acompanham e fazem parte integrante deste relatório, a Configuração Aplicada em Dispositivo Portátil Para Determinação da Capacidade Natatória em Peixes consiste de um dispositivo composto por uma bomba que retira a água do reservatório, passando pelas tubulações até chegar na câmara de teste, que contém tela de proteção para evitar ferimentos no animal em casos de arrastamento pela correnteza. Finalmente a água ao passar pelo medidor de velocidade onde ocorre a determinação da capacidade natatória, volta ao reservatório.

1 / 1

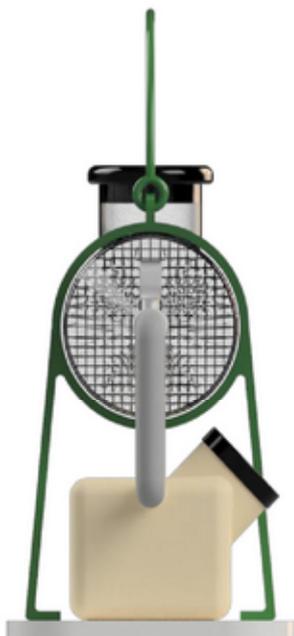
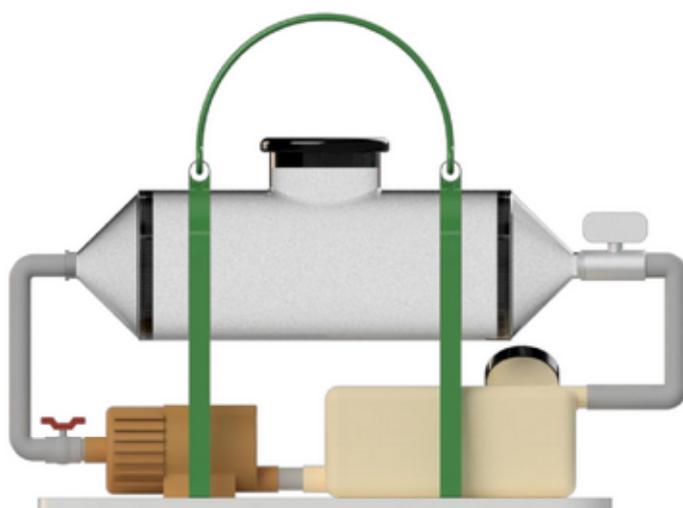
## REIVINDICAÇÕES

1. "CONFIGURAÇÃO APLICADA EM DISPOSITIVO PORTÁTIL PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM PEIXES" caracterizado por ter sua aparência definida conforme figuras em anexo.

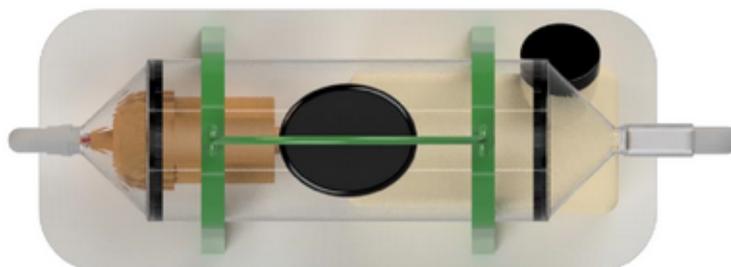
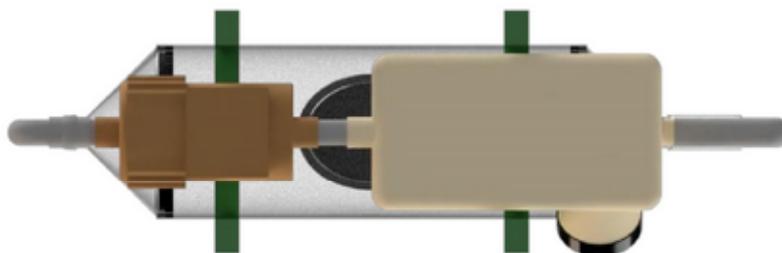
1 / 3

**Figura 1****Figura 2**

2 / 3

**Figura 3****Figura 4****Figura 5**

3 / 3

**Figura 6****Figura 7**

## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 025513 4

“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”

### Campo da invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um processo de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) produzidas por um processo de emulsificação sob agitação. As nanoemulsões são produzidas a partir de óleos essenciais, que contenham efeitos benéficos relatados na literatura para o tratamento de disfunções tireoidianas, sendo estes óleos presentes em sua fase orgânica, enquanto a levotiroxina é adicionada a fase aquosa. As fases são então estabilizadas pelo uso de surfactantes. O produto final contendo a nanoemulsão pode ser utilizado no tratamento do hipotireoidismo. Esta invenção se situa no campo da biotecnologia com ênfase em bionanotecnologia aplicada a saúde humana e animal.

### Fundamentos da invenção

[002] A glândula tireoide é revestida por células epiteliais cuboides que secretam substâncias dentro dos folículos, que por sua vez são preenchidos por coloide. O coloide por sua vez é composto pela tireoglobulina, uma proteína produzida pelas células foliculares que apresenta cerca de 70 aminoácidos de tirosina, que é o principal substrato a se combinar com o iodo e formar os hormônios tireoidianos (HTs). A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos é regulada por um sistema de *feedback* negativo envolvendo o hipotálamo, a hipófise anterior e a glândula tireoide. O hipotálamo produz o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) que vai agir na hipófise anterior que por sua vez produz o hormônio estimulante da tireoide (TSH). O TSH então estimula a tireoide a produzir

tiroxina ( $T_4$ ) (GUYTON; HALL, *Tratado de fisiologia médica*, 931-943, 2017). A conversão de tiroxina ( $T_4$ ) para triiodotironina ( $T_3$ ), o hormônio biologicamente ativo, ocorre nos tecidos periféricos pela remoção enzimática de uma unidade de iodo do anel externo da  $T_4$ , processo denominado desiodação. Sendo assim, faz-se necessário apresentar níveis intracelulares de  $T_3$  adequados afim de garantir a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvo (POWER et al., *Comp. Biochem. Phys. C*, 130: 447-459, 2001; NUNES, *Arquivos Brasileiros de Endocrinol. Metabol.*, 47(6): 639-643, 2003). Na existência de disfunção da glândula tireoide, pode ocorrer o fornecimento insuficiente ou excessivo de HTs para o corpo. O hipotireoidismo caracteriza-se como um estado clínico resultante da quantidade reduzida ou até mesmo ausência de hormônios tireoidianos circulantes para suprir a função normal do corpo, enquanto que o hipertireoidismo caracteriza-se pelo aumento dos hormônios tireoidianos circulantes devido ao aumento da função da glândula tireoide (OLIVEIRA; MALDONADO, *Interciência Soc.*, 3(2): 36-44, 2014).

[003] Após o diagnóstico de hipotireoidismo, a reposição de hormônio tireoideo com levotiroxina sódica é o tratamento comumente utilizado pelos pacientes, e se não tratado pode levar a uma série de complicações, inclusive a morte, sendo então necessário o tratamento por toda a vida do indivíduo, exceto em caso de hipotireoidismo transitório. O nome químico da levotiroxina sódica é (2S) -2-amino-3- [4- (4-hidroxi-3,5-diiodofenoxi) - 3,5-diiodofenil] propanoato de sódio, que é o sal de sódio da levotiroxina, um levoisômero sintético da tiroxina ( $T_4$ ) que é semelhante ao hormônio endógeno produzido pela glândula tireoide. Nos tecidos periféricos, a levotiroxina é desiodada pela 5'-desiodinase para formar a triiodotironina ( $T_3$ ). As formulações orais de L- $T_4$  comercialmente disponíveis podem compreender comprimidos, cápsulas de gelatina mole e solução oral (GERONIMO et al., *Braz. J. Surg. Clin. Res.*, 23(2): 128-134, 2018). O Brasil em 2018 movimentou o mercado farmacêutico com vendas de levotiroxina sódica obtendo assim a posição de 14º medicamento mais comercializado no país de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1-41, Brasília, 2019).

[004] A indicação e dosagem de L- $T_4$  descrita na literatura depende de fatores como gênero e idade do paciente, por exemplo. No caso de pacientes com idade inferior a 50 anos a indicação é de 1,7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , o que equivale a 100/150  $\mu\text{g}/\text{dia}$ . Já para pacientes idosos ou cardiopatas as doses devem ser menores e respeitando intervalos de 4 a 6 semanas. Enquanto para recém-nascidos, lactantes e adolescentes, as doses devem ser superiores a 1,7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  (COLUCCI et al., *EAAP endocrinol.*, 9(1): 40-47, 2013).

Adicionalmente, alguns pacientes podem necessitar de doses mais altas ou mais baixas do que as geralmente utilizadas, devido às variações individuais na absorção e muitas outras condições associadas que possam alterar as necessidades de L-T<sub>4</sub>, como no caso dos portadores de doenças gastrintestinais, os usuários de suplementos dietéticos (VINAGRE E SOUZA, *Rev. Bras. Ter. Intens.*, 23(2): 242-248, 2011) e alguns fármacos que podem interferir com a absorção de L-T<sub>4</sub>, tais como os anticoagulantes orais, antidiabéticos orais como insulina, indutores enzimáticos, amiodarona, glicocorticoides, inibidores de protease, inibidores da tirosina quinase, salicilatos e estrógenos, furosemida, bem como inibidores da bomba de prótons e modificadores da motilidade intestinal (GERONIMO et al., *Braz. J. Surg. Clin. Res.*, 23(2): 128-134, 2018). Ainda, outros fatores que também devem ser considerados incluem aqueles produtos usados contra disfunção na absorção, alimentação e gestação (BALOCH et al., *Thyroid*, 13(1): 3, 2003).

[005] A L-T<sub>4</sub> quando administrada por via oral é absorvida pela mucosa intestinal, especificamente no jejuno e íleo. A absorção é variável, girando em torno de 60% a 82% das doses durante as 3 horas após a administração do medicamento (SKELIN et al., *Clin. Ther.*, 39(2): 378-403, 2017). A sua meia-vida no plasma normal é de 5 a 7 dias (GOODMAN; GILMAN, *As bases farmacológicas da terapêutica*, 1175-1199, 2003), sendo aumentada nos casos de hipotireoidismo não tratado (HAYS; NIELSEN, *Thyroid*, (4):1, 1994). Na faixa de 80% da dose de levotiroxina ingerida é absorvida no trato gastrointestinal (MANDEL et al., *Ann. Intern. Med.*, 119, 1993) e seu pico de absorção é dado após 120 minutos da sua ingestão (JOHN-KALARICKAL et al., *Thyroid*, 17(8), 2007). No entanto, uma proporção substancial de pacientes tratados com levotiroxina têm apresentado sintomas persistentes, como depressão e bem-estar mental prejudicado, o que levou à questão se o tratamento com esse hormônio sintético é suficiente para todos os pacientes ou se terapias alternativas podem ser adotadas (CHACKER et al., *Lancet*, 390: 1550-15562, 2017).

[006] As doenças da tireoide podem se manifestar com sintomas evidentes ou de forma insidiosa. Em adultos diagnosticados com hipotireoidismo alguns sintomas como fadiga, letargia, intolerância ao frio, ganho de peso, constipação, alteração da voz e pele seca são comuns (CHACKER et al., *Lancet*, 390: 1550-1562, 2017). No hipotireoidismo ocorre produção acelerada de radicais livres (CHAKRABARTI et al., *Indian J. Endocrinol Metabol.*, 20: 674-678, 2016) e baixa disponibilidade de antioxidantes (MANCINI et al.

Mediat. *Inflamm.*, 2016: 1-12, 2016), que são as substâncias capazes de eliminar os radicais livres. Em consequência a esta condição biológica de desequilíbrio entre os radicais livres e a defesa antioxidante, decorre o aparecimento do estresse oxidativo que está implicado como um mecanismo fisiopatológico de diferentes doenças (MANCINI et al. *Mediat. Inflamm.*, 2016: 1-12, 2016).

[007] Métodos de detecção de sequestradores de radicais livres são utilizados para a identificação e quantificação de atividades antioxidante, como o 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (LUZIA et al., *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 69(2): 175-80, 2010). O DPPH é um radical livre, estável à temperatura ambiente, e a análise da atividade antioxidante por este método apresenta vantagens como a realização do teste em curto período de tempo, e por isso é comumente utilizado (ZOLA, Dissertação, 2014). Este radical apresenta coloração violeta, e é reduzido na presença de uma molécula de antioxidante doador de hidrogênio (LUZIA et al., *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 69(2): 175-80, 2010). O ABTS é um dos testes mais rápidos de ser realizado para análise da atividade antioxidante, apresentando outras vantagens como poder ser utilizado para amostras hidrossolúveis e lipossolúveis. O método é baseado na capacidade dos antioxidantes capturarem ABTS +, e o radical apresenta coloração azul esverdeado (ZOLA, Dissertação, 2014).

[008] Na literatura são relatados óleos essenciais com a proposta de serem ricos em antioxidantes, como *Cymbopogon citratus* (GUIMARÃES et al., *Ciênc. Agron.*, 42(2): 464-472, 2011), *Rhodostemonodaphne parvifolia* (ALCÂNTARA et al., *Acta Amazon.*, 40(3): 567 - 572, 2010), *Schinus terebinthifolius* (VELÁZQUEZ et al., *Fitoterapia*, 74: 91-97, 2003), *Citrus sinensis* (SINGH et al., *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1734-1740, 2010) e *Piper aduncum* (POHLIT et al., *Revista Fitos*, 2(1): 7-18, 2006). Todavia, até o presente momento, não foram localizados trabalhos que associassem esses óleos essenciais ao medicamento comumente prescrito para tratamento de disfunção tireoidiana.

[009] Os Óleos Essenciais (OEs) são líquidos voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com sua síntese podendo ser feita em diversos órgãos das plantas como flores, folhas e cascas (BILIA et al., *Evid-Based Compl. Alt.*, 2014: 1-14, 014). São misturas complexas compreendendo constituintes como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (BORN et al., *Exp. Appl. Acarol.*, 75: 491-502, 2018). Diversos são os métodos para extração de OEs, a exemplo da hidrodestilação, que consiste em colocar a planta em contato com a água fervente, podendo ela estar completamente imersa ou

apenas fluando (BUSATO et al., *Ciênc. Rural*, 44(9): 1574-1582, 2014). O produto final da extração pode variar, a depender da espécie da planta, tanto em qualidade e quantidade, como na própria composição. Isto se deve a fatores como clima, composição do solo, órgão da planta a qual é destinado a extração, idade e estágio do ciclo vegetativo da espécie (BILIA et al., *Evid-Based. Compl. Alt.*, 2014: 1-14, 014).

[0010] As NEs, também conhecidas como emulsões submicrônicas e miniemulsões, consistem em um tipo de sistema coloidal, sendo produzidas a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis (geralmente utiliza-se óleo e água), estabilizados através da adição de um surfactante apropriado para os compostos utilizados, que vai atuar diminuindo a tensão superficial entre os líquidos imiscíveis.

[0011] Uma NE pode conter vesículas pequenas com até 500 nm de tamanho (SINGH et al., *J. Control. Release*, 252: 28-49, 2017). O tamanho pequeno lhe confere tendência a serem transparentes ou apenas turvas, além de uma estabilidade melhor (MCCLEMENTS, *Soft Matter*, 7(6): 2297-2316, 2011).

[0012] O grau de estabilidade das nanoemulsões produzidas é determinado a partir de características físico-químicas como Tamanho, Carga (Potencial Zeta) e Índice de polidispersão das vesículas. Quanto ao tamanho da vesícula, durante a formulação, o tempo de homogeneização bem como a intensidade vão interferir gradativamente no tamanho das vesículas, podendo esta característica interferir no mecanismo de atuação da nanoemulsão. Quanto a carga, devido as emulsões serem sistemas que possuem tensoativos carregados em sua composição (surfactantes que geralmente são Tween e/ou Span), as partículas ganham carga positiva ou negativa, a depender do tipo de tensoativo e da proporção utilizada em sua composição, o que pode fazer com que as vesículas presentes na nanoemulsão se agreguem caso possuam carga próxima de zero (BILIA et al., *Evid-Based. Compl. Alt.*, 2014: 1-15, 2014; MCCLEMENTS, *Soft Matter*, 7(6): 2297-2316, 2011).

[0013] Os sistemas nanotecnológicos possuem diversas vias de administração, sendo as principais a administração tópica, oral e respiratória. O epitélio do trato intestinal é o mais importante para absorção de macro e micromoléculas, se tornando o mais utilizado para a absorção destes sistemas nanotecnológicos (HOET et al., *J. Nanobiotechnol.*, 2: 1-15, 2004).

[0014] Diante disso, o presente pedido de patente de invenção propõe uma nanoemulsão contendo a associação de levotiroxina sódica a óleos essenciais que apresentem atividade antioxidante, uma vez que estes por sua vez apresentam a capacidade de neutralizar, retardando ou inibindo, efeitos deletérios provocados por radicais livres em pacientes diagnosticados com hipotireoidismo. Logo, esse sistema nanotecnológico proposto se mostra um método mais eficiente para aumentar a eficácia terapêutica do fármaco.

[0015] Alguns documentos utilizando óleos essenciais para a formulação de nanopartículas ou nanoemulsões também são encontrados na literatura. Todavia, eles estão associados ao tratamento e/ou prevenção de outras enfermidades humanas que não seja o hipotireoidismo. Como o documento US 9492398 B2 que descreve a nanoencapsulação de óleos essenciais ou seu extrato com atividade antibacteriana de amplo espectro, atividade antiparasitária, atividade antifúngica, e/ou atividade antipatogênica. O extrato é encapsulado em nanopartículas ou nanocápsulas lipídicas obtidas por um método de temperatura de inversão de fase. A nanocápsula lipídica compreende uma mistura de lecitina de soja e uma mistura de polietilenoglicol livre 660 e 66-hidroxiestearato de polietilenoglicol. Ainda existe um veículo farmacologicamente aceitável que é solução salina ou solução salina tamponada. O documento difere da presente invenção por não propor uma nanoemulsão a base de óleo essencial associado a levotiroxina.

[0016] No que se refere ao uso de derivados dos hormônios tireoidianos associado a óleos essenciais na preparação de fármacos, o documento EP 2941272 A1 descreve uma composição farmacêutica compreendendo levotiroxina, acácia e um antioxidante selecionado de galato de propila, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado. Adicionalmente contém sacarose, celulose microcristalina e manitol. A composição farmacêutica tem uma vida útil melhorada para tratar distúrbios da tireoide por administração oral da composição ao paciente. O documento difere da presente invenção na sua composição, por não utilizar surfactante, e solução tampão, bem como por não se caracterizar como um sistema nanotecnológico.

[0017] Ainda, referente a utilização de derivados dos hormônios tireoidianos na preparação de fármacos, sem a associação a óleos essenciais, alguns documentos são encontrados na literatura. O documento US 9168239 B2 descreve uma substância de composição sólida, a qual é formada por um método que inclui a combinação de um

solvente, levotiroxina sódica, manitol e fosfato de sódio dibásico para formar uma mistura líquida e a liofilização dessa mistura. Difere da presente invenção em sua composição por não apresentar óleo essencial, e também por não se tratar de um sistema nanotecnológico.

[0018] Documentos como US 7723390 B2, US 9682045 B2, US 005753254 A, US 006936274 B2, WO 158463 A1, CA 2333193 A1, US 5225204 A, US 5635209 A, US 5753254 A, US 6936274 B2 diferenciam-se da presente invenção por não conter a associação de levotiroxina sódica com um óleo essencial para formar uma nanoemulsão.

[0019] Também, pode ser encontrado na literatura documentos como o US 0178870 A1 que descreve um dispositivo inalador compreendendo uma mistura estável de pó seco estável do hormônio da tireoide. De acordo com a invenção, o referido dispositivo contém uma mistura compreendendo hidrato de levotiroxina sódica, partículas de lactose, gelatina, amido de milho, glicolato de amido sódico, estearato de magnésio e talco silicificado. Este documento difere da presente invenção em seu processo, composição e via de administração do produto já que não apresenta óleo essencial e não se trata de um sistema nanotecnológico.

[0020] Diante do exposto, não foram encontradas informações no estado da técnica que divulguem os elementos contidos na presente invenção comprovando sua novidade. O estado da técnica também demonstra o espaço para a proposição de um novo processo de obtenção de produto a base de um sistema nanotecnológico, possuindo uma fase orgânica a base de óleo essencial e uma fase aquosa contendo levotiroxina sódica que se associam e podem potencializar o efeito terapêutico.

### **Descrição da invenção**

[0021] Para fins desta invenção, o material para a composição da fase orgânica foi óleos essenciais, que são substâncias voláteis que possuem vários compostos, dentre eles terpenos, cetonas, álcoois, fenilpropanóides (EDRIS, *Phytother. Res.*, 21: 308-323, 2007).

[0022] Para fins desta invenção, o tampão fosfato de sódio ou tampão fosfato salino podem ser utilizados preferencialmente como meio para a solubilização do fármaco levotiroxina, uma vez que este é hidrofílico.

[0023] A nanoemulsão foi preparada a partir de duas fases: i. Fase aquosa composta de tampão, preferencialmente com pH ajustado entre 6,5 e 7,4 a molaridade de 0,1 M, e levotiroxina sódica; ii. Fase oleosa composta por óleo essencial preferencialmente *Carum carvi*, *Citrus sinensis* ou *Piper aduncum*, por serem descritos na literatura por apresentarem eficácia no tratamento do hipotireoidismo e/ou serem ricos em antioxidantes (KHAN et al. *EAAP J. Pharm. Med. Res.*, 3(6), 231-236, 2016; SINGH et al. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1734-1740, 2010; POHLIT et al. *Fitos*, 2(1): 7-18, 2006), e Monooleato de sorbitano (Tween 80®) e/ou Polissorbato 80 (Span 80®) de 0 a 20% (p/p) submetida a suave agitação.

[0024] Para a formação da nanoemulsão, as fases oleosa e aquosa foram preparadas separadamente. Inicialmente a fase oleosa foi produzida sob agitação constante, por preferencialmente 30 minutos, a partir de óleo essencial e polissorbitano 80 (Tween 80®) e/ou monooleato de sorbitano 80 (Span 80®) nas concentrações preferenciais de 5% a 20%. Esta fase foi homogeneizada sob agitação controlada e constante, preferencialmente 635 g. Em simultaneidade, a fase aquosa foi produzida a partir da levotiroxina sódica e diluída em 43,75 mL de tampão fosfato.

[0025] Após finalizada a homogeneização, 4 g da fase aquosa foi vertida sob gotejamento, em uma taxa de fluxo de aproximadamente 3,5 mL/min, a fase oleosa ainda sob agitação. Em seguida, esta mistura foi mantida em agitação vigorosa, controlada e constante para formação da nanoemulsão óleo/água (O/A) durante preferencialmente 1 hora.

[0026] Por fim, para que seja possível a comercialização, o complexo final pode ser misturado com excipientes farmacologicamente aceitáveis, como o estearato de magnésio e outros adjuvantes, bem como crioprotetores como glicose, sacarose, manitol e polidextrose, para compressão em comprimidos ou colocados em cápsulas.

[0027] A nanoemulsão foi caracterizada conforme descrito nos exemplos a seguir:

#### **Exemplo 1: Produção de uma nanoemulsão O/A contendo levotiroxina e óleos essenciais em escala de bancada**

[0028] As nanoemulsões foram produzidas para um volume final de 5,00 g contendo duas soluções. Primeiramente a solução 1, que compreende a fase oleosa foi preparada contendo óleo essencial e polissorbato (Tween 80®) e monooleato de sorbitano 80 (Span

80®), e agitada por 30 minutos em suave agitação constante de 900 rpm em agitador magnético. Em seguida, a solução 2, que compreende a fase aquosa, contendo tampão fosfato com pH regulado para 7,4 e levotiroxina sódica diluída. A levotiroxina pode preferencialmente ser 1 comprimido macerado, sendo a quantidade total na formulação dependente da dosagem do comprimido utilizado. A dose exata do comprimido de levotiroxina sódica utilizada dependerá da finalidade do tratamento e será verificada por um especialista na técnica. Passados os 30 minutos, a solução 2 foi vertida na solução 1 por gotejamento utilizando bureta a uma taxa de fluxo de 3,5 mL/min. Após a solução aquosa ser completamente vertida, a agitação foi mantida por 60 minutos a 900 rpm. Os óleos essenciais de *Citrus sinensis* (CS) e *Piper aduncum* (PA) foram isolados separadamente das folhas frescas, enquanto o de *Schinus terebinthifolius* (ST) foi isolado dos frutos, usando um aparelho do tipo Clevenger modificado e hidrodestilação. Esses óleos foram caracterizados por Cromatografia Gasosa do tipo FID (500 GC, PerkinElmer Clarus, Shelton, CO, EUA) e MS (220-MS IT GC, Varian, Walnut Creek, CA, EUA). Enquanto o óleo essencial de *Carum carvi* (CC) foi adquirido em comércio. Quanto a composição dos óleos, o de *Citrus sinensis* apresentou os seguintes componentes: 1,25%  $\alpha$ -Pineno, 1,87%  $\beta$ -Pineno, 90,13% Limoneno. O óleo essencial de *Piper aduncum* apresentou os principais componentes: 1,01% (E)- $\beta$ -Ocimeno, 1,83%  $\alpha$ -Terpineol, 3,20%  $\beta$ -Cariofileno, 8,32%  $\alpha$ -Humuleno, 1,93%  $\gamma$ -Himachaleno, 1,34% Germacreno B, e 78,41% Dilapiol. O óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* apresentou os principais componentes: 7,18% iso-Silvestreno, 1,90% o-Cimeno, 1,02% Limoneno, 2,84% (E)- $\beta$ -Ocimeno, 1,50% Terpinen-4-ol, 1,29% (E)-Isocitral, 1,50%  $\delta$ -Elemeno, 1,66%  $\alpha$ -Copaeno, 3,42% iso-longipineno, 3,04% Longipineno, 1,00%  $\beta$ -funebreno, 16,18%  $\beta$ -Cariofileno, 1,51%  $\beta$ -lilangeno, 2,66%  $\beta$ -Copaeno, 1,91%  $\beta$ -Gurjuneno, 2,63%  $\gamma$ -Elemeno, 15,99% Aromadendreno, 1,87% 9-epi-(E)-Cariofileno, 1,3%  $\gamma$ -Gurjuneno, 2,25%  $\alpha$ -Amorfeno, 1,14% lalenceno, 8,54% Biciclogermacreno, 1,71%  $\beta$ -Himachaleno, 1,64% Germacreno A, 1,75% Germacreno B. *Carum carvi* apresenta os principais componentes: 2,14% p-Cimeno, 34,14% Limoneno, 1,19% Dill etér, 60,44% Carvona.

### **Exemplo 2: Efeito da concentração de óleos essenciais, surfactantes e tampão fosfato contendo levotiroxina sob a preparação da emulsão**

[0029] Para a determinação da proporção final de óleo essencial, tampão fosfato contendo levotiroxina a 4  $\mu$ g/mL, e surfactantes (tween 80 e span 80) na preparação da

emulsão foram utilizadas 4 diferentes concentrações destes compostos como demonstrado na tabela a seguir.

[0030] Tabela 1. Diferentes proporções dos componentes na preparação da emulsão.

Óleo	Amostra	Velocidade de agitação	Tempo de agitação	Óleo (p/p)	Tween® 80 (p/p)	Span® 80 (p/p)	Solução Tampão + L-T <sub>4</sub>	Total % (p/p)
<i>Carum carvi</i>	CC1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%
	CC2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	CC3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	CC4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%
<i>Citrus sinensis</i>	CS1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%
	CS2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	CS3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	CS4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%
<i>Piper aduncum</i>	PA1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%
	PA2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	PA3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	PA4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%
<i>Schinus terebinthfolius</i>	ST1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%
	ST2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	ST3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	ST4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%

### Exemplo 3: Determinação da estabilidade de acordo com a separação de fases

[0031] As emulsões após serem preparadas, foram colocadas em um frasco respeitando o *head space* com aproximadamente um terço da capacidade do frasco, e colocadas em

centrífuga a 1210 g (3000 rpm) durante 30 minutos para análise da separação de fases. Após isso, foram retiradas do equipamento e mantidas em bancada até temperatura ambiente para observar a separação de fases como um indicativo de estabilidade. No estudo, foi possível observar que dos 4 óleos essenciais utilizados para a formulação das emulsões, o de *Schinus terebinthfolius* separou fases em todas as combinações, enquanto que nos demais óleos essenciais não houve separação de fases.

#### **Exemplo 4: Avaliação das características organolépticas**

[0032] Após avaliação da separação de fases, foi realizada a análise das características organolépticas (avaliação macroscópica) de todas as emulsões, exceto as de *Schinus terebinthfolius* devido a separação de fases de todas as amostras. Esta etapa consistiu em uma análise física macroscópica a fim de determinar as melhores emulsões estabilizadas quanto a Aspecto, Cor e Odor de acordo com o protocolo da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004). Para aspecto foi analisado Fase de dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT); Consistência: Fluido (FL), Pouco espesso (PE), Espesso (E) ou Muito espesso (ME); Opacidade: Translúcido (TR), Pouco Opaco (PO) ou Opaco (O); e Grumos: Presença (PR) ou Ausente (AU). Para Odor e Cor foi analisado Presença (PR) ou Ausência (AU) que quando presente foi classificado em Modificado (MO), levemente modificado (LM) ou Sem alteração (SA) em relação ao óleo.

[0033] De acordo com a observação macroscópica foi possível observar que todas as formulações se mostraram homogêneas. Também foi observado que todas as formulações apresentaram consistência fluída, exceto a CC4 e PA4 que se mostraram pouca espessas. Ainda, quanto a opacidade, apenas as amostras CC1 e CS2 se mantiveram translúcidas. Apenas a amostra CS3 apresentou grumos em sua composição. O odor esteve presente em todas as amostras, visto que os óleos essenciais apresentam aromas variados, porém nas amostras PA1 e PA3 o odor foi modificado. A cor, também presente em todas as amostras, foi modificada em todas elas sendo levemente modificada em CS1 apenas.

[0034] De acordo com os dados obtidos, as melhores emulsões foram: *Carum carvi* (CC1) com 0,5 g de óleo, 1,0 g de tween 80 e 3,5 de solução tampão + L-T<sub>4</sub>, por se apresentar homogênea, fluída, translúcida e sem modificação de odor; *Citrus sinensis* (CS2) com 0,5 g de óleo, 1,0 g de tween 80 e 3,5 de solução tampão + L-T<sub>4</sub>, por se

apresentar homogênea, fluída, translúcida e sem modificação de odor; e *Piper aduncum* (PA4) com 0,5 g de óleo, 0,5 g de tween 80, 0,5 de span 80, e 3,5 de solução tampão + L-T<sub>4</sub> por se apresentar homogênea, fluída, pouco opaca e sem alteração de odor.

### **Exemplo 5: Efeito das variáveis físicas de tempo e velocidade de agitação no Tamanho, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta das emulsões**

[0035] De acordo com os resultados obtidos no Exemplo 4, apenas as emulsões que apresentaram as melhores características organolépticas (análise macroscópica) seguiram para elaboração do planejamento fatorial de dois níveis ( $3 \times 2^2$ ), com o objetivo de analisar o efeito das variáveis Tempo e Velocidade de agitação na formação das vesículas.

[0036] Na variável Tempo foi utilizado 1 hora, 1 hora e 30 minutos, e 2 horas. Enquanto na variável Velocidade de agitação utilizamos 282 g, 635 g e 1129 g. As nanoemulsões foram diluídas em água ultrapura para então serem submetidas a análise, reduzindo assim a sua turbidez. Foram avaliados o tamanho médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das vesículas de óleo pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons padrão (PCS) fixado 90° a 25 °C utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) (CADENA et al., BBA, 1828:309-316, 2013; RIQUELME et al., Food Sci, Technol., 111: 760-766, 2019).

[0037] As análises foram realizadas por 4 repetições e mais 3 pontos centrais para cada amostra, de acordo com o planejamento fatorial, e os resultados obtidos foram: Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Carum carvi* variaram de 218,5 a 408,6 para tamanho médio (nm), de 0,257 a 0,409 para PDI e de -12,5 a -22,7 para potencial zeta. Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* variaram de 200,2 a 401,9 para tamanho médio, de 0,113 a 0,460 para PDI, e de -12,9 a 21,3 de potencial zeta. Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Piper aduncum* variaram de 326,9 a 631,3 para tamanho médio, de 0,113 a 0,460 para PDI, e de -30,6 a 39,1 para potencial zeta.

[0038] Diante dessas informações, as emulsões produzidas se caracterizam como nanoemulsões, uma vez que os tamanhos de suas vesículas foram inferiores a 500 nm (SINGH et al., *J. Control. Release*, 252: 28-49, 2017), exceto em amostras contendo o óleo essencial de *Piper aduncum*. Adicionalmente, para o índice de polidispersão (PDI), uma medida que caracteriza a homogeneidade do tamanho das vesículas, é preferível que os valores estejam abaixo de 0,7. Estando os valores próximos a 0,3 é indicativo de

boa homogeneidade (CADDEO et al. *Int. J. Pharm.*, 363(1-2), 183-191, 2008). Valores próximos a 0,3 foram obtidos em todas as nanoemulsões. Em relação ao potencial zeta ( $\zeta$  - mv), todas as nanoemulsões apresentaram o potencial negativo, com valores próximos a -20 mV. Ainda, apenas as nanoemulsões de *Piper aduncum* apresentaram valores próximos a -30 mV. Torna-se importante destacar que em nenhuma formulação houve o acréscimo de agentes de carga, visando assim simplificar o processo de produção. Baseado nas informações acima, consideramos que nanoemulsões com menor Tamanho, menor PDI e maior Potencial Zeta foram as mais eficientes para a atual proposta, e que passarão para a etapa de avaliação da atividade antioxidante. Desta forma, para a nanoemulsão de *Carum carvi* a amostra 2 foi selecionada, para *Citrus sinensis* foi escolhida a amostra 5, e para *Piper aduncum* a amostra 11.

### Exemplo 6: Teste de Estabilidade Preliminar – Características Organolépticas

[0039] O teste de estabilidade preliminar consiste em submeter as formulações a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade baseando-se nos protocolos da ANVISA adaptados (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004). As amostras foram preparadas e armazenadas em recipientes fechados com tampa de boa vedação, contendo um *head space* equivalente a um terço da capacidade total do recipiente, afim de permitir possíveis trocas gasosas. As nanoemulsões utilizadas foram as mesmas preparadas para a análise do efeito das variáveis físicas de tempo e velocidade de agitação do exemplo 5. Essas amostras foram submetidas a estudos de aquecimento, resfriamento e congelamento durante 24 horas. Todas as nanoemulsões foram observadas e comparadas por suas características organolépticas após serem retiradas dos equipamentos e chegarem à temperatura ambiente. Os dados destas análises são observados na tabela a seguir.

[0040] Tabela 4. Aspectos organolépticos decorrentes dos diferentes estresses térmicos provocados nas nanoemulsões.

Centrifugação 1210 g /30 min						
Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HM	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO

CC3	HM	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CC4	HM	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
CC5	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS1	HT	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CS2	HT	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CS3	HT	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS4	HT	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CS5	HT	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA1	HM	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA2	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA3	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA4	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA5	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO

Resfriamento  $5 \pm 2$  °C

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	PO	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CC5	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CS1	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CS2	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CS3	HT	FL	PO	AU	PR/MO	PR/MO
CS4	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CS5	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
PA1	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA2	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA3	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA4	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO

Congelamento  $-20 \pm 2$  °C

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	LO	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HT	FL	LO	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	LO	AU	PR/LM	PR/MO

CC4	HT	FL	LO	AU	PR/SA	PR/MO
CC5	HT	FL	LO	AU	PR/LM	PR/MO
CS1	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS2	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS3	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS4	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS5	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA1	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA2	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA3	HM	E	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA4	HM	PE	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO

**Aquecimento 37 ± 2 °C**

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC5	HM	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CS1	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS2	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS4	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS5	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
PA1	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA2	HM	E	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA3	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA4	HM	E	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO

**Aquecimento 40 ± 2 °C**

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO

CC5	HM	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CS1	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS3	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS4	HM	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS5	HM	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
PA1	HM	PE	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA2	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA3	HM	PE	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA4	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO

**Aquecimento  $50 \pm 2$  °C**

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC5	HM	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CS1	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS2	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS4	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS5	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
PA1	HM	E	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA2	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA3	HM	E	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA4	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA5	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO

[0041] Após passagem por todas as etapas de estresse propostas pelo teste de estabilidade preliminar, os resultados foram apresentados conforme permanência da homogeneidade das amostras uma vez que essa seria a condição ideal de estabilidade para a nanoemulsão. Assim sendo, os nossos dados revelaram que para as nanoemulsões de *C. carvi*, a homogeneidade foi observada em todas as amostras após a centrifugação, e nas amostras 2, 4 e 5, nas 3 diferentes temperaturas de aquecimento (37, 40 e 50 °C). Para as nanoemulsões de *C. sinensis*, a homogeneidade foi observada em todas as amostras após congelamento e aquecimento a 40 °C. Por fim, para as

nanoemulsões de *P. aduncum*, a homogeneidade foi observada na amostra 1 após centrifugação, e em todas as amostras após resfriamento, congelamento, e nas 3 diferentes temperaturas de aquecimento (37, 40 e 50 °C). Acrescentamos ainda que todas as nanoemulsões não apresentaram grumos em condição de estresse. Apenas nanoemulsões contendo óleo essencial de *P. aduncum* apresentaram consistência variando de pouco espessa para espessa nas condições de estresse, exceto na centrifugação, bem como apresentaram opacidade em todas as condições.

### **Exemplo 7: Análise da atividade antioxidante das nanoemulsões**

[0042] Para esta análise foram utilizadas as nanoemulsões de *Carum carvi* contendo 0,5 g de óleo, 1,0 g de tween 80, 3,5 g de solução tampão contendo L-T<sub>4</sub>; *Citrus sinensis* contendo 1,0 g de óleo, 1,0 g de tween 80, 3,0 g de solução tampão contendo L-T<sub>4</sub>; *Piper aduncum* contendo 0,5 g de óleo, 0,5 g de tween 80, 0,5 g de span 80, 4,0 g de solução tampão contendo L-T<sub>4</sub> (as mesmas utilizadas no exemplo 5). A atividade sequestradora de radicais livre DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> das nanoemulsões foi realizada seguindo a metodologia de Silva et al. (2006) (SILVA et al. *J. Food Compost. Anal.*, 19, 507–511, 2006) e RE et al. (1999) (RE et al. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231–1237, 1999), respectivamente. As nanoemulsões após preparadas foram diluídas em etanol e testadas para os radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, com as concentrações variando entre 0,5 a 500,0 µg/mL. Nos testes DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> as amostras foram protegidas da luz e sonicadas (Potência 40kHz). Para DPPH<sup>•</sup> a sonicação durou 30 min, enquanto para e ABTS<sup>•+</sup> durou 6 min. A avaliação da atividade sequestradora de radicais livres nos testes DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, foi realizada através da medida das absorbâncias das amostras e dos controles positivos em comprimentos de onda de 517 nm e 734 nm, respectivamente, em um dispositivo UV-vis (Biochrom EZ Read 2000). O ácido ascórbico e o Trolox foram usados como antioxidante de referência (controle positivo) e todas as concentrações foram testados em triplicata. A porcentagem de atividade de sequestro (%AS) tanto para DPPH<sup>•</sup> quanto para ABTS<sup>•+</sup> foi calculada a partir da equação:  $\%AS = 100 \times (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle}$ . Onde  $Abs_{controle}$  é a absorbância do controle contendo apenas a solução de DPPH/ABTS<sup>•+</sup> em etanol e  $Abs_{amostra}$  é a absorbância do radical na presença da amostra ou do ácido ascórbico/Trolox padrão. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida por análise de regressão linear e o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos através do valor da Concentração Efetiva média (CE50), que representa a concentração

da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais. Todas as nanoemulsões contendo óleos essenciais se mostraram ativas nos testes antioxidantes. No teste de DPPH o melhor resultado foi observado para a nanoemulsão contendo o óleo de *C. carvi* (CE50 = 204,3 µg/mL). Já no teste com o radical ABTS, a nanoemulsão contendo o óleo de *P. aduncum* (CE50 = 156,6 µg/mL) apresentou o melhor resultado. Esses resultados observados para as espécies *C. carvi* e *P. Aduncum* podem ser justificados pela presença de compostos oxigenados em suas composições. Com isso, é possível concluir que essas nanoemulsões apresentam atividade antioxidante.

## REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA” **caracterizado por** um método de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) possuindo tamanho inferior a 500 nm, onde a fase aquosa é composta por tampão fosfato na faixa neutra e levotiroxina sódica, sendo esta vertida suavemente na fase oleosa formada por óleos essenciais compreendendo *Carum carvi*, *Citrus sinensis* e *Piper aduncum*, ainda tendo na fase oleosa tensoativo que confere estabilidade compreendendo o monooleato de sorbitano 80 e o polisorbato 80, podendo estas nanoemulsões serem incorporadas em formulações farmacêuticas de uso comercial.
2. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase oleosa ser preparada pela adição do monooleato de sorbitano 80 e polisorbato 80 no óleo essencial sob suave agitação.
3. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase aquosa ser preparada pela adição de levotiroxina a um tampão fosfato na faixa neutra.

## RESUMO

### “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”

A presente invenção descreve um processo de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) contendo a associação de levotiroxina sódica e óleos essenciais, produzidas por um processo de emulsificação sob agitação, com a fase aquosa sendo vertida sob gotejamento na fase oleosa. Esta associação visa melhorar a eficácia do fármaco comercial uma vez que os óleos utilizados apresentam atividade antioxidante comprovadamente descrita. A invenção compreende a formulação de vesículas com tamanhos inferiores a 500 nm. Ainda, a esta nanoemulsão pode ser incorporada em formas farmacêuticas de uso comercial. O produto final a partir da nanoemulsão pode ser usado na terapêutica humana e animal.



## Thyroxine, levothyroxine, and thyroxine complexed into cyclodextrin changed animal behavior, oxygen consumption, and photopic electroretinogram of *Colossoma macropomum*

Thamiris Pinheiro Santos · Priscila Rafaela Leão Soares ·  
 Marília Cordeiro Galvão da Silva · Stephannie Caroline Barros Lucas da Silva ·  
 André Lucas Correa de Andrade · Amanda Rodrigues dos Santos ·  
 Jadson Freitas da Silva · Elyda Grazyelle da Silva Oliveira ·  
 Elton Hugo Lima da Silva Souza · Fabrício Bezerra de Sá · Marília Ribeiro Sales Cadena ·  
 Pabyton Gonçalves Cadena

Received: 19 October 2018 / Accepted: 5 March 2019 / Published online: 2 April 2019  
 © Springer Nature B.V. 2019

**Abstract** The toxic effects of thyroxine ( $T_4$ ), levothyroxine ( $L-T_4$ ), and thyroxine complexed into  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD- $T_4$ ) on the biological parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) were evaluated. The animals were exposed to a chronic toxicity test based on concentrations of influent (60 ng/L) for 2 months. Weight, total length, animal behavior, oxygen consumption, photopic electroretinogram (ERG), and the Flicker exam were evaluated. No significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) on the weight and total

length measurements between all groups studied. Behavioral observations of the animals exposed to  $L-T_4$  and  $\beta$ -CD- $T_4$  complex showed a reduction ( $p < 0.05$ ) in slow swimming and an increase in staying motionless events. The animals exposed to the  $\beta$ -CD- $T_4$  complex presented the highest  $O_2$  consumption.  $L-T_4$  and  $\beta$ -CD- $T_4$  promoted a reduction in the ability of the animals to respond to stimuli in the photoreceptors according to the photopic ERG examination. Data from the experimental Flicker exam showed no significant differences

Thamiris Pinheiro Santos, Priscila Rafaela Leão Soares, Marília Cordeiro Galvão da Silva, Stephannie Caroline Barros Lucas da Silva, André Lucas Correa de Andrade, Amanda Rodrigues dos Santos, Jadson Freitas da Silva, Elyda Grazyelle da Silva Oliveira, Elton Hugo Lima da Silva Souza, Fabrício Bezerra de Sá, Marília Ribeiro Sales Cadena and Pabyton Gonçalves Cadena contributed equally to this work.

T. P. Santos · P. R. L. Soares · M. C. G. da Silva ·  
 S. C. B. L. da Silva · A. L. C. de Andrade ·  
 A. R. dos Santos · J. F. da Silva · E. G. da Silva Oliveira ·  
 E. H. L. da Silva Souza · F. B. de Sá · P. G. Cadena  
 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA),  
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de  
 Medeiros s/n, Dois Irmãos,, Recife, PE 52171-900, Brazil

Recife, PE 52171-900, Brazil

P. G. Cadena (✉)  
 Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA),  
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de  
 Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil  
 e-mail: pabyton.cadena@ufrpe.br

M. R. S. Cadena  
 Departamento de Biologia (DB), Universidade Federal Rural de  
 Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos,

## Resumo Apresentação Pôster

### Simpósio Internacional de Diagnóstico e Terapias (SINATER) – 2018

#### **TITLE: THYROXINE AND LEVOTHYROXINE PRESENTS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT CHANGED THE EMBRYOLOGICAL PARAMETERS OF THE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**

Thamiris Pinheiro Santos<sup>1,3</sup>, Paulo Eduardo da Silva Bastos<sup>3</sup>, Jadson Freitas da Silva<sup>2,3</sup>, Marília Cordeiro Galvão da Silva<sup>2,3</sup>, André Lucas Corrêa de Andrade<sup>1,3</sup>, Stefânia Maria de Medeiros Vieira<sup>3</sup>, Pabyton Gonçalves Cadena<sup>3,4</sup>

- 1- Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde;
- 2- Programa de Pós Graduação em Biociência Animal;
- 3- Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco;
- 4- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

When present in the aquatic environment, the thyroid hormones as thyroxine (T<sub>4</sub>) and its synthetic form, levothyroxine (L-T<sub>4</sub>) are considered endocrine disruptors (EDs). Due to limitations of removal in wastewater treatment systems, these compounds persist in the aquatic environment. In the literature were found the environmental concentrations in influent of 64 ng/L (T<sub>4</sub>) and 347 ng/L (L-T<sub>4</sub>). Fish can be used as indicators of environmental health and are classified as good experimental models for toxicological studies. In this framework, the objective of this study was to evaluate the toxic effects of T<sub>4</sub> and L-T<sub>4</sub> as endocrine disruptors in embryological parameters of zebrafish. Acute toxicity test was realized using *D. rerio* embryos exposed to environmental concentrations of T<sub>4</sub> and L-T<sub>4</sub> (n = 30 per group) according to OECD 236 guidelines. The heart rate, mortality, and teratogenic effects as pericardial edema (Pe), yolk sac edema (Yse), spine deformation (Sd), tail deformity (Td) and coagulation (Cg) were evaluated. The analysis of the results of the acute toxicity test with embryos showed a significant (p < 0.05) increase in the heart rate after 24 and 48 hpf in the animals exposed to T<sub>4</sub> and L-T<sub>4</sub> in 48 hpf. However, it was observed a reduction in the heart rate after 72 hpf in the group exposed to T<sub>4</sub>, but this effect was not observed in the group exposed to L-T<sub>4</sub>. Regarding mortality, it was observed 3.33% of mortality rate in all groups studied. It was not observed teratogenic effects in the animals exposed to T<sub>4</sub> and L-T<sub>4</sub>. According to these results, it was possible to observe the toxicity effects of these compounds only in the heart rate in the environmental concentrations, and T<sub>4</sub> showed more toxicity than L-T<sub>4</sub> in the studied parameters.

**KEYWORDS:** “Endocrine disruptor”; “Thyroid hormone”; “Teratogenicity”; “Embryos”; “Fish”.

**FINANCIAL SUPPORT:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE.

## Resumo Apresentação Pôster

### XVIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco - 2018

Amiodarona como disruptor endócrino e seus efeitos nos parâmetros embriológicos do *zebrafish* (*Danio rerio*).

Paulo Eduardo da Silva Bastos<sup>1</sup>; Thamis Pinheiro Santos<sup>3</sup>; Stefânia Maria de Medeiros Vieira<sup>1</sup>; Jadson Freitas da Silva<sup>2</sup>; Marília Cordeiro Galvão da Silva<sup>2</sup>; André Lucas Corrêa de Andrade<sup>3</sup>; Pabyton Gonçalves Cadena<sup>2</sup>; Marília Ribeiro Sales Cadena<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco - R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife- PE;

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- Universidade Federal Rural de Pernambuco - R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife-PE;

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego - Cidade Universitária, Recife - PE

Disruptores endócrinos (DEs) são resíduos químicos presentes no ambiente oriundos de atividade humana, por exemplo, excretas e descarte indevido de medicamentos vencidos ou sobras, e que podem ocasionar alterações morfológicas e fisiológicas em organismos. Dentre estes DEs, a amiodarona – um dos fármacos mais utilizados pela população mundial para o tratamento de distúrbios graves de desregulação do ritmo cardíaco – está presente em ambientes aquáticos em concentração aproximada de 555 ng/L. Por participarem do ecossistema aquático, os peixes como a espécie *Danio rerio* (*zebrafish*) podem ser utilizados como indicadores de saúde ambiental e são classificados como bons modelos experimentais para estudos toxicológicos, inclusive para estudos com DEs. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar qualitativamente os efeitos teratogênicos cardiopáticos (Edema de Pericárdio – Ep e Coagulação – Cg) da amiodarona em embriões de *Zebrafish* expostos à concentração ambiental do fármaco. Obteve-se a licença CEUA/UFRPE nº 056/2018 para o desenvolvimento desta pesquisa. Teste de toxicidade aguda foi realizado com amiodarona utilizando embriões de *D. rerio* de acordo com as diretrizes da OCDE 236. Foram utilizados 2 grupos (n = 10 com triplicatas autênticas), um grupo controle e outro exposto à amiodarona. Não foram observados efeitos teratogênicos Ep e Cg nos embriões nas primeiras 24h de experimentação. Às 48 e 72 hpf foi observado Cg e Ep. Além disso, apenas Ep foi observado às 96 hpf. De acordo com os resultados apresentados, foi possível observar origem ao Ep devido ao desvio de fluxos para o espaço intersticial do epitélio cardíaco do *zebrafish* em desenvolvimento e também foi possível observar a formação de coágulos. Ambos os efeitos observados provavelmente foram ocasionados devido às propriedades tóxicas da amiodarona. Dessa forma, este estudo fornece base para estudos posteriores dos efeitos da amiodarona como um DE.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Fármacos; Teratogenicidade; Peixe.

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA G- 10**  
**Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	91/2018
Número do processo	23082.015322/2018-23
Data de emissão da licença	22 de agosto de 2018
Título do Projeto	Efeitos tóxicos de fármacos e hormônios com atividade tireoidiana livres e microencapsulados/nanoencapsulados sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )–Parte 1
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Pabyton Gonçalves Cadena
Colaboradores	Thamires Pinheiro Santos; Marília Cordeiro Galvão da Silva; Paulo Eduardo da Silva Bastos Jadson Freitas da Silva.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe; macho 345; fêmea 345 total: 690



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS TÓXICOS DE MOLÉCULAS COM ATIVIDADE TIREOIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS EM ZEBRAFISH E DESENVOLVIMENTO DE ALTERNATIVAS NANOTECNOLÓGICAS COM ESTAS MOLÉCULAS ASSOCIADAS A ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS PARA O TRATAMENTO DO HIPOTIREOIDISMO (PARTE DOIS) ", protocolada sob o CEUA nº 2008150721 (ID 000825), sob a responsabilidade de **Pabyton Gonçalves Cadena e equipe; Thamiris Pinheiro Santos; Paulo Eduardo da Silva Bastos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 08/09/2021.

We certify that the proposal "TOXIC EFFECTS OF MOLECULES WITH THYROID ACTIVITY ON BIOLOGICAL PARAMETERS IN ZEBRAFISH AND DEVELOPMENT OF NANOTECHNOLOGICAL ALTERNATIVES WITH THESE MOLECULES ASSOCIATED THE ESSENTIAL OILS FOR HYPOTHYROIDISM TREATMENT (PART TWO)", utilizing 1980 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2008150721 (ID 000825), under the responsibility of **Pabyton Gonçalves Cadena and team; Thamiris Pinheiro Santos; Paulo Eduardo da Silva Bastos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 09/08/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [10/2021](#) a [10/2022](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA](#)

Espécie: [Peixes](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [0 a 6 dias](#) N: [1980](#)

Linhagem: [WT \(selvagem\)](#) Peso: [1 a 2 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) Biotério cadastrado na plataforma CIUCA-CONCEA



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso  
 Cadastro nº AA9F2DD

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AA9F2DD**  
 Usuário: **UFRPE**  
 CPF/CNPJ: **24.418.174/0001-08**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Piper aduncum**

**Schinus terebinthifolius**

Título da Atividade: **Efeitos tóxicos de compostos químicos disruptores da tireoide sobre os parâmetros biológicos em Danio rerio e desenvolvimento de alternativas nanotecnológicas com estes compostos associados a óleos essenciais para o tratamento do hipotireoidismo**

**Equipe**

<b>Pabyton Gonçalves Cadena</b>	<b>UFRPE</b>
<b>Thamiris Pinheiro Santos</b>	<b>Universidade Federal Rural de Pernambuco</b>
<b>Paulo Eduardo da Silva Bastos</b>	<b>Universidade Federal Rural de Pernambuco</b>
<b>Marília Ribeiro Sales Cadena</b>	<b>Universidade Federal Rural de Pernambuco</b>

Data do Cadastro: **18/11/2020 11:09:42**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:10 de 18/11/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**