

**ANGÉLICA IRASEMA SIBAJA LUIS**

**NANOTECNOLOGIA E AQUICULTURA: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS  
PARA CONTROLE DE DOENÇAS BASEADOS EM NANOPARTICULAS DE  
ZEINA CONTENDO EUGENOL E ÓLEO ESSENCIAL DE ALHO**

Sorocaba

2017

**ANGÉLICA IRASEMA SIBAJA LUIS**

**NANOTECNOLOGIA E AQUICULTURA: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS  
PARA CONTROLE DE DOENÇAS BASEADOS EM NANOPARTICULAS DE  
ZEINA CONTENDO EUGENOL E ÓLEO ESSENCIAL DE ALHO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Sorocaba

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp  
Instituto de Ciência e Tecnologia – Câmpus de Sorocaba

Luis, Angélica Irasema Sibaja.

Nanotecnologia e aquicultura: desenvolvimento de sistemas para controle de doenças baseados em nanopartículas de zeína contendo eugenol e óleos essenciais de alho / Angélica Irasema Sibaja Luis, 2017.

87 f. : il.

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba), 2017.

1. Nanopartículas. 2. Eugenol. 3. Aquicultura. 4. Alho. 5. Essências e óleos essenciais. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba). II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Nanotecnologia e aquicultura: desenvolvimento de sistemas para controle de doenças baseados em nanopartículas de zeína contendo Eugenol e óleo essencial de alho

AUTORA: ANGELICA IRASEMA SIBAJA LUIS

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO  
Engenharia Ambiental - ICTS/ UNESP / UNESP-Sorocaba

Prof. Dr. GERSON ARAUJO DE MEDEIROS  
ICT / UNESP/Sorocaba (SP)

Prof. Dr. RENATO GRILLO  
Pesquisador / UFABC

Sorocaba, 07 de julho de 2017

## DEDICATORIA

A meu filho, **Julio Cesar** que de forma especial me deu coragem e força nos momentos de dificuldades, valeu a pena toda distância e sofrimento, esta conquista é mais sua do que minha. Obrigada por ser a pessoa que me motiva a seguir adiante, Deus me deu o melhor presente, te amo meu Julio!

A meus pais **Heleodoro** e **Carmen** pela capacidade de acreditar em mim. Mãe, seu amor, dedicação e carinho me tornaram uma pessoa melhor a cada dia. Deus ganhou um anjo, sei que você não está mais perto de mim, mas sempre estará em meu coração. Pai, sua presença significou a segurança de que não estou sozinha nessa caminhada. Amo vocês!

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradeço a Deus por toda benção, força e coragem durante esta caminhada, por sempre me proporcionar um mundo cheio de possibilidades.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto pela orientação, disponibilidade, oportunidade e conhecimento transmitido. Me sinto muito afortunada por fazer parte de seu grupo de pesquisa. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Renata e M.S. Mariana Guilger, por todo apoio adquirido nas análises deste trabalho, sempre dispostas e disponíveis a ajudar.

Aos meus irmãos e família pelo apoio e carinho, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu namorado por sempre estar comigo em todos os momentos, obrigada pelo carinho e amor.

Um agradecimento a meu companheiro de laboratório Jhones Luiz de Oliveira, pela ajuda incondicional no dia a dia, sem você não teria conseguido.

A minha companheira e amiga, Estefânia, pela ajuda incondicional e experiência adquirida neste período, obrigada por estar sempre perto.

Aos meus companheiros (as) do laboratório Patrícia, Monica, Cintia, Anderson, Nathalie e Grillo, por fazerem parte de minha formação e pela amizade que irá continuar presente em minha vida.

Ao programa de Pós-Graduação em ciências ambientais e a Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), pela oportunidade e espaço.

Ao programa PROPAT-BRASIL-MÉXICO, pela oportunidade que me proporcionou vislumbrar um novo e grandioso horizonte.

A CONACYT pelo suporte financeiro outorgado para a realização deste trabalho.

Aos meus professores do ITSAL e UNESP, por me proporcionarem uma educação efetiva e um conhecimento de qualidade durante o processo de formação profissional.

A fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CNPq, pelo apoio concedido durante este período.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Deus deus abençoe sempre a todos!

*“Pies para qué los quiero si tengo alas para volar”*

(Frida Kahlo, 1953)

*Talvez não tenha conseguido fazer o  
melhor, mas lutei para que o melhor  
fosse feito.  
Não sou o que deveria ser,  
mas Graças a Deus, não sou o que era  
antes*

(Martin Luther King).

## SUMARIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS .....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1. <i>Doenças em peixes.....</i>	15
1.1.1. <i>Aeromonas hydrophila.....</i>	18
1.1.2. <i>Edwardsiella tarda.....</i>	19
1.1.3. <i>Streptococcus inae.....</i>	20
1.2. <i>Métodos alternativos para o controle de doenças em peixes.....</i>	20
1.2.2. <i>Eugenol.....</i>	25
1.2.3. <i>Óleo de alho.....</i>	27
1.3. <i>Nanotecnologia em aquicultura – sistemas de liberação modificada.....</i>	28
1.4. <i>Nanopartículas de zeína.....</i>	30
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1. <i>Objetivos gerais.....</i>	32
2.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	32
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. <i>Materiais.....</i>	33
3.2. <i>Metodologia Analítica para quantificação eugenol e óleo de alho.....</i>	34
3.2.1. <i>Espectrofotometria.....</i>	34
3.2.2. <i>Validação da metodologia de quantificação do eugenol e óleo de alho.....</i>	34
3.2.3. <i>Construção da curva de calibração.....</i>	35
3.2.4. <i>Seletividade.....</i>	35
3.2.5. <i>Linearidade.....</i>	35
3.2.6. <i>Precisão.....</i>	35
3.2.7. <i>Limite de detecção e quantificação.....</i>	36
3.2.8. <i>Exatidão.....</i>	36
3.3. <i>Preparo dos sistemas carreadores contendo eugenol e óleo de alho.....</i>	37
3.3.1. <i>Preparo das nanopartículas contendo eugenol ou óleo de alho.....</i>	37
3.4. <i>Estabilidade físico-química.....</i>	38
3.4.1. <i>Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão.....</i>	38
3.4.2. <i>Potencial Zeta.....</i>	39
3.4.3. <i>Análises do pH.....</i>	39
3.4.4. <i>Eficiência de encapsulação do eugenol ou óleo de alho.....</i>	39



3.5. Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	40
3.6. Caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	40
3.7. Análise morfológica por microscopia de força atômica .....	40
3.8. Cinética de Liberação do eugenol.....	41
3.8.1. Modelagem matemática .....	42
3.9. Atividade biológica <i>in vitro</i> através de disco de difusão .....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
4.1. Obtenções da metodologia analítica de quantificação do eugenol e óleo de alho.....	44
4.1.1. Curvas de calibração e adequação de metodologia analítica.....	44
4.2. Caracterização e estudo da estabilidade físico-química das nanopartículas contendo eugenol e óleo de alho .....	48
4.2.1. Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão .....	49
4.2.2. Concentração e tamanho das nanopartículas (Rastreamento de Nanopartículas) .....	51
4.2.3. Potencial zeta .....	54
4.2.4. Avaliação de alterações do pH .....	55
4.2.5. Eficiência de encapsulação .....	56
4.3. Espectroscopia na região do infravermelho .....	58
4.4. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial .....	61
4.5. Cinética de liberação do eugenol das nanopartículas .....	63
4.6. Microscopia de força atômica.....	67
4.7. Ensaio de disco de difusão .....	68
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Maiores produtores de peixe no mundo em 2014. ....	13
<b>Figura 2.</b> Modelo de três anéis Snieszko. Este modelo descreve a interação entre o hospedeiro e o meio ambiente. ....	16
<b>Figura 3.</b> Locais e mecanismos na célula bacteriana que podem ser locais de ação de óleos essenciais. ....	23
<b>Figura 4.</b> Esturura química do eugenol.....	26
<b>Figura 5.</b> Aplicações da nanotecnologia em aquicultura e seus potenciais usos em embalagem de alimentos, tratamento de água, controle de doenças e patologias, bem como diagnóstico através do uso de sensores.....	30
<b>Figura 6.</b> Método esquemático para o preparo das nanopartículas de zeína contendo eugenol e/ou óleo de alho. ....	38
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do sistema empregado para o ensaio de liberação do eugenol. O sistema utilizado consiste em um sistema doador, onde é adicionada a formulação contendo eugenol e um sistema acceptor que encontrasse em condição de diluição sink. Os dois sistemas são separados por sacos de diálise com um poro de exclusão de 15 kDa. Durante o ensaio, alíquotas são retiradas do compartimento acceptor e quantificadas por CLAE. ....	41
<b>Figura 8.</b> Curva analítica obtida para os óleos: A) Eugenol e B) Óleo de alho. Valores representam a média de três experimentos realizados em triplicata (n=9) .....	44
<b>Figura 9.</b> Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) das nanopartículas de zeína sem ativo (NP), e nanopartículas contendo eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com os dois óleos eugenol e óleo de alho (NPEA), em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Foi considerada com uma significância $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias. ....	49
<b>Figura 10.</b> Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para as nanopartículas de zeína sem ativo (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA). Valores expressos como média de três determinações. Foi considerada uma significância $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias. ....	51
<b>Figura 11.</b> Diâmetro médio (nm) pela técnica de NTA para as nanopartículas de zeína sem ativo (NP) e nanopartículas contendo eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA), em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=9). Foi considerada com uma significância $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no	

tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias. ....52

**Figura 12.** Concentração das nanopartículas pela técnica de NTA para as nanopartículas de zeína (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA), em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=9). Foi considerada com uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias.....53

**Figura 13.** Valores de potencial zeta (mV) para as nanopartículas de zeína (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA) em função de 90 dias. Valores expressos como média de três determinações. Foi considerada uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias. ....54

**Figura 14.** Perfil do pH das formulações de nanopartículas de zeína (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA) em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata. Foi considerada uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias. ....56

**Figura 15.** Eficiência de encapsulação (%) dos óleos nas nanopartículas de zeína e acompanhamento em função do tempo (90 dias), determinação em triplicata (n=3). ....57

**Figura 16.** Espectros de infravermelho para: A) Zeína pura; B) Pluronic F-68; C) Óleo essencial de alho; D) Eugenol; E) Nanopartículas carregadas com zeína; F) Nanopartículas carregadas com óleo essencial de alho; G) Nanopartículas carregadas com eugenol. Os espectros foram analisados em um equipamento de refletância total atenuada (ATR), com um total de 32 acumulações na faixa de frequência de 400 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção...60

**Figura 17.** Termogramas de calorimetria diferencial exploratória para: A) Zeína; B) Pluronic F-68; C) Mistura Física- Eugenol; D). Mistura física de óleos essencial de alho; E) Eugenol; F) Óleo de alho; G) Nanopartículas de zeína contendo eugenol - NPE; H) Nanopartículas de zeína contendo óleo de alho – NPA. ....63

**Figura 18.** Perfil de liberação do eugenol das nanopartículas de zeína (NPE). Ensaios realizado à 25 °C e valores expressos como a média de três experimentos (n=3)...64

<b>Figura 19.</b> Ajustes matemáticos para os diferentes modelos matemáticos estudados para a liberação do eugenol nas nanopartículas de zeína. A) ordem zero; B) primeira ordem; C) Higuchi e D) Korsmeyer-Peppas. ....	66
<b>Figura 20.</b> Micrografias das nanopartículas de zeína contendo A) eugenol, B) óleo de alho e C) mistura de eugenol e óleo de alho. ....	67
<b>Figura 21.</b> Representação esquemática de como foram montadas as placas com os diferentes tratamentos. ....	68
<b>Figura 22.</b> Placas de <i>Aeromonas hydrophila</i> (A), <i>Edwardsiella tarda</i> (B) e <i>Streptococcus iniae</i> (C) expostas às amostras. As placas A1, B1 e B2 referem-se a: 1. Sulfato de Neomicina 0,021mg/mL, 2. 0,210 mg/mL, 3. 0,525 mg/mL, 4. 1,050 mg/mL, 5. PLUE, 6. PLUEA e 7. PLU. As placas A2, B2 e C2 referem-se a: 1. Sulfato de Neomicina 0,021mg/mL, 2. 0,210 mg/mL, 3. 0,525 mg/mL, 4. 1,050 mg/mL, 5. NPE (5 mg/mL), 6. NPAE (5 mg/mL) e 7 NP. ....	69
<b>Figura 23.</b> Valores de halo médio formado pelo tratamento das bactérias <i>Aeromonas hydrophila</i> (A); <i>Edwardsiella tarda</i> (B) e <i>Streptococcus iniae</i> (C) após exposição as amostras de Sulfato de Neomicina (0,021mg/mL), PLUE, NPE, PLUEA, NPEA, PLU e NP (valores expressos como a média de três determinações). Comparações: a: entre os diferentes acompanhamentos; b: entre as diferentes nanopartículas; c: entre acompanhamentos e nanopartículas . Significância $p < 0,05$ . ....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais agentes patogênicos que afetam as espécies aquícolas. ....	17
<b>Tabela 2.</b> Propriedades físicas e químicas do eugenol.....	26
<b>Tabela 3.</b> Propriedades físicas e químicas da alicina. ....	28
<b>Tabela 4.</b> Condições cromatográficas do eugenol. ....	34
<b>Tabela 5:</b> Coeficientes de correlação (r) para as curvas de calibração de eugenol e Óleo de alho, realizado em três dias consecutivos. ....	46
<b>Tabela 6:</b> Valores do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações de óleos para avaliação da precisão.....	46
<b>Tabela 7:</b> Valores da concentração de eugenol, determinadas para avaliação da exatidão.....	47
<b>Tabela 8:</b> Valores da concentração de óleo de alho, determinadas para avaliação da exatidão.....	47
<b>Tabela 9:</b> Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada óleo estudado. ....	48
<b>Tabela 10.</b> Principais bandas de absorção das substâncias zeína, Pluronic F-68, eugenol e óleo de alho. ....	58
<b>Tabela 11.</b> Coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para os diferentes modelos matemáticos estudos para liberação do eugenol nas nanopartículas de zeína.....	65

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DLS: Dynamic Light Scattering

FTIR: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

NTA: Nanoparticle tracking analysis ou Rastreamento de Nanopartículas

NM: Nanomateriais;

NP: Nanopartículas de zeína

NPE: Nanopartículas de Eugenol

NPA: Nanopartículas de alho

PLU: Pluronic F-68

PDI: índice de polidispersão;

pH: Potencial hidrogênico;

ZP: Potencial zeta.

## RESUMO

A ocorrência de doenças tem ocasionado perdas severas na indústria aquícola. Em virtude do mau uso de produtos químicos no controle e prevenção de doenças em peixes, fica cada vez mais evidente que podem acarretar problemas de contaminação ambiental e riscos à saúde humana. Tem-se buscado novas técnicas de controle alternativo de doenças, como é o caso do emprego de óleos essenciais e extratos vegetais. O eugenol e o óleo de alho são antimicrobianos e antifúngicos naturais, ricos em compostos fenólicos. Entretanto, a eficácia depende da sua disponibilidade e preservação, portanto tem-se buscado alternativas capazes de aumentar sua eficácia, reduzir a volatilização e retardar a taxa de degradação no meio ambiente. Nesse sentido, novos procedimentos estão sendo conduzidos a fim de obter formulações mais eficazes. Polímeros e proteínas estão sendo estudados uma vez que possuem a capacidade de encapsular ativos. A zeína, principal proteína do milho, apresenta características de solubilidade e biocompatibilidade aos seres vivos, tornando a proteína adequada para a desenvolvimento de sistemas carreadores para encapsular ativos, tais como os óleos essenciais. Assim, objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de sistemas carreadores a partir de nanopartículas de zeína para encapsulamento de eugenol e óleo essencial de alho. As formulações apresentaram eficiência de encapsulação superior a 85% para ambos os óleos. As nanopartículas de zeína preparadas neste estudo apresentaram um tamanho médio compreendido entre 200 e 300 nm, um índice de polidispersão de 0,2 a 0,3 e potencial zeta de -31 a -27 Mv, para as nanopartículas contendo eugenol e óleo de alho, respectivamente. Sendo que as formulações se mantiveram estáveis por um período de 30 dias, e análises de infravermelho e calorimetria exploratória diferencial demonstraram a interação dos ativos com a matriz proteica de zeína. Através do ensaio de cinética de liberação do eugenol observou-se que a liberação deste das nanopartículas ocorre através do transporte anômalo. Os ensaios de disco de difusão realizados para as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Streptococcus inae*, mostraram que as formulações foram tão eficazes quanto o antibiótico comercial. Os resultados abrem novas perspectivas para a utilização de formulações baseadas em compostos naturais para o controle de doenças em peixes.

**Palavras-chave:** nanopartículas, zeína, eugenol, óleo de alho, aquíicultura

## ABSTRACT

The occurrence of diseases has caused severe losses in the aquaculture industry at any stage. Due to the misuse of chemicals in the control and prevention of fish diseases, it is increasingly evident that they can lead to problems of environmental contamination and risks to human health. It has been tried to obtain new techniques of alternative control of diseases, as it is the case of the use of essential oils and vegetal extracts. Eugenol and garlic oil are antimicrobial and natural antifungals, rich in phenolic compounds. However, the efficacy of these compounds depends on their availability and preservation, therefore we have looked for alternatives capable of increasing their effectiveness, reduce the volatilization and delay the rate of degradation in the environment. In this sense, new procedures are being conducted in order to obtain more effective formulations. Polymers and proteins are being studied due to encapsulation capacity, zein, the main maize protein, has characteristics of solubility and biocompatibility. These characteristics make zein a suitable protein for the development of carrier systems to encapsulate active (essential oils). The objective of this work was the development and characterization of carrier systems from zein nanoparticles for encapsulation of eugenol and essential oil of garlic. The formulations showed encapsulation efficiency higher than 85% for both oils. The zein nanoparticles prepared in this study had an average size of 200-300 nm, a polydispersity index of 0.2 to 0.3 and a zeta potential of -31 to -27 mV. The formulations remained stable for a period of 30 days. Infrared (FTIR) and differential calorimetry (DSC) analyzes demonstrated the interaction of the active compounds with the zein protein matrix. Through the release assays it was observed that the release of eugenol by nanoparticles occurs through anomalous transport. The diffusion disc assays performed for the bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus inae* showed that the formulations were as effective as the standard antibiotic. The results open new perspectives for their use of formulations based on natural compounds for the control of fish diseases.

**Keywords:** nanoparticles, zein, eugenol, garlic oil, aquicultur

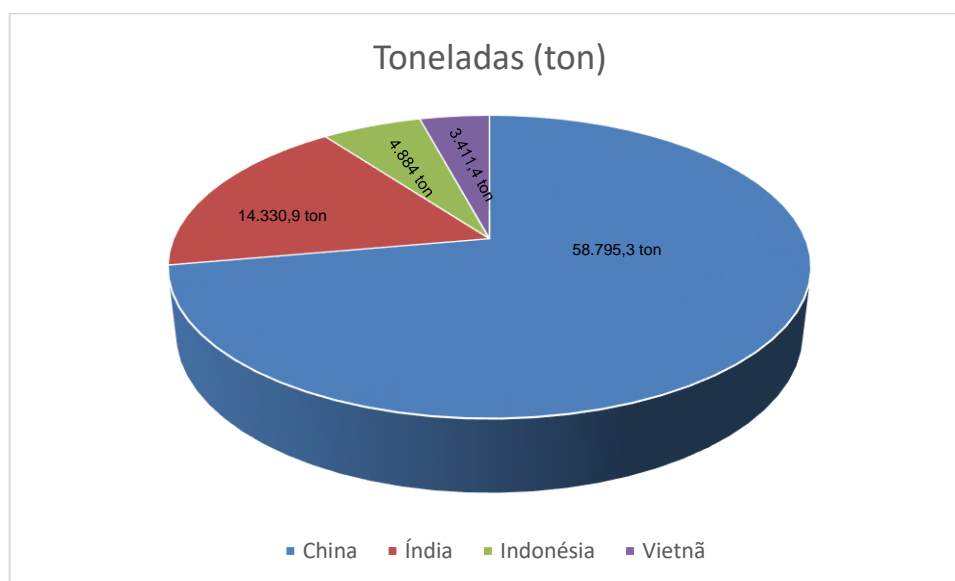


## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura tem inserção em todos os ramos da biologia, genética, ecologia e zoologia; incluindo também áreas como engenharia de pesca, a tecnologia de alimentos, a sociologia e a economia. A aquicultura como atividade produtiva de subsistência e/ou comercial, tem uma longa história, destacando-se como importante produtor de alimentos no mundo. Em 2014, a produção aquícola mundial atingiu 73,8 milhões de toneladas das quais 49,8 milhões eram peixes comestíveis, 16,1 milhões eram moluscos, 7,6 milhões eram outros organismos aquáticos, como por exemplo, as rãs e 6,9 milhões eram crustáceas. Os peixes produzidos pela aquicultura são destinados ao consumo humano, e seus subprodutos ou resíduos (esqueleto, cabeça, escamas e vísceras) são utilizados para outros fins, como por exemplo, a produção de farinhas para alimentação animal (FAO, 2016).

Conforme a FAO (2016), em 2014, 25 países foram responsáveis pela produção aquícola de mais de 200.000 toneladas (Figura 1). Com 96,3% de peixes e 99,3% de plantas aquáticas, a aquicultura tem o potencial de atingir às demandas da população, proporcionando 44% do total de peixes destinados à alimentação a nível mundial. A China destacou-se como o produtor mais importante, produzindo um total de 62% nos últimos anos.

**Figura 1:** Maiores produtores de peixe no mundo em 2014.



**Fonte:** (FAO, 2016).

No Brasil, a aquicultura é uma atividade com grande potencial de crescimento, com uma produção de 483,24 mil toneladas de peixes em 2015, dados publicados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), com uma taxa de crescimento de 1,5% em relação do ano seguinte.

A produção de camarão, a carcinicultura, atingiu 69,86 mil toneladas em 2015, representando 20,4% da produção; enquanto o cultivo de ostras e mexilhões, a malacocultura, alcançou 21,06 mil toneladas representando 2% da produção. As espécies de peixes mais cultivadas no Brasil são nativas e não nativas, entre elas: tilápia (*Oreochromis niloticus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), carpa (*Cyprinus carpio*), camarão (*Pterocladella capillacea*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), (IBEGE, 2015, PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002).

A expansão da aquicultura no Brasil está em desenvolvimento, pois o governo propôs programas de cultivo destinados a algumas espécies, tais como: camarão branco, tilápia, bivalves (moluscos) e outros peixes, como a carpa (*Cyprinus carpio*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), bagre americano (*Ictalurus punctatus*), surubím (*Pseudoplatystoma fasciatum*), entre outros, onde tais espécies obtêm bons rendimentos de produção. O governo propôs também a criação de centros de pesquisa relacionados diretamente com aquicultura. No Brasil os órgãos regulamentadores da aquicultura são: Conselho de Desenvolvimento Rural Sustentável (CODEPE), Conselho Nacional de aquicultura e Peca (CONAPE), Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Departamento de Pesca e Aquicultura (DPA) e Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP) (IBAMA, 2004; OSTRENSKY, 2008).

Um dos problemas que a aquicultura tem enfrentado os procedimentos de manejo inadequado; baixa qualidade da água; alimentação inadequada, o que leva o organismo ao estresse e aparição de doenças (OSTRENSKY, 2008). Com isso, este acaba sendo o principal problema enfrentado pela aquicultura no mundo inteiro, com perdas econômicas significantes (FAO, 2016). Nos últimos anos, as ostras na Europa, o salmão do Atlântico e o cultivo de camarão marinho em países como a Ásia, América do Sul e África, foram afetados por doenças. Em 2011, Moçambique teve perda total da produção de camarão devido a propagação de doenças. Em 1993, a China

apresentou perdas econômicas de produção calculadas em um valor cerca de US\$ 400 milhões na produção de camarão. Assim também ocorreu em 16 países asiáticos, que tiveram perdas anuais de US\$ 3 bilhões por doenças (BOYD; MCNEVIN, 2014). Ainda em relação a China, em 2010, houve perdas na produção de 1,7 milhões de toneladas por causa de doenças, contaminação e catástrofes naturais (ROMA, 2012).

### **1.1. Doenças em peixes**

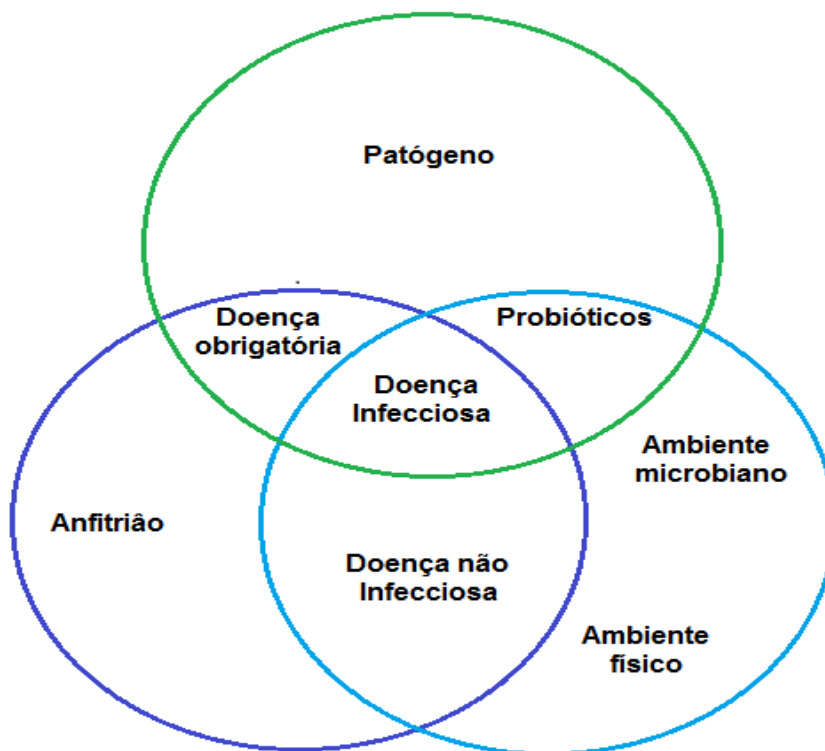
Um dos fatores que limitam a aquicultura são as doenças, que implicam na hospedagem de um agente etiológico, apresentando sinais clínicos. Os parasitas podem entrar no hospedeiro pela boca, pele, ânus e brânquias, levando a aparecimentos de sinais e sintomas próprios de enfermidade.

As doenças em peixes se dividem em infecciosas e não infecciosas, que inclui causas ambientais, genéticas e nutricionais. As doenças infecciosas são uma ameaça para a indústria aquícola, por isso, são as mais estudadas. As doenças não infecciosas são limitadas por boas práticas de manejo e higiene nas culturas (OWENS, 2012; LUCAS; SOUTHGATE, 2012).

Estas doenças podem ser provocadas por condições do meio ambiente, como a temperatura (afetando o metabolismo do peixe), gases dissolvidos na água (altas concentrações de oxigênio e nitrogênio dissolvido na água, leva a aparição de bactérias e fungos), além da eutrofização (alto teor de matéria orgânica, resultando em flutuações de oxigênio dissolvido, provocando numerosos patógenos), águas residuais (contendo resíduos domésticos, substâncias químicas, coliformes fecais e *Aeromonas*), pesticidas (causam efeito patológico no fígado, facilitando a infecção, e aumentam o estresse em peixes), contaminação industrial (causam estresse, o que facilita a aparição de doenças e infecções por agentes oportunistas), metais (cobre, zinco e outros metais causando danos na pele e brânquias, reduzindo a troca de gases levando a organismo a morte), (BARBUJO, 2013; GUZMAN, 1992).

As doenças infecciosas são representadas pelo modelo dos três anéis de Sneizko, o qual mostra as interações de três vias: a) patógeno b) hospedeiro (espécie da aquicultura) c) ambiente, (Figura. 2). (OWENS, 2012 *apud* LUCAS; SOUTHGATE, 2012).

**Figura 2.** Modelo de três anéis Sniezko. Este modelo descreve a interação entre o hospedeiro e o meio ambiente.



**Fonte:** OWENS, 2012 *apud* LUCAS; SOUTHGATE, 2012.

De acordo com este modelo, as doenças não infecciosas, são caracterizadas pela interação entre o hospedeiro e o ambiente, enquanto que as doenças infecciosas a interação entre o patógeno e o hospedeiro é obrigatória, e não precisam de estresse ambiental para causar doença clínica (OWENS, 2012 em (LUCAS; SOUTHGATE, 2012).

A maior mortalidade de peixes é causada por doenças infecciosas (SALAMA *et al.*, 2016), que podem influenciar na densidade, crescimento e qualidade da produção. Os principais agentes causadores de doenças infecciosas são vírus, bactérias, fungos, helmintos, protozoários e outros parasitas (Tabela 1). Adaptada de OWENS, 2012, em (LUCAS; SOUTHGATE, 2012)).

**Tabela 1:** Principais agentes patogênicos que afetam as espécies aquícolas.

Grupos	Gêneros
<b>Vírus</b>	<i>Vírus baciliformes, herpesvirus, iridovirus, nodavirus, rabdovirus, coronavirus, birnavirus</i>
<b>Bactérias</b>	<i>Riquétsias, Aeromonas, Enterococcus, Flavobacterium, Flexibacter, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Streptococcus, Vibrio</i>
<b>Fungos</b>	<i>Aphanomyces, Branchiomyces, Lagenidium, Saprolegnia, Sirolipidium</i>
<b>Protozoários</b>	<i>Amoebae: Neoparamoeba</i> <i>Flagelados: Hexamita, Ichthyobodo</i> <i>Ciliados: Ichthyophthirius, Trichodina</i> <i>Apicomplexa: Bonamia, Loma, Marteilia, Perkinsus</i>
<b>Helminthes</b>	<i>Dactylogyrus</i>
<b>Anelídeos</b>	<i>Polydora</i>
<b>Crustáceos</b>	“Piolhos” do peixe: <i>Isopoda, Branchiura (Argulus) Copepoda: Lernaea, Ergasilus, Mytilicola</i> <i>Caranguejos: Pinnotheridae</i>
<b>Gastrópodes</b>	<i>Pyramidellidae</i>

**Fonte:** Adaptado de OWENS, 2012, *apud* (LUCAS; SOUTHGATE, 2012).

Os parasitas são de grande interesse para a piscicultura já que são responsáveis pela mortalidade de algumas espécies de peixes cultivados (DIAS *et al.*, 2016). Os parasitas alimentam-se do sangue dos peixes e podem causar lesões bem severas. Alguns parasitas infestam as brânquias, dificultando a respiração dos peixes, causando a morte por asfixia. Um dos principais parasitas que afetam as culturas é o protozoário *Ichthyophthirus multifilis* e *Trichodina* spp. (LUQUE, 2004).

Já os vírus são microrganismos patogênicos que ploriferam somente dentro de uma célula viva, sendo responsáveis por várias doenças em peixes (CANABARRO *et al.*, 1992). Na China, foram infestadas mais de 50 espécies de peixes de água doce e marinhas, incluindo a ordem *Perciformes*, *Pleuronectiformes*, *Clupeiformes*, *Tetraodontiformes*, *Myctophiformes*, *Mugiliformes*, pelo vírus da necrose renal (FU *et al.*, 2012). As ocorrências por agentes bacterianos oportunistas são comuns em aquicultura, estas podem ser primárias ou secundárias dependendo do ambiente em

que se encontram, a bacteriose provoca altas taxas de mortalidade em peixes o que limita a produtividade dos cultivos (CARRASCHI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2012). Os gêneros *Aeromonas*, *Edwardsiella* e *Streptococcus* ou *estreptococos* uma vez que são um dos principais patógenos causadores de doenças em aquicultura, os quais podem ser encontrados em diferentes habitats. As principais espécies causadoras de doenças em peixes são: *Aeromonas hydrophila* (CARRASCHI *et al.*, 2011), *Edwardsiella tarda* (LIU; MA; *et al.*, 2017) e *Streptococcus inae* (NDONG *et al.*, 2007).

Estes parasitas podem se propagar quando os peixes estão estressados e também com mudanças drásticas nos parâmetros físico-químicos da água como: altas temperaturas, oxigênio baixo, dióxido de carbono alto, altas densidades de peixes, níveis altos de amônia, elevando a altas taxas de mortalidade (AGNEW; BARNES, 2007; NGUYEN; KANAI; YOSHIKOSHI, 2002; RUSSO; MITCHELL; YANONG, 2006)

#### 1.1.1. *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *A. hydrophila* pertencente a família das *Aeromonas*, são bacilos, gram-negativos móveis com um só flagelo (KONG *et al.*, 2017; SARKAR; RASHID, 2012). São primárias e oportunistas (MUSTHAFA *et al.*, 2016), comuns em habitats de água doce, capazes de crescer em condições anaeróbia ou aeróbia. (KONG *et al.*, 2017; KUGE *et al.*, 1992; YE *et al.*, 2013).

*A. hydrophila* é um patógeno associado a doenças graves, causando septicemia hemorrágica, ulceração dérmica, hidropisia, podridão da barbatana e cauda, distensão anormal, afetando diferentes espécies de peixes, causando enormes perdas econômicas na indústria aquícola e pesca (CIPRIANO; BULLOCK; PYLE, 1984; F. SOUZA *et al.*, 2016; KONG *et al.*, 2017; SWIFT *et al.*, 1997).

Algumas espécies de peixes de importância na aquicultura são afetadas por esta bacteriose, desde o peixe-gato de prata (*Rhamdia quelen*) (CANOVA *et al.*, 2017; F. SOUZA *et al.*, 2016), peixe-gato de canal (*Ictalurus punctatus*), perca-larga (*Micropterus salmoides*) (GOHARRIZI *et al.*, 2015), carpa (*Cyprinus carpio*) (MUSTHAFA *et al.*, 2016), Tilápia (*Oreochromis niloticus*) (AMAL; ZAMRI-SAAD; OTHERS, 2011), entre outros. Muitos antibióticos e produtos químicos são utilizados para o tratamento deste tipo de bactéria, incluindo oxitetraciclina, cloramfenicol e clortetraciclina. Porém a utilização excessiva e contínua destes fármacos trazem

problemas como a resistência ao antibiótico (CIPRIANO; BULLOCK; PYLE, 1984; F. SOUZA *et al.*, 2016).

### 1.1.2. *Edwardsiella tarda*

*Edwardsiella tarda* é uma bactéria infecciosa, tendo como principais hospedeiros, peixes, anfíbios, répteis e humanos (LIU; TANG; *et al.*, 2017a). Trata-se de uma bactéria gram-negativa, oportunista, facultativamente anaeróbia, em forma de bacilos curtos (com comprimento de 1 a 3 µm e diâmetro de 1µm), da família *Enterobacteriaceae* (HIRAI *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2008; MURATORI *et al.*, 2001). Infecta uma grande variedade de peixes, incluindo espécies de água doce e marinhos, causando a doença denominada edwardsielose (LIU; TANG; *et al.*, 2017b; SHINYOSHI *et al.*, 2017).

As espécies mais susceptíveis a esta bactéria são: enguias (*Anguilla angilla*), Enguia-japonesa (*Anguilla japonica*), truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa (*Cyprinus carpio*), Psetta máxima (*Scophthalmus maximus*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), Pargo-japonês (*Pagrus major*), Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), Tainha (*Mugilidae*), (LIMA *et al.*, 2008; PARK; AOKI; JUNG, 2012; SUN *et al.*, 2017). Esta bacteriostase traz perdas econômica na aquicultura do mundo inteiro.

A aparição desta bactéria pode estar relacionada as altas temperaturas da água, teores elevados de matéria orgânica e oxigênio baixo (PARK; AOKI; JUNG, 2012). *E. tarda* ocasiona uma natação anormal do peixe, tais como, movimento em espiral e flutuação perto da superfície da água. Os sinais clínicos incluem: septicemia hemorrágica, lesões na pele e vísceras, úlcera, despigmentação cutânea, necrose da linha lateral, nódulos nas brânquias, nódulos brancos no baço, rins e fígado, apresentando uma taxa de portadores entre 5 a 70 % e uma taxa de mortalidade de 5 % e 30 % (MURATORI *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2009).

Alguns antimicrobianos são usados para o controle desta doença aprovados pela FDA, entre eles estão, florfenicol e oxitetraciclina. A dosagem e modo de uso pode variar de acordo com a legislação de cada país (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014).

### 1.1.3. *Streptococcus inae*

*Streptococcus inae* (família *Streptococcus*), tratam-se de bactérias gram-positivo oportunistas que constituem cadeias em forma de cocos, facultativamente anaeróbia, causando uma infecção que também pode ser zoonótica (BAIANO; BARNES, 2009; COLORNI *et al.*, 2002; FERGUSON; MORALES; OSTLAND, 1994; NEELY; PFEIFER; CAPARON, 2002). Esta doença septicêmica afeta espécies de peixes de água doce e salgada (FERGUSON; MORALES; OSTLAND, 1994). Os primeiros relatos da infecção por *estreptococos inae* foi em 1976, afetando o golfinho de água doce (*Inia geoffrensis*) amazônico, causando a doença da “bola de golfe” (AGNEW; BARNES, 2007).

As culturas de peixes são socioeconomicamente afetadas por esta bactéria, podendo atingir viveiros de salmão coho (*Oncorhynchus kisutch*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa-comum (*Cyprinus carpio*), tilápia (*Oreochromis niloticus*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) assim como espécies de peixes ornamentais incluindo: peixe-zebra (*Danio rerio*) Rabo-amarelo (*Thripophaga macroura*), Barbo rosado (*Pethia conchonius*), peixe tetra (*Hyphessobrycon*), ciclídeo limão (*Neolamprologus leleupi*) (SUN *et al.*, 2017), e pode causar de 30 a 50 % de mortalidade (AGNEW; BARNES, 2007; NDONG *et al.*, 2007; RUSSO; MITCHELL; YANONG, 2006; WEINSTEIN *et al.*, 1997).

Uma característica deste parasita é que causa meningoencefalites em peixes, septicemia, hemorragia interna grave, deformidade vertebral, e letargia (AGNEW; BARNES, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2012; RUSSO; MITCHELL; YANONG, 2006). Alguns antibióticos como florfenicol, eritromicina, amoxicilina são usados para o tratamento dessas doenças em peixes (FIGUEIREDO *et al.*, 2012; RUSSO; MITCHELL; YANONG, 2006).

## 1.2. Métodos alternativos para o controle de doenças em peixes

A aplicação de produtos químicos para o controle de doenças tem uma longa história no mundo, iniciando com o uso de banhos de sal (cloreto de sódio), para o controle de ectoparasitos. A formalina é usada para o controle de protozoário flagelado costia (*Ichtyobodo*); desinfetantes como cobre e verde de malaquita são compostos eficazes para o controle de *I. multifiliis*, um protozoário que infecta espécies de água doce entre outros (BRAVO, 2005; PICÓN-CAMACHO *et al.*, 2012).



A *Food and Drug Administration* (FDA), verificou através de estudos que o verde de malaquita quando empregado no controle de doenças de peixe deixa resíduos na carne de animais como o salmão, truta, tilápia, camarão e bagre. Desta forma, seu uso foi proibido no controle de doenças de organismos aquáticos para consumo humano. Nos últimos anos são usados outros compostos incluindo peróxido de hidrogênio, cloreto de sódio, sulfato de cobre e formaldeído (BRAVO, 2005).

Amoxicilina, enrofloxinz, eritromicina, florfenicol (FFC) e oxitetraciclina (OTC), são exemplos de alguns dos antibióticos mais utilizados para bactérias gram negativas causadoras de infecções em peixes, e que apresentam baixa toxicidade nesses organismos (CARRASCHI *et al.*, 2011; HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011). O uso indiscriminado destes antibióticos, resultam no desenvolvimento de resistência de algumas bactérias ao fármaco. A resistência que apresenta ao uso de antibiótico em aquicultura é uma das maiores preocupações, já que as drogas geralmente ficam expostas no meio ambiente (BILA; DEZOTTI, 2003; GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014).

A terapia com antibióticos não é eficaz no caso de doenças virais. Para estes tipos de doenças acredita-se que a vacinação seja uma forma mais eficaz de controle, porém, há problemas associados com o uso de vacinas, como por exemplo, custo de produção onerosa, imunogenicidade e competição antígena (FU *et al.*, 2012).

Conforme ROMA, (2012), a FDA proibiu o uso de alguns antibióticos na aquicultura por apresentar riscos à saúde humana, dentre eles, destacam-se o cloramfenicol, clenbuterol, dietilstibestrol (DES), dimetridazol, ipronidazol, furazolidona, nitrofurazona, fluoroquinolones e glicopéptidos.

Nos Estados Unidos, a aplicação de fármacos em peixes de consumo é bastante restrita pela FDA. As indústrias aquícolas são obrigadas a vigiar os fatores de riscos (ação preventiva) minimizando o risco de aparecimento de doenças. Os fármacos aprovados pela FDA nos Estados Unidos são formalina, sulfadimetoxina/ormetoprim, sulfamerazina, oxitetraciclina, metasulfanato de tricáina e peróxido de hidrogênio (GONZÁLEZ-MANTILLA, 2010). No Brasil, apenas o florfenicol está aprovado para uso na aquicultura. Há também compostos de baixa prioridade que são empregados em condições específicas, tais como, ácido acético, óxido de cálcio, cebola, alho, cloreto de sódio, potássio e cálcio, papaína, iodo e bicarbonato de sódio. A natureza química destes compostos é de baixa complexidade e fácil biotransformação no organismo e ambiente. Uma grande parte dos fármacos é

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

O uso de produtos químicos na aquicultura pode ser prejudicial na cadeia alimentar e para o meio ambiente. Desta forma, tem-se buscado métodos alternativos para o controle de doenças em organismos aquáticos. Dentre estas novas alternativas, destaca-se o uso de produtos de origem vegetal, pois apresenta alta disponibilidade, eficácia no controle de patógeno e baixa toxicidade (DE QUEIROZ; DE ALMEIDA, 2013).

### **1.2.1. Óleos essenciais no controle de doenças em peixes**

Nos últimos anos tem se intensificado o uso de ervas medicinais, pois estas podem resolver alguns problemas como a diminuição do uso de antibióticos na aquicultura (REVERTER *et al.*, 2014). Os produtos naturais vegetais são amplamente usados como promotores do crescimento, estimulante de apetite, como anti-estresse, tônico e imunoestimulantes em camarões e peixes (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011).

Os produtos químicos extraídos das plantas medicinais se dividem em metabólitos primários, que se encontram principalmente em órgãos de armazenamento e sementes e são parte do metabolismo celular básico. Os metabólitos secundários são derivados dos metabólitos primários e são usados como compostos ativos pelo aroma forte e pela ação como pesticidas (CHAGAS, 2004).

Os alcalóides, os flavonoídes, pigmentos, fenóis, as saponinas e os óleos essenciais estão entre os compostos secundários mais estudados (BALAKRISHNAN; KUMARAN; OTHERS, 2011). Tais compostos são normalmente extraídos por inúmeros processos, entre os quais estão: meio de vapor ou hidro destilação, etc. (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

Conforme BAKKALI *et al.*, (2008), os óleos essenciais são compostos complexos e únicos contendo de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. São divididos em terpênicos e aromáticos, dependendo do metabólito principal (ácido chiquímico e acetato) via metabolismo da glicose. Essa classificação independe da complexidade do óleo essencial.

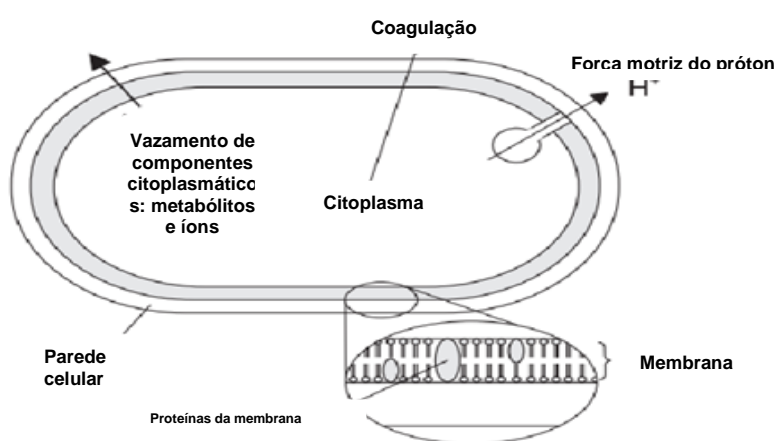
Os óleos são líquidos, voláteis, lípidos, sintetizados por todas as partes das plantas e armazenados em células secretoras, epiderme entre outras. São solúveis em solventes orgânicos e lipídeos, que geralmente possuem densidade menor que a

da água, como por exemplo o etanol, o qual facilita a evaporação e lixiviação na água (MONTES; SANTANA-NETA; CRUZ, 2014; SUTILI *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais são caracterizados pelo forte odor e conhecidos por apresentarem diferentes propriedades biológicas, organolépticas, como ação fungicida (ZABKA; PAVELA; SLEZAKOVA, 2009), bactericida, (AQUINO *et al.*, 2010; GONZÁLEZ-MANTILLA, 2010), atividade antioxidante (BURT, 2004), (ROCÍO TERUEL *et al.*, 2015), larvicida, (ARAUJO, 2014), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES, 2012), e atividade antitumoral (MOMESSO; MOURA; CONSTANTINO, 2009).

De acordo com GUSTAFSON *et al.*, (1998), os óleos essenciais tem um mecanismo de ação específico. As localizações na célula bacteriana que podem ser considerados sítios de ação dos óleos essenciais estão descritos na Figura 3. Os componentes fenólicos dos óleos essenciais têm capacidade de degradar a parede celular e lesar a membrana citoplasmática. A hidrofobicidade destes permite a saída de íons, moléculas e outros conteúdos da célula. Estes também envolvem diferentes mecanismos tais como: fluxo de elétrons, força próton motora coagulação do conteúdo das células, transporte ativo e excitação da membrana citoplasmática (BURT, 2004).

**Figura 3.** Locais e mecanismos na célula bacteriana que podem ser locais de ação de óleos essenciais.



**Fonte:** adaptado de (BURT, 2004)

As propriedades biológicas e biofísicas dos principais constituintes dos óleos essenciais imprimem as características destes compostos. A intensidade da resposta

varia dependendo da concentração usada e se são testados combinados ou não. (IPEK *et al.*, 2005).

O principal responsável pela atividade antimicrobiana dos óleos essenciais são os compostos fenólicos. Pesquisas demonstram que existe uma relação entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antimicrobiana, pois quanto maior o número destes compostos presente no óleo essencial, maior sua atividade antimicrobiana. Todavia, há outros estudos que mostram que em menores quantidades ou traços também apresentam um papel fundamental na atividade antimicrobiana, isto se deve ao efeito de sinergia que é o efeito que tem com outros componentes (BURT, 2004).

A utilização de óleos essenciais para o tratamento de doenças em peixes já tem sido demonstrada na literatura. Estes podem ser empregados como estimulante do apetite, antiparasitário, promotor de crescimento, redutor de mortalidade e estresse (CAMPAGNOLO *et al.*, 2013). A aplicação dos óleos essenciais na prevenção e tratamento de doenças em peixe pode ser feita de duas formas: adicionando os óleos na ração; ou por banhos terapêuticos (CHAGAS, 2004). Tais produtos naturais e sintéticos são uma nova ferramenta na aquicultura no intuito de diminuir mortalidade e estresse em peixes.

As vantagens do uso dos produtos naturais é que não causam problemas de resíduos, efeitos negativos sobre a saúde dos peixes, homem e ambiente (EMBRAPA, 2015). Assim estes podem ser usados como tratamento alternativo de bactérias, ectoparasitas em peixes e fungos (CHITMANAT *et al.*, 2005).

O óleo de cravo é muito usado como anestésico na aquicultura, algumas pesquisas indicam a efetividade deste óleo em algumas espécies de peixes como, pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), peixe gato (*Rhamdia quelen*), robalo (*Centropomus undecimalis*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (MURGAS *et al.*, 2010). CHITMANAT *et al.*, (2005), relata que o uso de eugenol extraído das folhas de amêndoa indiana foi eficaz contra *Staphylococcus aureus*. CHITMANAT *et al.* (2005) também relataram que, estudos *in vitro* mostraram que os extratos de *Terminalia catappa*, apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*.

Outros óleos extraídos das plantas *Zingiber officinale* (Gengibre), *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo), *Lippia alba* (erva-cidreira), *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) tem efeito bacteriostático (inibem o

crescimento) e bactericida (produzem a morte da bactéria), contra *Aeromonas hydrophila*, causador de doenças em peixes (EMBRAPA, 2015).

Estudos recentes demonstraram que o óleo essencial de casca de laranja doce (*Citrus sinensis*), adicionados na dieta de *Oreochromis mossambicus*, mostram um aumento no crescimento dos peixes, diminuição de colesterol e triglicérides, assim como diminuição na morte de peixes infestados por *Escherichia tarda* e *Streptococcus iniae* (ACAR *et al.*, 2015; BABA *et al.*, 2016).

Resultados semelhantes apresentados por ZHENG *et al.* (2009), onde foi comprovado que a adição de timol e carvacrol na dieta de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) resultou em aumento do crescimento e diminuição da mortalidade dos peixes infectados por *Aeromonas hydrophila* quando comparado com peixes controles, ou seja, não tratados com os bioativos.

O uso de óleo essencial de alho (*Allium sativum*) como suplemento na dieta dos peixes aumenta o crescimento em espécies de peixes como truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), esturjão esterlino (*Acipenser ruthenus*), *Epinephelus coioides*, *Clarias gariepinus* e *On cichlid*. O óleo de alho também foi capaz de remover protozoários do gênero *Trichodina sp.* em tilápia e *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (GABOR; ŞARA; BARBU, 2010; SAGHAEI; GHOTBEDDIN; GHATRAMI, 2015; SHAKYA; LABH, 2014). O principal constituinte do óleo essencial do alho, a alicina, atua como bactericida contra algumas bactérias patogênicas como: *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas punctata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Fibrobacter intestinalis*, *Myxococcus piscicola*, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda* (SHAKYA; LABH, 2014).

A baixa estabilidade, volatilização e deterioração dos produtos naturais e muitos medicamentos, em água natural, levam a explorar novos sistemas de administração de fármacos. Nesse contexto a encapsulação e microencapsulação poderiam ser uma alternativa para aumentar a vida útil, melhorar a solubilidade e estabilidade em água, dos óleos essenciais ou compostos aromáticos, a fim de envolver sistemas de revestimento para proteger o ativo de interesse (FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010; HANDY, 2012; SUTILI *et al.*, 2017).

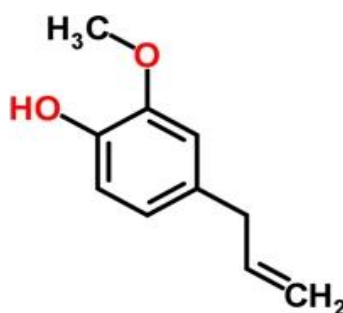
### 1.2.2. Eugenol

O eugenol é encontrado em diferentes tipos de especiarias como canela, folhas de louro, manjeriço e em óleo de cravo. Eugenol é o principal componente do óleo de cravo, possui odor fortemente aromático e é muito utilizado devido ao seu

poder antisséptico, anti-inflamatório e atividade inseticida (CARRASCO A. *et al.*, 2008). Pode ser extraído por destilação a vapor, a partir de gemas de flores secas, que contem 36 componentes entre os quais o eugenol apresenta a maior concentração (DANIEL *et al.*, 2009).

Eugenol ou 1-hidróxi-2-metoxi-4-allilbenzeno (Figura 4) é um composto fenólico com uma concentração que varia de 70 a 85 % da composição do óleo essencial de cravo (MARTINS; CORTEZ; FELIPE, 2009). As propriedades físico-químicas são descritas na Tabela 2.

**Figura 4.** Esturura química do eugenol.



**Tabela 2.** Propriedades físicas e químicas do eugenol

Propriedades	Eugenol
Nomenclatura	l-hydroxy-2-methoxy-4-allylbenzene
Formula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	164,20 g mol <sup>-1</sup>
Ponto de ebulição	253,5°C
Densidade (25°C)	1,064 g/cm <sup>3</sup>
Características	Liquido incoloro ou amarelado
Solubilidade	Solúvel em álcool etílico, éter, clorofórmio e óleo, mas pouco solúvel em água. 1 mL de eugenol e solúvel em 2 mL de álcool 70 %.

Adaptado de DA SILVA, *et al.*, (2012)

A sua utilização como agente antimicrobiano e propriedades bactericidas contra *Alicyclobacillus spp*, *E. coli* e *S. aureus*, foi avaliada em OLIVEIRA; ABREU FILHO,

(2012); PEREIRA, ALCILENE DE ABREU *et al.*, (2008). Em alguns trabalhos, o eugenol apresenta efeitos anti-inflamatório, cicatrizante e analgésico (SILVA, REJEANA MÁRCIA LIMA, 2010), além da sua atividade fungicida e nematicida (MAZZAFERA, 2003). Em algumas espécies de peixes como, pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), o eugenol foi testado como anestésico em diferentes concentrações, com a finalidade de minimizar o uso de substâncias analgésicas em peixes, (MOREIRA *et al.*, 2010; VIDAL *et al.*, 2008; MURGAS *et al.*, 2010; ROTILI *et al.*, 2012)).

### 1.2.3. Óleo de alho

O alho (*Allium sativum*) é um vegetal que pertence à mesma família da cebola e da cebolinha e as liliáceas, composto principalmente de aminoácidos, metais (manganês, alumínio, selênio e zinco) e vitaminas (A, B e C) assim como de compostos fenólicos (SANTOS, 2013). O gênero *Allium* constitui mais de 600 espécies diferentes, estes componentes foram avaliados por civilizações antigas como produtos medicinais para o tratamento de doenças (BLOCK *et al.*, 1993).

Alguns dos primeiros relatos sobre o alho como medicamento foram encontrados desde 2600 a 2100 a.C. O alho tem sido muito utilizado desde os tempos antigos na China e na Índia tendo efeitos sobre doenças cardiovasculares. Também é reconhecido pelo uso terapêutico para diferentes micro-organismos incluindo bactérias, protozoários, vírus e fungos (DAKA, 2011).

O cheiro e sabor forte do *Allium sativum* deve-se principalmente a presença de compostos de enxofre principalmente: alicina, alliina, ajoeno, sulfeto de alil-mercaptao, dialil-dissulfido e S-acil-cisteína. O processo de destilação do alho é via vapor, as condições de extração definem que compostos de enxofre podem ser extraídos. CARVALLITO e colaboradores em (1994) identificaram o componente alicina, através de uma extração alcólica.

A alicina é um composto instável e se decompõe na presença de compostos sulfurados, mas mesmo assim esta apresenta ação bactericida e antifúngica. Outros compostos já identificados no óleo de alho são os derivados sulfetos tais como: dissulfureto de alil, trissulfureto e dialil. Estes compostos diluídos no óleo essencial são os responsáveis pelo seu odor forte de alho. A Tabela 3 mostra as propriedades físicas e químicas da alicina (GAFAR *et al* 2012; TURNER; MOLGAART; MARCKMANN, 2004).

**Tabela 3.** Propriedades físicas e químicas da alicina.

Propriedades	ALHO		
Nomenclatura	2-propeno-1-ácido propenílico	sulfinotiótico	S-2-éster
Formula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> OH <sub>2</sub>		
Peso molecular	162,28 g.mol <sup>-1</sup>		
Ponto de ebulição	Sem dados		
Densidade (25°C)	1,112 g/cm <sup>3</sup>		
Características	Amarelo claro		
Solubilidade	Solúvel em etano e insolúvel em água		

O óleo de alho é considerado seguro, segundo a Food and Drug Administration (FDA), sendo usado desde a indústria alimentícia em produtos como carnes e frango como agente antimicrobiano natural. Na indústria farmacêutica é empregado para a prevenção de algumas doenças cardiovasculares e cancerígenas, e também apresenta atividade antioxidante, antifúngica e efeito como antibiótico. Um dos problemas que tem enfrentado o uso de alho na indústria alimentícia é o odor forte, volatilização e baixa solubilidade, (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2008; RAFE, 2014).

### 1.3. Nanotecnologia em aquicultura – sistemas de liberação modificada

A ampla utilização dos produtos químicos na indústria aquícola, às vezes de maneira indiscriminada, em cultivos de pequenos e médios produtores, causa um risco de toxicidade para os organismos não alvos e poluição ambiental, (GONZALEZ *et al.*, 2014).

Porém, tem se buscado alternativas viáveis como, inseticidas menos tóxicos (produtos naturais), biodegradável, e mais seguros para o meio ambiente, (GONZALEZ *et al.*, 2014). Através da nanotecnologia, podem-se desenvolver novas formulações com compostos ativos de interesse na indústria da aquicultura e pesca.

Nos últimos anos o termo “nano” vem sendo modificado conforme os avanços da ciência e tecnologia, mas ainda não há um consenso internacional específico neste

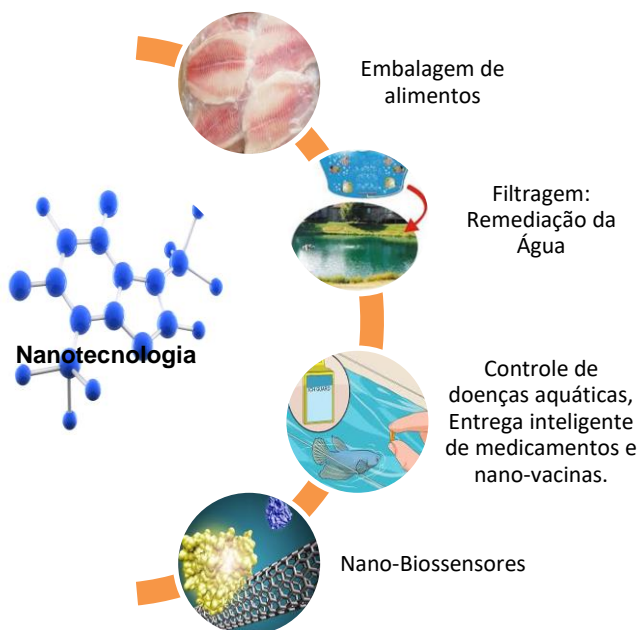


campo. A Organização Internacional de Normalização (ISO/TS 80004-1, 2015), refere-se ao termo “nano” como uma dimensão de 1 a 100 nm. EUROPEAN COMMISSION, 2013, define nanotecnologia como estrutura de 1 a 100 nm. Estas definições podem mudar de agência regulatória para outra, uma vez que também são consideradas outras propriedades da matéria em escala nano, tais como: tamanho, concentração, agregação das nanopartículas, área superficial, reatividade, entre outras (CALDERÓN-JIMÉNEZ *et al.*, 2017; MILLER, 2005; MOHANRAJ; CHEN; OTHERS, 2006; RATHER *et al.*, 2011).

Basicamente o desenvolvimento de formulações baseadas em nanopartículas como sistemas carreadores apresentam propriedades como o aumento da solubilidade dos compostos ativos, liberação de forma lenta e/ou proteger contra a degradação prematura do ativo encapsulado (KAH, M. *et al.*, 2013). Na aquicultura, a utilização destes tipos de formulações pode resolver muitos problemas como o aumento da estabilidade e eficiência de produtos naturais.

A nanotecnologia tem potencial para resolver muitos problemas relacionados com a saúde animal, reprodução e produção. Atualmente, existem inúmeros vislumbres da aplicação futura como, desempenhar inumeráveis materiais de construção, de filtração e purificação de água, assim como novas abordagens para o diagnóstico de saúde em peixes (vacinas, drogas, hormônios e nutrientes) e criação de animais (colheita e pós- colheita) (Figura 5), (DOMINGUEZ, 2014; RATHER *et al.*, 2011). Entre eles, destacam alguns trabalhos de (ASHRAF, 2011; HANDY, 2012; JARIYAPONG *et al.*, 2015; RATHER *et al.*, 2011). A literatura apresenta possíveis benefícios e oportunidades da nanotecnologia nas culturas. (EXPLICAR OS TRABALHOS)

**Figura 5.** Aplicações da nanotecnologia em aquicultura e seus potenciais usos em embalagem de alimentos, tratamento de água, controle de doenças e patologias, bem como diagnóstico através do uso de sensores.



Na indústria aquícola muitos produtos estão na fase de pesquisa ou desenvolvimento. Um deles é a vacinação contendo nanopartículas para tratar doenças em peixes. No entanto, umas das preocupações associadas a isto é a distribuição de tamanho das nanopartículas, as quais pode trazer riscos ao organismo. As nanopartículas têm várias vantagens, como a liberação sustentada de vacinas (solubilizar drogas para entrega intravascular) e melhorar a solubilidade de antígenos da vacina contra a degradação enzimática (BHATTACHARYYA *et al.*, 2015; RATHER *et al.*, 2011). Apesar das vantagens do desenvolvimento destes sistemas nanotecnológicos, é necessário a segurança ambiental no uso de solventes e a observação do seu comportamento no ambiente, assim com os efeitos no organismo alvos e não alvos.

#### 1.4. Nanopartículas de zeína

Os polímeros naturais são de grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação de ativos. Por apresentar biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade (LUO; WANG, 2014). Entre os polímeros naturais mais usados encontra-se a zeína representando 45-50 % da proteína do

milho (SHUKLA; CHERYAN, 2001; WU; LUO; WANG, 2012). A zeína é uma proteína que contém principalmente os aminoácidos alanina (10 %), glutamina (22-2 %) e leucina (20 %), o que a confere característica hidrofóbica e solúvel em etanol 90 %, acetona, ácido acético, etc. (DA ROSA *et al.*, 2015a). Com base na solubilidade e massas moleculares a zeína pode ser separada em quatro classes:  $\alpha$ -zeína,  $\beta$ -zeína,  $\gamma$ -zeína e  $\delta$ -zeína, sendo a maior a  $\alpha$ -zeína, a qual compreende 70-85 % da zeína encontrada no milho (ZHANG, YONG *et al.*, 2015).

O interesse científico pela zeína se deve principalmente pela capacidade de formar filmes biodegradáveis, flexíveis, revestimentos resistentes e hidrofóbicos a baixo custo e a prova de ataque antimicrobiano o que facilita a formação de micro/nanopartículas como sistemas de entrega de nutrientes e fármacos (LUO; WANG, 2014; KIM; XU, 2008; SHUKLA; CHERYAN, 2001a).

Atualmente, a zeína é usada na fabricação de tecidos, placas laminadas, plásticos, na área farmacêutica e usada para revestimento e mascaramento de cápsulas e aromas (TORRES *et al.*, 2015). ZHANG, YONG *et al.*, (2015) e colaboradores relatam que a zeína é biocompatível com fibroblastos embrionários de ratos e células do fígado humano. Além disso, comprimidos, películas, filmes, revestidos de zeína exibem uma maior resistência a altas temperaturas, humidade, adaptando os bioativos para ser liberados e entregues de uma maneira controlada. Como exemplo, nanopartículas de zeína contendo timol estabilizadas com caseinato de sódio (SC) e cloridrato de quitosana (CHC), foi demonstrado que as nanopartículas de timol estabilizadas com SC apresentaram uma inibição do crescimento de *S. aureus* após 12 e CHC após 16 horas, indicando que as nanopartículas de timol apresentaram maior atividade antimicrobiana em um período de tempo mais longo do que o timol livre. Também foi relatado que as nanopartículas estabilizadas aumentaram a eficiência de encapsulação para timol (ZHANG, YAQIONG *et al.*, 2014). WU; LUO; WANG, (2012) mostrou que as nanopartículas de zeína contendo timol e carvacrol apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*. Este trabalho também relata que os óleos essenciais encapsulados em nanopartículas de zeína, aumenta sua solubilidade em água, o que aumenta a aplicação dos óleos essenciais na indústria alimentícia.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve como principal objetivo preparar e caracterizar sistemas nanocarreadores produzidos a partir da proteína zeína para eugenol e óleo de alho, a fim de aumentar a eficiência dos compostos bioativos, diminuir possíveis impactos e viabilizar sua aplicação em aquicultura. Além do preparo e caracterização, foram investigadas também a atividade biológica (*in vitro*) dos sistemas carreadores (com ou sem o composto) em culturas de bactérias patogênicas de peixes

### 2.2. Objetivos específicos

Este trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do óleo de eugenol e óleo essencial de alho através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria respectivamente;
- Preparo dos sistemas nanocarreadores contendo óleo de alho e eugenol;
- Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química dos sistemas nanoestruturados contendo os biocidas em função do tempo: medidas de eficiência de encapsulação, medidas de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão (espectroscopia de correlação de fótons e microeletroforese) e fotoestabilidade;
- Estudo da interação entre os biocidas/sistemas carreadores por calorimetria diferencial exploratória e infravermelho;
- Avaliação da morfologia das partículas por microscopia de força atômica - MFA;
- Realização de ensaios de cinética de liberação do biocida na presença e na ausência dos sistemas carreadores e aplicação de modelos matemáticos para elucidar o possível mecanismo de liberação dos ativos;
- Avaliação da atividade biológica das formulações contendo o biocida em três cepas de bactérias *Aeromona hydrophila*, *Aeromona Edwardsiella tarda* e *Streptococcus inae*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

- Eugenol - Sigma®
- Óleo essencial de alho - Sigma®
- Pluronic F-68 – Sigma®
- Álcool Isopropílico - Merck®
- Acetonitrila (grau HPLC) – JT Baker®
- Filtros de 45µm - Millipore®
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa- Millipore®
- Agitador magnético - Tecnal®
- Analisador de partículas Zetasizer Nano - Malvern®
- Microcentrifuga – MiniStar®
- Microscopia de Transmissão – Zeiss LEO® 906
- DCS Q20 – TA Instruments®
- Espectrofotômetro de FI-IR 660, Varian®
- pHmetro – MS TechnoPON®
- Placas de petri
- Béqueres
- Hipoclorito de sódio
- Espécie vegetal: *Allium cepa* (Cebola)
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Varian® ProStar
  - Bomba OS 210 solvent delivery module - Varian®
  - Detector UV-Vis OS 210 - Varian®
  - Coluna cromatográfica Varian® C18 fase reversa, 5µ110A, 250X4, 60mm
  - Software Galaxie Workstation

### 3.2. Metodologia Analítica para quantificação eugenol e óleo de alho

A quantificação do eugenol foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando equipamento da *Agilent Varian Pro Star*. Através do ajuste do método cromatográfico ideal, construiu-se uma curva analítica para o biocida, a fim de quantificar a eficiência de encapsulação destes nas nanopartículas. As condições cromatográficas para eugenol estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas do eugenol.

Amostra	Eugenol
<b>Fase Móvel</b>	Acetonitrila/água (50/50) (v/v)
<b>Volume de injeção</b>	100 µL
<b>Fluxo</b>	0,75 mL/min
<b>Temperatura</b>	Ambiente (25°C)
<b>Detector</b>	Ultravioleta (UV), $\lambda = 225$ nm
<b>Coluna Cromatográfica</b>	Varian® C18 fase reversa 5µ 110A, 250x4, 60mm

#### 3.2.1. Espectrofotometria

A quantificação do óleo de alho foi realizada através de um detector UV-VIS, sendo as medidas realizadas no comprimento de onda de 217 nm. Foi construída uma curva analítica para o biocida a fim de que possa ser utilizada para determinação da eficiência de encapsulação do composto nas nanopartículas.

#### 3.2.2. Validação da metodologia de quantificação do eugenol e óleo de alho

Para que um método analítico seja confiável é preciso à obtenção de condições analíticas. Desta forma os métodos estatísticos devem ser adequados para que os resultados possam ser interpretados corretamente. A validação de um método permite demonstrar que ele é apropriado ao uso desejado. As principais características para a validação de um método analítico são os seguintes: exatidão, linearidade, precisão, limite de quantificação (LQ) é limite de detecção (LD), (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2013). Neste trabalho a metodologia de quantificação dos óleos foi avaliada a partir dos documentos da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA, 2002).

### **3.2.3. Construção da curva de calibração**

Soluções com diferentes concentrações de eugenol foram preparadas para a construção da curva analítica em soluções na faixa de concentração de (1-5 $\mu$ g/mL) e analisadas em triplicata por CLAE, conforme as condições analíticas apresentado na Tabela 6. Para o óleo de alho soluções na faixa de concentração entre 5-10  $\mu$ g/mL foram preparadas e analisadas através de um espectrofotômetro UV-VIS. Três diferentes curvas foram analisadas em três dias consecutivos, sendo que a curva média (n=9) foi usada como padrão para a quantificação dos óleos.

### **3.2.4. Seletividade**

A especificidade ou seletividade está relacionada com a eficácia de uma metodologia em detectar um composto de interesse na presença de impurezas e outros compostos, particularmente produtos de degradação e constituintes da matriz (ANVISA, 2002). A avaliação da especificidade do método analítico para quantificação dos óleos foi realizada a partir de injeções do composto utilizado para o preparo das nanopartículas sem adição dos óleos.

### **3.2.5. Linearidade**

Resultados linearmente proporcionais à concentração do analito em uma amostra confere ao método a capacidade de linearidade, dentro de um intervalo de concentração. Inmetro recomenda que a linearidade seja originada pela análise de 5 concentrações diferentes (mínimo), e seus resultados deverão ser tratados por métodos estatísticos adequados para determinação do coeficiente de correlação (r). De acordo com ANVISA e INMETRO o valor de (r) deve ser acima de 0,99 (BRASIL, 2003, INMETRO, 2011).

A linearidade foi determinada a partir das curvas analíticas realizadas em três dias consecutivos, sendo um total de três curvas com seis concentrações compreendidas para eugenol diluída em acetonitrila/água, e para alho de diluída em metanol.

### **3.2.6. Precisão**

A precisão do método avalia a proximidade entre uma série de várias medidas efetuada de uma mesma amostra. Esta é avaliada através de níveis, repetibilidade

(precisão intra-corrída): concordância entre um curto período de tempo, verificada no mínimo 9 determinações. Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância dos resultados obtidos em dias diferentes um mínimo de dois dias (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativa (DPR), segundo a (equação 1).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

Onde CMD é a concentração media determinada e DP é o desvio padrão. Vários parâmetros são empregados para definição do valor máximo aceitável, como a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, onde os valores não podem ser superiores a 5 % (BRASIL, 2003).

### 3.2.7. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém não pode ser quantificada com precisão, sob as condições experimentais estabelecidas, enquanto que o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com aceitável precisão e exatidão nas condições experimentais estabelecidas.

A estimativa dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizados a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às Equações 2 e 3 (ANVISA, IMMETRO).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (3)$$

Onde, DP é o desvio padrão do coeficiente linear com o eixo y e IC é o coeficiente angular da curva analítica média.

### 3.2.8. Exatidão

Por este método pode ser determinada a concordância entre o valor real do analito na amostra e estimado pelo processo analítico. Esta é avaliada dentro de um dado nível de confiança e dentro de certos limites. Este método deve ser determinado



após o estabelecimento do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo analisada a partir três, concentrações, baixa, média e alta, com três determinações, as quais se devem encontrar dentro do intervalo linear da curva analítica. A exatidão pode ser expressa pela relação média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 4, (BRASIL, 2003).

$$Exatidão = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (4)$$

Onde, CMD é concentração média experimental e CT é a concentração teórica.

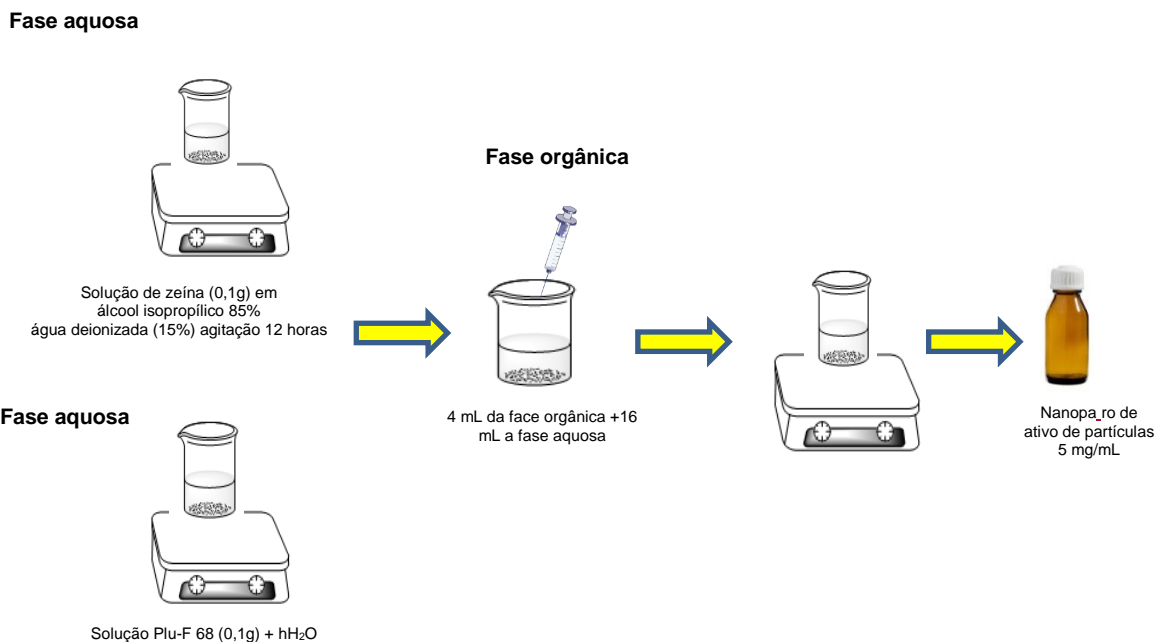
### **3.3. Preparo dos sistemas carreadores contendo eugenol e óleo de alho**

#### **3.3.1. Preparo das nanopartículas contendo eugenol ou óleo de alho**

As nanopartículas de zeína foram preparadas pelo método de precipitação com anti-solvente (Figura 6), descrito por (HU; MCCLEMENTS, 2014). Primeiramente 1 % de zeína em pó foi adicionada à 100 mL de uma solução álcool isopropílico 85 % (v/v), a qual foi mantida sob agitação (overnight). Posteriormente o pH da solução de zeína foi ajustado para 4,5 com HCl 1,0 mol/L e filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm para remover partículas insolúveis. Para o preparo das nanopartículas 100 mg do eugenol e/ou óleo de alho foram preparados separadamente e conjuntamente, foram adicionados a uma solução de zeína. Uma solução aquosa 1 % (v/v) de Pluronic F-68® foi preparada ajustada pH 4. Utilizando uma seringa, 4 mL de uma solução de zeína foi injetada rapidamente em 16 mL da solução de Pluronic F-68® sob agitação, obtendo uma concentração final de óleo na nanopartículas de 5 mg/mL. O solvente (álcool isopropílico) foi removido da suspensão de nanopartículas a partir de evaporação à temperatura ambiente. Após a evaporação, o volume perdido foi compensado pela adição de água a pH 4,0.

Neste estudo foram preparadas as nanopartículas de zeína: I) sem ativos (NP), II) contendo eugenol (NPE), III) contendo óleo de alho (NPA), IV) contendo eugenol e óleo de alho (NPEA). A concentração dos ativos em cada formulação final foi de 5 mg/mL.

**Figura 6.** Método esquemático para o preparo das nanopartículas de zeína contendo eugenol e/ou óleo de alho.



### 3.4. Estabilidade físico-química

Foram determinadas algumas propriedades físico-química como, pH, potencial zeta, tamanho (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão e eficiência de encapsulação em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias), para avaliar a estabilidade das formulações de nanopartículas.

#### 3.4.1. Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão

##### 3.4.1.1. Espectroscopia de correlação de fótons

Para a avaliação do tamanho médio e da distribuição de tamanho das nanopartículas (polidispersão), foi utilizada a técnica de espectroscopia de correlação de fótons. Foi avaliada diluindo-se (1000 vezes) as nanopartículas em água deionizada e utilizando-se um analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern) a um ângulo fixo de 90 ° e temperatura de 25°C. A distribuição de tamanho

foi dada pelo índice de polidispersão. O resultado foi expresso como média de três determinações.

#### 3.4.1.2. Rastreamento de nanopartículas

Para determinar a concentração e distribuição de tamanho das nanopartículas contendo os óleos essenciais, foi analisado por meio da técnica de rastreamento de nanopartículas. Os dados foram coletados por meio de uma célula um a célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm) e uma câmera sCMOS usando software NanoSight (versão 3.1). Para garantir a não contaminação das amostras, medições da água deionizada foram realizadas. As suspensões de nanopartículas foram diluídas (1500 vezes), sendo realizadas análises em triplicata para cada amostra. Para garantir que diferentes partículas fossem analisadas, para cada réplica, 1 mL de suspensão da amostra foram injetadas na célula volumétrica, com o intuito de deslocar o conteúdo medido anteriormente.

#### 3.4.2. *Potencial Zeta*

O potencial zeta indica a carga de superfície das nanopartículas, (GREENWOOD, 2003). A carga de superfície das partículas foi avaliada através da determinação de potencial zeta, utilizando-se um analisador de potencial zeta Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern). As análises foram realizadas diluindo-se as suspensões de nanopartículas de eugenol, óleo de alho e mistura dos óleos em água deionizada 1000 vezes e os resultados foram expressos como médias de três determinações

#### 3.4.3. *Análises do pH.*

O monitoramento do pH é importante para avaliação da estabilidade das suspensões. As alterações do pH podem indicar a degradação do polímero ou outros componentes presentes na formulação. O pH foi medido por 120 dias em um potenciômetro (Tecnal®), calibrado com soluções tampão em pH 4,0 e 7,0.

#### 3.4.4. *Eficiência de encapsulação do eugenol ou óleo de alho*

A quantidade de óleo encapsulado às nanopartículas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação. Neste método a suspensão de nanopartículas

é submetido à filtração em filtros de celulose regenerada com poro de exclusão 10 kDa (Microcon-Millipore®). Através desse poro, atravessa apenas o óleo não encapsulado. O ultrafiltrado é quantificado por CLAE no caso do eugenol e UV-visível no caso do óleo de alho, onde se determina a quantidade de óleo não encapsulado. Por diferença entre a quantidade total (100%) de óleo adicionado no sistema e a quantidade que não está associado, determina-se a eficiência de encapsulação dos sistemas coloidais, (PEREIRA, ANDERSON E. S. *et al.*, 2014).

### **3.5. Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Análise de FTIR são realizadas para investigar possíveis interações entre os óleos e carreadores. As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro de FTIR Agilent em uma faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando 128 varreduras por amostra com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ , (WU; LUO; WANG, 2012). As amostras do eugenol e óleo de alho, e as nanopartículas contendo os óleos, assim como a mistura física entre componentes foram analisadas utilizando o acessório de refletância total atenuada (ATR), o qual permite a análise de compostos em pastas, em pó e aqueles que não podem ser analisados em forma de pastilhas ou filmes.

### **3.6. Caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A formulações de nanopartículas contendo os óleos e sem os óleos foram centrifugados a 15000 rpm por 15 minutos, até a formação de um pellet, sendo armazenado em dessecador durante 4 dias. As amostras secas (10 mg) foram colocadas em recipientes de alumínio e analisadas em DSC, utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, com uma variação de temperatura de 10°C/min, em uma faixa de 0 a 300°C. Os resultados de calorimetria diferencial exploratória foram expressos na forma de termogramas, indicando o ponto de fusão de cada material.

### **3.7. Análise morfológica por microscopia de força atômica**

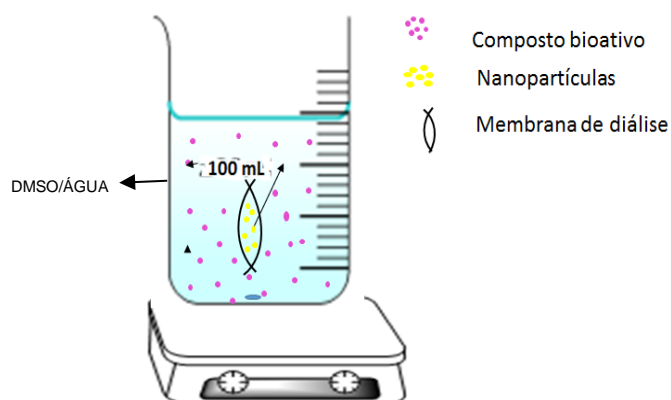
A morfologia das partículas contendo eugenol (NPE), nanopartículas de alho NPA e nanopartículas contendo os dois óleos (NPAE), foi investigada pela técnica Microscopia de Força Atômica (AFM), usando um microscópio Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM -Pattern BT02217 (Nanosurf®, Suíça) com modo de Tapping mode. Foram

realizadas diluições das nanopartículas e as suspensões foram colocadas sobre placas de silício previamente preparadas com remoção do dióxido de silício para facilitar a interação/adesão da amostra nas placas. As imagens foram capturadas no modo de tempo com 256x256 pixels em formato TIFF com um formato de gama em uma faixa de 10 piconewtons (pN), e analisados utilizando o software Gwyddion®.

### 3.8. Cinética de Liberação do eugenol

Com a finalidade de determinar o perfil de liberação *in vitro* do eugenol a partir das nanopartículas de zeína sendo usado um sistema de dois compartimentos (Figura 7).

**Figura 7.** Representação esquemática do sistema empregado para o ensaio de liberação do eugenol. O sistema utilizado consiste em um sistema doador, onde é adicionada a formulação contendo eugenol e um sistema acceptor que encontrasse em condição de diluição sink. Os dois sistemas são separados por sacos de diálise com um poro de exclusão de 15 kDa. Durante o ensaio, alíquotas são retiradas do compartimento acceptor e quantificadas por CLAE.



Nesse sistema, 2 mL das nanopartículas de zeína contendo eugenol, foi adicionado sacos de membrana de diálise, com um poro de exclusão de 15 kDa. Em seguida, os sacos foram colocados em solução de DMSO/água (5:95 v/v) e submetidas à agitação lenta. A cada tempo, alíquotas de 1 mL da solução foram coletadas e o volume retirado, repostado com a solução de DMSO/água (5:95 v:v), a fim de manter o volume final do compartimento acceptor (ABREU et al., 2012a). A

quantidade de eugenol liberada foi quantificada por CLAE sendo convertidas em % de eugenol liberado. Os ensaios foram realizados em triplicata. No caso das nanopartículas contendo óleo de alho não foi possível realizar os ensaios devido à interferência de componentes da amostra no processo de quantificação do óleo.

### 3.8.1. Modelagem matemática

A utilização de modelos matemáticos da liberação controlada de princípios ativos permite obter inúmeras informações a respeito dos processos químicos e de transporte envolvidos nestes sistemas de liberação. Existem inumeráveis teorias matemáticas, desde modelos mecanísticos e empíricos. Neste trabalho foram aplicados os seguintes modelos matemáticos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (COSTA; LOBO, 2001; CRUZ *et al.*, 2006).

No modelo matemático de ordem zero (Equação 5) é considerada a quantidade de princípio ativo liberado num determinado tempo (t), desta forma, formulações que apresentam este perfil de liberação, é liberada a mesma quantidade de princípio ativo por unidade de tempo independentemente da quantidade de princípio ativo que resta na formulação.

$$F_{t=K_0^t} \quad (5)$$

Onde  $f_t$  é a quantidade de fungicida liberada num tempo t e  $k_0$  é a constante de liberação de ordem zero (COSTA & LOBO, 2001; LOPES *et al.*, 2005).

Já o modelo matemático de primeira ordem (Equação 6) a liberação do composto bioativo é dependente da quantidade do composto remanescente na partícula por unidade de tempo, ocorrendo a diminuição do composto bioativo em função do tempo.

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1^t \quad (6)$$

Onde  $Q_t$  é a quantidade de composto bioativo liberada no tempo t,  $Q_0$  é a quantidade inicial de composto bioativo na solução e  $K_1$  a constante de liberação de primeira ordem.

O modelo matemático de Higuchi (Equação 7) descreve o processo de difusão baseado na Lei de Fick. O mecanismo de liberação do composto bioativo é dependente da raiz quadrada do tempo.

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad (7)$$

Onde  $f_t$  é a quantidade de fungicida liberada num tempo  $t$  e  $K_H$  é a constante de liberação de Higuchi. Este modelo pode ser empregado para descrever liberação de compostos bioativos a partir de diversos tipos de liberação modificada (COSTA & LOBO, 2001; LOPES et al., 2005).

O modelo semi-empírico de Korsmeyer Peppas (Equação 8) foi aplicado para elucidar o tipo de mecanismo com que o ativo é liberado das nanopartículas, (SOPPIMATH, 2001; COLOMBO et al., 2005).

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (8)$$

Onde,  $M_t$  é  $M_\infty$  representam a quantidade mássica de ativo liberado em um determinado tempo  $t$  e o  $k$  é uma constante,  $n$  representa o expoente de liberação.

### 3.9. Atividade biológica *in vitro* através de disco de difusão

O teste de disco é utilizado para avaliar a atividade antibacteriana de determinadas substâncias. No presente trabalho esse teste foi conduzido visando verificar o potencial de nanopartículas e de seus respectivos acompanhamentos no controle das espécies de bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Streptococcus iniae*, as quais são responsáveis pela infecção de peixes.

As bactérias foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e em seguida foi realizada contagem em câmara de Neubauer utilizando azul de trypan para a obtenção de uma concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL para a realização do teste, sendo que quando a concentração foi superior as bactérias foram diluídas no próprio meio de cultura. Após a contagem e padronização da concentração das bactérias as mesmas foram inoculadas em placas de petri (9 cm) utilizando swab, foram adicionados discos de papel filtro (0,6 cm) e pipetados sobre eles os tratamentos até completa absorção. As placas foram preparadas em triplicata sendo dividida em placas com nanopartículas (NPE, NPAE e NP) e placas com seus respectivos controles contendo pluronic (pluronic 1% e eugenol - PLUE, pluronic 1% e óleo de alho - PLUA, pluronic 1%, eugenol e óleo de alho - PLUEA e pluronic 1% -

PLU). Como controle em ambas as placas, tanto para as nanopartículas como acompanhamentos, foi utilizado o antibiótico comercial para aquários Bacter (Labcon®) de Sulfato de Neomicina na concentração de uso (0,021 mg/mL) e dez (0,210 mg/mL), vinte e cinco (0,525 mg/mL) e cinquenta (1,050 mg/mL) vezes maior que a concentração de uso. As placas foram incubadas por 24 horas e então foi realizada a medição do diâmetro dos halos e calculada a média e desvio padrão das três medidas. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida de teste de Tukey com significância  $p < 0,05$  utilizando o programa GraphPad Prism 7.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação do eugenol e óleo de alho

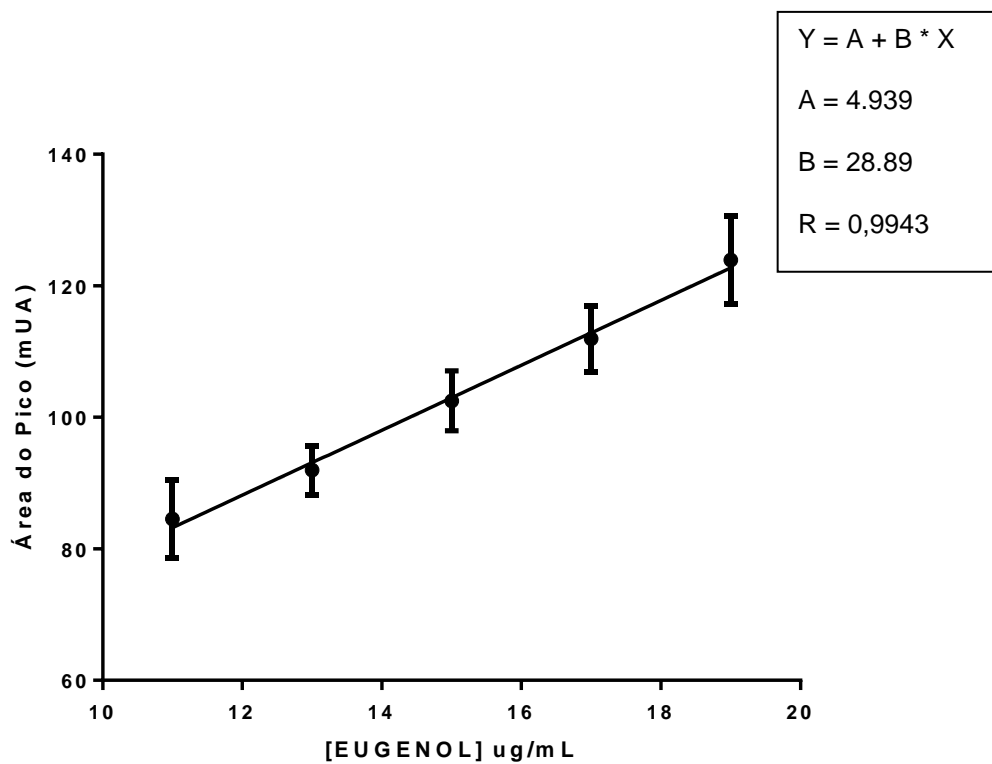
#### 4.1.1. *Curvas de calibração e adequação de metodologia analítica*

As curvas analíticas mostram a resposta do método analítico frente à concentração conhecida de um determinado analito. A Figura 8 traz os gráficos correspondentes às curvas analíticas dos óleos, sendo os gráficos apresentados a média de três curvas analíticas construídas em três dias consecutivos. Para o ativo eugenol foram utilizadas concentrações compreendidas entre 1-5 µg/mL para eugenol e para o óleo de alho as concentrações variam na faixa de 5-10 µg/mL.

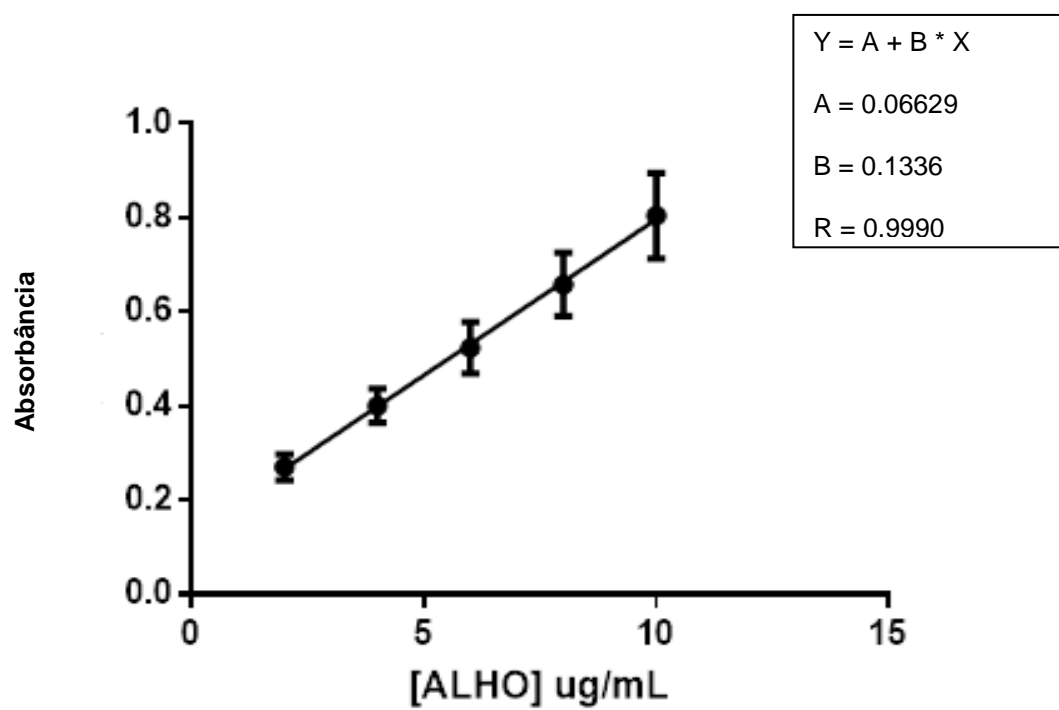
**Figura 8.** Curva analítica obtida para os óleos: A) Eugenol e B) Óleo de alho. Valores representam a média de três experimentos realizados em triplicata (n=9)



A)



B)



O coeficiente de correlação recomendado pelo INMETRO e ANVISA deve ser maior ou igual a 0,99. Buscando a linearidade do método demonstrado através do coeficiente de correlação ( $r$ ), foram obtidos 0,9943 e 0,9990 para eugenol e óleo de alho respectivamente, atendendo as especificações dos órgãos reguladores em todas as datas avaliadas (Tabela 5).

**Tabela 5:** Coeficientes de correlação ( $r$ ) para as curvas de calibração de eugenol e Óleo de alho, realizado em três dias consecutivos.

Óleo	R		
	Dia 1 (n=3)	Dia 2 (n=3)	Dia 3 (n=3)
Eugenol	0,9926	0,99724	0,99543
Alho	0,9982	0,99958	0,9994

Outra condição para avaliação do método analítico, é a reprodutibilidade ou precisão intra-dia, a qual foi determinada através do desvio padrões relativos (DPR) para as concentrações de eugenol e óleo de alho. Os resultados das análises para este parâmetro estão sumarizados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Valores do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações de óleos para avaliação da precisão.

Óleo	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR dia 1 (%)	DPR dia 2 (%)	DPR inter-dias (%)
Eugenol	12	0,145	0,080	0,112
	16	0,106	0,089	0,096
	18	0,717	0,095	0,406
Alho	3	0,015	0,010	0,012
	7	0,091	0,052	0,075
	9	0,007	0,013	0,01

Como podemos observar na tabela para ambos os óleos os resultados se encontram abaixo dos limites preconizados pela ANVISA e o INMETRO 5% para os DPR intra-dias e Inter-dias, considerando o método como preciso.

A exatidão é estabelecida mediante comparação com diferentes concentrações de analito, determinada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica. Os valores correspondentes podem ser observados na Tabela 7 para eugenol e para o óleo de alho na Tabela 8.

**Tabela 7:** Valores da concentração de eugenol, determinadas para avaliação da exatidão.

[Eugenol] teórica (µg/mL)	[Eugenol] obtida (µg/mL)	% de Recuperação	[Eugenol] obtida (µg/mL)	% de Recuperação
12	11,48	95,66	11,84	98,66
12	11,74	97,83	12,00	100,00
12	11,40	95,00	11,82	98,50
16	15,77	98,56	16,19	101,18
16	15,99	99,93	16,00	100,00
16	16,00	100,00	16,00	100,00
18	17,47	97,08	17,92	99,55
18	17,68	98,32	18,00	100,00
18	17,57	97,63	17,77	98,72
<b>Media</b>		97,77		99,62
<b>DPR</b>		1,605		0,81
<b>Media (n18)</b>			98,70	
<b>DPR (n18)</b>			1,21	

**Tabela 8:** Valores da concentração de óleo de alho, determinadas para avaliação da exatidão.

[Alho] teórica (µg/mL)	[Alho] obtida (µg/mL)	% de Recuperação	[Alho] obtida (µg/mL)	% de Recuperação
3	0,3348	102,00	0,3425	103,99
3	0,3417	103,00	0,344	104,75
3	0,3404	95,00	0,3426	104,04
7	0,612	103,54	0,6101	103,12
7	0,6202	101,28	0,6149	104,17
7	0,6199	104,42	0,6183	104,92
9	0,7546	104,77	0,7528	104,44
9	0,7537	104,55	0,7534	104,55
9	0,7531	104,44	0,7536	104,55
<b>Media</b>		103,33		104,28
<b>DPR</b>		1,24		0,505

<b>Media (n18)</b>	103,80
<b>DPR (n18)</b>	0,87

As instituições reguladoras estabelecem um intervalo de exatidão entre um intervalo de 95 a 105%. Os resultados obtidos encontram-se dentro do intervalo. Sendo a porcentagem de recuperação para eugenol variou entre 96,38 a 99,62%, e para o óleo de alho a variação foi de 103,33 a 104,28 %, estando dentro das especificações.

Outro parâmetro estudado foi à estimativa do limite de quantificação (LQ) e detecção (LD) para os óleos (Tabela, 9), determinados a partir de resultados obtidos com regressões lineares das curvas de calibração aplicadas às equações 2 e 3.

**Tabela 9:** Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada óleo estudado.

	<b>Eugenol</b>	<b>Alho</b>
<b>Limite de detecção (µg/mL)</b>	0,159± 0,15	0,187± 0,07
<b>Limite de quantificação (µg/mL)</b>	0,530± 0,23	0,625± 0,19

De acordo com as especificações dos órgãos reguladores, ANVISA (2003) e INMETRO (2011), os resultados obtidos para o método analítico foram considerados satisfatórios, sendo considerado um método exato, preciso e linear, dentro do intervalo de concentração estudado de 1 a 5 µg/mL, para eugenol e 5 a 10 µg/mL, para óleo de alho.

#### **4.2. Caracterização e estudo da estabilidade físico-química das nanopartículas contendo eugenol e óleo de alho**

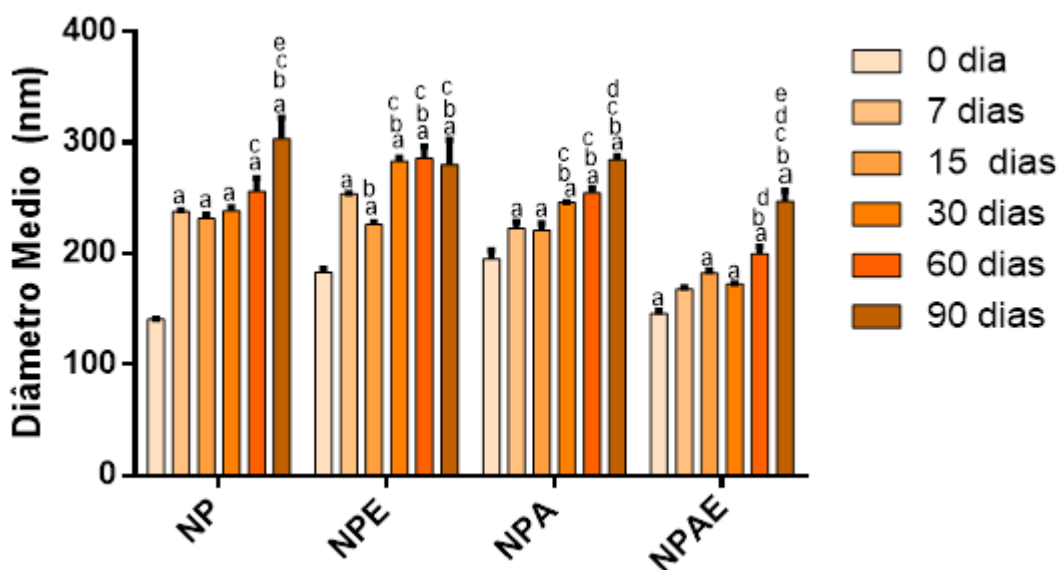
Para a caracterização e determinação da estabilidade físico-química foram analisadas índice de polidispersão, diâmetro hidrodinâmico (tamanho), pH, potencial zeta, eficiência de encapsulação dos ativos nas nanopartículas e concentração em função do tempo (0-90 dias). Como controles foram preparadas nanopartículas de zeína sem a adição dos compostos bioativos. Todas as formulações preparadas foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas à temperatura ambiente.

#### 4.2.1. Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão

O tamanho e índice de polidispersão são influenciados por numerosos parâmetros como: método de preparo, natureza e concentração de tensoativos, óleos e solventes, indicando a distribuição de tamanho. O estudo destes parâmetros é importante porque pode indicar se as suspensões coloidais estão sedimentando ou precipitando, auxiliando na compreensão da estabilidade (CHOUINARD *et al.*, 1991; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O diâmetro hidrodinâmico (nm) foi analisado a fim de determinar o tamanho das nanopartículas em função do tempo (90 dias). A figura 9 apresenta o diâmetro hidrodinâmico em (nm) para as nanopartículas de zeína carregadas com os diferentes óleos, utilizando como agente estabilizante o tensoativo Pluronic F-68. No tempo inicial as nanopartículas de zeína apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de 140 nm enquanto que as formulações contendo, eugenol, óleo de alho e eugenol/óleo de alho apresentaram diâmetro médio de 183, 145, 146 nm.

**Figura 9.** Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) das nanopartículas de zeína sem ativo (NP), e nanopartículas contendo eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com os dois óleos eugenol e óleo de alho (NPAE), em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Foi considerada com uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias.



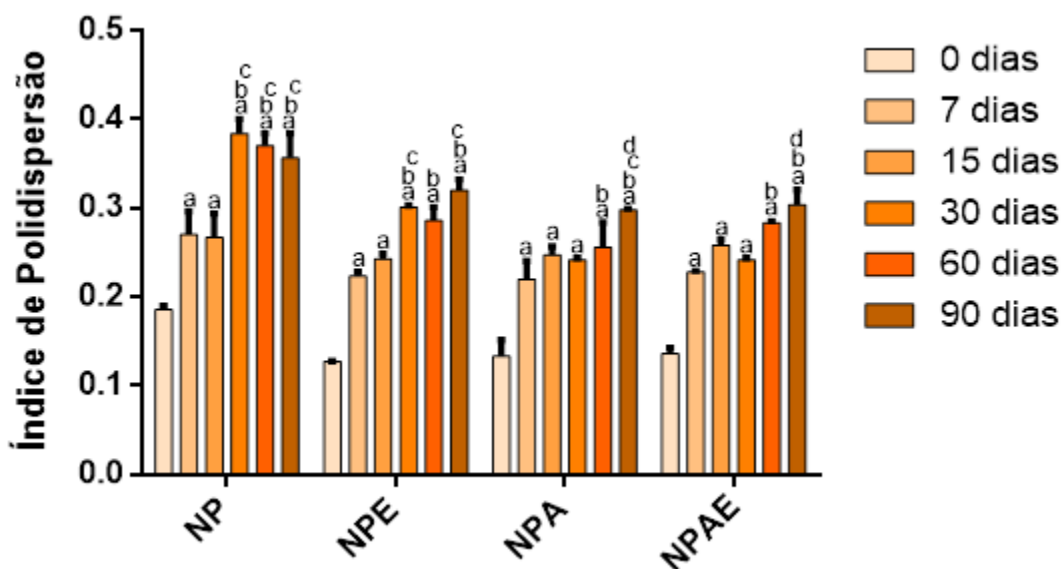
Todas as formulações apresentaram alteração significativa no diâmetro médio após 7 dias de armazenamento. Com 90 dias de armazenamento as nanopartículas de zeína controle (NP) apresentaram diâmetro médio de 303 nm enquanto que as formulações contendo, eugenol, óleo de alho e eugenol/óleo de alho apresentaram diâmetro médio de 280, 284, e 247 nm, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Zou *et al.*, (2012), os quais, prepararam nanopartículas de zeína contendo timol através do método líquido-líquido, sendo que estas apresentaram um tamanho de 269,4 nm.

Dentre todas as nanoformulações preparadas, observou-se que as nanopartículas de zeína controle (NP) foram as que mais apresentaram aumento do diâmetro médio em função do tempo de armazenamento quando comparadas com as nanoformulações contendo eugenol, óleo de alho ou os dois juntos. De acordo com Da Rosa *et al.*, (2015b) este menor aumento do diâmetro médio para as nanopartículas contendo os bioativo é devido a maior associação destes com o tensoativo Pluronic F-68, resultando em maior estabilidade das nanopartículas.

Outro parâmetro avaliado foi o índice de polidispersão (Figura 10), o qual está relacionado com a distribuição de tamanho médio das nanopartículas, valores abaixo de 0,2 indicam uma boa estabilidade do sistema coloidal e um faixa estreita de tamanho (MOHANRAJ; CHEN; OTHERS, 2006). As nanopartículas de zeína controle (NP) apresentaram um valor médio de  $0,185 \pm 0,004$  no tempo inicial e após 30 dias de armazenamento houve aumento significativo ( $p < 0.05$ ) do índice de polidispersão, o que pode ser um indicativo da formação de agregados. Os dados de índice de polidispersão para as nanopartículas de zeína controle (NP) corroboram com os dados de diâmetro médio (Figura 9), cujo qual, demonstrou um aumento do diâmetro médio após 30 dias de armazenamento. As nanopartículas contendo eugenol apresentaram índice de polidispersão de  $0,127 \pm 0,005$  no tempo inicial, apresentando aumento gradativo até 30 dias de armazenamento, onde atingiu um valor de  $0,301 \pm 0,02$ , após este período não foram observadas alterações significativas até os 90 dias de armazenamento. Já as nanopartículas contendo óleo de alho apresentaram no tempo inicial índice de polidispersão de  $0,133 \pm 0,01$  e após sete dias de armazenamento se observou um aumento significativo para este parâmetro ( $0,220 \pm 0,02$ ) e permaneceu praticamente sem alterações até 60 dias de armazenamento e posteriormente houve novo aumento do índice de polidispersão, chegando ao valor de  $0,298 \pm 0,01$  com 90 dias de armazenamento. As nanopartículas contendo ambos os óleos apresentaram

comportamento semelhante ao observado para as nanopartículas contendo apenas alho, onde houve aumento significativo após 7 dias, seguido por um período onde houve pequenas alterações na polidispersão e com 90 dias de armazenamento um novo aumento significativo quando comparado com o valor observado para 7 dias de armazenamento. Os resultados de diâmetro médio (Figura 9) e índice de polidispersão (Figura 10) evidenciaram que todas as nanopartículas apresentaram variações no deslocamento e intensidade, evidenciando alterações na polidispersão das partículas. Demonstrando com isso a possível formação de agregados ou a presença de frações não solúveis após 30 e 60 dias de armazenamento, respectivamente.

**Figura 10.** Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para as nanopartículas de zeína sem ativo (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPAE). Valores expressos como média de três determinações. Foi considerada uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias.

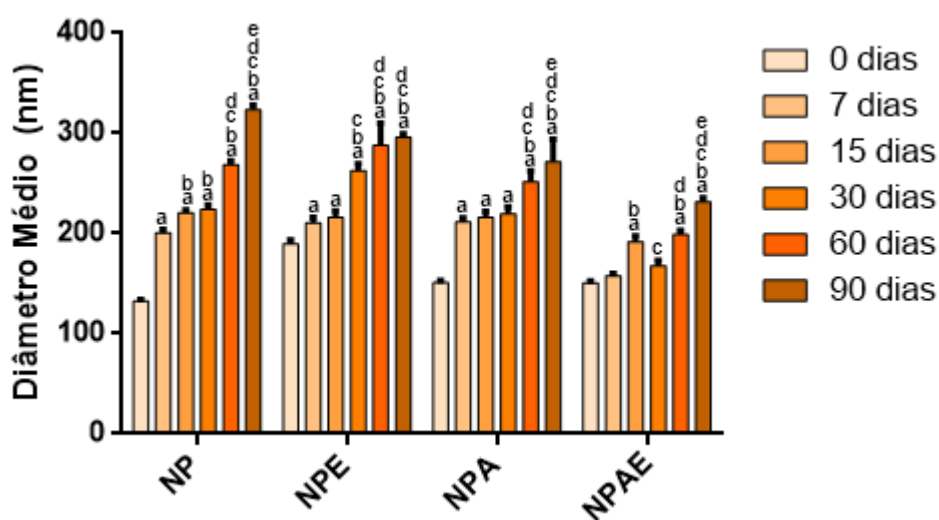


#### 4.2.2. Concentração e tamanho das nanopartículas (Rastreamento de Nanopartículas)

A técnica de rastreamento de nanopartículas ou também conhecida como Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), foi utilizada para caracterizar as formulações de nanopartículas de zeína contendo eugenol e óleo de alho. Esta técnica analisa

simultaneamente nanopartículas em suspensões líquidas, distribuição e concentração de tamanho em tempo real (GROSS *et al.*, 2016). O NTA é capaz de medir com precisão uma amostra de partículas polidispersa (ENJETI *et al.*, 2016). Neste estudo a técnica NTA foi utilizada para complementar os resultados obtidos pela técnica DLS. A Figura 11 traz o diâmetro hidrodinâmico (nm) para as nanopartículas de zeína contendo os diferentes óleos.

**Figura 11.** Diâmetro médio (nm) pela técnica de NTA para as nanopartículas de zeína sem ativo (NP) e nanopartículas contendo eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA), em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=9). Foi considerada com uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias.

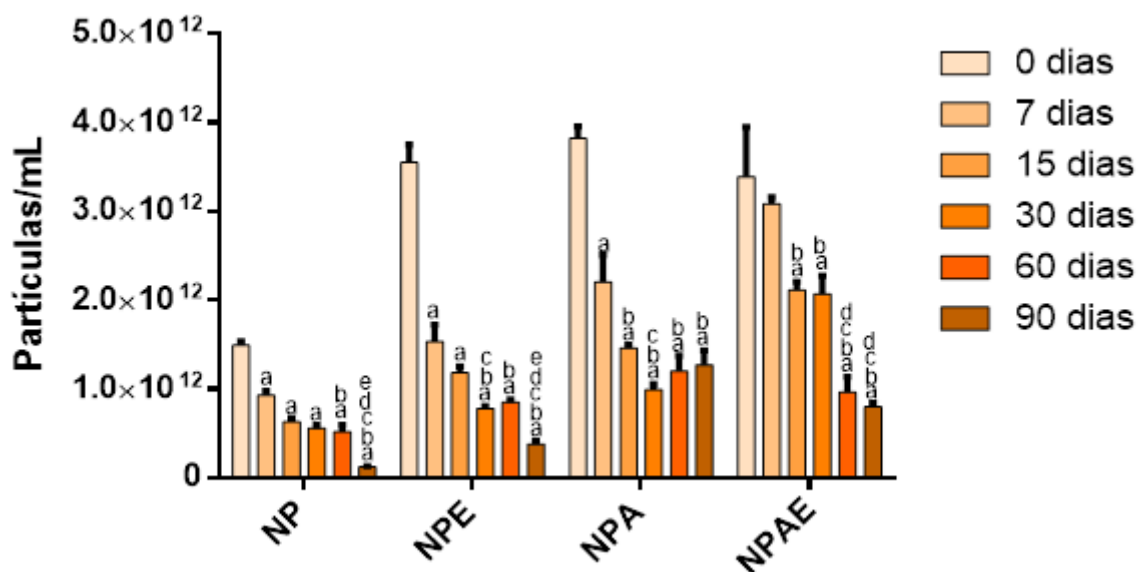


As nanopartículas de zeína controle (NP) apresentaram diâmetro médio de  $132,5 \pm 1,8$  nm no tempo zero e assim como observado pela técnica de DLS houve aumento significativo do diâmetro médio em função do tempo, após 90 dias de armazenamento o diâmetro médio destas nanopartículas chegou a  $323,5 \pm 4,6$  nm. As nanopartículas contendo eugenol, óleo de alho e a mistura dos dois óleos apresentaram no tempo inicial, diâmetro médio de  $189,7 \pm 4$  nm,  $151,2 \pm 2,1$  nm e  $150,7 \pm 1,9$  nm, respectivamente. Todas as nanopartículas contendo bioativo apresentaram aumento significativo no diâmetro médio após 7 dias de armazenamento, exceto a nanopartícula contendo a mistura dos dois óleos, em que houve aumento significativo apenas após 15 dias de armazenamento. Assim como



observado pela técnica de DLS (Figura 9) a técnica de NTA também evidenciou um maior aumento do diâmetro médio após 60 dias de armazenamento para todas as nanopartículas, indicando a formação de agregados. Observa-se que o diâmetro médio das nanopartículas, determinados por ambas as técnicas, se apresentaram bastante semelhantes. Além do diâmetro médio a técnica de NTA foi empregada para medir a concentração de nanopartículas. A Figura 12 mostra o gráfico de concentração da NPZ, NPE e NPA, em função do tempo determinado pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA).

**Figura 12.** Concentração das nanopartículas pela técnica de NTA para as nanopartículas de zeína (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA), em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=9). Foi considerada com uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias.



De acordo com a figura 12 observa-se que a concentração das nanopartículas de zeína controle, contendo eugenol, com óleo de alho e com a mistura dos óleos no tempo inicial foi de  $1,49 \times 10^{12} \pm 4,23 \times 10^{10}$ ;  $3,55 \times 10^{12} \pm 1,98 \times 10^{11}$ ;  $3,82 \times 10^{12} \pm 1,32 \times 10^{11}$  e  $1,39 \times 10^{12} \pm 5,59 \times 10^{11}$  partículas/mL, respectivamente. Para todas as nanoformulações preparadas contendo ou não os bioativos foi observada uma diminuição significativa da concentração das nanopartículas em função do tempo de armazenamento. A diminuição na concentração das nanopartículas é um forte

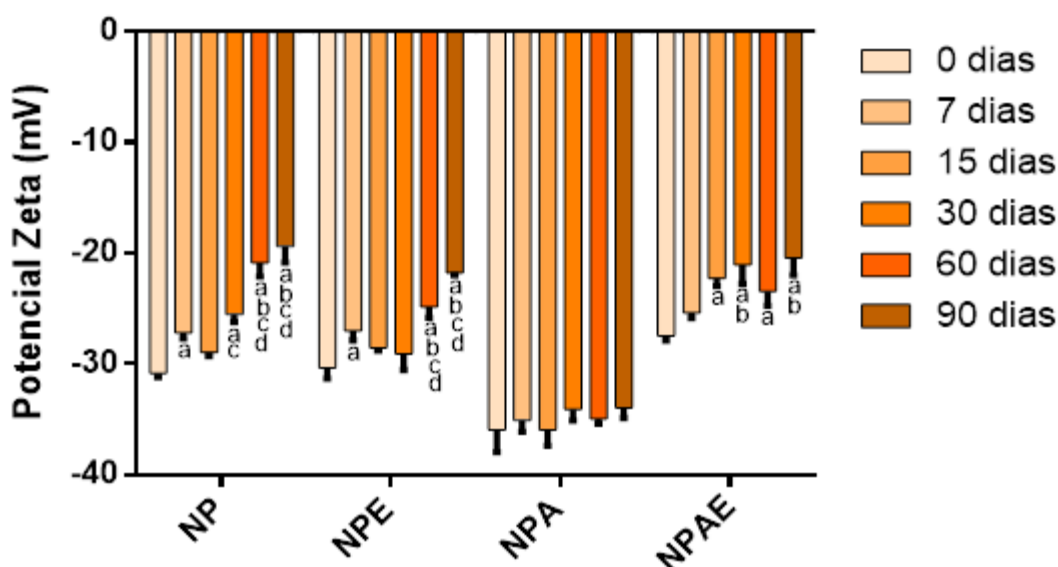
indicativo de formação de agregados, uma vez que, no processo de agregação há uma diminuição na concentração devido a junção de várias nanopartículas resultando em aumento do diâmetro médio, o que foi comprovado pelas técnicas de DLS e NTA, bem como aumento do índice de polidispersão.

#### 4.2.3. Potencial zeta

Outro parâmetro analisado foi o potencial zeta das nanopartículas (Figura 13). Este parâmetro pode ser influenciado pela composição das nanopartículas e de acordo com a literatura, sistemas coloidais com potencial de  $\pm 30$  mV são considerados estáveis, diminuindo processos de agregação (MOHANRAJ; CHEN; OTHERS, 2006). As nanopartículas de zeína controle apresentaram um potencial zeta de  $-30,9 \pm 0,30$  mV enquanto que as nanopartículas contendo eugenol, óleo de alho e mistura dos dois óleos apresentaram potencial zeta no tempo inicial de  $-30,4 \pm 0,95$ ;  $-36,0 \pm 1,96$  e  $-27,5 \pm 0,4$  mV. Para todas as nanoformulações, exceto para as nanopartículas contendo óleo de alho, foram observadas mudanças significativas no potencial zeta em função do tempo de armazenamento. Entretanto, vale ressaltar que estas nanopartículas foram preparadas empregando-se Pluronic F-68 como tensoativo, o qual, apresenta mecanismo de estabilização por impedimento estérico, ou seja, este tipo de tensoativo fica na superfície das nanopartículas. Desta forma a estabilização eletrostática não é o principal mecanismo de estabilização destes sistemas coloidais, porém, o valor de potencial zeta negativo reflete as características das nanopartículas (DA ROSA *et al.*, 2015b; MARIN; BRICEÑO; CABALLERO-GEORGE, 2013). Resultados semelhantes foram observados por Da Rosa *et al.*, (2015) o qual mostrou que tensoativos não iônicos diminuem a taxa do potencial zeta atribuído a uma dada partícula e que estes tensoativos proporcionam uma estabilidade devido ao impedimento estérico gerado pela presença destes na superfície.

**Figura 13.** Valores de potencial zeta (mV) para as nanopartículas de zeína (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA) em função de 90 dias. Valores expressos como média de três determinações. Foi considerada uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b)

comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias.

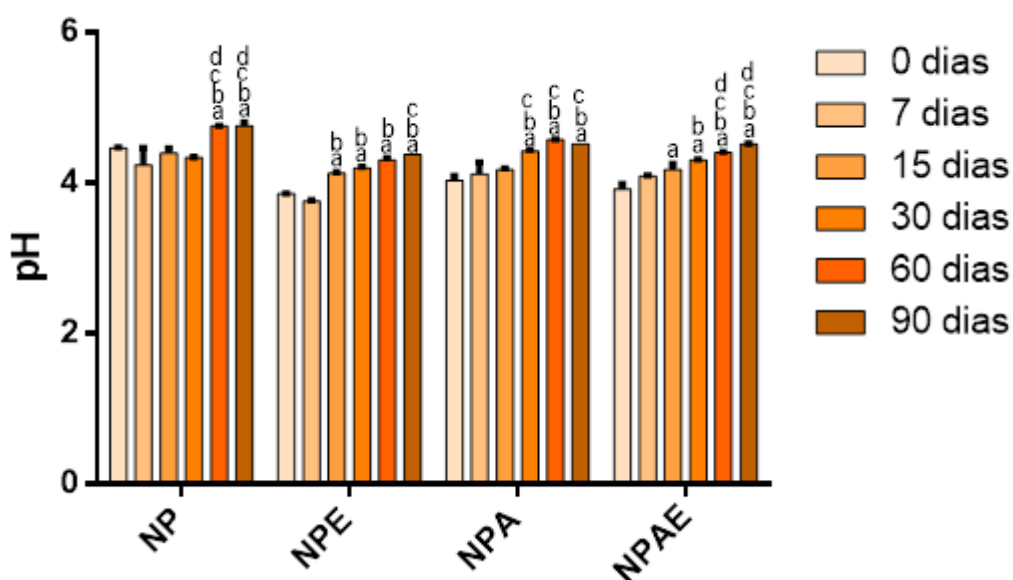


#### 4.2.4. Avaliação de alterações do pH

Outro parâmetro de estabilidade analisado foi o pH (Figura 14). As nanopartículas controle de zeína apresentaram pH de  $4,46 \pm 0,01$  no tempo inicial e com 60 dias de armazenamento houve aumento significativo do valor de pH para  $4,75 \pm 0,05$ . As nanopartículas contendo eugenol e mistura dos dois óleos apresentaram no tempo inicial pH de  $3,75 \pm 0,01$  e  $3,92 \pm 0,06$  e um aumento significativo do pH após 15 dias de armazenamento, enquanto que as nanopartículas contendo óleo de alho apresentaram-se mais estáveis quando comparada com as outras nanopartículas contendo óleos, apresentando-se estáveis até 30 dias de armazenamento, e posteriormente também tiveram aumento significativo do pH. O aumento do valor de pH influencia na formação de agregados e precipitação das nanopartículas devido a desestabilização nas cargas da proteína zeína. Desta forma, os dados de pH corroboram com os dados de diâmetro médio, mais uma vez evidenciando a formação de agregados. Hu e McClements, (2014) prepararam nanopartículas de zeína pelo método de precipitação por anti-solvente e avaliaram a influência da mudança do pH na estabilidade das nanopartículas. Os autores relataram que na faixa de pH entre 4,0-4,5 as formulações apresentaram um pequeno aumento na turbidez o que é indicativo que algumas partículas estão se agregando nesta faixa de pH. Na faixa de pH 5,0 e 6,5 houve aumento de aproximadamente 100

nm no diâmetro das nanopartículas enquanto que na faixa de pH 5.5 e 6.0 houve um grande aumento no diâmetro médio das nanopartículas e sedimentação das mesmas.

**Figura 14.** Perfil do pH das formulações de nanopartículas de zeína (NP) e nanopartículas com eugenol (NPE), com óleo de alho (NPA) e com mistura de eugenol e óleo de alho (NPEA) em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata. Foi considerada uma significância  $p < 0,05$  para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos onde: a) representa variação significativa entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero, b) comparação com o tempo 7 dias, c) comparação com o tempo 15 dias, d) comparação com o tempo 30 dias, e comparação com o tempo 60 dias.



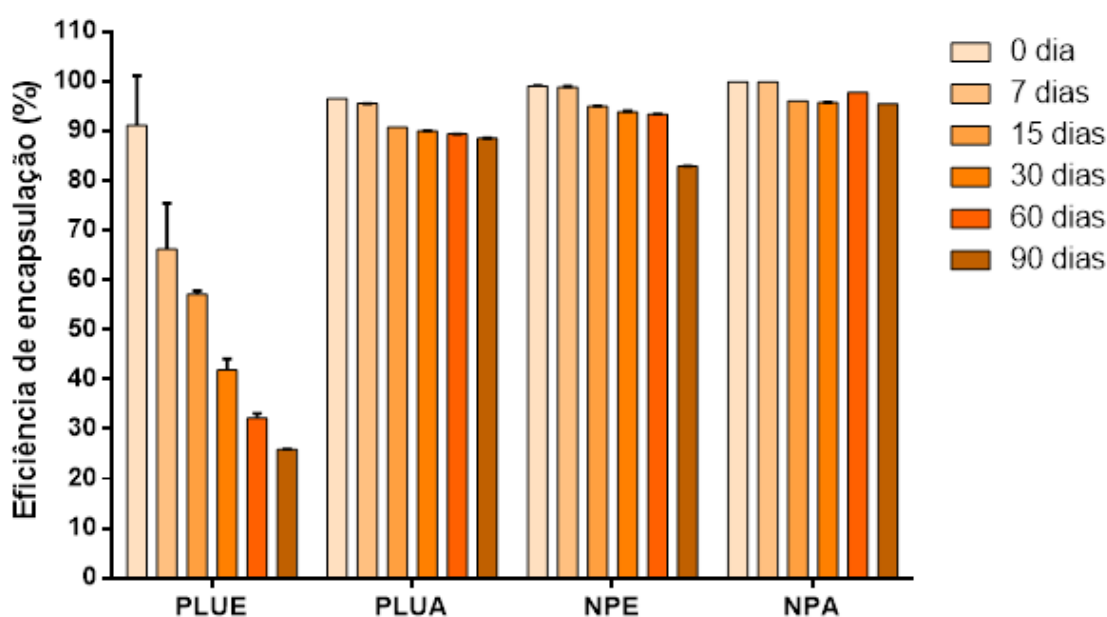
#### 4.2.5. Eficiência de encapsulação

Através da eficiência de encapsulação, determina-se a quantidade de bioativo encapsulado pela nanopartícula. Características físico-químicas podem influenciar na quantidade de bioativo associado ao sistema nanoparticulado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A Figura 15 mostra a eficiência de encapsulação (%) do eugenol e óleo de alho nas nanopartículas de zeína em função do tempo. A fim de avaliar a eficiência das nanopartículas em proteger os óleos contra degradação, foram preparadas emulsões de eugenol com Pluronic F-68 (PLUE) e óleo de alho com Pluronic F-68 (PLUA). Todas as amostras possuíam a mesma concentração inicial de ativo (5 mg/mL). No tempo inicial  $91,2 \pm 9,9$  % do eugenol estava presente na emulsão e após 90 dias houve uma

redução para  $25,9\pm 0,01\%$ . Já para o PLUA no tempo inicial  $96,5\pm 0,01\%$  estava presente na emulsão e após 90 dias reduziu para  $88,5\pm 0,03\%$ . Para o sistema nanoparticulado contendo eugenol e óleo de alho a eficiência de encapsulação no tempo inicial foi de  $99,1\pm 0,01\%$  e  $99,9\pm 0,01\%$ , respectivamente e após 90 dias de armazenamento houve uma redução de  $16,9\%$  para o eugenol e  $4,4\%$  para o óleo de alho. Em ambos os sistemas preparados (nanopartículas e emulsão) observa-se que o eugenol apresenta uma maior perda em função do tempo de armazenamento, característica esta que pode ser atribuída a maior volatilidade quando comparada com o óleo de alho. Isto se deve principalmente a característica de cada composto, sendo que o óleo essencial de alho é uma mistura complexa de compostos bioativos, e eugenol é um composto bioativo isolado, desta maneira a sua volatilização é mais rápida (FRANS *et al.*, 2011). Desta forma, as nanopartículas de zeína mostram-se eficazes para reduzir as perdas dos compostos bioativos, como por exemplo, volatilização e fotodegradação, resultando em aumento da atividade biológica destes compostos quando os mesmos forem aplicados para o controle de doenças em peixes (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005; ZHONG; TIAN; ZIVANOVIC, 2009). Uma das vantagens da encapsulação de óleos essenciais é que melhora na estabilidade de compostos aromáticos, aumenta a solubilidade em água e poderia ser uma via eficaz de entrega em aplicações *in vivo* (FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010).

**Figura 15.** Eficiência de encapsulação (%) dos óleos nas nanopartículas de zeína e acompanhamento em função do tempo (90 dias), determinação em triplicata (n=3).



### 4.3. Espectroscopia na região do infravermelho

A Espectroscopia IV ou espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), mede movimentos vibracionais, os quais correspondem a níveis de energia do átomo ou molécula. Com o propósito de observar possível interação com os diferentes óleos e as nanopartículas foram coletados espectros na região do infravermelho. A Tabela 10 descreve as principais bandas de absorção para os constituintes das partículas. A Figura 16 mostra os componentes das nanopartículas (zeína e pluronic F-68) e dos carreadores contendo ou não os compostos bioativo.

**Tabela 10.** Principais bandas de absorção das substâncias zeína, Pluronic F-68, eugenol e óleo de alho.

	Banda	Observação
<b>Zeína</b>	2820-3089 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento das ligações OH e C-H dos grupos funcionais $\text{CH}_3$ e $=\text{CH}_2$ correspondentes a ácidos graxos e aminoácidos
	1658 $\text{cm}^{-1}$	Ligação Amida I, devido ao estiramento C=O
	1550 $\text{cm}^{-1}$	Amida II vibração do grupo N-H e estiramento do grupo C-N
	1790-1600 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento do grupo amida C-O acoplado ao enlace do grupo N-H, estas vibrações indicam a presença das estruturas secundárias $\alpha$ e $\beta$ .
<b>Pluronic F-68</b>	3200 $\text{cm}^{-1}$	Vibrações do estiramento C-H
	1600-955 $\text{cm}^{-1}$	Alongamento simétrico e assimétrico da estrutura C-O
	1700 $\text{cm}^{-1}$	Pico do grupo C=O
<b>Óleo de alho</b>	3200-2900 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento assimétrico da ligação C-H e simétrico da dupla $=\text{CH}_2$
	1640 $\text{cm}^{-1}$	Ligação dupla do grupo alil C=C
	1500-1100 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento do grupo $\text{CH}_2$ e OH
	980-900 $\text{cm}^{-1}$	Ligação dupla $=\text{CH}_2$
	800-700 $\text{cm}^{-1}$	Alongamento da ligação C-S
<b>Eugenol</b>	3500-3200 $\text{cm}^{-1}$	Alongamento do grupo fenol $\text{CO}\rightarrow\text{H}$
	3000-3050 $\text{cm}^{-1}$	Alongamento do grupo $\text{C}=\text{C}\rightarrow\text{H}$
	1600-1500 $\text{cm}^{-1}$	Alongamento do grupo aromático C=C
	1455-1360 $\text{cm}^{-1}$	

995-917  $\text{cm}^{-1}$ Dobragem simétrico e assimétrico do grupo  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2-$ Dobragem do grupo vinilo  $\text{C}=\text{CH}_2$ 

No espectro da proteína zeína (Figura 16-A), se observa a presença das principais bandas, onde a faixa compreendida entre 2820 a 3089  $\text{cm}^{-1}$ , são atribuídas ao estiramento das sobreposições das ligações C-H e OH, dos grupos funcionais  $\text{CH}_3$  e  $=\text{CH}_2$  (ácidos graxos e aminoácidos). A banda na região 1658  $\text{cm}^{-1}$  bandas intensas, atribuídas à amida I devido ao estiramento da ligação C=O. Amida II na região 1550  $\text{cm}^{-1}$  indicam vibrações de estiramento do grupo N-H e estiramento do grupo C-N, nesta região também se faz presente estiramentos por vibrações dos grupos carbóxilos. Na região 1790-1600  $\text{cm}^{-1}$ , há bandas correspondente à amida, predominantes lipídeos e proteínas, bandas com vibrações do grupo C-O acoplado ao enlace do grupo N-H, estas indicam a presença das estruturas secundarias de  $\alpha$ -zeína e  $\beta$ -zeína.

No espectro do tensoativo Pluronic F-68 (Figura 16-B) a região 3200  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações de estiramento dos grupos C-H, nas regiões 1600 e 955  $\text{cm}^{-1}$  são picos característicos as vibrações de alongamento simétrico e assimétrico da estrutura C-O pertencente a grupos éter. A banda 1700  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento do grupo C=O. O pico em torno de 1280  $\text{cm}^{-1}$  pertence ao grupo  $-\text{CH}_2-$ .

No óleo de alho (Figura 16-C) podem-se destacar as bandas dentro da região 3200  $\text{cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento assimétrico do grupo C-H, na região de 1600-955  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao alongamento assimétrico das ligações C-H, a banda na região 1640-1700  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração da ligação dupla no grupo alil C=C, a região de 1490  $\text{cm}^{-1}$  é característica do grupo OH, as bandas em 1400 e 1107  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento do grupo  $\text{CH}_2$ .

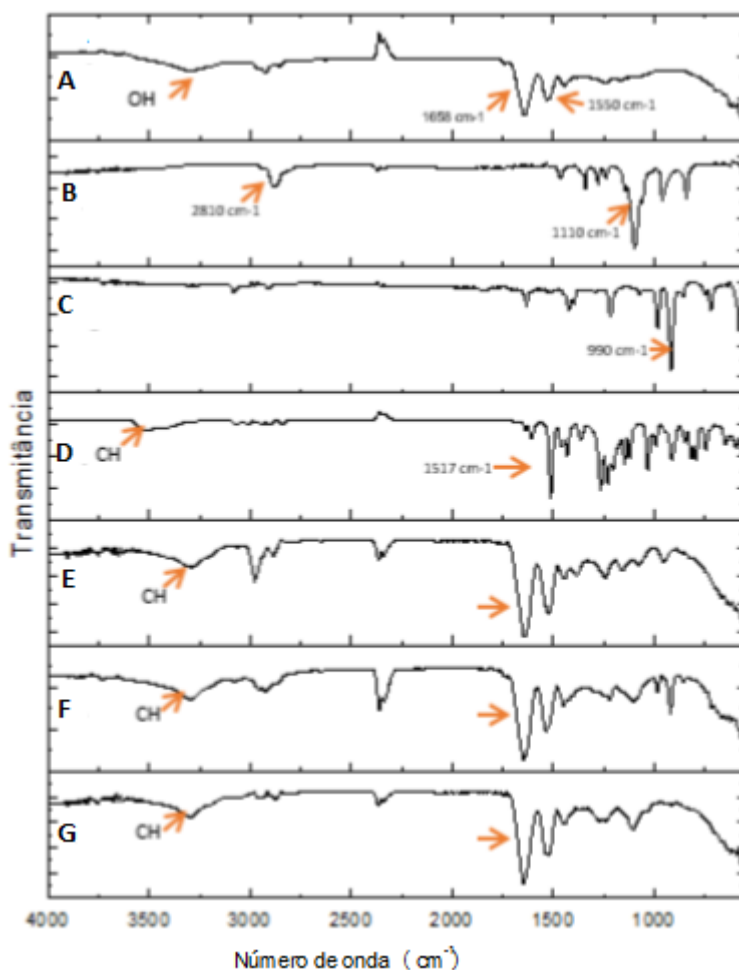
No espectro do eugenol (Figura 16-D) pode-se observar o a região 3530-3200  $\text{cm}^{-1}$  a qual é atribuída ao estiramento axial de OH e alongamento do grupo fenol O-H e da dupla C=C-H, as bandas na região de 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$  associados ao estiramento C=C do anel aromático, na região 1455-1360  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a dobragem simétrica e assimétrica do grupo  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2$ , enquanto que na região de 995 e 917 são atribuídos ao estiramento do grupo vinilo e  $-\text{C}=\text{CH}_2$ .

No espectro das nanopartículas de zeína controle (Figura 16-E) há um alongamento e algumas alterações nas formas das bandas na faixa de 2820-3089  $\text{cm}^{-1}$ , da sobreposição do grupamento OH e CH e à ligação de hidrogênio, que pode estar atribuído a presença de água, a região de 1700-1550  $\text{cm}^{-1}$  é correspondente a amidas I e II, atribuídas ao estiramento intenso nas formas de bandas, assim como um estiramento dos grupos C-O, unido a uma dobragem da união N-H, na banda 1498  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a altas interações eletrostáticas entre os grupos carbóxilos presentes no tensoativo Pluronic F-68. O espectro para a formulação de nanopartículas de zeína carregada com óleo de alho (Figura 16-F), e possível observar na região 3315  $\text{cm}^{-1}$  a sobreposição do grupo NH e OH, na região 1101  $\text{cm}^{-1}$  e possível identificar com menor intensidade o grupo alil da ligação dupla C=C, assim como o agrupamento C-S-C por volta de 950  $\text{cm}^{-1}$ , bandas características do óleo de alho. O espectro para a formulação da nanopartículas de eugenol (Figura 16-G) é possível observar a presença de bandas características do grupo ester aromático e C-vinilo, presentes no eugenol em torno de 910  $\text{cm}^{-1}$ . As interações da zeína (amida I e II), são visíveis também para as nanopartículas de eugenol (NPE) e nanopartículas de óleo de alho (NPA) (Figura 16-F e G). O alongamento intenso das bandas da zeína com (OH), correspondente aos grupos fenólicos do eugenol e alho.

**Figura 16.** Espectros de infravermelho para: A) Zeína pura; B) Pluronic F-68; C) Óleo essencial de alho; D) Eugenol; E) Nanopartículas carregadas com zeína; F) Nanopartículas carregadas com óleo essencial de alho; G) Nanopartículas carregadas com eugenol. Os espectros foram analisados em um equipamento de refletância total



atenuada (ATR), com um total de 32 acumulações na faixa de frequência de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção



#### 4.4. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial

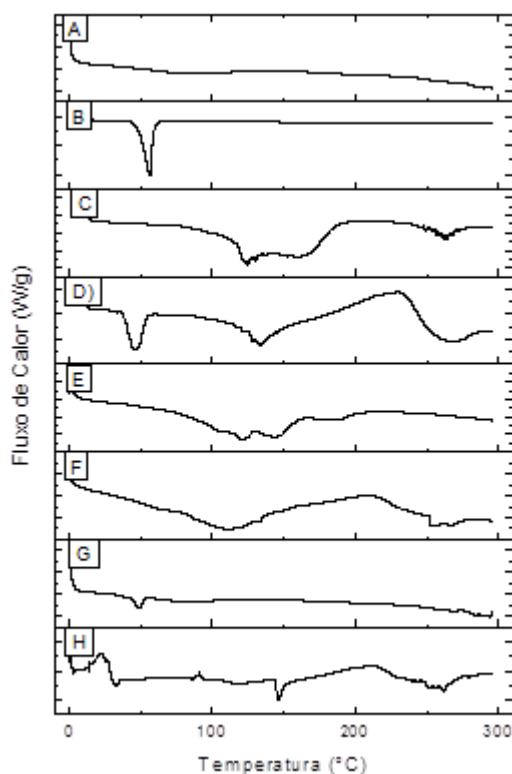
As análises de calorimetria diferencial exploratória foram realizadas para caracterizar e observar a interação do eugenol e óleo de alho com as nanopartículas de zeína. Os resultados são apresentados na figura 17, onde os termogramas indicam o fluxo de calor (W/g) em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). Estas análises foram realizadas para os constituintes das partículas (zeína e pluronic F-68), formulações e mistura física.

A zeína em pó figura 17-A apresenta um pico endotérmico pouco visível em  $78,3^{\circ}\text{C}$ , isso pode estar relacionado com a degradação da proteína. Segundo Luo; Teng; Wang, (2012), os picos característicos da zeína pura se encontram em  $73,2^{\circ}\text{C}$ , sendo que este pico poderia estar associado a evaporação de água das moléculas de

zeína. O termograma para o tensoativo Pluronic F-68 (Figura 17-B) pode-se observar apenas um pico endotérmico em 58,6°C, correspondente ao ponto de fusão (CHEN, XIANGNING *et al.*, 2017). Na mistura física de eugenol/zeína/Pluronic F-68 (Figura 17-C) pode-se observar no começo uma transição vítrea (Tg) acompanhada de uma mudança de capacidade calorífica (CP), isto acontece pelos movimentos dos segmentos das cadeias, se faz visível um pico endotérmico amplo em 119 °C o qual pode estar relacionado com a volatilização do ativo. A mistura física de óleo de alho/zeína/Pluronic F-68 (Figura 17-D) mostra o pico endotérmico de fusão óleo de alho com uma diminuição de temperatura de 58 a 48°C. No termograma do eugenol (Figura 17-E) e do óleo de alho (Figura 17-F) observa-se a presença de um pico endotérmico amplo em 122°C e 188°C, respectivamente, provavelmente relacionados a degradação e volatilização dos ativos.

No termograma das nanopartículas contendo eugenol (NPE), mostra um pico endotérmico de fusão do Pluronic F-68, com um deslocamento e diminuição da temperatura, de 58,6 ° para 47°C, isto se deve a uma maior estabilização do eugenol nas nanopartículas. Para a formulação de nanopartículas contendo óleo de alho (NPA) é possível observar o pico característico de tensoativo Pluronic F-68, sendo que houve diminuição na temperatura de aparecimento do mesmo. A redução da temperatura de fusão pode indicar a reorganização estrutural dessa matriz com moléculas hidrofóbicas, também pode ser indicativo da interação dos ativos, evidenciando que os óleos e a proteína zeína estão molecularmente dispersos na matriz. Desta maneira, através dos resultados apresentados tanto para FTIR (Figura 16) como para DSC (Figura 17), acredita-se que ocorreram interações entre a matriz proteica (zeína) e os óleos essenciais.

**Figura 17.** Termogramas de calorimetria diferencial exploratória para: A) Zeína; B) Pluronic F-68; C) Mistura Física- Eugenol; D). Mistura física de óleos essencial de alho; E) Eugenol; F) Óleo de alho; G) Nanopartículas de zeína contendo eugenol - NPE; H) Nanopartículas de zeína contendo óleo de alho – NPA.

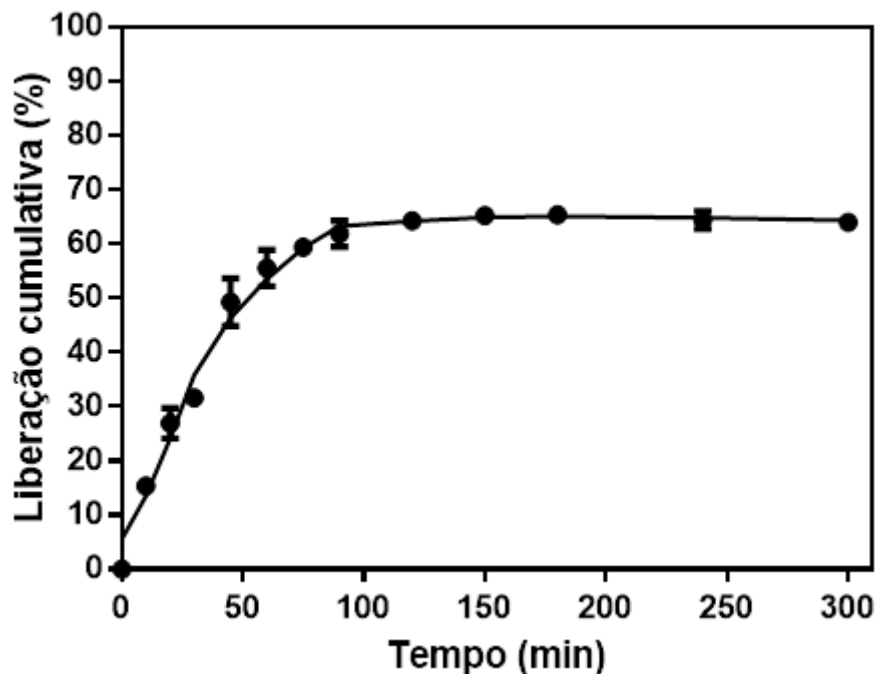


#### 4.5. Cinética de liberação do eugenol das nanopartículas

O ensaio de liberação do eugenol das nanopartículas de zeína (NPE) foi realizado utilizando a metodologia proposta no item 3.8. Neste as amostras foram analisadas por CLAE e os resultados das áreas foram convertidos em porcentagem de liberação em função do tempo (horas). Não foram realizados ensaios de nanopartículas contendo óleo de alho pois o tensoativo interferiu na quantificação por espectrofotometria.

Na Figura 18 é possível observar o perfil de liberação de eugenol através das nanopartículas de zeína. O perfil de liberação do eugenol a partir das nanopartículas de zeína mostrou uma rápida liberação nos primeiros 45 minutos de experimento, onde aproximadamente  $49,2 \pm 4,3$  % do ativo foi liberado e após este período, a liberação passa a ser mais lenta. A liberação máxima foi em torno de  $65,6 \pm 0,89$  % em aproximadamente 150 minutos de experimento.

**Figura 18.** Perfil de liberação do eugenol das nanopartículas de zeína (NPE). Ensaios realizados à 25 °C e valores expressos como a média de três experimentos (n=3).



Parris; Cooke; Hicks, (2005) prepararam nanoesferas de zeína por separação de fases contendo óleo de orégano e avaliaram o potencial destas nanopartículas em liberar de forma sustentada esses óleos essenciais a fim de maximizar a ação antimicrobiana dos mesmos. O ensaio de óleo de orégano foi realizado em tampão fosfato salino pH 7,2 com ou sem a adição de etanol. Após 24 h para o sistema contendo etanol 83% do óleo foi liberando enquanto que o sistema sem adição de etanol apresentou liberação de 61% no mesmo período de tempo. Durante as primeiras 4 horas em torno de 60% do óleo foi liberado a uma taxa constante enquanto que nas outras 20 horas subsequente a liberação ocorreu numa taxa mais baixa.

Marini *et al.* (2014) prepararam nanopartículas de zeína para encapsular e liberar terpinen-4-ol pelo método de precipitação por anti-solvente. O composto bioativo foi encapsulado sozinho e na presença de melhoradores de penetração na pele, tais como, ácido oleico, propilenoglicol e R-(+)-limoneno. As nanopartículas contendo apenas zeína e o composto bioativo apresentaram liberação de 55,9% em 7 horas de experimento, enquanto que as nanopartículas preparadas com ácido oleico e limoneno apresentaram no mesmo período de tempo liberação de 36,5% e 27,8%, respectivamente. As nanopartículas contendo propilenoglicol apresentaram a menor

porcentagem de liberação (19,6%) quando comparado com as outras nanopartículas no mesmo período de tempo.

Os resultados obtidos neste estudo, corroboram com os descritos nos trabalhos em literatura, uma vez que as nanopartículas de zeína modularam o perfil de liberação do eugenol. Em nosso estudo, o eugenol atingiu 60 % de liberação com cerca de 100 minutos. Portanto, destaca-se que foi utilizado nos experimentos 5% de DMCO, o que contribuiu para uma liberação mais rápida em comparação aos estudos descritos.

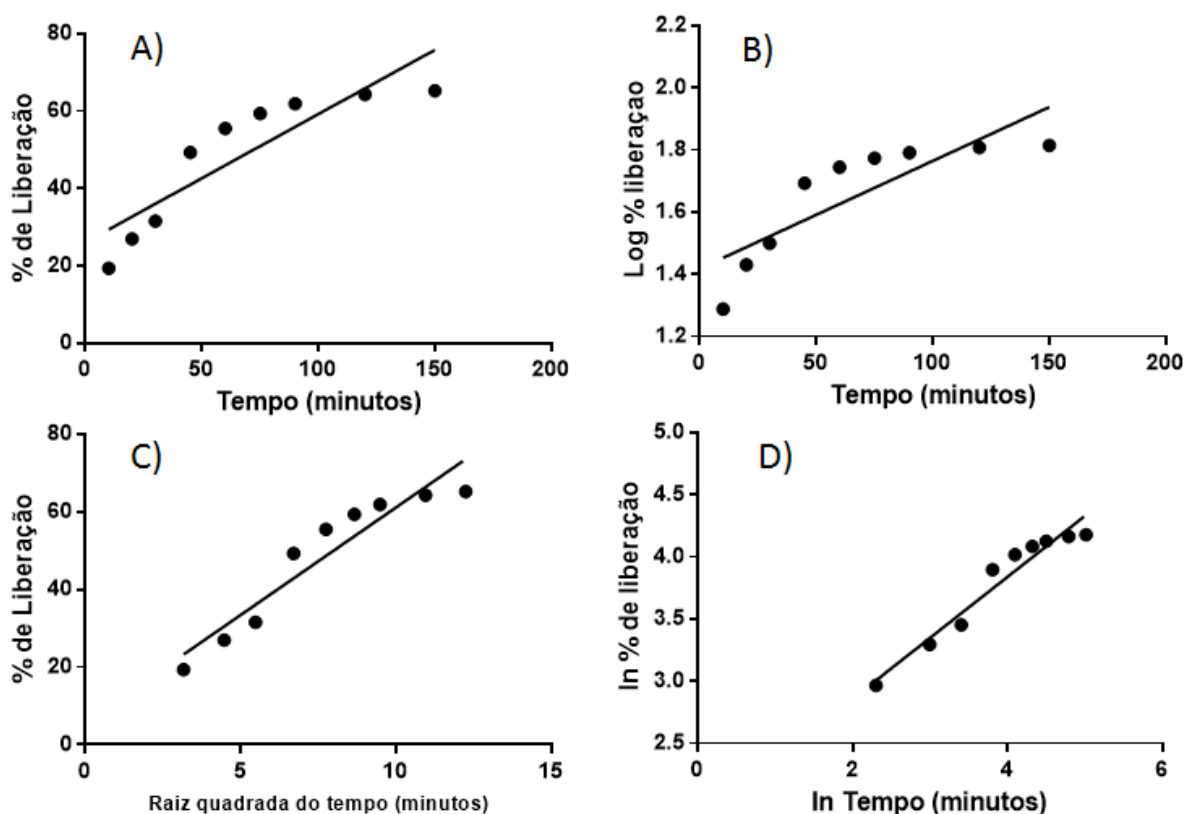
A fim de compreender o mecanismo de liberação do eugenol através da nanopartículas de zeína, foram aplicados diferentes modelos matemáticos (Ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas). A Tabela 11 e a Figura 18, mostram os ajustes para os diferentes modelos avaliados: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Foi usada regressão linear a fim de calcular o coeficiente de correlação ( $r$ ) a constante de liberação ( $k$ ).

**Tabela 11.** Coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para os diferentes modelos matemáticos estudos para liberação do eugenol nas nanopartículas de zeína

Nanopartículas	Ordem-Zero		Primeira-Ordem		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$k$ ( $h^{-1}$ )	$r$	$k$ ( $h^{-1}$ )	$R$	$k(h^{-1/2})$	$r$	$k(h^{-1})$	$n$	$r$
<b>Zeína</b>	0,3315	0,7845	0,003	0,7072	5,539	0,8971	2,036	0,533	<b>0.9424</b>

Levando em consideração o perfil de liberação do eugenol a partir das nanopartículas de zeína, observa-se que o modelo matemático que melhor se ajustou ao perfil de liberação foi o modelo de Korsmeyers-Peppas. Este modelo considera que a liberação do eugenol obedece a Lei de Fick ou é decorrente de fenômenos de relaxamento (transporte Caso II). De acordo com o valor de  $n$  obtido (0,533) o que é indicativo de cinética de transporte anômalo, ou seja, a combinação dos mecanismos de difusão e transporte de Caso II (DASH *et al.*, 2010; SIEPMANN; PEPPAS, 2011).

**Figura 19.** Ajustes matemáticos para os diferentes modelos matemáticos estudados para a liberação do eugenol nas nanopartículas de zeína. A) ordem zero; B) primeira ordem; C) Higuchi e D) Korsmeyer-Peppas.

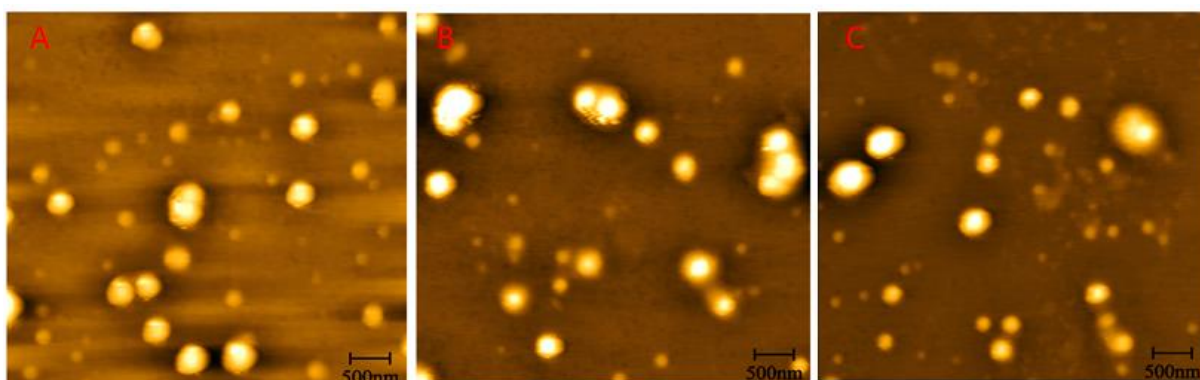


Marini *et al.*, (2014) aplicaram quatro modelos matemáticos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas sobre a liberação de terpinen-4-ol. De acordo com os autores, o modelo que mais se ajustou a liberação do terpinen-4-ol foi o modelo de ordem zero, entretanto, o modelo de Korsmeyer-Peppas também apresentou valores de  $r$  de aproximadamente 0,99, ou seja, também se ajustando ao perfil de liberação do terpinen-4-ol. Na ausência de melhoradores de penetração na pele a liberação do terpinen-4-ol foi próximo de 1, indicando que a liberação obedece a cinética de ordem zero enquanto que a liberação a partir das nanopartículas contendo agentes melhoradores de penetração na pele ficaram entre 0,75-0,83 isto é indicativo de transporte anômalo, envolvendo difusão e relaxamento das cadeias poliméricas.

#### 4.6. Microscopia de força atômica

A técnica de microscopia de força atômica foi utilizada para analisar a morfologia das nanopartículas de zeína (NPE, NPA e NPEA). A partir da figura 20 se pode verificar os aspectos morfológicos das nanopartículas contendo os óleos.

**Figura 20.** Micrografias das nanopartículas de zeína contendo A) eugenol, B) óleo de alho e C) mistura de eugenol e óleo de alho.



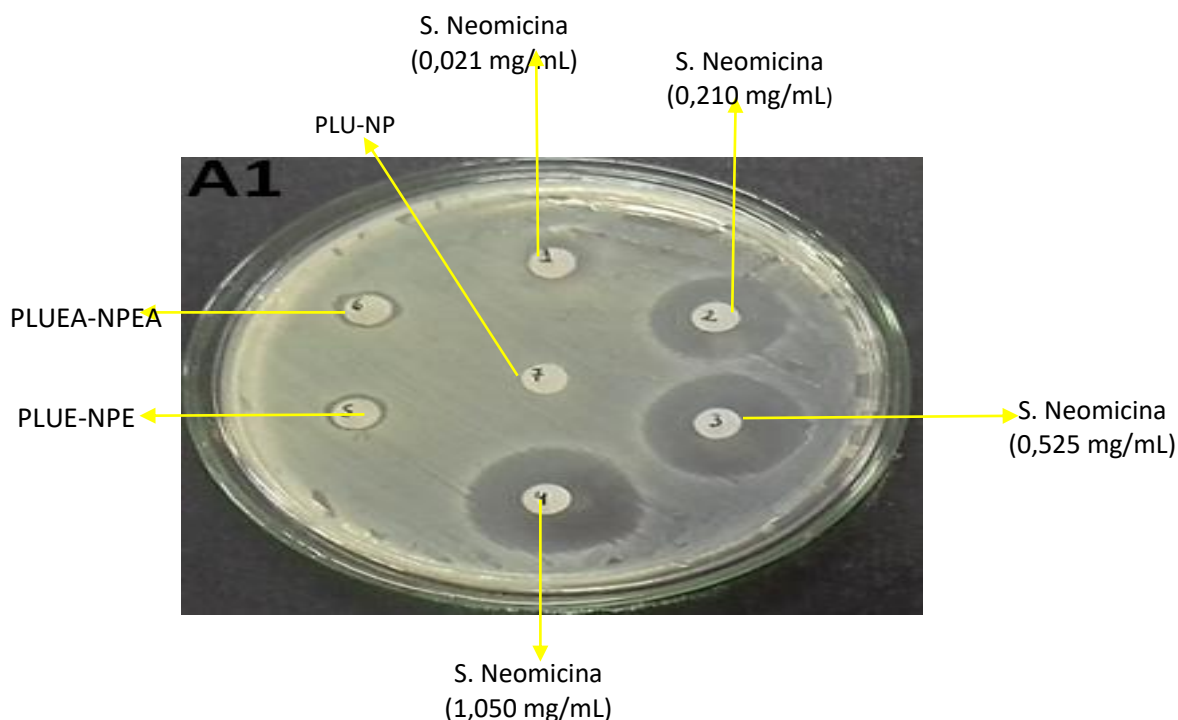
Para todas as nanoformulações analisadas observou-se que as nanopartículas apresentam geometria esférica. As nanopartículas contendo eugenol (Figura 20-A), óleo e alho (Figura 20-B) e a mistura dos dois óleos (Figura 20-C) apresentaram diâmetro médio de  $200,0 \pm 54,9$  nm;  $300,0 \pm 50,32$  nm e  $330,0 \pm 40,12$  nm, respectivamente. Para a análise de distribuição de tamanho foram consideradas 20 partículas, desta forma, o diâmetro médio obtido por esta técnica foi um pouco superior do que diâmetro determinado pelas técnicas de DLS e NTA. Essa diferença pode ser explicada pela polidispersividade dos sistemas bem como pelo número reduzido de nanopartículas que foram consideradas para mensurar a distribuição de tamanho por esta técnica.

Técnicas semelhantes foram observados por Chen, Huaiqiong; Zhong, (2015) que empregaram a técnica de microscopia de força atômica para caracterizar nanopartículas de zeína estabilizadas com goma arábica contendo óleo essencial de hortelã-pimenta. Os resultados desse estudo mostraram que as nanopartículas apresentaram uma morfologia esférica com diâmetro médio de  $128,7 \pm 37,4$  nm.

#### 4.7. Ensaio de disco de difusão

A técnica de ensaio de disco de difusão determina o potencial antimicrobiano da substância em questão. Neste trabalho os testes foram realizados com 3 diferentes tipos de bactérias responsáveis por infecção em peixes (*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Streptococcus iniae*), sendo a substância testada nanopartículas contendo eugenol e óleo de alho, denominadas NPE, NPA e NPEA e em forma de emulsão utilizando o tensoativo pluronic (PLUE, PLUA e PLUEA) Figura . Como controles foram utilizadas as nanopartículas sem ativo (NP), solução de pluronic (PLU), assim como um controle positivo de Sulfato de Neomicina (Bacter - Labcon®) na concentração de uso (0,021 mg/mL) e dez (0,210 mg/mL), vinte e cinco (0,525 mg/mL) e cinquenta (1,050 mg/mL) vezes maior que a concentração de uso.

**Figura 21.** Representação esquemática de como foram montadas as placas com os diferentes tratamentos



Os resultados dos testes mostraram que o antibiótico (controle positivo de Sulfato de neomicina) apresenta atividade proporcional as concentrações testadas (Figura 21). As amostras contendo eugenol e mistura de eugenol e alho de óleo

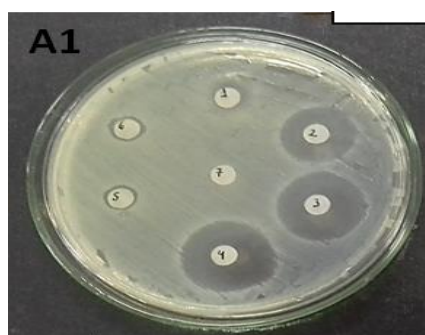


encapsulados apresentaram atividade, assim como as formas de emulsão com pluronic (Figura 21).

**Figura 22.** Placas de *Aeromonas hydrophila* (A), *Edwardsiella tarda* (B) e *Streptococcus iniae* (C) expostas às amostras. As placas A1, B1 e B2 referem-se a: 1. Sulfato de Neomicina 0,021mg/mL, 2. 0,210 mg/mL, 3. 0,525 mg/mL, 4. 1,050 mg/mL, 5. PLUE, 6. PLUEA e 7. PLU. As placas A2, B2 e C2 referem-se a: 1. Sulfato de Neomicina 0,021mg/mL, 2. 0,210 mg/mL, 3. 0,525 mg/mL, 4. 1,050 mg/mL, 5. NPE (5 mg/mL), 6. NPAE (5 mg/mL) e 7 NP.

### Emulsão

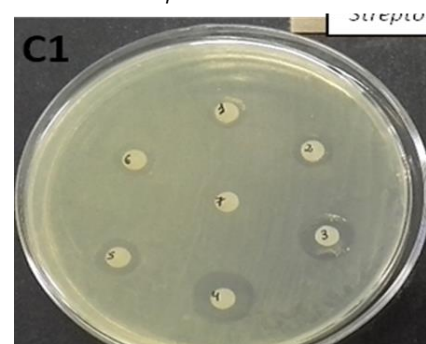
*Aeromonas hydrophila*



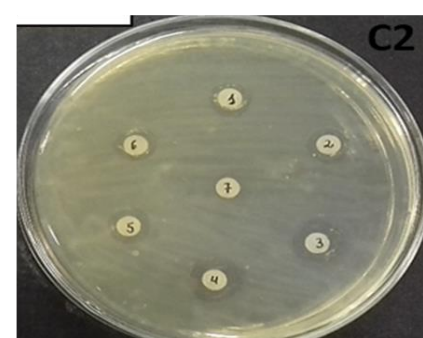
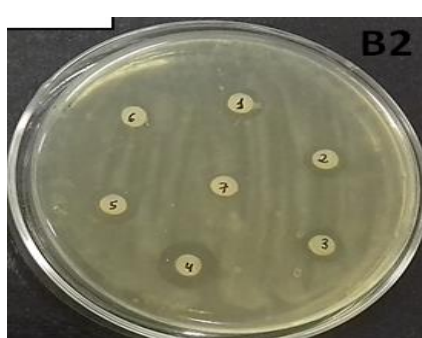
*Edwardsiella tarda*



*Streptococcus iniae*

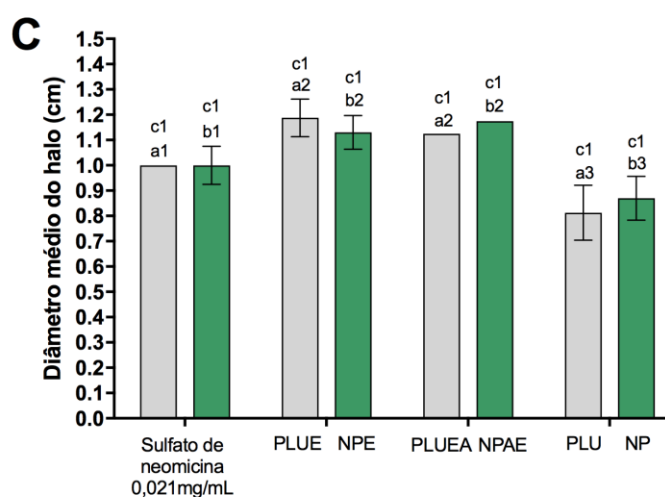
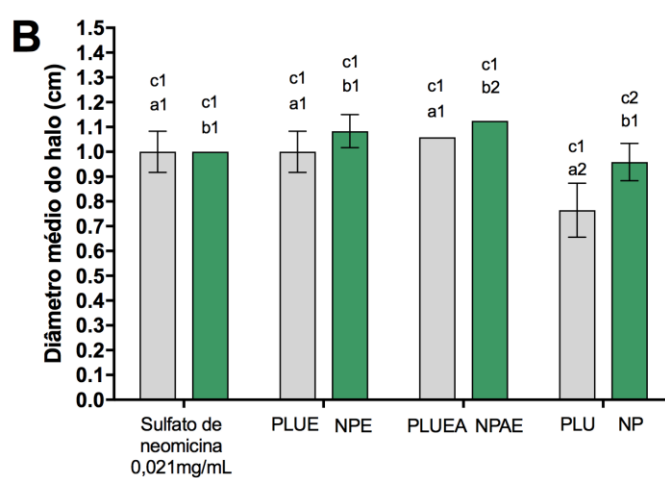
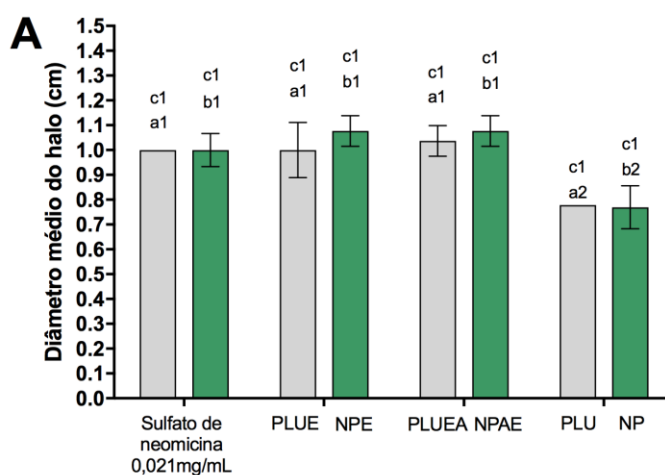


### Nanopartículas



Em geral a atividade das substâncias testadas, sejam nanopartículas ou emulsão, não apresentaram diferença aparente com relação aos diferentes tipos de bactérias utilizadas. Porém quando foi realizado o cálculo quantitativo baseado no tamanho do halo formado foi possível observar que os halos em *Streptococcus iniae* apresentaram maior diferença quando comparados ao controle positivo (Figura 22).

**Figura 23.** Valores de halo médio formado pelo tratamento das bactérias *Aeromonas hydrophila* (A); *Edwardsiella tarda* (B) e *Streptococcus iniae* (C) após exposição as amostras de Sulfato de Neomicina (0,021mg/mL), PLUE, NPE, PLUEA, NPEA, PLU e NP (valores expressos como a média de três determinações). Comparações: a: entre os diferentes acompanhamentos; b: entre as diferentes nanopartículas; c: entre acompanhamentos e nanopartículas. Significância  $p < 0,05$ .



Os tratamentos contendo os ativos eugenol e eugenol com óleo de alho na concentração de 5 mg/mL apresentaram halos semelhantes para os três tipos de bactérias testadas, porém nos testes com *Streptococcus iniae* as diferenças foram significativas para PLUE, NP e PLUEA e NPAE, quando comparados com o antibiótico

de uso comercial, assim como para *Edwardsiella tarda* nas análises que utilizaram NPAE (Figura 22 B e C).

Estes resultados são interessantes, pois os sistemas desenvolvidos neste estudo mostraram ser tão eficazes quanto ao antibiótico convencional, desta maneira além das diversas vantagens da encapsulação de ativos como o eugenol e óleo de alho (aumento estabilidade, diminuição de perda por volatilização, etc) os mesmos ainda apresentaram atividade biológica *in vitro* para as bactérias patogênicas (*Aeromonas hydrophila*; *Edwardsiella tarda* e *Streptococcus iniae*).

Outro aspecto observado é a semelhança existente entre os resultados dos ativos (eugenol e óleo de alho) encapsulados em NP em relação as emulsões dos ativos com pluronic. Tal fato demonstra que as micelas de tensoativo também podem funcionar como um sistema de liberação (micelas) e desta forma, promovendo atividade biológica similar aos sistemas encapsulados. No entanto é interessante destacar que de acordo com os dados de eficiência de encapsulação em função do tempo para o eugenol e óleo de alho, assim como também do perfil de perda de eugenol e óleo de alho de emulsões de pluronic no mesmo período de tempo (Figura 15), a atividade biológica das formulações com nanopartículas de zeína devem ser mais ativas ao longo do tempo que as dos controles com pluronic. Estes estudos serão realizados no sentido de comprovar esta hipótese.

Já em relação aos controles NP e PLU, a Figura 22 mostra que estes apresentaram um menor valor de formação de halo, demonstrando que estes sistemas carreadores não possuem atividade antibactericida.

## 5. CONCLUSÃO

Até o momento este trabalho apresenta informações referentes ao preparo e caracterização de nanopartículas de zeína contendo eugenol e óleo de alho. Com base nos resultados através de método precipitação com anti-solvente, foi possível alcançar uma eficiência de encapsulação média de aproximadamente 90% para os ativos, indicando uma boa interação dos óleos com o sistema. Com base nas medidas de diâmetro hidrodinâmico as formulações apresentaram valores médios de 200 nm respectivamente, índice de polidispersão médio de 0,152, potencial zeta médio de -30 mV e concentração média de  $3 \times 10^{12}$  nanopartículas/mL. As partículas mostraram variações na estabilidade ao longo do tempo (90 dias), mas de uma maneira geral o sistema foi bem estável dentro do período de realização dos ensaios. As análises de FTIR e DSC mostraram que existem alterações devido a presença dos ativos nas nanopartículas de zeína. O ensaio de liberação do eugenol mostrou que este ativo é liberado das nanopartículas de zeína por um mecanismo de transporte anômalo. Também o ensaio de disco de difusão demonstrou que as nanopartículas de zeína contendo eugenol e óleo de alho foram capazes de inibir as bactérias *Aeromonas hydrophila*; *Edwardsiella tarda* e *Streptococcus iniae* da mesma forma que o produto comercial a base de sulfato de neomicina (controle positivo). Até o momento a literatura apresenta poucos trabalhos relacionados a encapsulação de compostos naturais a base de óleos e que demonstrem atividade biológica similar a sistemas convencionais e desta forma, este estudo abre perspectivas para o controle de doenças em peixes provocadas por bactérias utilizando sistemas à base de nanopartículas de zeína.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, Ümit *et al.* Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture** v. 437, p. 282–286, fev. 2015.

AGNEW, Wendy; BARNES, Andrew C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. **Veterinary Microbiology** v. 122, n. 1–2, p. 1–15, 16 maio 2007.

AMAL, Mohammad Noor Azmai; ZAMRI-SAAD, M.; OTHERS. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. **Pertanika J Trop Agric Sci** v. 34, n. 2, p. 195–206, 2011.

ANVISA. DAVI RUMEL ANEXO GUIA PARA ISENÇÃO E SUBSTITUIÇÃO DE ESTUDOS DE. , 2002.

AQUINO, Luciana Cristina Lins De *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. , 2010. Disponível em: <<https://ri.ufs.br/handle/123456789/1525>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

ARAUJO, Adriana Faraco de Oliveira [UNESP. Atividade larvicida dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* em populações de *Aedes aegypti*. **Aleph** p. 63 f. : il. , 28 jul. 2014.

ASHRAF, 2011.pdf. . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

AYALA-ZAVALA, J. Fernando *et al.* Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry** v. 60, n. 3–4, p. 359–368, 1 abr. 2008.

BABA, Esin *et al.* Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture** v. 465, p. 13–18, 1 dez. 2016.

BAIANO, Justice C.F.; BARNES, Andrew C. Towards Control of *Streptococcus iniae*. **Emerging Infectious Diseases** v. 15, n. 12, p. 1891–1896, dez. 2009.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology** v. 46, n. 2, p. 446–475, fev. 2008.

BALAKRISHANAN, Gunalan; KUMARAN, Ramchandran; OTHERS. Comparison of *Penaeus monodon* (Crustacea, Penaeidae) growth between commercial feed vs commercial shrimp feed supplemented with *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) seaweed sap. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux)** v. 4, n. 3, 2011. Disponível em: <[http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth\\_type=crawler&jrnl=18448143&AN=67415750&h=oYuZX3Sq6SCwnWNI9qdQ2zqhAH](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth_type=crawler&jrnl=18448143&AN=67415750&h=oYuZX3Sq6SCwnWNI9qdQ2zqhAH)>

nOPoe4sAakTWaWnJfyzSzpJPaXFmAE9tmXK5Qr90wsfhvdmfBsBhsfF%2FYtIA%3D%3D&crl=c>. Acesso em: 7 nov. 2016.

BHATTACHARYYA, Atanu *et al.* Nanotechnology - a unique future technology in aquaculture for the food security. **International Journal of Bioassays** v. 4, n. 7, p. 4115–4126 , 30 jun. 2015.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Pharmaceutical drugs in the environment. **Química Nova** v. 26, n. 4, p. 523–530 , ago. 2003.

BLOCK, Eric *et al.* Organosulfur chemistry of garlic and onion: Recent results. **ResearchGate** v. 65, n. 4, p. 625–632 , 1 abr. 1993.

BOYD, Claude; MCNEVIN, Aaron. **Aquaculture, Resource Use, and the Environment** Google-Books-ID: shnuBQAAQBAJ. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2014. 466 p. Aquaculture, Resource Use, and the Environment will be vital resource for anyone involved in the field of aquaculture.978-1-118-85781-6.

BRAVO, SILVA. CASILLA 1327 PUERTO MONTT-CHILE. , 2005. Disponível em: <<http://www.fip.cl/FIP/Archivos/pdf/informes/inffinal%202003-28.pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2016.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology** v. 94, n. 3, p. 223–253 , ago. 2004.

CALDERÓN-JIMÉNEZ, Bryan *et al.* Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. **Frontiers in Chemistry** v. 5 , 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2017.00006/full>>. Acesso em: 1 maio 2017.

CAMPAGNOLO, Rodrigo *et al.* Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** v. 14, n. 3 , 2013. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewArticle/2808>>. Acesso em: 9 nov. 2016.

CANABARRO, Terezinha Flores *et al.* BACTERIAL AND VIRAL ISOLATIONS FROM FISHES FROM THE WATER OF SANTA MARIA COUNTY AND SURROUNDINGS. **Ciência Rural** v. 22, n. 1, p. 93–100 , abr. 1992.

CANOVA, Raíssa *et al.* Oligodeoxynucleotides CpGs increase silver catfish (*Rhamdia quelen*) resistance to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Aquaculture** v. 473, p. 278–282 , abr. 2017.

CARRASCHI, S. P. *et al.* Efficacy of the florfenicol and of the oxytetracycline in the control in *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 63, n. 3, p. 579–583 , 2011.

CARRASCO A., H. *et al.* Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (Part I). **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 19, n. 3, p. 543–548 , 2008.

CHAGAS. *Controle de parasitas utilizando extratos vegetais*. - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/528747/control-de-parasitas-utilizando-extratos-vegetais>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

CHEN, Huaiqiong; ZHONG, Qixin. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids** v. 43, p. 593–602 , jan. 2015.

CHEN, Xiangning *et al.* Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh-cut lettuce. **Food Chemistry** v. 214, p. 432–439 , jan. 2017.

CHITMANAT, Chanagun *et al.* The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Songklanakarin J. Sci. Technol** v. 27, n. Suppl 1, p. 359–64 , 2005.

CHOUINARD, Francois *et al.* Preparation and purification of polyisohexylcyanoacrylate nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics** v. 72, n. 3, p. 211–217 , 17 jun. 1991.

CIPRIANO, Rocco C.; BULLOCK, Graham L.; PYLE, S. W. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. , 1984. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/usfwspubs/134/>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

COLORNI, A. *et al.* Streptococcus iniae infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. **Diseases of aquatic organisms** v. 49, n. 3, p. 165–170 , 2002.

DA ROSA, Cleonice Gonçalves *et al.* Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** v. 481, p. 337–344 , set. 2015a.

DA ROSA, Cleonice Gonçalves *et al.* Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** v. 481, p. 337–344 , 20 set. 2015b.

DA SILVA, Thaís Cavalcante; DE OLIVEIRA, Jordana Rodrigues; DE SOUZA, Sônia Júlia Oliveira. Extração de Eugenol a Partir do Cravo da Índia e Produção de Sabonetes Aromatizados. **Revista Crase. edu** v. 1, n. 1, p. 50–61 , 2012.

DAKA, Deresse. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. **African journal of Biotechnology** v. 10, n. 4, p. 666–669 , 2011.

DANIEL, Aparecido N. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 19, n. 1B, p. 212–217 , 2009.

DASH, Suvakanta *et al.* Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Pol Pharm** v. 67, n. 3, p. 217–23 , 2010.

DE QUEIROZ, Marieta Nascimento; DE ALMEIDA, Zuleika Tavares. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA *Piper aduncum* L EM MONOGENÉTICOS E NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* CUVIER 1818. , 2013. Disponível em: <<http://repositorio.inpa.gov.br/handle/123/714>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

DIAS, Marcia K.R. *et al.* Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. **Veterinary Microbiology** v. 188, p. 12–15 , maio 2016.

DOMINGUEZ, Gustavo A. *Nanotechnology in the Aquaculture Industry*. **Sustainable Nano**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://sustainable-nano.com/2014/02/11/nanotechnology-in-the-aquaculture-industry/>>. Acesso em: 10 nov. 2016. , 11 fev. 2014

EMBRAPA. *Plantas medicinais melhoram saúde dos peixes em piscicultura - Portal Embrapa*. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/6658495/plantas-medicinais-melhoram-saude-dos-peixes-em-piscicultura>>. Acesso em: 9 nov. 2016.

ENJETI, Anoop K. *et al.* Correlative analysis of nanoparticle tracking, flow cytometric and functional measurements for circulating microvesicles in normal subjects. **Thrombosis Research** v. 145, p. 18–23 , set. 2016.

FAO. **State of world fisheries and aquaculture 2016 (spanish)**. OCLC: 954536980. S.l.: Food & Agriculture Org, 2016. .978-92-5-309185-0.

F. SOUZA, Carine *et al.* In vivo bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Aeromonas hydrophila*: Silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. **Microbial Pathogenesis** v. 98, p. 82–87 , set. 2016.

FERGUSON, H. W.; MORALES, J. A.; OSTLAND, V. E. Streptococcosis in aquarium fish. **Diseases of Aquatic Organisms** v. 19, n. 1, p. 1–6 , 1994.

FIGUEIREDO, H. C. P. *et al.* Streptococcus iniae outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L: ) farms. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 43, n. 2, p. 576–580 , jun. 2012.

FRANS, I. *et al.* *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. **Journal of Fish Diseases** PMID: 21838709, v. 34, n. 9, p. 643–661 , set. 2011.

FRANZ, C.; BASER, Khc; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal** v. 25, n. 5, p. 327–340 , 1 set. 2010.

FU, Xiaozhe *et al.* Protective immunity against iridovirus disease in mandarin fish, induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus. **ResearchGate** PMID: 22971336, v. 33, n. 4, p. 880–5 , 21 ago. 2012.



GABOR, Erol-Florian; ŞARA, Aurel; BARBU, Aurelian. The effects of some phytoadditives on growth, health and meat quality on different species of fish. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies** v. 43, n. 1, p. 61–65 , 2010.

GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, Fernando. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa** v. 3, n. 1, p. 29–45 , 2014.

GOHARRIZI, L. Y. *et al.* The study on effect of temperature stress on occurrence of clinical signs caused by *Aeromonas hydrophila* in *Capoeta damascina* in in vitro condition. **Adv. Anim. Vet. Sci** v. 3, n. 7, p. 406–412 , 2015.

GONZALEZ, Marcelo S. *et al.* Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 24, n. 4, p. 413–418 , ago. 2014.

GONZÁLEZ-MANTILLA, Jaime Fernando. Farmacología, Terapéutica y Anestesia de Peces. **Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional** v. 6, n. 1, p. 50–62 , 15 fev. 2010.

GUSTAFSON *et al.* Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology** v. 26, n. 3, p. 194–198 , 1 mar. 1998.

HANDY, R. D. FSBI briefing paper: nanotechnology in fisheries and aquaculture. **Fisheries Society of the British Isles** p. 1–29 , 2012.

HARIKRISHNAN, Ramasamy; BALASUNDARAM, Chellam; HEO, Moon-Soo. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture** v. 317, n. 1–4, p. 1–15 , jul. 2011.

HIRAI, Yuji *et al.* *Edwardsiella tarda* bacteremia. A rare but fatal water- and foodborne infection: Review of the literature and clinical cases from a single centre. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology** PMID: 26744588PMCID: PMC4692300, v. 26, n. 6, p. 313–318 , 2015.

HU, Kun; MCCLEMENTS, David Julian. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Research International** v. 64, p. 329–335 , out. 2014. Acesso em: 25 ago. 2014.

IPEK, Evrim *et al.* Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chemistry** v. 93, n. 3, p. 551–556 , dez. 2005.

JARIYAPONG, Pitchanee *et al.* Delivery of double stranded RNA by *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus-like particles to protect shrimp from white spot syndrome virus. **Aquaculture** v. 435, p. 86–91 , jan. 2015.

KONG, Xianghui *et al.* *H2A* and *Ca-L-hipposin* gene: Characteristic analysis and expression responses to *Aeromonas hydrophila* infection in *Carassius auratus*. **Fish & Shellfish Immunology** v. 63, p. 344–352 , abr. 2017.

KUGE, Toshihiro *et al.* *Aeromonus hydrophila*, a Causative Agent of Mass Mortality in Cultured Japanese Catfish Larvae (*Silurus asotus*). **Fish Pathology** v. 27, n. 2, p. 57–62, 1992.

LIMA, L. C. *et al.* Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from pacu *Myleus micans*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 60, n. 1, p. 275–277, fev. 2008.

LIU, Fuguo; MA, Cuicui; *et al.* A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution. **Food Hydrocolloids** v. 63, p. 625–634, fev. 2017.

LIU, Fuguo; TANG, Xiaoqian; *et al.* Comparative study of the vaccine potential of six outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* and the immune responses of flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 185, p. 38–47, mar. 2017a.

LIU, Fuguo; TANG, Xiaoqian; *et al.* Construction and evaluation of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccine encoding outer membrane protein C. **Microbial Pathogenesis** v. 104, p. 238–247, mar. 2017b.

LUCAS, John S.; SOUTHGATE, Paul C. (Orgs.). **Aquaculture: farming aquatic animals and plants** OCLC: 837248979. 2. ed ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012. 629 p. .978-1-4051-8858-6.

LUO, Yangchao; TENG, Zi; WANG, Qin. Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 60, n. 3, p. 836–843, 25 jan. 2012.

LUO, Yangchao; WANG, Qin. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. **Journal of Applied Polymer Science** v. 131, n. 16, p. n/a–n/a, 15 ago. 2014.

LUQUE, José Luis. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 13, n. Supl 1, p. 161–165, 2004.

MARIN, Edgar; BRICEÑO, Maria Isabel; CABALLERO-GEORGE, Catherina. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. **International Journal of Nanomedicine** PMID: 23990720PMCID: PMC3753153, v. 8, p. 3071–3090, 2013.

MARINI, Vanderléia G. *et al.* Biodegradable nanoparticles obtained from zein as a drug delivery system for terpinen-4-ol. **Química Nova** v. 37, n. 5, p. 839–843, jun. 2014.

MARTINS, Rosana Mendonça; CORTEZ, Lúcia Elaine Ranieri; FELIPE, Daniele Fernanda. Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregando o óleo essencial extraído do cravo-da-índia. **Saúde e Pesquisa** v. 1, n. 3, p. 259–263, 2009.

MAZZAFERA, Paulo. Allelopathic effects of the alcoholic extract of clove and eugenol. **Brazilian Journal of Botany** v. 26, n. 2, p. 231–238, jun. 2003.

MENDES, Ana Isabel da Silva. Preparação e caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas contendo miconazol. , 2012. Disponível em: <<http://repositorio.utad.pt/handle/10348/2485>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

MILLER, John C. (Org.). **The handbook of nanotechnology: business, policy, and intellectual property law**. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, 2005. 368 p. .978-0-471-66695-0.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y.; OTHERS. Nanoparticles—a review. **Trop J Pharm Res** v. 5, n. 1, p. 561–573 , 2006.

MOMESSO, Luciano da Silva; MOURA, Rute Mendonça Xavier De; CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim. Antitumoral activity of the *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 19, n. 3, p. 660–663 , set. 2009.

MONTES, S. de S.; SANTANA-NETA, L. G.; CRUZ, Renato Souza. Óleos essenciais em embalagens para alimentos-Revisão de literatura de 2000 a 2012. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693** v. 5, n. 1–2, p. 1 , 2014.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics** v. 385, n. 1–2, p. 113–142 , 29 jan. 2010.

MOREIRA, Antonio Glaydson Lima *et al.* Eficácia do eugenol extraído da planta *Eugenia aromática* como anestésico para realização de biometrias em adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences** v. 32, n. 4 , 25 out. 2010. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/9973>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MURATORI, M. C. S. *et al.* Edwardsiella septicemia mortality in tilapia-integrated with pig in fish farming. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 53, n. 6, p. 658–662 , dez. 2001.

MURGAS, Luis David Solis *et al.* Aceite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2010, [S.l: s.n.], 2010. p.69–76. Disponível em: <<http://revistas.um.es/analesvet/article/view/125061/0>>. Acesso em: 9 nov. 2016.

MUSTHAFI, Mohamed Saiyad *et al.* Protective efficacy of Azomite enriched diet in *Oreochromis mossambicus* against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture** v. 451, p. 310–315 , jan. 2016.

NDONG, Diegane *et al.* The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. **Fish & Shellfish Immunology** v. 22, n. 6, p. 686–694 , jun. 2007.

NEELY, Melody N.; PFEIFER, John D.; CAPARON, Michael. Streptococcus-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis. **Infection and Immunity** PMID: 12065534PMCID: PMC128100, v. 70, n. 7, p. 3904–3914 , jul. 2002.

NGUYEN, Huu T; KANAI, Kinya; YOSHIKOSHI, Kazuma. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. **Aquaculture** v. 205, n. 1–2, p. 7–17 , 28 fev. 2002.

OLIVEIRA, Juliana Guerra De; ABREU FILHO, Benício Alves De. Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)** v. 71, n. 2, p. 410–414 , 2012.

OSTRENSKY, A. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, DF: Ed. dos Autores, 2008. 271 p. A produção aquícola brasileira; Principais sistemas produtivos empregados comercialmente; O papel do poder público no desenvolvimento da aquíicultura brasileira; Organização e administração do setor para o desenvolvimento da aquíicultura; Principais problemas enfrentados atualmente pela aquíicultura brasileira; Potencial para o desenvolvimento da aquíicultura no Brasil; Aquíicultura, segurança alimentar sanidade e meio ambiente; Aspectos da viabilidade econômica da aquíicultura em pequena e média escala; Reflexões sobre as bases técnicas e conceituais para o desenvolvimento da aquíicultura; Propostas estruturais e executivas para consolidação da aquíicultura brasileira.978-85-60930-00-5.

PARK, Seong Bin; AOKI, Takashi; JUNG, Tae Sung. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. **Veterinary Research** PMID: 23035843PMCID: PMC3479428, v. 43, n. 1, p. 67 , 2012.

PARRIS, Nicholas; COOKE, Peter H.; HICKS, Kevin B. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 53, n. 12, p. 4788–4792 , jun. 2005.

PAVANELLI, Gilberto Cezar; EIRAS, Jorge da Costa; TAKEMOTO, Ricardo Massato. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. [S.l.]: Eduem, 2002. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=402504&indexSearch=ID>>. Acesso em: 29 nov. 2016. .978-85-85545-67-3.

PEREIRA, Alcilene de Abreu *et al.* Chemical characterization and inhibitory effect of essential oils on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia** v. 32, n. 3, p. 887–893 , jun. 2008.

PEREIRA, Anderson E. S. *et al.* Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials** PMID: 24508945, v. 268, p. 207–215 , 15 mar. 2014.

PICÓN-CAMACHO, S. M. *et al.* An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. **Parasitology** PMID: 22078025, v. 139, n. 2, p. 149–190 , fev. 2012.

RAFE, Ali. Physicochemical Characteristics of Garlic (*Allium sativum* L.) Oil: Effect of Extraction Procedure. **International Journal of Nutrition and Food Sciences** v. 3, n. 6, p. 1 , 2014.

RATHER, M. A. *et al.* Nanotechnology: a novel tool for aquaculture and fisheries development. A prospective mini-review. **Fisheries and Aquaculture Journal** v. 16, p. 1–5 , 2011.

REVERTER, M. *et al.* Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture** v. 433, p. 50–61 , 20 set. 2014.

ROCÍO TERUEL, M. *et al.* Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. **Food Chemistry** v. 172, p. 40–46 , abr. 2015.

ROMA. **State of world fisheries and aquaculture 2012: spanish edition**. OCLC: 939618611. Place of publication not identified: Food & Agriculture Organi, 2012. .978-92-5-307225-5.

ROTILI, Daniel Antonio *et al.* Eugenol as anesthetic for *Piaractus mesopotamicus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical** v. 42, n. 3, p. 288–294 , 2012.

RUSSO, Riccardo; MITCHELL, Hugh; YANONG, Roy P.E. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. **Aquaculture** v. 256, n. 1–4, p. 105–110 , jun. 2006.

SAGHAEI, Ali; GHOTBEDDIN, Negar; GHATRAMI, Ebrahim Rajabzadeh. Evaluation of growth performance and body composition of Oscar fish (*Astronotus ocellatus*) in response to the consumption of dietary intake of garlic (*Allium sativum*). **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux)** v. 8, n. 4 , 2015. Disponível em: <[http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth\\_type=crawler&jrnl=18448143&AN=109578151&h=goawtBT0rBh50SZEfwzmWreRm01vnZdtAdH87fE2KAtnVQdP8ZNqMNJxutDkSKPUvzLArIbjmz4jFR4eetjUg%3D%3D&crl=c](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth_type=crawler&jrnl=18448143&AN=109578151&h=goawtBT0rBh50SZEfwzmWreRm01vnZdtAdH87fE2KAtnVQdP8ZNqMNJxutDkSKPUvzLArIbjmz4jFR4eetjUg%3D%3D&crl=c)>. Acesso em: 7 nov. 2016.

SALAMA, N.K.G. *et al.* Using fish mortality data to assess reporting thresholds as a tool for detection of potential disease concerns in the Scottish farmed salmon industry. **Aquaculture** v. 450, p. 283–288 , jan. 2016.

SANTOS, Juliana Cantalino Dos. Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliana*). , 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/handle/ri/8801>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

SARKAR, M. J. A.; RASHID, M. Mamnur. Pathogenicity of the bacterial isolate *Aeromonas hydrophila* to catfishes, carps and perch. **Journal of the Bangladesh Agricultural University** v. 10, n. 1, p. 157–161 , 2012.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** v. 26, n. 5, p. 726–737 , 2003.

SHAKYA, Shubha Ratna; LABH, Shyam Narayan. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. **European Journal of Biotechnology and Bioscience** v. 2, n. 4, p. 44–47 , 2014.

SHINYOSHI, Sayaka *et al.* Naringenin suppresses *Edwardsiella tarda* infection in GAKS cells by NanA sialidase inhibition. **Fish & Shellfish Immunology** v. 61, p. 86–92 , fev. 2017.

SHUKLA, Rishi; CHERYAN, Munir. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products** v. 13, n. 3, p. 171–192 , 2001.

SIEPMANN, Juergen; PEPPAS, Nicholas A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics** Mathematical modeling of drug delivery systems:Fifty years after Takeru Higuchi's models. v. 418, n. 1, p. 6–12 , 10 out. 2011.

SILVA, Rejeana Márcia Lima. Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da Região da Baixada Ocidental Maranhense. , 2010. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/103814>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

SUN, Lina *et al.* Quantitative proteomic analysis of *Edwardsiella tarda* in response to oxytetracycline stress in biofilm. **Journal of Proteomics** v. 150, p. 141–148 , 6 jan. 2017.

SUTILI, Fernando J. *et al.* Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. **Reviews in Aquaculture** p. n/a-n/a , 1 mar. 2017.

SWIFT, S *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. **Journal of Bacteriology** PMID: 9286976PMCID: PMC179392, v. 179, n. 17, p. 5271–5281 , set. 1997.

TORRES, Alfredo G. *et al.* Protection of non-human primates against glanders with a gold nanoparticle glycoconjugate vaccine. **Vaccine** v. 33, n. 5, p. 686–692 , jan. 2015.

VALENTINI, Sóstenes Rosa; SOMMER, Willy Arno; MATIOLI, Graciette. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar** v. 11, n. 2, p. 26–31 , 2013.

VIDAL, Luiz Vítor Oliveira *et al.* Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. , 2008. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/3871>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WANG, Qiyao *et al.* Genome Sequence of the Versatile Fish Pathogen *Edwardsiella tarda* Provides Insights into its Adaptation to Broad Host Ranges and Intracellular Niches. **PLOS ONE** v. 4, n. 10, p. e7646 , 29 out. 2009.

WEINSTEIN, M. R. *et al.* Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. S. *iniae* Study Group. **The New England Journal of Medicine** PMID: 9271480, v. 337, n. 9, p. 589–594 , 28 ago. 1997.

WOLFFENBÜTTEL. *Oleo Essencial*. Disponível em: <<http://www.oleoessencial.com.br/>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

WU, Yunpeng; LUO, Yaguang; WANG, Qin. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology** v. 48, n. 2, p. 283–290 , out. 2012.

XU, De-Hai *et al.* Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. **Veterinary Parasitology** v. 184, n. 2–4, p. 101–107 , mar. 2012.

YE, Y. W. *et al.* Characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic diseased freshwater fishes in Anhui Province, China. **International Food Research Journal** v. 20, n. 3 , 2013. Disponível em: <[http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth\\_type=crawler&jrnl=19854668&AN=91511838&h=1b0%2BeL5SyxtBo3EaXV%2BWp3SpFL2a3pAA4i5QddzYoDS4eym72s2r4oeRXXmzcUdEv7h1hMeqRtNRISziSLKYw%3D%3D&crl=c](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&auth_type=crawler&jrnl=19854668&AN=91511838&h=1b0%2BeL5SyxtBo3EaXV%2BWp3SpFL2a3pAA4i5QddzYoDS4eym72s2r4oeRXXmzcUdEv7h1hMeqRtNRISziSLKYw%3D%3D&crl=c)>. Acesso em: 7 mar. 2017.

ZABKA, Martin; PAVELA, Roman; SLEZAKOVA, Ludmila. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Industrial Crops and Products** v. 30, n. 2, p. 250–253 , set. 2009.

ZHANG, Yaqiong *et al.* Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry** v. 142, p. 269–275 , jan. 2014.

ZHANG, Yong *et al.* Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. **Journal of Controlled Release** v. 206, p. 206–219 , maio 2015.

ZHENG, Z. L. *et al.* Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture** v. 292, n. 3–4, p. 214–218 , 15 jul. 2009.

ZHONG, Qixin; TIAN, Huilin; ZIVANOVIC, Svetlana. Encapsulation of Fish Oil in Solid Zein Particles by Liquid-Liquid Dispersion. **Journal of Food Processing and Preservation** v. 33, n. 2, p. 255–270 , 1 abr. 2009.

ZOU, Tao *et al.* Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. **Food Hydrocolloids** v. 27, n. 2, p. 293–300 , jun. 2012.